

**PENGARUH TERAPI ANTOSIANIN DARI UBI JALAR UNGU (*Ipomoea batatas L*) TERHADAP EKSPRESI *BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR* (BDNF) DAN *TROPOMYOSIN RECEPTOR KINASE B* (TrkB) PADA CEREBRUM TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL STROKE ISKEMIK**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

GITA HAPSARI DIANINGTYAS

125130107111040



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**PENGARUH TERAPI ANTOSIANIN DARI UBI JALAR UNGU (*Ipomoea batatas L*) TERHADAP EKSPRESI *BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR* (BDNF) DAN *TROPOMYOSIN RECEPTOR KINASE B* (TrkB) PADA CEREBRUM TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL STROKE ISKEMIK**

Oleh :

GITA HAPSARI DIANINGTYAS**125130107111040**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 10 Januari 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I**Pembimbing II**

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech
NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Gita Hapsari Dianingtyas
Nim : 125130107111040
Program Studi : Kedokteran Hewan
Penulis Skripsi berjudul : Pengaruh Terapi Antosianin dari Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L*) Terhadap Ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) dan *Tropomyosin Reseptor Kinase B* (TrkB) pada Cerebrum Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Stroke Iskemik

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 10 Januari 2018

Yang menyatakan,

(Gita Hapsari Dianingtyas)

NIM. 125130107111040

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbilamin,

Puji syukur yang sedalam-dalamnya dipanjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga Penulis dapat menyelesaikan tugas akhir skripsi dengan Judul “*Pengaruh Terapi Antosianin dari Ubi Jalar Ungu (Ipomoea batatas L) Terhadap Ekspresi Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) dan Tropomyosin Reseptor Kinase B (TrkB) pada Cerebrum Tikus (Rattus norvegicus) Model Stroke Iskemik*” ini dapat terselesaikan. Penelitian ini menggunakan payung penelitian yang di ketuai oleh dr. I Made Oka Adnyana, Sp.S dibawah bimbingan Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES.

Pada penulisan ini penulis tidak lupa mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES selaku dosen pembimbing I dan selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan atas bimbingan, kesabaran, waktu dan kasih sayang yang telah diberikan. Terima kasih atas kesempatan untuk bergabung pada payung penelitian.
2. drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, kesabaran, waktu dan kasih sayang yang telah diberikan.
3. drh. M. Arfan Lesmana, M. Sc dan drh. Yudit Oktanella, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan pengarahan dan masukan dengan kesabaran serta kasih sayang selama ujian skripsi.

4. Ayahanda H. Idjin Yasa, Ibunda Hj. Lima Hanifah, Adik Elmira dan semua keluarga besar tercinta yang selalu memberikan dorongan, semangat, dukungan, kasih sayang dan doanya.
5. Suami tercinta Mas Afdi Choiri, sang calon pendamping wisuda yang tanpa henti selalu memberikan dukungan dan semangat. Nasihat dan saran yang ia berikan adalah hal yang menolong dan membuat saya tersadar untuk berusaha lebih baik dan bekerja lebih keras dari sebelumnya, membuat saya dapat bangkit dan tidak takut lagi ketika berbagai tamparan dan teguran keras saya peroleh dan membuat saya merasa putus asa.
6. Rekan-rekan, sahabat, kakak dan adik Fakultas Kedokteran Hewan, khususnya temen-temen penelitian Stroke Iskemik (Mas Anton, Mas Farid, Pak Har, Koko, Yana, Vindy, Mbak Latifa dan Mbak Eni), keluarga kelas 2012 D, sahabat Ohana (Analya, Gusfa, Pipit, Yana dan Vindy) dan semua pihak yang telah membantu motivasi, semangat, inspirasi dan semua hal yang bermanfaat dalam penyelesaian penulisan skripsi ini.

Penulis berharap semoga semua pihak yang ikut serta penyelesaian skripsi ini diberi kelancaran dan kebaikan oleh Allah SWT dalam setiap langkahnya dan skripsi ini dapat memberikan manfaat untuk menambah pengetahuan bagi penulis dan pembaca.

Malang, Januari 2018

Penulis

**PENGARUH TERAPI ANTOSIANIN DARI UBI JALAR UNGU (*Ipomoea batatas L*) TERHADAP EKSPRESI *BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR* (BDNF) DAN *TROPOMYOSIN RECEPTOR KINASE B* (TrkB) PADA CEREBRUM TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL STROKE ISKEMIK**

ABSTRAK

Stroke iskemik merupakan penyakit yang terjadi bila pembuluh darah yang memasok darah ke otak tersumbat oleh gumpalan darah sehingga sel-sel di daerah *injury* tidak menerima oksigen dan glukosa yang dibutuhkan. Antioksidan merupakan senyawa atau molekul yang dapat mencegah terjadinya proses oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas. Antosianin pada ubi jalar ungu berfungsi sebagai antioksidan dan penangkap radikal bebas, sehingga berperan untuk mencegah terjadinya stroke. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh terapi antosianin ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L*) terhadap ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) dan ekspresi *Tropomyosin receptor kinase B* (TrkB) pada cerebrum tikus (*Rattus norvegicus*) model stroke iskemik. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus novergicus*) umur 8-12 minggu dan berat rata-rata 200 gram. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif, stroke iskemik 24 jam, stroke iskemik 72 jam, terapi stroke iskemik 24 jam dan 72 jam dengan dosis 4 mg/kg berat badan. Pengamatan ekspresi BDNF dan TrkB dilihat menggunakan metode imunohistokimia. Analisa data ekspresi BDNF dan TrkB menggunakan analisa ragam ANOVA dan uji lanjutan Tukey untuk melihat ada tidaknya perbedaan nyata. Hasil penelitian menunjukkan pemberian terapi 72 jam antosianin dari ubi jalar ungu secara signifikan ($p < 0,05$) dapat meningkatkan area ekspresi *Brain derived neurotrophic factor* (BDNF) sebesar 73,44 % dan meningkatkan area ekspresi *Tropomyosin receptor kinase B* (TrkB) sebesar 75,30%. Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan antosianin dari ubi jalar ungu dapat digunakan sebagai terapi alternatif pada tikus model stroke iskemik.

Kata kunci: Stroke iskemik, Antosianin, *Brain derived neurotrophic factor* (BDNF), *Tropomyosin receptor kinase B* (TrkB)



**THERAPY OF ANTHOCYANINS FROM PURPLE SWEET POTATO
(*Ipomoea batatas L*) ON TOWARD *BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC
FACTOR (BDNF)* AND *TROPOMYOSIN RECEPTOR KINASE B (TrkB)*
EXPRESSION OF CEREBRUM ON ISCHEMIC
STROKES RATS (*Rattus norvegicus*)**

ABSTRACT

Ischemic stroke is a disease that occurs when blood vessels that supply blood to the brain are clogged by blood clots so that cells in the injury region do not receive the required oxygen and glucose. Antioxidants are compounds or molecules that can prevent the oxidation process caused by free radicals. The anthocyanin compound in purple sweet potato serves as an antioxidant and free radical catcher, thus contributing to prevent of stroke. The aim of this study was to determine the effect of purple sweet potato anthocyanin therapy (*Ipomoea batatas L*) on expression of *Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)* and expression of *Tropomyosin receptor kinase B (TrkB)* on rat cerebrum (*Rattus norvegicus*) ischemic stroke model. The experimental animals used were white rats (*Rattus norvegicus*) aged 8-12 weeks and average weight of 200 grams. The rats were divided into 5 groups, negative control group, ischemic stroke of 24 h, ischemic stroke of 72 h, ischemic stroke therapy 24 h and 72 h with a dose of 4 mg/kg. Expressions of BDNF and TrkB were measured by immunohistochemistry method. Data of BDNF and TrkB expressions area were analyzed by using anova test followed by honestly significant difference test (HSD). Data of BDNF and TrkB expressions area were analyzed by using anova test followed by honestly significant difference test (HSD) $\alpha = 0,05$. The results showed that 72 h anthocyanin therapy from purple sweet potato significantly ($p < 0.05$) increased the expression area of Brain derived neutrophic factor (BDNF) up to 73,44% and increased expression area of Tropomyosin receptor kinase B (TrkB) up to 75,30%. In conclusions : anthocyanin from purple sweet potato can be used as an alternative therapy in ischemic stroke based on BDNF and TrkB expressions.

Keywords: Ischemic stroke, Anthocyanin, *Brain derived neurotrophic factor (BDNF)*, *Tropomyosin receptor kinase B (TrkB)*

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Batasan Masalah	6
1.4 Tujuan	7
1.5 Manfaat	7
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Susunan Saraf Pusat	8
2.1.1 Otak Besar (Cerebrum)	8
2.2 Stroke Iskemik	11
2.3 Patofisiologi Stroke Iskemik	13
2.4 Mekanisme Pembentukan Radikal Bebas Pada Stroke Iskemik	17
2.5 Potensi Antosianin sebagai Terapi Stroke Iskemik	19
2.6 <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> (BDNF)	22
2.7 <i>Tropomyosin Reseptor Kinase B</i> (TrkB)	25
2.8 Hewan Coba Tikus Model Stroke Iskemik	27
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	29
3.1 Kerangka Konseptual	29
3.2 Hipotesis Penelitian	37
BAB 4. METODE PENELITIAN	39
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	39
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	39
4.3 Rancangan Penelitian	40
4.4 Variabel Penelitian	42
4.5 Metode Penelitian	42
4.5.1 Persiapan Hewan Coba	42
4.5.2 Metode Induksi Stroke pada Hewan Coba	43
4.5.3 Metode Pemberian Antosianin	44
4.5.4 Preparasi Organ Cerebrum	44
4.5.5 Pemeriksaan Ekspresi BDNF Secara Imunohistokimia	46
4.5.6 Pemeriksaan Ekspresi <i>TrkB</i> Secara Imunohistokimia	47
4.6 Analisa Data	48



BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	49
5.1 Pengaruh Terapi terhadap Ekspresi BDNF	49
5.2 Pengaruh Terapi terhadap Ekspresi TrkB.....	57
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	64
6.1 Kesimpulan.....	64
6.2 Saran	64
DAFTAR PUSTAKA	65
LAMPIRAN	74



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Pemberian perlakuan.....	41
5.1 Ekspresi <i>Brain Derived Neurotrophic factor</i> (BDNF)	51
5.2 Ekspresi <i>Tropomyosin Kinase Receptor B</i> (TrkB).....	59



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Otak Tikus	10
2.2 Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea batatas</i> L.)	20
2.3 Struktur <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>	23
2.4 Prose Signaling dalam Persarafan	24
3.1 Kerangka konsep	29
5.1 Ekspresi <i>Brain Derived Neurotrophic factor</i> (BDNF)	50
5.2 Ekspresi <i>Tropomyosin Kinase Receptor B</i> (TrkB).....	58



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat laik etik.....	75
2. Kerangka operasional.....	76
3. Pembuatan Preparat Imunohistokimia	77
4. Pemeriksaan BDNF dengan Imunohistokimia.....	79
5. Pemeriksaan TrkB dengan Imunohistokimia.....	80
6. Data Hasil Ekspresi BDNF dan Perhitungan	81
6.1 Data Hasil Ekspresi BDNF.....	81
6.2 Perhitungan Ekspresi BDNF	81
7. Hasil Uji Statistika Ekspresi BDNF dengan Aplikasi <i>SPSS16</i>	82
7.1 Uji Normalitas	82
7.2 Uji Homogenitas.....	82
7.3 Uji One Way ANOVA	82
7.4 Uji Tukey	83
7.5 Grafik Kadar Ekspresi BDNF.....	84
8. Data Hasil Ekspresi TrkB dan Perhitungan	85
8.1 Data Hasil Ekspresi TrkB	85
8.2 Perhitungan Ekspresi TrkB.....	85
9. Hasil Uji Statistika Ekspresi TrkB dengan Aplikasi <i>SPSS 16</i>	86
9.1 Uji Normalitas	86
9.2 Uji Homogenitas.....	86
9.3 Uji One Way ANOVA	86
9.4 Uji Tukey.....	87
9.5 Grafik Kadar Ekspresi TrkB.....	88
10. Dokumentasi kegiatan.....	89



DAFTAR ISTILAH

AMPA	: <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
ATP	: <i>Adenosin trifosfat</i>
ATPase	: <i>ATP sintase</i>
BDNF	: <i>Brain derived neutropic factor</i>
Ca	: <i>Calsium</i>
cAMP	: <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CCA	: <i>Common carotid artery</i>
CO	: <i>Karbon monoksida</i>
CPE	: <i>Carboxypeptidase E</i>
CRE	: <i>cAMP response elements</i>
CREB	: <i>Ca-response element/enchancer binding</i>
DAB	: <i>Diaminobenzinidine</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECA	: <i>External carotid artery</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
eNO	: <i>Endothelial nitrat oksida</i>
ERK	: <i>Extracellular sinyal regulated kinease</i>
ETC	: <i>Electron transport chain</i>
HIF-1	: <i>Hypoxia inducible factor 1</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hidrogenperoksida</i>
IKK	: <i>ikappa B kinase</i>
IL-1β	: <i>Interleukin 1 beta</i>
IL-6	: <i>Interleukin 6</i>
iNO	: <i>Inducible nitrat oksida</i>
K ⁺	: <i>Kalium</i>
LNGFR	: <i>Low affinity nerve growth factor receptor</i>
LTP	: <i>Long term potentiation</i>
LTD	: <i>Long term depression</i>
MAPK	: <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCAO	: <i>Middle cerebral artery occlusion</i>
Mg	: <i>Magnesium</i>
mL	: <i>Mililiter</i>
Na ⁺	: <i>Natrium</i>
NaCl	: <i>Natrium klorida</i>
NF-KB	: <i>Nuclear factor kappa B</i>
NGF	: <i>Nerve growth factor</i>
NMDA	: <i>N-methyl D-aspartat</i>
nNO	: <i>Neuronal nitrat oksida</i>
NO	: <i>Nitrat oksida</i>
NOS	: <i>Nitric oksida sintetase</i>
NT	: <i>Neurotrophin</i>
O ₂	: <i>Oksigen</i>
OH	: <i>hydroxyradical</i>
PBS	: <i>Phosphate buffered saline</i>

PFA	: <i>Parafolmaldehid</i>
pH	: <i>Potential of Hydrogen</i>
PI3 Kinase	: <i>Phosphatidylinositol 3 kinase</i>
Ras	: <i>reticular activating system</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SA-HRP	: <i>Streptavidin-Horseradish Peroxidase</i>
SSP	: <i>Sistem saraf pusat</i>
TNF α	: <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TrkB	: <i>Tropomyosin receptor kinase B</i>
VGCC	: <i>voltage gated calcium channels</i>
μmol	: <i>Mikromol</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Stroke merupakan penyakit gangguan fungsional otak akut fokal maupun global akibat terhambatnya aliran darah ke otak karena perdarahan (stroke hemoragik) ataupun sumbatan (stroke iskemik) dengan gejala dan tanda sesuai bagian otak yang terkena, yang dapat sembuh sempurna, sembuh dengan cacat, atau kematian (Junaidi, 2011). Menurut Davenport dan Dennis (2000), stroke dapat dibagi menjadi stroke iskemik dan stroke hemoragik. Dari seluruh penderita stroke yang terdata, 80% merupakan jenis stroke iskemik sementara sisanya merupakan jenis stroke hemoragik. Stroke iskemik terjadi bila pembuluh darah yang memasok darah ke otak tersumbat oleh gumpalan darah sehingga sel-sel di daerah *injury* tidak menerima oksigen dan glukosa yang dibutuhkan (Zieve, 2011).

Otak merupakan organ yang sangat bergantung pada oksigen dan glukosa (Mergenthaler, 2004). Peristiwa ini menyebabkan eksitotoksisitas yang dimulai dengan berkurangnya *adenosine triphosphate* (ATP) sehingga mengakibatkan Na^+/K^+ -ATPase tidak dapat bekerja sehingga Na^+ yang juga bersama-sama dengan air akan terperangkap di dalam sel dan K^+ tidak dapat keluar, akibatnya terjadi edema sitotoksik (Liang *et al.*, 2007). Hal ini juga mengakibatkan peningkatan pelepasan glutamat yang menyebabkan meningkatnya Ca^{2+} dan kemudian meningkatkan kerusakan mitokondrial, membran sel, sitoskeleton, fragmentasi DNA, dan produksi radikal bebas sehingga pada akhirnya menyebabkan kematian sel neuron (Breton, 2012). Meningkatnya radikal bebas

juga mengakibatkan kerusakan sel endotel sawar darah otak yang menyebabkan edema vasogenik (Rosenberg, 2012). Kematian neuron mengakibatkan defisit fungsi neurologis primer (Soyuer, 2005).

Neuron otak memiliki plastisitas yaitu kemampuan untuk beradaptasi seumur hidup terhadap perubahan, mengatasi cedera, dan mengkompensasi hilangnya fungsi dalam satu bagian otak dengan bekerja lebih keras di daerah lain (Caplan, 2007). Kemampuan bertahan dan plastisitas yang dimiliki neuron diaktifkan melalui jalur sinyal ERK (*extracellular sinyal-regulated kinase*) 1/2. ERK 1/2 diaktifkan melalui *growth factor* seperti neurotropin, aktivitas neuronal, atau cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) (Cavanaugh, 2008). Neurotrophin, termasuk *nerve growth factor* (NGF) & *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) juga melindungi neuron dari proses eksitotoksitas (Nguyen *et al.*, 2010). BDNF berikatan dengan dua reseptor yang terletak pada permukaan sel. TrkB (Tyrosine kinase B) dan p75 yang merupakan *Low-affinity nerve growth factor receptor* (LNGFR) untuk BDNF (Patapotian, 2001).

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) adalah suatu neurotropin yang berperan dalam perkembangan sinaps, plastisitas sinaps, dan fungsi kognitif (Pinilla, 2008). Pada masa perkembangan otak BDNF mempunyai peranan meregulasi *cell survival* dan kematian sel yang terprogram (apoptosis). BDNF berperan pada fungsi fisiologis SSP dan perkembangan maturasi korteks dan plastisitas sinaps (McCain, 2005). BDNF merupakan neurotropin yang terbanyak pada otak dan sangat penting dalam kelangsungan hidup neuron selama perkembangan dan integrasi neuron pada otak. BDNF juga terlibat dalam

plastisitas sinaps, diferensiasi neuron dan daya tahan neuron. BDNF juga diekspresikan pada hati, otot skeletal, dan berperan pada perkembangan sistem kardiovaskular. BDNF dalam darah terutama disimpan dalam trombosit dan hanya fraksi kecil saja yang tersimpan di dalam plasma. Kadar BDNF dalam serum dapat ditentukan dengan menggunakan ELISA (Klein, 2011). BDNF terlibat dalam pertumbuhan neurit, transmisi sinaps serta sintesis neurotransmitter dengan berikatan pada *tropomyosin receptor kinase B* (TrkB) (Binder & Scharfman, 2004).

Tropomyosin receptor kinase B (TrkB) adalah suatu reseptor tirosin kinase yang dapat memfosforilasi tirosin dalam sel dan mengaktifkan sinyal intrasellular. Faktor neurotropik lain yang berhubungan dengan BDNF, adalah NGF, NT-3 (neurotrophin-3), dan NT-4 (neurotrophin-4). TrkB memediasi efek BDNF dan NT-4, TrkA mengikat NGF, dan TrkC mengikat NT-3. NT-3 dapat berikatan dengan TrkA dan TrkB, walaupun afinitasnya rendah (Patapoutian, 2001). TrkB terdiri dari 2 isoform yaitu *full-length receptor* (rantai utuh) (gp 145TrkB) dan *truncated receptor* (gp95TrkB), jenis yang *truncated* ini hanya memiliki sedikit tirosin kinase domain, BDNF berikatan terutama dengan yang rantai utuh TrkB (Sardari *et al.*, 2003).

Sebagai organ target dari stroke, sel saraf otak sangat sensitif terhadap deprivasi oksigen termasuk sel saraf pada hipokampus serebri yang berfungsi dalam proses penggabungan ingatan (NINDS, 2012). Pada hipoksia, kadar *reactive oxygen species* (ROS) akan meningkat yang menyebabkan degradasi membran lipid, enzim, dan kerusakan DNA (Albert, 2003). Selain itu, pada

keadaan hipoksia, sintesis *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) dan *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) yang bersifat neuroprotektif menurun. Kerusakan dan kematian sel saraf yang terjadi bersifat ireversibel sehingga tidak diobati dengan cara apapun. Oleh karena itu, dibutuhkan suatu agen neuroproteksi untuk melindungi sebanyak mungkin sel saraf pada otak dari kerusakan akibat hipoksia (Prass, 2003).

Antioksidan merupakan senyawa atau molekul yang dapat mencegah terjadinya proses oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas. Tubuh sebenarnya dapat menghasilkan antioksidan tapi jumlahnya tidak mencukupi untuk menetralkan radikal bebas yang jumlahnya semakin menumpuk di dalam tubuh. Oleh karena itu, tubuh memerlukan antioksidan dari luar berupa makanan atau suplemen (Rahardjo & Hernani, 2005). Antosianin merupakan senyawa flavonoid yang banyak ditemukan pada pangan nabati berwarna merah, ungu, merah gelap seperti pada beberapa buah, sayur, maupun umbi (Bridle dan Timberlake (2000); Elbe dan Schwartz (2001) yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Antosianin mempunyai kapasitas sebagai antioksidan karena reaktifitasnya yang tinggi sebagai pendonor hidrogen atau elektron, dan kemampuan radikal turunan polifenol untuk menstabilkan dan mendelokalisasi elektron yang tidak berpasangan, serta kemampuannya mengkelat ion logam (Terahara dan Matsui, 2008).

Warna ungu pada ubi jalar (*Ipomoea batatas L*) disebabkan oleh adanya zat warna alami yang disebut antosianin. Antosianin adalah kelompok pigmen yang menyebabkan warna kemerah-merahan, letaknya di dalam cairan sel yang bersifat

larut dalam air (Nollet, 2002). Komponen antosianin ubi jalar ungu adalah turunan mono atau diasetil 3-(2-glukosil) glukosil-5-glukosil peonidin dan sianidin (Suda dkk., 2003). Senyawa antosianin berfungsi sebagai antioksidan dan penangkap radikal bebas, sehingga berperan untuk mencegah terjadi penuaan, kanker, dan penyakit degeneratif. Selain itu, antosianin juga memiliki kemampuan sebagai antimutagenik dan antikarsinogenik, mencegah gangguan fungsi hati, antihipertensi, dan menurunkan kadar gula darah (Jusuf dkk., 2008). Antosianin memiliki kemampuan yang tinggi sebagai antioksidan karena kemampuannya menangkap radikal bebas dan menghambat peroksidasi lemak, penyebab utama kerusakan pada sel yang berasosiasi dengan terjadinya penuaan dan penyakit degeneratif (Cevallos-Casals dan Cisneros- Zevallos 2002; Suda *et al.* 2003). Kemampuan antioksidan ubi jalar ungu (4,6-6,4 μmol setara Trolox/g bb) lebih tinggi dibanding ubi jalar putih, kuning atau orange, seperti yang diamati pada varietas Ayamurasaki (Suda, 2003).

Pembuatan hewan model stroke iskemik dapat dilakukan dengan metode *middle cerebral artery occlusion* (MCAO). MCAO adalah metode penginduksian stroke dengan cara mengikat arteri karotis komunis, arteri yang langsung mengalirkan darah menuju otak dan pengikatan arteri karotis eksterna yang merupakan cabang dari arteri karotis komunis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian antosianin dari ekstrak ubi jalar ungu dalam meningkatkan ekspresi *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) dan ekspresi *tropomyosin receptor kinase B* (TrkB) pada cerebrum tikus (*Rattus norvegicus*) model stroke iskemik.

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Apakah pemberian antosianin dari ubi jalar ungu berpengaruh terhadap ekspresi *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) pada cerebrum tikus (*Rattus norvegicus*) model stroke iskemik?
2. Apakah pemberian antosianin dari ubi jalar ungu berpengaruh terhadap ekspresi *tropomyosin receptor kinase B* (TrkB) pada cerebrum tikus (*Rattus norvegicus*) model stroke iskemik?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar, umur 8-12 minggu dengan berat badan rata-rata 200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Biosains, Universitas Brawijaya Malang. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor 651-KEP-UB.
2. Produk jadi ubi jalar ungu yang dijadikan sebagai bahan terapi merupakan produk komersial berbentuk cair yang berasal dari spesies Bali yaitu Sweet Imo®
3. Pembuatan keadaan stroke iskemik pada hewan model tikus putih dilakukan dengan cara metode *middle cerebral artery occlusion* (MCAO)

dengan mengikat pembuluh darah arteri karotis komunis dan arteri karotis komunis eksterna.

4. Dosis terapi yang diberikan adalah 4 mg/kg BB diberikan satu kali sehari selama 3 hari secara per oral dengan volume pemberian 2 mL.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah pengamatan ekspresi BDNF dan TrkB dilakukan menggunakan metode imunohistokimia. Analisa data yang digunakan menggunakan analisa kuantitatif untuk ekspresi BDNF dan TrkB menggunakan analisa statistik ANOVA. Jika terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Tukey ($\alpha = 0,05$).

1.4 Tujuan

Berdasarkan latar belakang, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh terapi antosianin dari ubi jalar ungu terhadap ekspresi *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) pada cerebrum tikus (*Rattus norvegicus*) model stroke iskemik.
2. Mengetahui pengaruh terapi antosianin dari ubi jalar ungu terhadap ekspresi *tropomyosin receptor kinase B* (TrkB) pada cerebrum tikus (*Rattus norvegicus*) model stroke iskemik.

1.5 Manfaat

Penelitian ini bermanfaat untuk membuktikan efek terapi antosianin dari ubi jalar ungu terhadap ekspresi BDNF dan TrkB pada cerebrum hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) dan membuktikan bahwa kandungan antosianin dari ubi jalar ungu dapat digunakan sebagai antioksidan terapi stroke iskemik.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Susunan Saraf Pusat

Susunan saraf pusat merupakan organ vital yang menjamin kepekaan hewan terhadap lingkungan, sehingga mampu sadar akan diri dan lingkungan (Dyce, 2002). Menurut Banks (1993) susunan saraf pusat terdiri atas otak dan perpanjangannya, dan *medulla spinalis*. Secara umum terdapat dua daerah pada susunan saraf pusat yaitu, daerah yang beraspek putih (*substansia alba*), terdiri atas berkas-berkas serabut saraf pekat yang dibungkus oleh selubung mielin dan daerah yang beraspek abu-abu (*substansia grisea*), yang tidak atau sedikit menunjukkan struktur mielin dan banyak mengandung badan sel saraf (perikarion), sel-sel glia, dan neuropil. *Substansia grisea* yang terdapat pada *cerebrum* lazim disebut *cortex* sedangkan *substansia alba* sering disebut *medulla* (Dyce, 2002). Pada otak *cortex* terletak di luar *medulla*, kondisi sebaliknya ditemukan pada *medulla spinalis* dimana *substansia grisea* terletak dalam *substansia alba* (Banks, 1993).

2.1.1 Otak Besar (Cerebrum)

Otak adalah bagian dari susunan saraf pusat yang terletak di dalam *cavum cranii* (rongga tengorak). Menurut Dyce *et al.*, (2002) struktur anatomi otak dibagi menjadi *hindbrain* (rhombencephalon) terdiri atas *medulla oblongata*, *pons*, dan *cerebellum*; *midbrain* (mesencephalon); *forebrain* terdiri atas diencephalon, telencephalon (*cerebrum*) dan sumsum punggung (*medulla spinalis*). Berdasarkan strukturnya, fungsi otak secara umum berkaitan dengan

fungsi vital somatik, otonomik, reflek, dan suatu fungsi vegetatif agar dapat bertahan hidup dan memelihara kehidupan (Dyce, 2002).

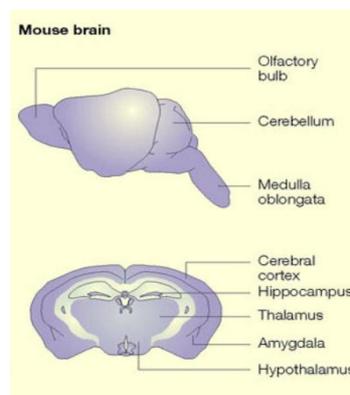
Kerusakan otak akibat iskemik mulai terjadi apabila cerebral blood flow (CBF) turun 70-80% yaitu sekitar kurang dari 50-55 ml/100 gr jaringan otak/menit, kerusakan otak yang paling berat akibat iskemik adalah hipokampus 80%, basal ganglia 79%, kemudian cerebelum 44% (Gustav *et al.*, 2003).

Cerebrum (otak besar) merupakan bagian dari otak depan (forebrain) yang terdiri atas sepasang *hemisphere* (kanan dan kiri) dan *lamina terminalis grisea*. *Hemisphere* dari *cerebrum* menutupi permukaan dorsolateral dari diencephalon. Dalam perkembangannya *hemisphere* akan semakin berkembang ke arah caudal menutupi medulla oblongata hingga dekat *cerebrum*, hal ini menjadikan *hemisphere* struktur terbesar pada otak. *Hemisphere* kanan dan kiri dihubungkan melalui garis tengah oleh substansia alba (*corpus callosum*) (Dyce *et al.*, 2002). Permukaan *cerebrum* diperluas dengan lipatan-lipatan yang terdiri atas peninggian-peninggian berbentuk bulat yang disebut *gyri*, yang dipisahkan oleh suatu alur yang disebut *sulci* (Junqueira dan Jose 2003). Menurut Dyce (2002) pada tikus *nucleus caudatus* dan *putamen* tidak dipisahkan oleh internal kapsul tetapi membentuk kompleks *caudatus-putamen*.

Menurut Rick (2003) secara histologis *cerebrum* terdiri atas dua lapisan utama yaitu, *substansia grisea* dan *substansia alba*. *Substansia grisea* pada *cerebrum* terletak pada bagian superfisial, langsung di bawah pia mater dan lazim disebut *cortex cerebri*. Kompleksitas dan luasnya fungsi *cerebrum* ditunjukkan oleh kompleksitas *cytoarchitecture* dari *cortex cerebri* (Banks, 1993). Menurut Banks

(1993) *cortex cerebri* dapat dibedakan menjadi enam lapis sel, dari permukaan luar yaitu: (1) Lapisan molekular, lapis ini terdiri atas neuropil utama yang tersusun atas dendrit apikal dari sel piramid telodendron dari serabut saraf yang masuk ke *cortex*; (2) Lapisan granular luar, sebagian besar terdiri atas neuron kecil; (3) Lapisan piramid luar, mengandung neuron berukuran medium atau besar; (4) Lapisan granular dalam, merupakan lapisan reseptif primer untuk masukan khusus ke *cortex*, terdiri atas neuron selata kecil yang membentuk lapis tebal dalam daerah *cortex* sensori (misalnya daerah visual); (5) Lapis piramid dalam, terdapat neuron piramid medium dan besar, membentuk lapis tebal pada daerah *cortex* motorik dimana rangsangan listrik membangkitkan gerakan; (6) Lapis polimorf (*multiformis*), banyak terdapat neuron berbentuk gelendang substansia alba, terdiri atas serabut saraf yang keluar dan masuk dari *cortex*.

Selain dalam *cortex* akumulasi substansia grisea juga terdapat pada substansia alba yang biasa disebut *nucleus*. *Nucleus* terdiri atas kumpulan badan sel saraf pada *substansia alba* yang mampu menerima akson dari satu atau lebih traktus pada *substansia alba*. *Nucleus* ini terdapat pada medulla dari susunan saraf pusat, seperti sumsum punggung, medulla oblongata, *cortex cerebri* dan *cortex cerebelli* (Rick, 2003).



Gambar 2.1 Struktur otak tikus (John F. Cryan & Andrew Holmes, 2005)

2.2 Stroke Iskemik

Stroke adalah gangguan fungsi saraf yang disebabkan oleh gangguan aliran darah dalam otak yang dapat timbul secara mendadak dalam beberapa detik atau secara cepat dalam beberapa jam dengan gejala atau tanda-tanda sesuai dengan daerah yang terganggu. Menurut WHO (2008): stroke adalah terjadinya gangguan fungsional otak fokal maupun global secara mendadak dan akut yang berlangsung lebih dari 24 jam akibat gangguan aliran darah otak. Menurut Neil F. Gordon (2004): stroke adalah gangguan potensial yang fatal pada suplai darah bagian otak. Tidak ada satupun bagian tubuh yang dapat bertahan bila terdapat gangguan suplai darah dalam waktu relatif lama sebab darah sangat dibutuhkan dalam kehidupan terutama oksigen pengangkut bahan makanan yang dibutuhkan pada otak dan otak adalah pusat *control system* tubuh termasuk perintah dari semua gerakan fisik. Dengan kata lain stroke merupakan manifestasi keadaan pembuluh darah *cerebral* yang tidak sehat sehingga bisa disebut juga "*cerebral arterial disease*" atau "*cerebrovascular disease*". Cedera dapat disebabkan oleh sumbatan bekuan darah, penyempitan pembuluh darah, sumbatan dan penyempitan atau pecahnya pembuluh darah, semua ini menyebabkan kurangnya pasokan darah yang memadai (Irfan, 2010).

Terdapat dua macam bentuk stroke yaitu stroke iskemik dan stroke hemoragik. Stroke iskemik merupakan 80% dari penyebab stroke, disebabkan oleh gangguan pasokan oksigen dan nutrisi ke sel-sel otak akibat bentukan trombus atau emboli. Keadaan ini dapat diperparah oleh terjadinya penurunan perfusi sistemik yang mengalir otak. Sedangkan stroke hemoragik intraserebral

dan subarakhnoid disebabkan oleh pecahnya pembuluh darah kranial (Smith *et al.*, 2012).

Stroke iskemik terjadi pada otak yang mengalami gangguan pasokan darah yang disebabkan karena penyumbatan pada pembuluh darah otak. penyumbatannya adalah plak atau timbunan lemak yang mengandung kolesterol yang ada dalam darah. Penyumbatan bisa terjadi pada pembuluh darah besar (*arteri karotis*), atau pembuluh darah sedang (*arteri serebri*) atau pembuluh darah kecil (Junaidi, 2011). Reperfusi yang terjadi kemudian dapat menyebabkan pelepasan radikal bebas yang akan menambah kematian sel. Reperfusi juga menyebabkan transformasi perdarahan dari jaringan infark yang mati (Wibowo, 2001).

Penyumbatan pembuluh darah bisa terjadi karena dinding bagian dalam pembuluh darah (*arteri*) menebal dan kasar, sehingga aliran darah tidak lancar dan tertahan. Oleh karena darah berupa cairan kental, maka ada kemungkinan akan terjadi gumpalan darah (*trombosis*), sehingga aliran darah makin lambat dan lama-lama menjadi sumbatan pembuluh darah. Akibatnya, otak mengalami kekurangan pasokan darah yang membawahi nutrisi dan oksigen yang diperlukan oleh darah. Sekitar 85 % kasus stroke disebabkan oleh stroke iskemik atau infark, stroke infark pada dasarnya terjadi akibat kurangnya aliran darah ke otak. Penurunan aliran darah yang semakin parah dapat menyebabkan kematian jaringan otak (Junaidi, 2011).

Stroke iskemik adalah gejala klinis defisit serebri fokal dengan onset yang cepat dan berlangsung lebih dari 24 jam dan cenderung menyebabkan kematian. Oklusi pembuluh darah disebabkan oleh proses trombosis atau emboli yang

menyebabkan iskemia fokal atau global. Oklusi ini mencetuskan serangkaian kaskade iskemik yang menyebabkan kematian sel neuron atau infark serebri (Adam *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2006). Aliran darah ke otak akan menurun sampai mencapai titik tertentu yang seiring dengan gejala kelainan fungsional, biokimia dan struktural dapat menyebabkan kematian sel neuron yang *irreversible* (Adam *et al.*, 2003; Bandera *et al.*, 2006).

2.3 Patofisiologi Stroke Iskemik

Iskemik otak mengakibatkan perubahan dari sel neuron otak secara bertahap, terdapat dua mekanisme patofisiologi pada iskemik otak yaitu hilang atau berkurangnya suplai oksigen dan glukosa yang terjadi sekunder akibat oklusi vaskuler, serta adanya perubahan pada metabolisme seluler akibat gangguan proses produksi energi akibat oklusi sebelumnya. Suatu percobaan pada otak tikus menunjukkan respon metabolik tertentu pada penurunan aliran darah otak yang progresif. Akibat oklusi akan terjadi gangguan hemodinamik aliran darah otak.

Keadaan hipoksia juga mengakibatkan produksi molekul oksigen tanpa pasangan elektron. Keadaan ini disebut *oxygen-free radicals*. Radikal bebas ini menyebabkan oksidasi *fatty acid* di dalam organel sel dan plasma sel yang mengakibatkan disfungsi sel (Tator, 2002). Dan bila suplai O₂ berkurang (hipoksia) proses anaerob glikolisis akan terjadi dalam pembentukan ATP dan laktat sehingga akhirnya produksi energi menjadi kecil dan terjadi penumpukan asam laktat, baik di dalam sel saraf maupun di luar sel saraf (*lactic acidosis*). Akibatnya fungsi metabolisme sel saraf terganggu (Salton, 2003).

Berbeda dengan organ tubuh lainnya otak hanya menggunakan glukosa sebagai sumber energi utama dari otak. Dengan adanya oksigen, glukosa dirubah oleh mitokondria menjadi ATP. Otak normal membutuhkan 500cc O₂ dan 75-100 mg glukosa setiap menitnya (total sekitar 125 mg glukosa per harinya). ATP digunakan oleh sel otak untuk semua proses yang membutuhkan energi. Energi yang berasal dari ATP digunakan untuk membuat dan mempertahankan komponen dan proses sel serta memacu fungsi motor, kognitif dan daya ingat. Suplai produksi ATP secara konstan penting untuk mempertahankan integritas neuron mayoritas kation Ca²⁺, Na⁺ ekstraseluler dan K⁺ intraseluler (Pereira *et al.*, 2000).

Pada stroke aliran darah terganggu sehingga terjadi iskemik, yang menghambat penyediaan glukosa, oksigen dan bahan makanan lain ke sel otak. Hal tersebut akan menghambat mitokondria dalam menghasilkan ATP, sehingga tidak saja terjadi gangguan fungsi seluler, tetapi juga aktivasi berbagai proses toksik. Bila hal ini tidak dikoreksi pada waktunya, iskemik dapat menyebabkan kematian sel (Pereira *et al.*, 2000). ATP sangat diperlukan dalam menjaga keseimbangan ionik dalam sitoplasma neuron dengan menyediakan energi pada pertukaran ion melalui Na⁺-K⁺-ATPase. Pada stroke iskemik terdapat kekurangan oksigen dan glukosa dalam sel, sehingga produksi ATP dan Na-K-ATPase berkurang, penurunan fungsi Na⁺-K⁺-ATPase akan menyebabkan kenaikan konsentrasi Na⁺ dalam sel meningkat sehingga timbul pembengkakan sel, serta pelepasan glutamat karena depolarisasi membran sel. Depolarisasi ini menyebabkan rangsangan pada berbagai reseptor glutamat dan masuknya ion

bermuatan positif serta secara tak langsung merangsang pembukaan *voltage-gated calcium-channels* (Pereira *et al.*, 2000).

Radikal bebas adalah satuan molekul atau atom yang mempunyai elektron tidak berpasangan dilingkaran terluarnya. Adanya elektron bebas membuat radikal bebas ini menjadi sangat reaktif. Suatu radikal bebas mudah bereaksi dengan molekul/ atom lain non radikal bebas, untuk membentuk radikal bebas baru (Bourassa, 2006) Oksigen dapat menghilangkan elektron dari molekul lain dalam sel dan membentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS). Substansi ini merupakan faktor yang berpengaruh dalam berbagai penyakit. ROS diatur oleh sistem pertahanan yang bergantung pada aktivitas enzim dan non enzim. Ketidakseimbangan antara ROS dan sistem pertahanan tubuh dikenal dengan stress oksidatif (Anggraini, 2007).

Menurut Indriyanti (2005), selain memproduksi energi mitokondria juga merupakan penghasil utama ROS yang berasal dari respirasi mitokondria adalah terbentuknya electron yang tidak berpasangan (radikal bebas). Interaksi antara elektron yang tidak berpasangan dengan oksigen (O_2) akan menghasilkan radikal peroksida (O_2^+) yang merupakan ROS yang sangat reaktif. ROS bereaksi cepat dengan DNA, protein, dan lipid sehingga menyebabkan kerusakan oksidatif.

Ca mengaktifkan berbagai proses yang menyebabkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), termasuk pelepasan asam arakhidonat, pembentukan NO, degradasi adenosine, kebocoran *electron transport chain* (ETC), Ca juga mengaktifkan fosfolipase termasuk fosfolipase A2 (PLA2) yang memecah fosfolipid. Asam arakhidonat selanjutnya akan dimetabolisir oleh *cyclo-oxygenase*

dan *lipo-oxygenase* menjadi prostaglandin dan leukotriene. Pada reaksi yang akhir ini akan terbentuk *anion superoxide*, suatu ROS.

Mitokondria merupakan sumber utama dari ROS selama dan segera setelah serangan stroke. Pada keadaan *Ca overload* dan atau manfaat dari ETC berkurang, maka elektron cenderung bocor dari ETC juga membentuk *anion superoxide*. Enzim SOD akan mengkatalisis H_2O_2 yang sebagian besar akan diubah menjadi H_2O oleh katalase. Namun apabila terdapat ion Fe, H_2O_2 akan membentuk *hydroxyl radical* (OH), suatu ROS yang lain. Pada keadaan biasa, berbagai darah di otak juga mengandung banyak Fe yang mempermudah pembentukan (OH) ini (,).

Mitokondria mempunyai peran pula dalam mempertahankan keseimbangan Ca^{2+} yaitu dengan melakukan uptake dari Ca^{2+} saat terjadi pemasukan Ca^{2+} yang berlebihan ke ruang intraseluler (Csordas, 2000; Mattson *et al.*, 2000). Interaksi antara sitosol (ER) dan mitokondria secara *bidirectional* baik dalam sel neuron maupun sel glia mempunyai peran penting dalam menstabilkan kadar ion Ca^{2+} agar tidak bersifat toksik terhadap sel. Ca^{2+} itu sendiri mempunyai fungsi penting dalam mitokondria diantaranya mengaktifkan enzim dehydrogenase dalam siklus tricarboxylic acid serta pembentukan ATP (Simpson *et al.*, 1998).

Saat iskemik akan terjadi metabolik stress dan Ca^{2+} akan memicu ekspresi beberapa gen baik yang bersifat apoptosis maupun yang bersifat survival, gen-gen yang menyebabkan apoptosis misalnya c-jun, c-fos, FosB, jun-B, jun-D dan lain-lain (McGahan *et al.*, 2004), sedangkan untuk survival selain BDNF juga CREB, NF-kB (Akins *et al.*, 2000).

2.4 Mekanisme Pembentukan Radikal Bebas Pada Stroke Iskemik

Berhentinya *supply* oksigen selama 4-5 menit dapat mengakibatkan kerusakan otak yang irreversible. Saat reperfusi terjadi peningkatan Ca^{2+} yang terus menerus, yang akan menyebabkan terjadinya serentetan peristiwa yang nantinya meningkatkan penumpukan radikal bebas (Juurlink *et al.*, 2001).

ROS terdiri dari radikal bebas dan non radikal ROS. Radikal bebas adalah senyawa kimia yang berkemampuan independen, terdiri dari satu atau lebih electron yang tidak berpasangan. Radikal bebas bisa memberikan elektron yang tidak berpasangan ke non radikal sebaiknya ia dapat mengambil elektron dari senyawa non radikal. Superoksida anion terbentuk saat metabolisme anaerob dan ini akan dikonversikan oleh enzim superoksida dismutase menjadi hydrogen peroksida yang merupakan bentuk yang berbahaya karena dapat merangsang serentetan reaksi sehingga menghasilkan lebih banyak ROS apabila berikatan dengan Fe^{2+} maupun Cu^{2+} (Reaksi Fenton dan Haber-Weiss).

Jenis radikal bebas lain yang dapat ditemukan pada iskemik akibat CO adalah F_2 , isoprostane dan protein sulhydryl. Perbaikan *outcome* setelah CO ditentukan oleh keseimbangan antara cadangan antioksidan yang dimiliki dan besarnya kadar ROS yang terbentuk (Bayir *et al.*, 2002).

Sel dapat menghasilkan NO berasal dari oksidasi arginin oleh nitrik oksida sintetase, telah dikenal 3 jenis NO yaitu endotelial NO (eNO), *inducible* NO (iNO), dan neuronal NO (nNO) (Alderton *et al.*, 2001). NO merupakan radikal bebas diatomik yang mempunyai daya difusi yang sangat tinggi, jalur NO/cGMP mempunyai peran penting dalam mengatur tekanan darah, platelet agregasi,

relaksasi otot polos serta neurotransmisi sentral dan perifer. NO juga dapat menghambat enzim mitokondria sitokrom C oksidase dengan mengikatnya melalui kompetitif dengan oksigen (Xu W *et al.*, 2005). Enzim yang berperan untuk pembentukan NO adalah nitric oksida sintetase (NOS), terdiri dari 2 bentuk yaitu *constitutive* NOS (cNOS) dan *inducible* NOS (iNOS). cNOS terutama dimodulasikan oleh Ca^{2+} , sedangkan iNOS oleh aktivitas sitokin dan bacterial endotoksin yaitu lipopolisakarida (Klabunde, 2004).

Dalam keadaan iskemik maka iNOS merupakan penghasil NO yang terbanyak serta merangsang keluarnya beberapa sitokin sebagai reaksi inflamasi seperti TNF α , IL-1 β , IL-6 yang mengakibatkan apoptosis, iNOS juga merangsang astrosit dan mikroglia untuk menghasilkan NO. Jadi pada iskemia diperlukan penghambatan melalui beberapa jalur seperti antioksidan, antiinflamasi, proteksi endothelial yang dapat menghambat pelepasan NO lebih banyak dari eNOS (Vaughan, 2001). Saat iskemia maka NO dapat berinteraksi dengan Ras/MAPK/ERK serta PI3-Kinase/Akt yang merupakan jalur untuk *survival* yaitu dengan menginduksi gen CREB yang nantinya dapat memodulasi BDNF serta pengaktifan IKK yang akan menghasilkan NF-kB, serta penghambatan kaskade apoptosis (Huang., 2004).

Apabila terjadi kerusakan pada korteks serebri akibat cedera kepala ataupun stroke, ini akan mengakibatkan disfungsi organ yang diatur oleh korteks tersebut misalnya kelumpuhan, setelah beberapa hari atau minggu fungsi organ tersebut mulai kembali membaik, kemampuan otak untuk memperbaiki fungsi tersebut

bukan karena menggantikan jaringan otak yang rusak akan tetapi karena resolusi dari inflamasi dan edema di sekitar cedera serta *rewiring* dari sirkuit di otak.

Plastisitas merupakan fungsi normal dari otak dewasa berupa modifikasi dari kekuatan sinaps seperti terlihat fungsi BDNF pada LTP yang sangat penting untuk fungsi memori. Plastisitas terutama terjadi pada jaringan korteks akan tetapi daerah subkortikal dapat pula menunjukkan fungsi tersebut berupa *rearrangement* dari input dan output pada dari korteks pada level subkortikal, demikian juga jaringan hipokampus. Mekanisme ini merupakan mekanisme yang aktif yang mengikat sertakan NT seperti *Nerve Growth Factor* (NGF) dan BDNF, NO, *cadherins*, *integrins* dan molekul yang lain (McAllister *et al.*, 2000, Rohrbough *et al.*, 2000) serta NT-R yaitu *tropomyosin reseptor kinase* (Trk) (Sardari *et al.*, 2003).

2.5 Potensi Antosianin dari Ubi Jalar Ungu Sebagai Terapi Stroke Iskemik

Ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L. var. *Ayamurasaki*) merupakan salah satu jenis ubi jalar yang semua bagian umbinya berwarna ungu dan pertama kali dikembangkan di Jepang. Varietas introduksi tersebut mempunyai banyak kelebihan dibandingkan ubi jalar lokal seperti *Gunung Kawi* dan *Samarinda* baik dari aspek produktivitas (varietas introduksi 20-25 ton/ha, sedang varietas lokal 15-20 ton/ha), maupun warna ungunya yang lebih pekat dan merata keseluruhan bagian umbinya mulai dari kulit sampai dagingnya. Dengan demikian ubi jalar *Ayamurasaki* sangat potensial untuk dijadikan bahan baku antosianin (Widowati, 1994). Klasifikasi ubi jalar ungu menurut Juanda dan Cahyono (2000) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Convolvulales
Family : Convolvulaceae
Genus : Ipomoea
Spesies : *Ipomoea batatas* L.



Gambar 2.2 Ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) (Rosidah, 2010)

Ubi jalar ungu merupakan sumber energi karena mengandung karbohidrat yang tinggi. Ubi jalar ungu juga mengandung beberapa vitamin seperti vitamin A, vitamin C, dan vitamin B6. Kandungan mineral dari ubi jalar ungu diantaranya yaitu fosfor, kalsium, mangan, dan zat besi. Selain itu ubi jalar ungu juga mengandung antosianin tinggi yang menyebabkannya berwarna ungu. Kandungan antosianin dari ubi jalar ungu berkisar ± 519 mg/100 g berat basahnya (Apriliyanti, 2010).

Warna ungu pada ubi jalar disebabkan oleh adanya zat warna alami yang disebut antosianin. Antosianin adalah kelompok pigmen yang menyebabkan warna kemerah-merahan, letaknya di dalam cairan sel yang bersifat larut dalam air (Nollet, 2002). Komponen antosianin ubi jalar ungu adalah turunan mono atau diasetil 3-(2-glukosil) glukosil-5-glukosil peonidin dan sianidin (Suda dkk., 2003). Senyawa antosianin berfungsi sebagai antioksidan dan penangkap radikal

bebas, sehingga berperan untuk mencegah terjadi penuaan, kanker, dan penyakit degeneratif. Selain itu, antosianin juga memiliki kemampuan sebagai antimutagenik dan antikarsinogenik, mencegah gangguan fungsi hati, antihipertensi, menurunkan kadar gula darah dan stroke (Jusuf *et al.*, 2008).

Antosianin merupakan senyawa flavonoid yang banyak ditemukan pada pangan nabati berwarna merah, ungu, merah gelap seperti pada beberapa buah, sayur, maupun umbi (Schwartz *et al.*, 2007), yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Antosianin mempunyai kapasitas sebagai antioksidan karena reaktifitasnya yang tinggi sebagai pendonor hidrogen atau elektron, dan kemampuan radikal turunan polifenol untuk menstabilkan dan mendelokalisasi elektron yang tidak berpasangan, serta kemampuannya mengelat ion logam (terminasi reaksi Fenton) (Terahara dan Matsui, 2008).

Ubi jalar ungu mengendalikan produksi hormon melatonin yang dihasilkan kelenjar pineal di dalam otak. Melatonin merupakan antioksidan yang menjaga kesehatan sel dan sistem saraf otak, sekaligus memperbaiki jika ada kerusakan. Asupan vitamin A yang kurang akan menghambat produksi melatonin dan menurunkan fungsi saraf otak (Kumalaningsih, 2006).

Antioksidan merupakan senyawa atau molekul yang dapat mencegah terjadinya proses oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas. Tubuh manusia sebenarnya dapat menghasilkan antioksidan tapi jumlahnya tidak mencukupi untuk menetralkan radikal bebas yang jumlahnya semakin menumpuk di dalam tubuh. Oleh karena itu, tubuh memerlukan antioksidan dari luar berupa makanan atau suplemen (Yanita 2011). Menurut Kumalaningsih (2006) antioksidan adalah

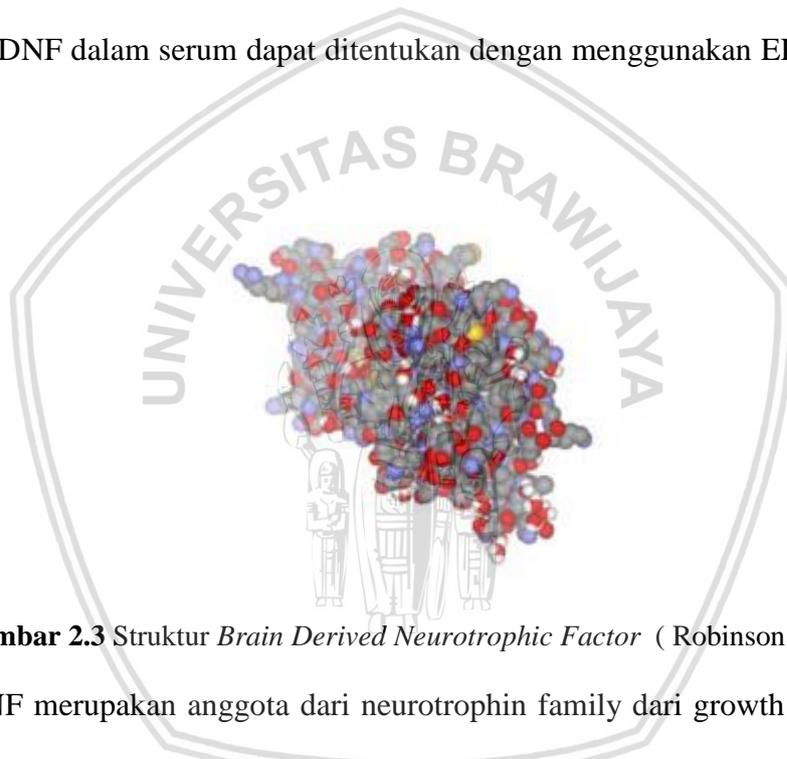
senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas. Salah satu bahan alam yang mengandung antioksidan yaitu ubi jalar (Wholfe, 2003).

2.6 *Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)*

Pertumbuhan dan differensial dari sel neuron diatur oleh protein yang disebut neurotrophin (NT). Jadi NT adalah suatu kumpulan *neuropeptide* atau ada pula yang menyebut sebagai neuromodulator, yang bekerja secara *endogenous signaling*, mengatur *long-term survival* dan differensiasi spesifik dari neuron selama perkembangan dan mempertahankan viabilitas dari sel neuron serta neuroplastisitas saat dewasa. Selain itu NT dalam sirkuitnya dapat mengontrol keseimbangan enersi dalam otak terutama pada SSP dan perifer (Salton, 2003). Untuk saraf perifer NT juga penting untuk poliferasi, migrasi sel schwan dan mielinisasi (Chan *et al.*, 2001). NT yang pertama kali ditemukan adalah NGF yang berasal dari implantasi tumor sarcoma dari tikus ke medulla spinalis (Levi-Montalcini, 2002), kemudian BDNF yakni dengan mengisolasi faktor *survival* neuron dari otak babi. BDNF merupakan protein homolog dengan NGF (Levi-Montalcini, 2002).

BDNF merupakan suatu protein dasar yang berukuran 27 kDa yang berikatan secara nonkovalen terhadap subunit yang berukuran 13,5 kDa, yang berikatan dengan *nerve growth factor*. BDNF dihasilkan oleh sel glia pada susunan saraf pusat (Robinson *et al.*, 2000).

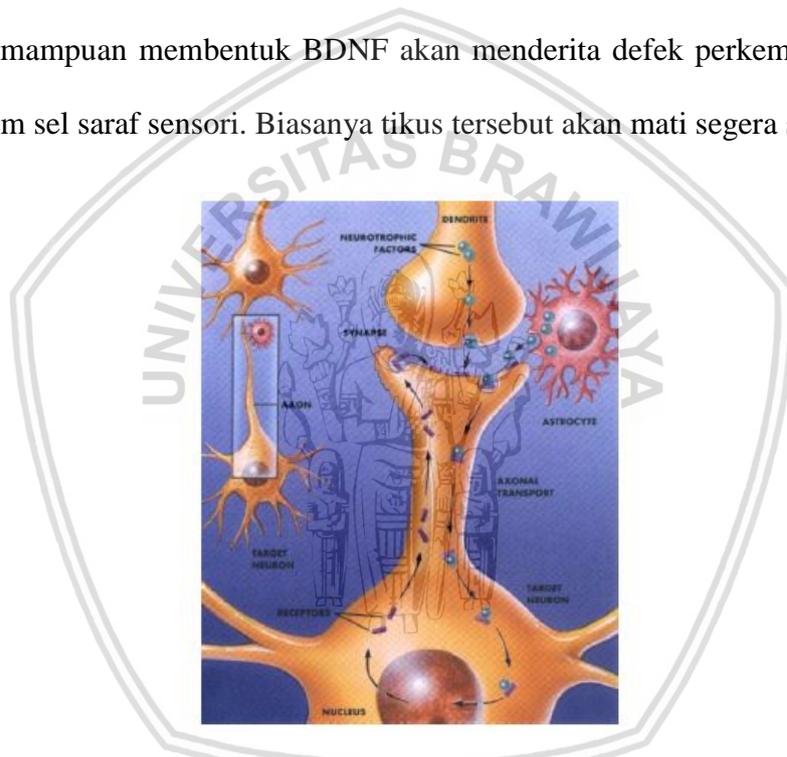
BDNF merupakan neurotrophin yang terbanyak pada otak dan sangat penting dalam kelangsungan hidup neuron selama perkembangan dan integrasi neuron pada otak dewasa. BDNF juga terlibat dalam plastisitas sinaps, diferensiasi neuron. BDNF juga diekspresikan pada hati, otot skeletal, dan berperan pada perkembangan sistem kardiovaskular. BDNF dalam darah terutama disimpan dalam trombosit dan hanya fraksi kecil saja yang tersimpan di dalam plasma. Kadar BDNF dalam serum dapat ditentukan dengan menggunakan ELISA (Klein, 2011).



Gambar 2.3 Struktur *Brain Derived Neurotrophic Factor* (Robinson *et al.*, 2000)

BDNF merupakan anggota dari neurotrophin family dari growth factor, yang berhubungan dengan NGF. Dalam otak, BDNF aktif pada *hippocampus*, *cortex*, dan *basal forebrain* yaitu daerah vital untuk memori, belajar serta untuk berpikir lebih tinggi. BDNF sendiri penting untuk penyimpanan ingatan jangka panjang (Bekinschtein *et al.*, 2008). BDNF sebenarnya terdapat dalam berbagai jaringan dan sel, yaitu pada retina, CNS, neuron motor, ginjal, dan prostat, serta saliva manusia. BDNF paling tinggi pada *hippocampus* dan korteks serebral (Bekinschtein *et al.*, 2008).

BDNF merupakan faktor neurotropik spesifik kedua setelah NGF. Walaupun mayoritas utama dari neuron otak mammalian dibentuk prenatal, tetapi sebagian otak dewasa menyimpan kemampuan untuk menumbuhkan neuron baru dari *stem cells neural* dimana proses ini dikenal sebagai neurogenesis. Neurotrophin merupakan senyawa kimia yang merangsang dan mengontrol neurogenesis. BDNF merupakan salah satu dari *neurotrophin* yang aktif. Tikus yang baru lahir tanpa kemampuan membentuk BDNF akan menderita defek perkembangan otak dan sistem sel saraf sensoris. Biasanya tikus tersebut akan mati segera setelah lahir.



Gambar 2.4 Proses Signaling dalam Persarafan (Choi *et al.*, 2009)

Gambar 2.4 menunjukkan perkembangan dalam otak. Faktor neurotrofik dilepas oleh neuron atau sel pendukung, seperti astrosit dan berikatan dengan reseptor neuron yang di dekatnya. Ikatan ini menghasilkan sinyal yang dikirim ke nukleus dari neuron yang menerimanya. Hasilnya yaitu terjadi peningkatan sintesa protein yang berhubungan dengan *survival* dan fungsi neuron. (Choi *et al.*, 2009).

BDNF berikatan dengan dua reseptor yang terletak pada permukaan sel. TrkB (“Tyrosine kinase B”) dan p75 yang merupakan *Low-affinity nerve growth factor receptor* (LNGFR) untuk BDNF. BDNF juga dapat memodulasi aktivitas dari berbagai reseptor neurotransmitter, termasuk *alpha-7 nicotine receptor*. TrkB adalah suatu reseptor tyrosine kinase yang dapat memfosforilasi tyrosine dalam sel dan mengaktifkan sinyal intraselular. Faktor neurotropik lain yang berhubungan dengan BDNF adalah NGF, NT-3 (neurotrophin-3), dan NT-4 (neurotrophin-4). TrkB memediasi efek BDNF dan NT-4, TrkA mengikat NGF, dan TrkC mengikat NT-3. NT-3 dapat berikatan dengan TrkA dan TrkB, walaupun afinitasnya rendah (Patapoutian, 2001).

Reseptor BDNF yang lain, yaitu p75 memiliki peran yang kini masih kurang jelas. Beberapa penelitian memperlihatkan bahwa p75NTR berfungsi sebagai suatu *sink* untuk neurotrophin. Sel-sel yang mengekspresi p75NTR dan reseptor Trk mempunyai aktivitas yang lebih besar karena mempunyai mikrokoncentrasi neurotrophin yang lebih besar. P75NTR dapat memicu apoptosis apabila sel tersebut tidak memiliki reseptor Trk. BDNF diproduksi di *endoplasmic reticulum* dan diekspresikan melalui *dense-core vesicle* setelah berikatan dengan reseptor *carboxypeptidase E* (CPE). Kerusakan ikatan ini dapat menyebabkan hilangnya kemampuan sel untuk mengekspresikan BDNF melalui *dense-core vesicle* (Patapoutian, 2001).

2.7 Tropomyosin Reseptor Kinase B (TrKB)

NT terikat dengan 2 protein reseptor transmembran yaitu Trk dan p75 yang termasuk dalam family TNF-R. Ada 3 gen Trk yang teridentifikasi pada mamalia

yaitu terdiri Trk-A, Trk-B, dan Trk-C. NGF akan melekat pada Trk-A, sedangkan BDNF dan NT-4/5 akan melekat pada Trk-B, sedangkan NT-3 melekat pada Trk-C, akan tetapi pelekatan ini tidak absolut NT-3 bisa melekat pada Trk-A atau B (Bibel *et al.*, 2000). TrkB memiliki deretan asam amino (aa) rantai pendek di jukstamembran domains yang penting bagi jenis NT tertentu untuk mengaktifkan reseptor tersebut, apabila TrkB tidak memiliki rantai aa tersebut maka reseptor tersebut hanya dapat diaktifkan oleh BDNF tidak oleh NT 4/5 (Strohmaier *et al.*, 2004).

Trk reseptor adalah glikoprotein transmembran dengan berat atom -140 KD, mengandung banyak leucine dan dua *cysteine clusters* (C1, C2), dan dua *immunoglobulin-like domain*. Signalling BDNF melalui TrkB dimana BDNF dan TrkB dapat ditemukan baik di neuron maupun pada astrosit, hanya saja pada astrosit baru teraktivasi bila terjadi proses depolarisasi atau adanya Ca^{2+} (Araque *et al.*, 2000). TrkB terdiri dari 2 isoform yaitu *full-length receptor* (rantai utuh) (gp145trkB) dan *truncated receptor* (gp95trkB), jenis yang *truncated* ini hanya memiliki sedikit tirosin kinase domain, BDNF berikatan terutama dengan yang rantai utuh TrkB (Sardari *et al.*, 2003). TrkB yang rantai utuh hanya terdapat di neuron sedangkan bentuk *truncated* terutama ditemukan pada sel non-neuronal seperti astrosit dan oligodendrosit. Fungsi yang *truncated* masih belum diketahui secara jelas mungkin bertugas sebagai penjemput NT dari celah ekstraseluler untuk dibawa ke dalam sel (Levitan, 2002).

Aktivitas neuronal melalui peningkatan Ca^{2+} di ruang intraseluler dapat memodulasi BDNF/TrkB melalui beberapa mekanisme yaitu sintesis BDNF yang

dirangsang oleh depolarisasi neuron melalui Ca^{2+} dependent regulatori element di BDNF promoter (Tabuchi *et al.*, 2002, Gartner *et al.*, 2002). Ca^{2+} merangsang perjalanan TrkB ke plasma membrane sel neuron (Du *et al.*, 2003), dan depolarisasi juga mengakibatkan ekspresi dari TrkB mRNA di neuron (Kingsbury *et al.*, 2003).

2.8 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Stroke Iskemik

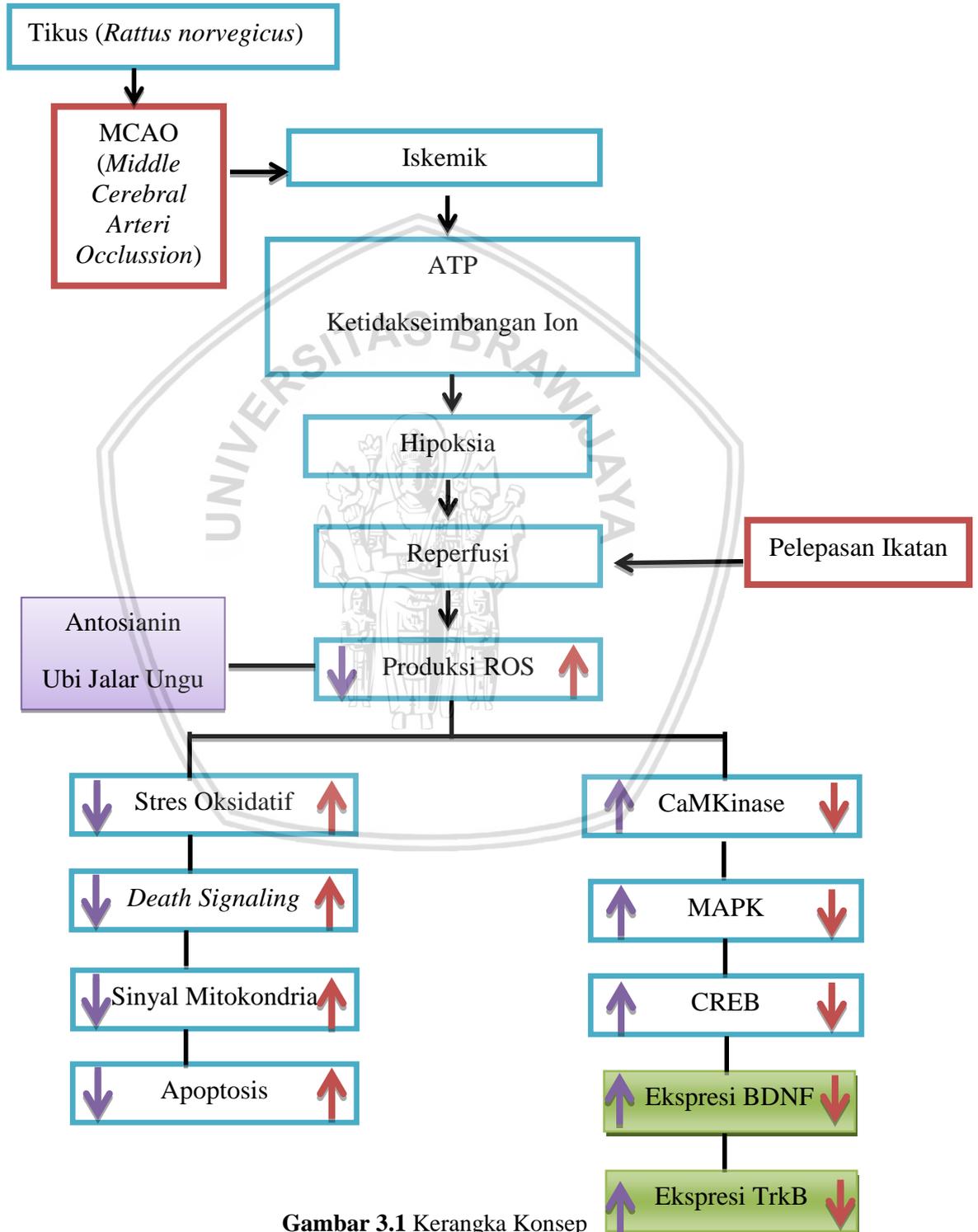
Rattus norvegicus merupakan salah satu hewan laboratorium yang sering digunakan sebagai hewan coba. Ciri *Rattus norvegicus* adalah bertubuh relatif panjang dengan kepala lebih sempit, telinga tikus ini tebal dan pendek dengan rambut tubuh halus berwarna putih. *Rattus norvegicus* memiliki mata berwarna merah. Ciri yang terlihat berbeda dengan tikus lain adalah ekornya yang panjang ± 205 mm, panjang tubuh total ± 440 mm. Tikus ini mampu bertahan hidup antara 4 - 5 tahun. Hewan ini memiliki waktu hidup 2,5 tahun sampai 3,5 tahun, berat badan umum tikus jantan 250-500 gram dan betina 225-325 gram, denyut jantung 330-480 kali per menit, frekuensi respirasi 85 kali per menit dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari (Potter, 2007). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) ini memiliki klasifikasi sebagai berikut (Armitage, 2004) :

- Kingdom : Animalia
- Sub filum : Vertebrata
- Klass : Mammalia
- Ordo : Rodentia
- Sub Ordo : Sciurognathi
- Familia : Muridae
- Genus : *Rattus*
- Spesies : *Rattus norvegicus* strain Wistar

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) ini digunakan sebagai hewan coba karena memiliki keunggulan seperti kadar asam amino dan system fisiologisnya yang hampir sama dengan manusia sehingga menciptakan kondisi yang sesuai dengan tubuh manusia (Miller *et al.*, 2010). Pada tikus yang mendapat perlakuan iskemik diinduksi oleh *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) pada bagian *common carotid artery* (CCA) dan *external carotid artery* (ECA) (Liu, 2011). Setelah 3 jam MCAO, tikus direperfusi dan sutura oklusif dilepas kemudian tikus ditempatkan dalam lingkungan temperatur yang terkendali dengan suhu lingkungan yang dibutuhkan yaitu 20-28 °C dan kelembaban 50%. Hewan ini adalah jenis omnivore dan sering digunakan dalam penelitian pengaruh pakan. Kebutuhan minum sebanyak 10-12 mL/100g BB per hari dan pakan sebanyak 10 g/ 100g BB per hari. Jumlah darah yang bias diambil sebesar 64 mL/kg (*Institutional Aimal Care and Use Comitte*, 2014).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan :

	= efek pasca MCAO		= MCAO
	= efek terapi antosianin		= antosianin
	= variabel yang diteliti		

Oklusi yang dilakukan pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) model stroke iskemik dengan metode *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) yaitu dengan pengikatan pembuluh darah arteri karotis komunis dan arteri karotis komunis externa menyebabkan terhambatnya peredaran darah ke otak. Otak merupakan organ yang sangat bergantung terhadap suplai oksigen dan glukosa secara terus menerus dimana kebutuhan otak akan kedua molekul ini sebanyak 20% dari total kebutuhan tubuh secara keseluruhan.

Dalam keadaan normal, kadar Ca^{2+} ekstrasel 10.000 lebih tinggi daripada intrasel sedangkan iskemik yang diakibatkan oklusi mengakibatkan penurunan ATP dan gangguan homeostasis ion. Ca^{2+} melalui VGCC (*voltage gated calcium channels*) adalah melewati *eletrone gradient*, yaitu pertukaran Na^{2+} - Ca^{2+} . Apabila konsentrasi Ca^{2+} dalam ruang intraseluler sudah cukup tinggi maka *gate* akan menutup, sehingga tidak ada pertukaran lagi. Akan tetapi pada saat iskemik terjadi penurunan asupan dari ATP yang mengakibatkan depolarisasi membran sel. Selain itu ada pelepasan Glu (glutamat) dari post sinaptik neuron yang mengakibatkan perangsangan dari ionotropik GluR yaitu AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) kemudian NMDA (*N-methyl D-*

aspartat) yang akhirnya berakibat semakin banyak Ca^{2+} masuk ke ruang intraseluler. Pada keadaan iskemik pelepasan Glu terutama berasal dari simpanan intraseluler dari sel neuron, karena neuron merupakan sel dengan neurotransmitter Glu paling tinggi konsentrasinya (Danbolt, 2001). Pemasukan Ca^{2+} melalui VGCC biasanya dapat ditoleransi oleh sel neuron, namun Ca^{2+} influx yang berlebihan terutama akibat aktivasi NMDA akan bersifat toksik terhadap sel (Hansson *et al.*, 2000).

Pelepasan Glu di neuron terutama disebabkan oleh membran depolarisasi yang diinduksi oleh penurunan ATP, tidak adanya ATP mengakibatkan gagalnya pompa sodium sehingga Na^+ banyak masuk ke ruang intrasel yang kemudian akan merangsang AMPA GluR. Apabila membran post sinaptik telah mengalami depolarisasi maka sumbat Mg^{2+} di NMDA GluR akan dilepas sehingga Glu dapat melekat pada reseptor tersebut dan ion Ca^{2+} dapat lewat, mengakibatkan semakin banyak Ca^{2+} masuk ke dalam ruang intrasel (Centonze *et al.*, 2001).

Peningkatan Ca^{2+} intrasel ini akan merangsang reseptor AMPA, yang akhirnya akan melepaskan sumbat magnesium dari NMDA, sehingga NMDA dapat dilalui oleh Ca^{2+} serta membuka VGCC. Hal ini mengakibatkan pemasukan Ca^{2+} ke dalam sel semakin banyak. Dalam keadaan tertentu VGCC dapat pula terbuka oleh rangsangan ROS. Misalnya H_2O_2 (Hansson *et al.*, 2000).

Tiap daerah di otak mempunyai kepekaan berbeda-beda terhadap iskemia. Hipokampus, misalnya adalah daerah yang sangat padat reseptor NMDA, sehingga mempunyai tingkat resiko tinggi mengalami kerusakan saat iskemik maupun reperfusi berupa Ca^{2+} *overload* dan kemudian terjadi Glu toksisitas

(Hansson *et al.*, 2000). Akan tetapi dapat pula terjadi *delayed neuronal death* akibat terlambatnya reperfusi atau adanya gangguan ekspresi DNA mitokondria yang mengakibatkan terjadi gangguan produksi enersi di neuron (Hansson *et al.*, 2000). Pada hipoksia, kadar ROS akan meningkat yang menyebabkan degradasi membrane lipid, enzim, dan kerusakan DNA. Selain itu, pada keadaan hipoksia, sintesis *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) dan *brain derived neutrophic factor* (BDNF) yang bersifat neuroprotektif menurun.

Saat dilakukan reperfusi terjadi peningkatan Ca^{2+} yang terus menerus, yang akan menyebabkan terjadinya serentetan peristiwa yang nantinya mengakibatkan penumpukan radikal bebas, adapun rangkaian peristiwa itu adalah merangsang Ca^{2+} *dependent hydrolase* seperti protease dan lipase contohnya fosfolipase; selain itu Ca^{2+} influx ini juga mengakibatkan peningkatan radikal bebas di mitokondria; Ca^{2+} influx juga akan mengkonversikan xantin dehydrogenase menjadi xantin oksidase sehingga mengakibatkan penumpukan radikal bebas.

Reactive Oxygen Species (ROS) terdiri dari radikal bebas dan non radikal ROS. Radikal bebas adalah senyawa kimia yang berkemampuan independen, terdiri dari satu atau lebih electron yang tidak berpasangan. *Nitrik oksida sintetase* (NOS) terdiri dari 3 isoform yaitu neuronal, endotelial dan *inducible* (nNOS, eNOS dan iNOS). Sel neuron mengandung nNOS dan eNOS diaktivasi oleh Ca^{2+} influx, saat Glu berikatan dengan NMDA penting untuk plastisitas sinaptik yaitu pada *proses long term potentiation* (LTP) dan *long term depression* (LTD). NO dapat disebut sebagai retrograde transmitter yang memberikan *feedback* ke pre sinaptik (Huang, 2004).

Pada saat permulaan iskemik baik sel neuron maupun sel endotel akan menghasilkan NO, meskipun eNO diketahui mempunyai efek positif yaitu dapat memperbaiki aliran darah akan tetapi bila overproduksi dari eNO justru akan mengakibatkan kerusakan jaringan karena dapat merubah menjadi iNO (Gursoy-Ozdemir *et al.*, 2000).

Aktivasi reseptor glutamat mengakibatkan masuknya Ca^{2+} ke dalam sel, sehingga merangsang terbentuknya ROS. ROS telah terbukti menyebabkan kematian sel (nekrosis dan apoptosis) pada stroke iskemik. Apoptosis pada stroke bisa melalui mekanisme intrinsik dan ekstrinsik. Mitokondria memegang peranan penting dalam apoptosis intrinsik, yaitu dengan keluarnya protein proapoptosis yang akan memicu kaskade apoptosis (Mattson *et al.*, 2000).

Mitokondria merupakan organ yang sangat penting untuk mengatur kematian atau *survive* dari sel. Mitokondria mempunyai peran pula dalam mempertahankan keseimbangan Ca^{2+} yaitu dengan melakukan *uptake* dari Ca^{2+} saat terjadi pemasukan Ca^{2+} yang berlebihan ke ruang intraseluler (Mattson *et al.*, 2000). Interaksi antara sitosol *endoplasmic retikulum* (ER) dan mitokondria secara *bidirectional* baik dalam sel neuron maupun sel glia mempunyai peran penting dalam menstabilkan kadar ion Ca^{2+} agar tidak bersifat toksik terhadap sel. Ca^{2+} itu sendiri mempunyai fungsi penting dalam mitokondria diantaranya mengaktifkan enzim dehydrogenase dalam siklus tricarboxylic acid serta pembentukan ATP. Peningkatan ion Ca^{2+} di neuron merupakan suatu komponen penting dalam jalur *signaling* karena mengaktifkan beberapa *cascade calcium dependent* dalam proses pembentukan ekspresi gen baru seperti transkripsi mRNA, *elongasi*, *splicing*,

stabilitas dan translasi dari gen yang penting untuk plastisitas dari sel neuron. Salah satu gen yang terpenting untuk *survival* sel neuron adalah gen BDNF (West et al., 2001).

Glutamat juga merunukan potensial membran dari mitokondria karena adanya penumpukan dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga menyebabkan disfungsi dari mitokondria (Pereira et al., 2000). Ternyata bukan Glu saja yang berperan saat iskemik akan tetapi juga NMDA reseptor dimana NMDA *receptor mediated signaling* dapat merangsang ekspresi dari inflamatori sitokin dari *inducible nitric oxide synthethase* (iNOS) di otak yang dapat menyebabkan kematian sel saraf (apoptosis) (Jander et al., 2000).

Pada jaringan otak yang mengalami kerusakan ternyata terdapat mekanisme signaling melalui GTPase RhoA yang memblokir regenerasi akson, meningkatkan kadar cAMP dengan pemberian neurotropin ternyata dapat merangsang pertumbuhan akson karena NT menghambat aktivitas *axonal blocking agen* tersebut (Properzi et al., 2004).

Saat iskemik maka NO dapat berinteraksi dengan Ras/MAPK/ERK serta PI3-kinase/Akt yang merupakan jalur untuk *survival* yaitu dengan menginduksi gen *cAMP response element binding* (CREB) yang nantinya dapat memodulasi BDNF serta mengaktifkan *ikappa B kinase* (IKK) yang akan menghasilkan NF-kB, serta penghambatan kaskade apoptotik (Huang, 2004).

Plastisitas terutama terjadi pada jaringan korteks akan tetapi daerah subkortikal dapat pula menunjukkan fungsi tersebut berupa *rearrangement* dari input dan output pada korteks dan jaringan hipokampus. Mekanisme ini

merupakan mekanisme aktif yang mengikut sertakan *neurotrophin* (NT) seperti *nerve growth factor* (NGF) dan *brain derived neurotropic factor* (BDNF) (Rohrbough *et al.*, 2000) serta NT-R yaitu *tropomyosin reseptor kinase* (Trk) (Sadari *et al.*, 2003).

Gen BDNF diatur oleh *calcium responsive elements* (CRE). Induksi dari ekspresi BDNF exon II di neuron secara selektif diaktivasi oleh Ca^{2+} influx dan *cAMP/Ca-response element/enhancer binding protein* (CERB). Aktivasi CERB saja tidak cukup untuk menyebabkan transkripsi dari BDNF, diperlukan Ca propagasi melalui CaM kinase II (Tao *et al.*, 2001).

Aktivasi *reticular activating system* (Ras) akan mengakibatkan survival sel neuron melalui baik aktivasi dari PI-3 inase maupun melalui aktivasi *extracellular response kinase* (ERK) famili dari *mitogen activated protein* (MAP) kinase. MAPK merupakan serine/threonine kinase. Ras mengatur diferensiasi sel saraf, *survival* (Huang, 2001). Ras mengaktifkan MAP kaskade yaitu ERK ½. ERK akan memfosforilasi CREB dan faktor transkripsi. CREB ini berperan untuk mengatur gen yang membentuk *neurotrophin* (NT) (Huang, 2001). CREB dapat diaktivasi oleh MAPK maupun oleh Akt (Kaplan *et al.*, 2000).

Jalur ERK disebut juga MEK/MAP kinase dapat menginduksi jalur *survival* dengan melindungi sel neuron terhadap *injury* (Han *et al.*, 2000). ERK diaktivasi oleh NT, aktivitas neuronal seperti stress oksidatif, depolarisasi membrane karena Ca^{2+} influx ataupun rangsangan Glu serta cAMP untuk ekspresi gen. Kaskade MAPK sangat berperan dalam mengatur siklus sel maupun *survival* signaling (Sebolt-Leopold *et al.*, 2004).

Trk mampu untuk mengaktivasi *mitogen activated protein kinase* (MAPK) secara cepat dan terus menerus berperan untuk modulasi serta membantu perkembangan formasi NT- Trk (Lad *et al.*, 2003). Pada penelitian yang sudah dilakukan, TrkB dapat diaktivasi oleh suatu protein yaitu adenosine yang merupakan suatu neuromodulator tanpa adanya NT, dan dapat berfungsi sebagai neuroplastisitas. Jadi disini terlihat bahwa tidak hanya NT yang penting untuk survival akan tetapi juga peranan TrkB (Lee *et al.*, 2001).

Antioksidan digunakan dengan tujuan menghambat pembentukan radikal bebas akibat stress oksidatif, baik di daerah nekrosis maupun di daerah penumbra. Beberapa jenis antioksidan yang digunakan ternyata memberikan hasil yang baik pada binatang percobaan (Margaill *et al.*, 2005).

ROS yang terbentuk saat stroke iskemik melebihi kemampuan antioksidan endogen untuk menetralsir, maka antioksidan eksogen merupakan alternatif untuk mencegah efek buruk dari ROS. Oleh karena itu, dibutuhkan suatu agen neuroproteksi untuk melindungi sebanyak mungkin sel pada otak dari kerusakan akibat hipoksia. Salah satunya yaitu penggunaan terapi antosianin dari ubi jalar ungu sebagai antioksidan. Pemberian ekstrak ubi jalar ungu pada cerebrum ischemia meningkatkan kadar BDNF dengan ikatan reseptornya TrkB. Antosianin merupakan senyawa flavonoid yang ditemukan pada ubi jalar ungu. Studi perkembangan mengindikasikan antosianin mengurangi insiden *age-related neurological disorders* termasuk degenerasi makular, stroke, dan demensia. Antosianin mampu berfungsi sebagai neuroprotektif membantu menguptake glutamat, dan menurunkan radikal bebas. Antosianin menginduksi pengeluaran

neurotrophic factor seperti GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) dan BDNF yang berkontribusi untuk perkembangan dan kemampuan neuron untuk hidup.

Salah satu kandungan ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L) mengandung antosianin yang dapat membantu *uptake* glutamat dan menurunkan radikal bebas sehingga dapat mengurangi kerusakan akibat eksitotoksitas yang dapat berkontribusi dalam perbaikan jumlah sel neuron yang rusak, edema sel dan fungsi motorik, maka diperlukanlah suatu penelitian yang membuktikan korelasi antara perbaikan sel neuron yang rusak, dan fungsi motorik setelah pemberian ekstrak ubi jalar ungu dalam meningkatkan regenerasi neuron.

Pemberian ekstrak ubi jalar ungu juga menurunkan apoptosis sel-sel saraf yang dan diharapkan mampu menekan produksi ROS yang meningkat sehingga jumlah ROS menurun, Substansi ROS yang meningkat akibat iskemik pada cerebrum akan diseimbangkan oleh antioksidan eksogen dari antosianin sehingga radikal bebas dapat ditekan.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dipaparkan, maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

1. Pemberian antosianin dari ubi jalar ungu dapat memberikan pengaruh terhadap peningkatan ekspresi *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) pada cerebrum tikus (*Rattus norvegicus*) model stroke iskemik.

2. Pemberian antosianin dari ubi jalar ungu dapat memberikan pengaruh terhadap peningkatan ekspresi *tropomyosin reseptor kinase B* (TrkB) pada cerebrum tikus (*Rattus norvegicus*) model stroke iskemik.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya meliputi perawatan dan perlakuan terhadap hewan model. Pembuatan preparat histopatologi cerebrum dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pengukuran ekspresi BDNF dan TrkB cerebrum dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan selama bulan September 2016 sampai dengan Desember 2016.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang hewan coba, kandang jepit hewan coba, tempat pakan dan minum hewan coba, timbangan digital, seperangkat alat bedah, papan bedah, needle, benang *non-absorbable*, spuit (1 mL, 3 mL, 5 mL), sonde lambung, cawan petri, labu takar (100 mL, 500 mL, dan 1.000 mL), gelas ukur 500 mL, aluminium foil, *microtube*, *mikropipet* (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, dan 1.000 μ L), tabung reaksi, rak tabung reaksi, *waterbath*, lemari pendingin, seperangkat alat sentrifugasi, *entellan*, *objek glass*, *cover glass*, lem *entellan*, beaker glass, labu *erlenmeyer*, corong gelas, labu evaporator, labu penampung, plastik klip, pot organ, kertas label, jarum pentul, blue tip, yellow tip, *hand glove*, masker, *autoclave*, mortar, cetakan dari logam berbentuk L untuk *embedding*, *staining* jaringan untuk pengecatan, mikroskop.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah cerebrum tikus putih (*Rattus novergicus*), antosianin 2 mL dari ekstrak ubi jalar ungu. Bahan untuk pembuatan imunohistokimia antara lain aquades, alkohol, *buffer formalin* 10%, NaCl Fisiologis 0,9%, Xylol, Parafin, PBS, antibodi primer anti-BDNF, antibodi primer anti-TrkB, antibodi sekunder (*rabbit anti rat labeled streptavidin biotin*), *Navocastra Peroxide Block*, *Navocastra Post Primari*, Counterstain (*mayer hematoxylen*), *Strep avidin-Horseradish Peroxidase (SA-HRP)* dan *entellan*, kromogen DAB (*Diaminobenzinidine*).

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana sampel yang digunakan dipilih secara acak namun tetap dalam satu strain dan dari peternakan yang sama.

Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini dapat dihitung menggunakan rumus $[p(n-1) \geq 15]$ (Kusriningrum, 2008), sehingga :

$$P(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan: p = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah minimal ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk tiga kelompok perlakuan dibutuhkan minimal jumlah ulangan minimal 4 kali ulangan dalam setiap kelompok.

Perlakuan dibagi dalam enam kelompok secara acak dan diberi perlakuan sesuai kelompoknya sesuai **Tabel 4.1**.

Table 4.1 Pemberian perlakuan

Kelompok	Perlakuan
K1 (kontrol negatif)	Tikus sehat tanpa perlakuan
K2 (kontrol positif 24 jam)	Induksi stroke iskemik dan 24 jam kemudian dibedah
K3 (kontrol positif 72 jam)	Induksi stroke iskemik dan 72 jam kemudian dibedah
K4 (terapi antosianin 24 jam volume 2 mL)	Induksi stroke iskemik dan pemberian antosianin selama 24 jam dengan volume 2 mL per oral kemudian dibedah pada hari tersebut
K5 (terapi antosianin 72 jam volume 2 mL)	Induksi stroke iskemik dan pemberian antosianin selama 72 jam dengan volume 2 mL per oral kemudian dibedah pada hari tersebut

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : induksi stroke iskemik dengan metode MCAO dan terapi antosianin volume 2 mL.

Variabel tergantung : ekspresi BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) dan ekspresi TrkB (*Tropomyosin Receptor Kinase B*)

Variabel kontrol : Tikus strain Wistar jantan berumur 8-12 minggu dengan berat rata-rata 200 gram

4.5 Metode Penelitian

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan model dibagi dalam lima kelompok perlakuan secara acak. Hewan model diadaptasikan dalam kandang kelompok selama tujuh hari sebelum perlakuan. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar* jantan umur 8-12 minggu dengan berat rata-rata 200 gram. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di dalam kandang berupa bak plastik dengan tutup kawat beralas sekam yang ditempatkan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Jumlah keseluruhan yang digunakan 20 ekor yang masing-masing terbagi atas lima kelompok perlakuan secara acak dan semua perlakuan terdiri atas empat pengulangan.

Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 50 x 40 x 20 cm dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan. Kandang terbuat dari plastik dengan tutup dari rangka kawat yang beralaskan berupa sekam serbuk

kayu, tempat minum (*nipple*) yang berisi air minum dan pakan yang tersusun dari komposisi alami. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap serta polutan lainnya. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24 °C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.5.2 Metode Induksi Stroke pada Hewan Coba

Metode induksi stroke yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO). Metode induksi MCAO adalah metode penginduksian stroke dengan cara mengikat arteri karotis komunis, arteri yang langsung mengalirkan darah menuju otak. Selain itu juga dilakukan pengikatan pengikatan arteri karotis eksterna yang merupakan cabang dari arteri karotis komunis. Pengikatan pada daerah ini dilakukan karena posisinya yang lebih mendekati otak sehingga memudahkan terjadinya stroke iskemik. Waktu yang digunakan untuk meligasi arteri karotis komunis dan arteri karotis komunis eksterna adalah selama 3 jam (Kuraoka *et al.*, 2009). Arteri karotis komunis memberi suplai darah kepada sebagian besar korteks otak. Arteri serebri media merupakan cabang utama dari arteri karotis komunis. Pembuluh darah ini memberi suplai darah ke bagian korteks motorik primer yang berfungsi untuk gerakana volunter (Bradac, 2011).

Hewan coba disiapkan, kemudian dilakukan pencukuran rambut disekitar leher sebelah kiri kemudian diberi alkohol 70%. Leher diinsisi menggunakan blade nomer 15 sepanjang 2-3 cm, selanjutnya dilakukan ligasi pada arteri karotis komunis dan arteri karotis komunis eksterna selama 3 jam, selanjutnya dilakukan reperfusi.

4.5.3 Metode Pemberian Antosianin

Pemberian antosianin dari ekstrak ubi jalar ungu dibeikan pada tikus secara per oral (PO) menggunakan sonde lambung. Sonde lambung yang digunakan adalah spuit sonde ukuran 3 mL. Dosis ekstrak ubi jalar ungu yang adalah 4 mg/kg BB dengan berat badan tikus rata-rata 200 gram. Konsentrasi ekstrak ubi jalar ungu adalah 40 mg/100 ml.

$$\frac{\text{dosis} \times \text{berat badan}}{\text{konsentrasi}}$$
$$\frac{4 \text{ mg/kg} \times 200 / 1000 \text{ kg}}{40 \text{ mg/100 ml}} = 2 \text{ mL}$$

4.5.4 Preparasi Organ Otak

Pengambilan sampel cerebrum pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-3. Langkah awal yang dilakukan yaitu euthanasi dengan cara dislokasi leher, hewan coba diposisikan secara rebah dorsal, sehingga bagian punggung terletak dibagian dorsal untuk mempermudah pengambilan sampel. Pembedahan pada bagian cranial dilakukan untuk pengambilan organ otak. Otak lalu dibersihkan dengan NaCl fisiologis 0,9% dan disimpan didalam wadah yang telah diisi dengan larutan *buffered formalin* 10%.

Otak direndam dalam larutan *buffered formalin* 10% selama 24 jam. Setelah dilakukan perendaman, cerebrum dikeluarkan dari larutan fiksatif. Tujuan dilakukan fiksasi adalah untuk mempertahankan susunan jaringan otak agar tidak berubah oleh proses biokimia karena enzim atau pembusukan oleh bakteri. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan direndam dalam larutan fenol 4% dalam akuades selama 1-3 hari. Tahap selanjutnya yaitu dehidrasi, yakni

merendam jaringan otak ke dalam larutan alkohol secara bertahap, yaitu alkohol 70%, alkohol 80% dan alkohol 90% masing masing selama 1 hari. Jaringan kemudian direndam dengan alkohol 100% selama 2 hari yang diganti setiap harinya. Proses dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan dapat diisi dengan parafin atau zat lain yang digunakan untuk blok preparat.

Tahap selanjutnya adalah *clearing*. Jaringan yang sudah melalui tahap dehidrasi direndam ke dalam cairan xylol I selama 15 menit dan xylol II selama 15 menit berfungsi untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin. Agar jaringan otak muda dipotong, maka jaringan harus dipadatkan menggunakan parafin. Tahap berikutnya adalah proses *impegnasi*, berfungsi mengeluarkan cairan pembening (*clearing agent*) dari jaringan kemudian diganti dengan parafin. Dalam tahap ini jaringan harus benar-benar bebas dari *clearing agent* karena sisa cairan tersebut dapat mengkristal dan ketika dipotong dengan mikrotom akan mengakibatkan jaringan menjadi mudah robek. Jaringan dibenamkan ke dalam parafin/paraplast I selama 2 jam, kemudian dipindahkan ke dalam parafin/paraplast II selama 1 jam dan kemudian ke dalam parafin/paraplast III selama 2 jam. Tahap selanjutnya adalah *blocking* yaitu *histoplate* diletakkan di atas piringan logam. Cairan parafin dituangkan sedikit ke dalam cetakan tersebut dan secepatnya jaringan dimasukkan ke dalam cetakan. Parafin cair kemudian dituangkan kembali hingga menutupi cetakan tersebut.

Tahap pemotongan jaringan dilakukan dengan menggunakan mikrotom. Pisau pada mikrotom diletakkan pada sudut tertentu. Blok parafin yang akan dipotong direkatkan pada holder dengan menggunakan spatula. Blok preparat kemudian diletakkan pada tempatnya di mikrotom dan diatur jarak preparat ke arah pisau sedekat mungkin. Ketebalan irisan $\pm 5 \mu\text{m}$. Rotor mikrotom kemudian diputar secara ritmis. Pita-pita parafin awal yang tanpa jaringan dibuang dan setelah potongan mengenai jaringan, jaringan dipindahkan secara hati-hati dengan sengkeli ke atas air di dalam waterbath yang diatur pada suhu 55°C , tujuannya agar lembaran/pita parafin berkembang dengan baik. Jaringan yang diperoleh diletakkan pada *Premium Coated Slide Poly-L-Lisine* (brand Biogear, Biozatic) agar hasil hibridisasi lebih bersih dan jaringan lebih kuat menempel. Kaca objek kemudian disimpan selama 12 jam agar benar-benar kering (Setiabudi, 2005).

4.5.5 Pemeriksaan Ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* Secara Imunohistokimia

Dilakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit. Kemudian rehidrasi preparat dengan menggunakan alkohol 100%, alkohol 95% dan alkohol 70% masing-masing selama dua menit, dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit. Tetesi PBS pada slide dan ditunggu selama 5 menit dan keringkan secara perlahan menggunakan *tissue*. Teteskan *Navocstra Peroxidase Block* sampai menutupi organ pada setiap slide dan ditunggu selama 20 menit kemudian dibuang. Kemudian teteskan PBS kembali sampai pengulangan 3 kali selama 5 menit. Rendam preparat didalam antibodi primer *anti-BDNF* selama 24 jam dan teteskan preparat dengan PBS

selama 5 menit sebanyak 3 kali pengulangan. Kemudian ditetesi *Navocstra* Post Primer pada setiap slide dan dibiarkan selama 1 jam, dilanjutkan dengan PBS sebanyak 3 kali selama 5 menit, pembuangan post primer bersamaan dengan pembilasan pertama. Preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit dengan suhu ruang. Kemudian dicuci kembali dengan PBS dan dibilas dengan steril water. Kemudian slide ditetesi dengan kromogen DAB (*Diaminobenzinidine*) selama 10-20 menit, setelah itu dicuci kembali dengan PBS pH 7.4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan Hematoxylen selama 5 menit. Dicuci *mounting, entellan*, dan ditutup dengan coverglass.

Hasil pewarnaan kemudian diamati di mikroskop dan dilihat ada tidaknya reaksi positif. Slide kemudian diambil foto sebanyak 5 bidang pandang dengan perbesaran obyektif 40x, dan dihitung jumlah sel yang masing-masing mengekspresikan BDNF. Perhitungan ekspresi BDNF dengan menggunakan *Immunoratio*.

4.5.6 Pemeriksaan Ekspresi Tropomyosin Receptor Kinase B Secara Imunohistokimia

Langkah-langkah dalam metode pewarnaan imunohistokimia yaitu dengan pembuatan preparat. Pertama dilakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit. Selanjutnya dilakukan rehidrasi preparat dengan etanol, 100%, etanol 95%, dan etanol 70% masing-masing selama dua menit, dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit. Preparat direndam dalam *peroxidase blocking solution* pada suhu

kamar selama 10 menit. Kemudian preparat diinkubasi dalam *prediluted blocking serum* selama 10 menit. Preparat direndam di dalam antibodi primer anti-TrkB selama 10 menit. Preparat dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) selama 5 menit kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder (*rabbit anti rat labeled streptavidin biotin*) selama 10 menit lalu dicuci preparat dengan PBS selama 5 menit. Preparat kemudian diinkubasi kembali dengan peroksidase selama 10 menit lalu dicuci preparat dengan dengan PBS selama 5 menit. Inkubasi preparat yang terakhir menggunakan kromogen DAB (*Diaminobenzinidine*) selama 10 menit. Hasil semua inkubasi preparat diwarnai dengan Hematoksin Eosin. Preparat kemudian dibersihkan dan ditetesi dengan *mounting media*. Preparat yang telah jadi ditutup dengan *coverglass*.

Hasil pewarnaan kemudian diamati di mikroskop dan dilihat ada tidaknya reaksi positif. Slide kemudian diambil foto sebanyak 5 bidang pandang dengan perbesaran obyektif 40x, dan dihitung jumlah sel yang masing-masing mengekspresikan TrkB. Perhitungan ekspresi TrkB dengan menggunakan *Immunoratio*.

4.6 Analisa Data

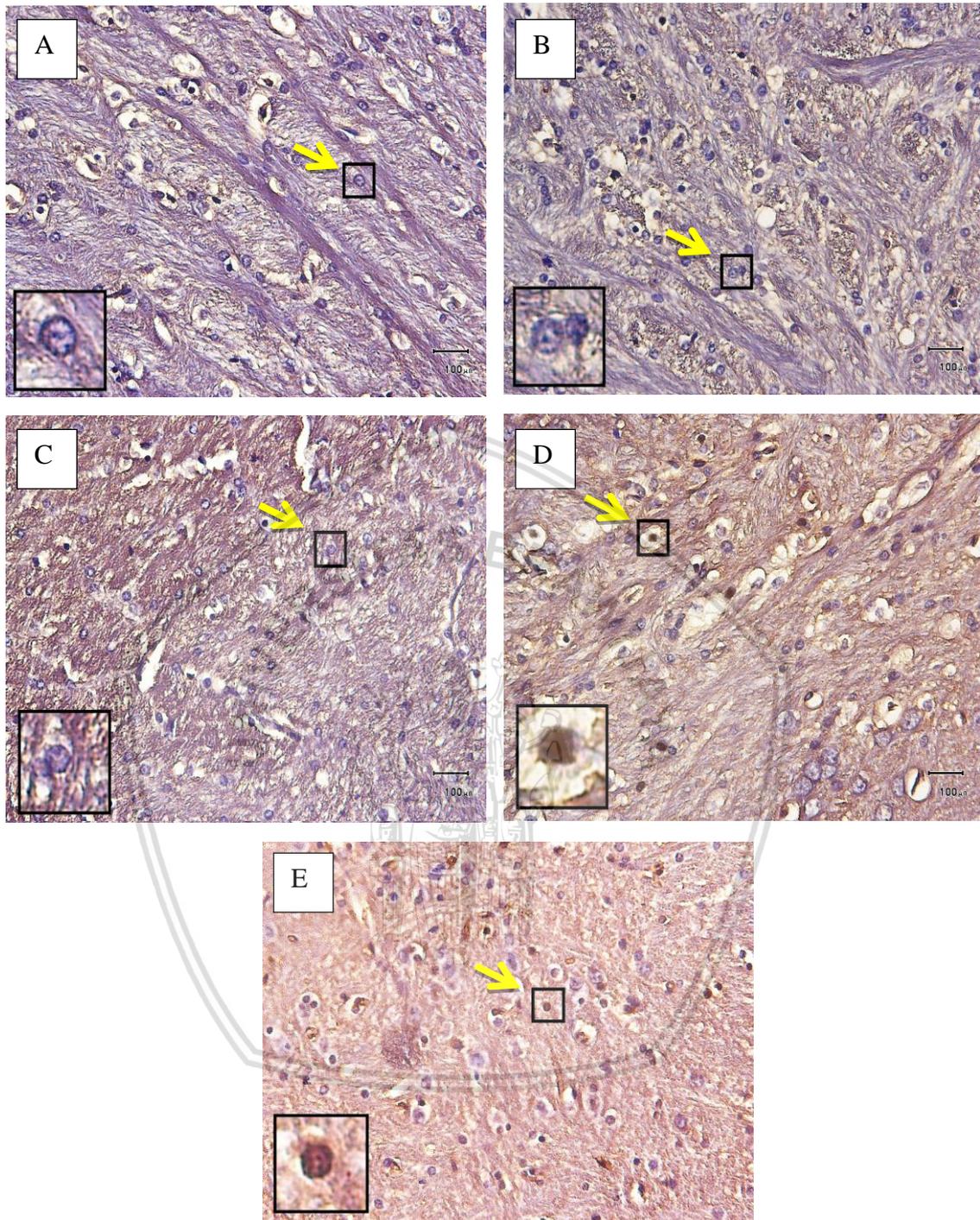
Analisa data yang digunakan pada penelitian ini menggunakan analisa kuantitatif untuk ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) dan ekspresi *Tropomyosin Receptor Kinase B* (TrkB) yang dianalisa menggunakan analisa statistik *one way analysis of varians* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Tukey ($\alpha = 0,05$).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Antosianin dari Ubi Jalar Ungu terhadap Ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) pada Cerebrum Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Stroke Iskemik

Pemeriksaan ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) dan *Tropomyosin Receptor Kinase B* (*TrkB*) dilakukan menggunakan teknik pengujian imunohistokimia yang didasarkan pada interaksi antigen-antibodi, memperlihatkan ekspresi yang terbentuk pada semua kelompok perlakuan. Ekspresi BDNF pada otak besar tikus stroke ditandai dengan pembentukan warna coklat pada neuron. Warna coklat ini dikarenakan adanya pengikatan kompleks antigen-antibodi yang dikenali *Strep-Avidin Horseradish Peroxidase* (SA-HRP) yang mengikat H_2O_2 sehingga teroksidasi menjadi O_2 dan H_2O lalu O_2 akan berikatan dengan substrat kromagen DAB sehingga memunculkan warna coklat. Warna coklat dihasilkan dari kromogen DAB yang berfungsi untuk memvisualisasikan reaksi kompleks antigen dengan antibodi. Oleh karena itu, berdasarkan hasil pengamatan menunjukkan terbentuknya ekspresi pada kelompok perlakuan yang diujikan.

Pengukuran ekspresi pada sel otak dilakukan menggunakan *immunoratio*. Hasil pengamatan ekspresi pada cerebrum tikus dari lima kelompok perlakuan seperti **Gambar 5.1** ekspresi BDNF dan **Gambar 5.2**. ekspresi TrkB. Pengukuran dilakukan pada perbesaran 400x sebanyak lima kali lapang pandang.



Gambar 5.1 Ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) di sel neuron pada gambaran imunohistokimia cerebrum tikus perbesaran 400x

Keterangan Gambar 5.1: (A) Tikus kontrol negatif, (B) tikus kontrol positif 24 jam, (C) tikus kontrol positif 72 jam, (D) Terapi antosianin dari ubi jalar ungu 24 jam, (E) Terapi antosianin dari ubi jalar ungu 72 jam. Tanda panah () menunjukkan ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF).

Pemberian antosianin dari ubi jalar ungu mampu meningkatkan ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF). Ubi jalar ungu yang ada di Bali memiliki kadar antosianin cukup tinggi (Suprpta, 2004), dan terbukti dapat mengatasi stres oksidatif pada tikus (Jawi, 2008). Hasil pengukuran rata-rata ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) pada cerebrum setiap kelompok perlakuan ditunjukkan pada (**Tabel 5.1**)

Tabel 5.1 Ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) pada cerebrum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi antosianin dari ubi jalar ungu model stroke iskemik

Kelompok	Persentase area ekspresi BDNF (%)
(K1) Kontrol negatif	34,72 ± 0,01 ^b
(K2) Kontrol positif 24 jam	22,38 ± 0,02 ^a
(K3) Kontrol positif 72 jam	50,84 ± 0,02 ^c
(K4) Terapi 24 jam	58,86 ± 0,01 ^d
(K5) Terapi 72 jam	73,44 ± 0,04 ^e

Keterangan: Perbedaan notasi a, b, c, d, e menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$.

Hasil uji statistik menggunakan *One Way ANOVA* dengan menggunakan software *SPSS 16* menunjukkan bahwa pemberian antosianin dari ubi jalar ungu mampu meningkatkan ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF). Hasil dilanjutkan dengan uji *Tukey/Beda Nyata Jujur* (BNJ) dengan taraf kepercayaan $\alpha = 5\%$ menunjukkan ekspresi BDNF berbeda signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan. (**Lampiran 6-7**).

Ekspresi BDNF pada kelompok kontrol negatif sebesar $34,72 \pm 0,01\%$ yang menunjukkan adanya produksi BDNF pada keadaan normal pada kelompok kontrol negatif (K1). *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) sendiri merupakan neurotropin yang terbanyak pada otak dan sangat penting dalam

kelangsungan hidup neuron selama perkembangan dan integrasi neuron pada otak (Klein, 2011). Ekspresi BDNF merupakan bentuk respon otak terhadap kerusakan yang terjadi pada jaringan. Respon ini diawali dari oklusi mengakibatkan penurunan ATP dan gangguan homeostasis ion Ca^{2+} sehingga aktivasi *hypoxia inducible factor 1* (HIF-1) yang berperan pada pengiriman sinyal hipoksia. Selanjutnya, reseptor sel menerima rangsangan dan mengaktifkan pembentukan BDNF. BDNF merupakan salah satu jenis faktor neurotropin yang bekerja pada proses angiogenesis atau proteksi otak (Rahmawati, 2017).

Pada kelompok positif 24 jam (K2) ekspresi BDNF yaitu $22,38 \pm 0,02\%$. Hasil analisa dengan menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa ekspresi BDNF pada kelompok positif 24 jam berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif dengan penurunan sebesar 35,5%. Penurunan dari kadar ekspresi BDNF tersebut terjadi karena ketika iskemik reperfusi berlangsung, terjadi peningkatan Ca^{2+} yang terus menerus, yang akan menyebabkan terjadinya serentetan peristiwa yang nantinya mengakibatkan penumpukan radikal bebas, adapun rangkaian peristiwa itu adalah merangsang Ca^{2+} dependent hydrolase seperti protease dan lipase contohnya fosfolipase; selain itu Ca^{2+} influx ini juga mengakibatkan peningkatan radikal bebas di mitokondria; Ca^{2+} influx juga akan mengkonversikan xantin dehidrogenase menjadi xantin oksidase sehingga mengakibatkan penumpukan radikal bebas dan pelepasan glutamat yang berlebihan pada celah sinaps neuron. Pasca 24 jam iskemik reperfusi, kejadian yang terjadi di dalam sel lebih banyak berperan adalah protein pro apototik yang dipicu oleh ledakan oksigen yang berakibat pada stres oksidatif sel. Akibatnya,

kadar BDNF pada kelompok kontrol positif 24 jam menurun tajam. Apabila terjadi kerusakan pada korteks serebri akibat cedera kepala ataupun stroke, ini akan mengakibatkan disfungsi organ yang diatur oleh korteks tersebut misalnya kelumpuhan, setelah beberapa hari atau minggu fungsi organ tersebut mulai kembali membaik,

Eksresi BDNF pada kelompok positif 72 jam (K3) yaitu $50,84 \pm 0,02\%$. Hasil analisa dengan menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa ekspresi BDNF pada kelompok positif 72 jam berbeda signifikan ($p < 0,05$) peningkatan sebesar 46,4%. Hal ini terjadi karena saat dilakukan reperfusi pasca stroke 72 jam, akan terjadi ledakan oksigen yang meningkat sehingga akan memicu sel untuk melakukan proliferasi dan mengaktifkan BDNF untuk melakukan regenerasi. Peningkatan BDNF karena kemampuan otak untuk memperbaiki fungsi tersebut bukan karena menggantikan jaringan otak yang rusak akan tetapi karena resolusi dari akibat reperfusi stroke di sekitar cedera serta *rewiring* dari sirkuit di otak. Hal ini terjadi dengan cara jaringan korteks yang disebelahnya akan memperbaiki jaringan tersebut dan bahkan bisa dari jaringan korteks yang jauh letaknya dapat pula melakukan reorganisasi. Kejadian ini merupakan aktivisasi dari *silent synapses*, dan proses *rewiring* inilah yang disebut plastisitas (Tator, 2002).

Plastisitas terutama terjadi pada jaringan korteks akan tetapi daerah subkortikal dapat pula menunjukkan fungsi tersebut berupa *rearrangement* dari input dan output pada korteks dan jaringan hipokampus. Mekanisme ini merupakan mekanisme aktif yang mengikut sertakan *neurotrophin* (NT) seperti *nerve growth factor* (NGF) dan *brain derived neurotrophic factor* (BDNF)

(Rohrbough *et al.*, 2000) serta NT-R yaitu *tropomyosin reseptor kinase* (Trk) (Sadari *et al.*, 2003).

Substansia alba pada jaringan otak mengandung sel mikroglia, oligodendrosit dan astrosit, ketiganya memiliki kepekaan dan fungsi yang berbeda pula dalam melindungi sel neuron. Oligodendrosit membentuk myelin dari sel saraf yang merupakan bagian paling peka, mudah rusak karena proses iskemia (Goldberg *et al.*, 2003). Astrosit sebagai daerah penunjang ternyata mempunyai fungsi yang sangat kompleks yang dapat menguntungkan maupun merugikan sel neuron. Sedangkan sel neuron pun mempunyai peran terhadap astrosit yaitu differensiasi sel serta pematangan dari glioblast (Goldberg *et al.*, 2003). Sejak ditemukan Ca^{2+} *signaling* antara astrosit dan sel neuron oleh Cornell-Bell maka penelitian tentang peranan astrosit mulai berkembang (Cornell-Bell *et al.*, 2000). Selain itu, astrosit juga dapat berfungsi sebagai *clearance* dari ion ekstraseluler serta memodulasi neurotransmisi sinaptik (Sul *et al.*, 2004). Berkaitan dengan fungsi plastisitas maka astrosit ini mempunyai kemampuan untuk neurogenesis dengan membentuk serta mengatur formasi sinaps, transmisi sinaps serta proliferasi (Song *et al.*, 2002).

Peningkatan ekspresi BDNF pada kelompok ini menunjukkan bahwa pasca iskemik reperfusi 72 jam otak secara alami akan menginduksi perbaikan jaringan otak. Hal ini menunjukkan bahwa jaringan otak membentuk neuroproteksi dengan meningkatkan pembentukan faktor neurotropin yang berperan penting pada pertahanan sel-sel otak. Selain itu, secara umum teknik *Middle Cerebral Arteri Occlusion* (MCAO) yang dilakukan pada tikus mengakibatkan kerusakan

pada area otak besar. Oleh karena otak besar merupakan daerah inti kerusakan, justru iskemik reperfusi merangsang terjadinya kenaikan BDNF pada otak besar. Peningkatan BDNF juga diindikasikan karena BDNF tidak hanya dihasilkan oleh sel neuron tapi juga oleh sel non neuron seperti endotelial, mikroglia dan astrosit sehingga peningkatan BDNF sangat dimungkinkan untuk terjadi (Rahmawati, 2017).

Hasil analisa statistika menunjukkan ekspresi BDNF pada kelompok terapi 24 jam dan 72 jam berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok positif stroke iskemik. Hal ini ditunjukkan adanya peningkatan ekspresi BDNF pada kelompok terapi 24 jam yang diberikan satu kali sehari memiliki ekspresi BDNF yaitu sebesar $58,86 \pm 0,01\%$ dan pemberian terapi 72 jam yang diberikan satu kali sehari memiliki ekspresi BDNF yaitu sebesar $73,44 \pm 0,04\%$ dengan volume pemberian sama pada kelompok terapi 24 jam dan kelompok terapi 72 jam yaitu 2 mL. Dilihat dari ekspresi BDNF diatas menunjukkan peningkatan ekspresi pada terapi yang diberikan. Pemberian terapi antosianin ubi jalar ungu 24 jam dan 72 jam mampu meningkatkan ekspresi berturut-turut sebesar 69,5% dan 115,5%.

Bahan terapi yang diberikan berupa antosianin ubi jalar ungu yang dijadikan sebagai bahan terapi merupakan produk komersial berbentuk cair yang berasal dari spesies Bali yaitu Sweet Imo®. Antioksidan digunakan dengan tujuan menghambat pembentukan radikal bebas akibat stress oksidatif, baik di daerah nekrosis maupun di daerah penumbra. Beberapa jenis antioksidan yang digunakan

ternyata memberikan hasil yang baik pada binatang percobaan (Margaill *et al.*, 2005).

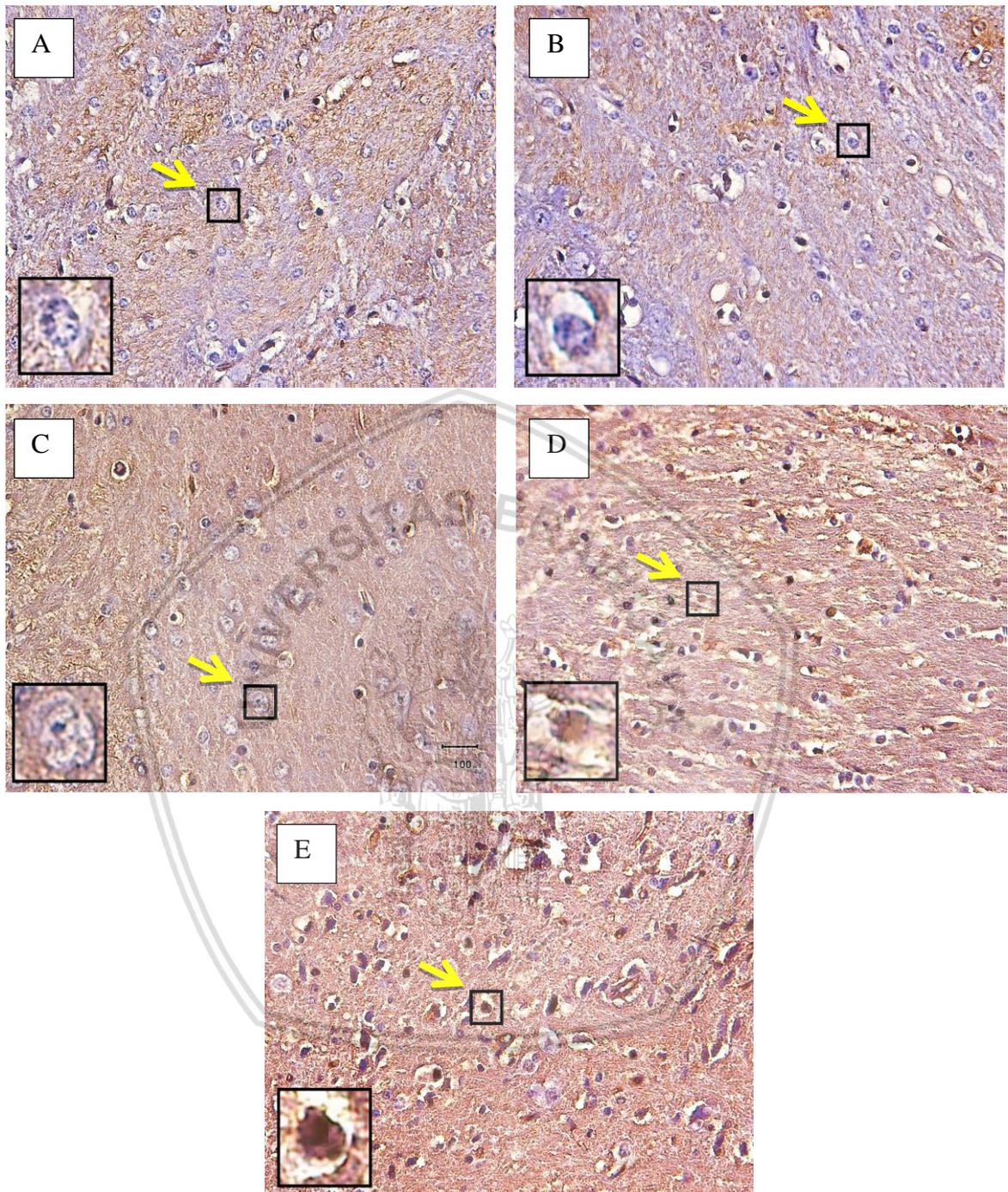
Pemberian ekstrak antosianin dilaporkan meningkatkan produksi BDNF pada otak besar. Antosianin memiliki aktivitas antioksidan yang dapat menekan efek peningkatan radikal bebas berlebih pada awal iskemik reperfusi. Antosianin memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dan gugus fenolik yang membuat antosianin mampu menetralkan kerusakan akibat radikal bebas. Selain itu, antosianin mampu memperbaiki kerusakan sel melalui modifikasi jalur *signaling* yaitu pada proses fosforilasi protein diikuti dengan penurunan produksi ROS di sertai dengan penghambatan apoptosis sel sehingga kadar BDNF bisa meningkat (Apriliyanti, 2010).

Pemberian terapi antosianin dari ubi jalar ungu memiliki pengaruh yang sangat nyata terhadap ekspresi BDNF pada cerebrum tikus model stroke iskemik. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian terapi selama 72 jam adalah terapi efektif yang didukung adanya hasil analisa statistik dapat meningkatkan ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) pada cerebrum tikus dan menekan produksi radikal bebas yang berlebih akibat dari stroke iskemik. Kadar ekspresi area presentase pada kelompok terapi 72 jam (K5) lebih tinggi daripada ekspresi area persentase ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) pada cerebrum tikus kontrol negatif. Hal ini dikarenakan kemampuan otak untuk plastisitas dan regenerasi sangat cepat karena adanya pemberian terapi antioksidan eksogen dari ubi jalar ungu.

5.2 Pengaruh Pemberian Antosianin dari Ubi Jalar Ungu terhadap Ekspresi *Tropomyosin Receptor Kinase B (Trkb)* pada Cerebrum Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Stroke Iskemik

Pemberian antosianin dari ubi jalar ungu mampu meningkatkan ekspresi *Tropomyosin Receptor Kinase B (Trkb)*. *Trkb* merupakan reseptor dari BDNF. *Trkb* suatu reseptor *tyrosine kinase* yang dapat memfosforilasi tirosin dalam sel dan mengaktifkan sinyal intras seluler (Patapoutian, 20010. *TrkB* terdiri dari 2 isoform yaitu *full-length receptor* (rantai utuh) (*gp145trkB*) dan *truncated receptor* (*gp95trkB*), jenis yang *truncated* ini hanya memiliki sedikit tirosin kinase domain, BDNF berikatan terutama dengan yang rantai utuh *TrkB* (Sardari *et al.*, 2003). *TrkB* yang rantai utuh hanya terdapat di neuron sedangkan bentuk *truncated* terutama ditemukan pada sel non-neuronal seperti astrosit dan oligodendrosit.

Gambar 5.2 memperlihatkan gambaran ekspresi *TrkB* di bawah pengamatan mikroskop. Ekspresi *TrkB* ditunjukkan dengan pembentukan warna coklat pada neuron. Berdasarkan pemeriksaan gambaran imunohistokimia dapat disimpulkan bahwa terjadi pembentukan ekspresi *TrkB* pada kelompok perlakuan. Dari intensitas pewarnaan yang dihasilkan, ekspresi *TrkB* menurun pada 24 jam pertama pasca iskemik reperfusi. Lalu, mengalami peningkatan setelah diterapi antosianin ubi jalar ungu.



Gambar 5.2 Ekspresi *Tropomyosin Receptor Kinase B* (Trkb) di membran sel pada gambaran imunohistokimia cerebrum tikus perbesaran 400x

Keterangan Gambar 5.2: (A) Tikus kontrol negatif, (B) tikus kontrol positif 1 hari, (C) tikus kontrol positif 3 hari, (D) Terapi antosianin dari ubi jalar ungu 1 hari, (E) Terapi antosianin dari ubi jalar ungu 3 hari. Tanda panah () menunjukkan ekspresi *Tropomyosin Receptor Kinase B* (Trkb).

Hasil uji statistik menggunakan *One Way ANOVA* dengan menggunakan software *SPSS 16* menunjukkan bahwa pemberian antosianin dari ubi jalar ungu mampu meningkatkan ekspresi *Tropomyosin receptor kinase B* (BDNF). Hasil dilanjutkan dengan uji *Tukey/Beda Nyata Jujur* (BNJ) dengan taraf kepercayaan $\alpha = 5\%$ menunjukkan ekspresi TrkB berbeda signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan.

(Lampiran 8-9).

Tabel 5.2 Ekspresi *Tropomyosin Receptor Kinase B* (TrkB) pada cerebrum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi antosianin dari ekstrak ubi jalar ungu model stroke iskemik

Kelompok	Presentasi area Ekspresi TrkB (%)
(K1) Kontrol negatif	32,40 ± 0,01 ^b
(K2) Kontrol positif 24 jam	20,28 ± 0,03 ^a
(K3) Kontrol positif 72 jam	50,08 ± 0,02 ^c
(K4) Terapi 24 jam	62,34 ± 0,03 ^d
(K5) Terapi 72 jam	75,30 ± 0,05 ^e

Keterangan: Perbedaan notasi a, b, c, d, e menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$.

Berdasarkan perhitungan secara statistika menggunakan *One Way Analysis of Variant* (ANOVA) pemberian antosianin ubi jalar ungu memberi pengaruh signifikan terhadap kelompok yang diujikan (**Tabel 5.2**). Ekspresi TrkB pada kelompok kontrol negatif sebesar 32,40 ± 0,01%. Pada keadaan normal TrkB sendiri merupakan protein reseptor transmembran yang termasuk dalam famili TNF-R. dimana BDNF akan melekat pada TrkB (Nakajima *et al.*, 2001).

Ekspresi TrkB pada kelompok positif 24 jam yaitu 20,28 ± 0,03%. Hasil analisa dengan menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa ekspresi TrkB pada kelompok positif stroke iskemik berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif dengan penurunan sebesar 37,4%. Penurunan ekspresi tersebut

dikarenakan TrkB merupakan reseptor sama halnya dengan BDNF, pada penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya ternyata TrkB dapat diaktivasi oleh suatu protein yaitu adenosine yang merupakan suatu neuromodulator tanpa adanya *neurotrophin* (NT), dan dapat berfungsi sebagai neuroplastisitas. Jadi disini terlihat bahwa tidak hanya NT yang penting untuk *survival* akan tetapi juga peranan TrkB (Lee *et al.*, 2001). Aktivitas neuronal melalui peningkatan Ca^{2+} di ruang intraseluler dapat memodulasi BDNF/TrkB melalui beberapa mekanisme yaitu sintesis BDNF yang dirangsang oleh depolarisasi neuron melalui Ca^{2+} *dependent regulatori element* di BDNF promoter (Tabuchi *et al.*, 2002, Gartner *et al.*, 2002). Ca^{2+} merangsang perjalanan TrkB ke plasma membrane sel neuron (Du *et al.*, 2003), dan depolarisasi juga mengakibatkan ekspresi dari TrkB mRNA di neuron (Kingsbury *et al.*, 2003). Ketika iskemik reperfusi berlangsung, terjadi peningkatan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada konsentrasi rendah ROS bermanfaat untuk stimulasi pertumbuhan dari sel. Akan tetapi peningkatan kadar ROS yang berlebihan akan mempengaruhi aktivasi jalur sinyal transduksi intraseluler dan memicu apoptosis. Hal ini akan berdampak pada gangguan angiogenesis sehingga terjadi penurunan kadar TrkB pada 1 jam pertama sampai 24 jam pasaca reperfusi (Tabuchi *et al.*, 2002).

Ekspresi TrkB pada kelompok positif 72 jam yaitu $50,08 \pm 0,02\%$. Hasil analisa dengan menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa ekspresi TrkB menunjukkan bahwa ekspresi TrkB pada kelompok positif 72 jam stroke iskemik berbeda signifikan ($p < 0,05$) peningkatan sebesar 54,5%. Peningkatan kadar TrkB pada kelompok ini menunjukkan bahwa pasca iskemik reperfusi 72 jam otak

secara alami akan menginduksi perbaikan jaringan otak. Semakin lama waktu pasca stroke iskemik 72 jam ini akan memicu sel untuk melakukan proliferasi. Pada jaringan normal, proliferasi sel mengarah kepada penambahan jaringan di mana jumlah sel tidak hanya tergantung kepada proliferasi sel tetapi juga oleh kematian sel. Kematian sel terprogram (apoptosis) adalah proses dikeluarkannya sel-sel yang rusak. Keseimbangan antara produksi sel baru dan kematian sel itulah yang mempertahankan sel yang tepat pada jaringan (homeostasis) (Brody dan Rudel, 2003). Hal ini menunjukkan bahwa jaringan otak membentuk neuroproteksi dengan meningkatkan pembentukan faktor neurotropin beserta protein reseptornya yang berperan penting pada pertahanan sel-sel otak (Durst, 2005) sehingga pada kelompok positif 72 jam BDNF mengalami peningkatan.

Hasil analisa statistika menunjukkan ekspresi TrkB pada kelompok terapi 24 jam dan kelompok terapi 72 jam berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok positif stroke iskemik. Hal ini ditunjukkan adanya peningkatan ekspresi TrkB pada kelompok terapi 24 jam yang diberikan satu kali sehari memiliki ekspresi TrkB yaitu sebesar $62,34 \pm 0,03\%$ dan pemberian terapi 72 jam yang diberikan satu kali sehari memiliki ekspresi TrkB yaitu sebesar $75,30 \pm 0,05\%$ dengan volume pemberian sama pada kelompok terapi 24 jam dan kelompok terapi 72 jam yaitu 2 mL. Dilihat dari ekspresi TrkB di atas menunjukkan peningkatan ekspresi pada terapi yang diberikan. Pemberian terapi antosianin ubi jalar ungu 24 jam dan 72 jam mampu meningkatkan ekspresi berturut-turut sebesar 86,2% dan 116,9%.

Peningkatan ekspresi TrkB dalam penelitian ini karena kandungan antosianin dari ubi jalar ungu mengandung faktor neurotrofik dan neuroprotektif. Faktor neurotrofik adalah faktor yang dapat menginduksi ketahanan sel (Spormann, 2008), menstimulasi pertumbuhan sel saraf dan meningkatkan kompleksitas antar saraf (Truong *et al.*, 2005), meningkatkan fungsi neuron, serta meningkatkan perbaikan akson. Faktor neuroprotektif adalah faktor yang memberikan perlindungan kepada neuron terhadap degenerasi dan apoptosis, mencegah kematian sel-sel saraf (Durst, 2005) dan proteksi terhadap stres oksidatif. Pengaruh antioksidan dalam ubi jalar ungu terutama antosianin yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok lain menangkap radikal bebas sehingga ROS menurun. Penurunan ROS disertai dengan penghambatan apoptosis sel sehingga kadar TrkB bisa meningkat. Antosianin memiliki efek neuroprotektif terhadap stres oksidatif dengan cara menurunkan kadar kortikosteron plasma dan radikal bebas intraseluler serta meningkatkan ekspresi protein BDNF beserta reseptornya TrkB dan neurotransmitter monoamin di otak (Durst, 2005). Oleh karena itu, antosianin ubi jalar ungu dapat dijadikan sebagai bahan terapi untuk penyakit stroke yang dipicu oleh peningkatan radikal bebas.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian terapi selama 72 jam adalah terapi efektif yang didukung adanya hasil analisis statistik dapat meningkatkan ekspresi *Tropomyosin Receptor Kinase B (TrkB)* pada cerebrum tikus dan menekan produksi radikal bebas yang berlebihan akibat dari stroke iskemik. Kadar ekspresi area presentase pada kelompok terapi 72 jam (K5) lebih tinggi daripada ekspresi area persentase ekspresi TrkB pada cerebrum tikus kontrol

negatif. Hal ini dikarenakan kemampuan otak untuk plastisitas dan regenerasi sangat cepat karena adanya pemberian terapi antioksidan eksogen dari ubi jalar ungu.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian terhadap tikus model stroke iskemik yang diberi terapi antosianin dari ubi jalar ungu, dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian terapi antosianin dari ubi jalar ungu dapat meningkatkan ekspresi *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) pada cerebrum tikus (*Rattus norvegicus*) model stroke iskemik. Dosis terapi antosianin selama 72 jam meningkatkan ekspresi BDNF sebesar 73,44 %.
2. Pemberian terapi antosianin dari ekstrak ubi jalar dapat meningkatkan ekspresi *Tropomyosin Kinase Reseptor B* (TrkB) pada cerebrum tikus (*Rattus norvegicus*) model stroke iskemik. Dosis terapi antosianin selama 72 jam meningkatkan ekspresi TrkB sebesar 75,30 %.

6.2 Saran

Sebagai saran dari penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui waktu terapi yang lebih optimal menggunakan antosianin dari ubi jalar ungu.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh antosianin di berbagai jaringan tubuh selain di otak.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams HP, A. Bruno, JJ. Connorss, BM. Demaerschalk, P. Khatri, PW jr McMullan, AI. Qureshi, K. Rosenfield, PA. Scott. 2003. *Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke:A Scientific Statement From the Stroke Council of theAmerica Stroke Association. Stroke*.34: 1056-1083
- Adnyana, I Made Oka. 2017. Antosianin Dalam Ekstrak Ubi Ungu Kultivar Bali Mengakibatkan Apoptosis, Kadar Sitokrom C, Kaspase 3 Lebih Rendah dan Ekspresi Bcl-2 lebih Tinggi Pada Sel Jaringan Korteks Serebri Tikus Wistar Dengan Stroke Iskemik. Denpasar: Universitas Udayana.
- Akins PT, PK. Liu, CYH. Hsu, 2000. *Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia, friend or foe?* Stroke 27: 1682-7
- Albert GA. *Phytochemical investigations of plants suspected to cause the FTS of african elephants: heliotropium of alitonium forssk.* (Boraginaceae) and *Blumea Gariepina DC.* (Asteraceae). Universile de Lausanne. 2003. 66-9.
- Alderton WK, CE. Cooper, RG. Knowles. 2001. *Nitric oxide synthetase: structure function and inhibition.* Biochem J 57:593-615.
- Anggraini. 2007. Stress Oxidative. <http://www.ptcombiphar.co.id>. Diakses tanggal 20 Juni 2009.
- Apriliyanti. T, 2010. Kajian Sifat Fisikokimia Dan Sensori Tepung Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas Blackie*) Dengan Variasi Pengeringan [Skripsi]. Program Studi Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Sebelas Maret, Surakarta
- Araque A, V. Parpura, RP. Sanzgiri, PG Haydon, 2000. *Tripartite Synapses: Glia, the unacknowledged partner.* TINS 22(5):208-15.
- Armitage D. 2004. *Rattus novergicus.* Michigan : Animal Diversity of Zoology. *Int.* 68:625-937.
- BardeYA, D. Edgar, H. Thoenen. 2001. *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain.* EMBO J 1: 549-53. (Abstract).
- Bayir H, VE Kagan, YY Tyurina, V Tyurin, RA Ruppel, D Adelson. 2002. *Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infant and children.* Pediatric Research 51 (5):571-8.
- Becker JU, CR Bandera. 2006. *Stroke Ischemic.* eMedicine Journal.Vol. 35.



- Bekinschtein P, M Cammarota, I Izquierdo and JH Medina. 2008. *BDNF and Memory Formation and Storage*. *Neuroscientist* 14(2):147-56.
- Bibel M, Y Barde. 2000. *Neutrophins: Key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system*. *Genes & Development*. 14 (23): 2919-37.
- Binder DK and HE Scharfman. 2004. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*. *Growth Factor* 22(3):123-31.
- Bourassa MG and JC Tardif. 2006. *Antioxidant and Cardiovascular Disease, Second Edition*. United States of America: Springer Science + Business Media Inc.
- Bradac G. 2011. *Cerebral Angiography: Normal Anatomy and Vascular Pathology*. Springer. Berlin
- Breton RR and CG Rodriguez. *Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke*. Intech, Croatia. 2012. p29-58.
- Bridle P and C.F Timberlake. 2000. *Anthocyanin as natural food colours selected aspects*. *Food Chemistry*. Vol. 58, pp 103-109.
- Caplan A. *Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine*. *J Cell Physiol*. 2007; 213(2):341-347.
- Cavanaugh J. 2008. *Differential Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinases ERK1/2 and ERK5 by Neurotrophins, Neuronal Activity, and cAMP in Neurons*. *The Journal of Neuroscience*.
- Chentouze D, GA Marfia, A Pisani, B Picconi, P Giacomini, Bernardi. 2001. *Ionic mechanism underlying differential vulnerability to ischemia in striatal neurons*. *Progress in Neurobiology* 63:687-96.
- Chan JR, JM Cosgaya, YJ Wu, EM Shooter. 2001. *Neurotrophin are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system*. *PNAS* 98 (25): 14661-8
- Choi HM, J.D.H Bang, 2009. *Anti-Inflammatory and Antiarthritic Effects of Piperine in Human Interleukin 1 β - Stimulated Fibroblast Like Synoviocytes and in Rat Arthritis Models*. *Arthritis Research and Therapy* 2009. 11:49.
- Cornell-Bell AH, SM Finkbeiner, MS Cooper, SJ Smith. 2000. *Glutamate induce Ca²⁺ waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling*. *Science* 247:470-3
- Csordas G. 2000. *Quasi-synaptic calcium signal transmission ER and mitochondria*. *EMBO J* 18: 96-108.

- Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol* 65:1-105.
- Davenport R and M. Dennis. *Neurological Emergencies: Acute Stroke*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2000; 68: 277-288.
- Du J, L Feng, E Zaitsev, HS Je, XW Liu, B Lu. 2003. *Regulation of TrkB receptor tyrosine kinase and its internalization by neuronal activity and Ca²⁺ influx*. *J Cell Biol* 163 (2):385-95
- Durst, RW Wrolstad. 2005. Unit F1.2: Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Handbook of analytical food chemistry* (pp. 33-45). New York: John Wiley & Sons.
- Dyce KM, W.O Sack, C.J.G Wensing. 2002. *Textbook of Veterinary Anatomy*. Edisi ke-3. Philadelphia: Saunders.
- Elbe, J.H.V. dan SJ Schwarts. 2001. Colorants. Di dalam *Food Chemistry*. Fennema, O.R. (ed). Marcel Dekker Inc., New York.
- Gartner A, V. Staiger .2002. *Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term potentiation-inducing electrical stimulation patterns*. *PNAS* 99 (9):6386-91
- Goldberg MP, BR Ransom. 2003. New light on white matter. *Stroke* 34:330-2
- Gusev E, VI. Skvortsova. 2003. *Brain Ischemia*. Hong Kong: Kluwer Academic. Pp: 9-19.
- Hansson E, Muyderman H, Leovana J, Allansson I, Sinclair J, Blomstrand F. 2000. Astroglia and glutamate in physiology and pathology aspect on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap junction communication. *Neurochemistry International* 27:317-29.
- Huang EJ, LF Reichardt. 2001. Neurotrophins : Roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:677-736.
- Huang PI. 2004. Nitric oxide and cerebral ischemic precondition. *Cell calcium* 36:323-9.
- Indriyanti, 2005. Peran Asam Lemak Bebas, Stres oksidatif dan Keadaan Inflamasi Terhadap Kejadian Resistensi Insulin. *Forum Diagnosticom Prodia*.

- Institutional Animal Care and Use Committee. 2014. Blood collection. Emory University
- Jawi I M, DN Suprpta, SU Dwi, I Wiwiek. 2008. *Ubi Jalar Ungu Menurunkan Kadar MDA dalam Darah dan Hati Mencit setelah Aktivitas Fisik Maksimal*. Jurnal Veteriner Jurnal Kedokteran Hewan Indonesia. 9(2):65-72.
- Jander S. Schroeter M. Stoll G. 2000. *Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia*. Journal of Neuroimmunology 109:181-7
- John F. C, A Holmes. 2005. *The Ascent of Mouse: Advances in Modelling Human Depression and Anxiety*. Nature Reviews Drug Discovery 4, 775-790.
- Juanda D, dan B. Cahyono. 2000. *Ubi Jalar Budi Daya Dan Analisis Usaha Tani*. Kanisius. Yogyakarta
- Junaidi I. 2011. *Stroke Waspadai Ancamannya*. Penerbit Andi, Yogyakarta
- Junqueira LC, C Jose. 2003. *Histologi Jaringan Saraf*. Jakarta: Gramedia.
- Jusuf, M., S.T ARahayuningsih, dan E Ginting. (2008). *Ubi jalar ungu*. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 30: 13-14.
- Juurlink BHJ, MI Sweeney. 2001. *Mechanism that result in damage during and following cerebral ischemia*. *Neurosci Biobehav Rev* 21 (2):121-8.
- Kaplan DR, FD Miller. 2000. *Neurotrophin signal transduction in the nervous system*. *Curr. Op. Neurobiol.* 10:381-91.
- Kingsbury TJ, PD Murray, LL Bambrick, BK Krueger. 2003. *Ca-dependent regulation of TrkB expression in neuron*. *J Biol Chem* 278(42):40744-8.
- Klabunde RE. 2004. *Cardiovascular physiology concepts*. Nitric Oxide. (<http://www.cvphysiology.com/blood%20flow/BF011.htm>).
- Klein A. B, R Williamson, M.A Santini, C Clemmensen, A Ettrup, M Rios. 2011. *Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species*. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14, 347-353
- Kumalaningsih S. 2006. *Antioksidan Alami-Penangkal Radikal Bebas, Sumber, Manfaat, Cara Penyediaan dan Pengolahan*. Trubus Agrisarana. Surabaya
- Kuraoka, M., T. Furuta, T. Matsuwaki, T. Omatsu, Y. Ishii, S. Kyuwa, Y. Yoshikawa. 2009. *Direct Experimental Occlusion Of The Distal Middle*

Cerebral Artery Induces High Reproducibility Of Brain Ischemia In Mice. Journal of Exp. Animal 2009. 58(1): 19-29

Lad SP, DA Peterson, RA Bradshaw, KE Neet. 2003. *Individual and combined effects of TrkA and p75NTR Nerve Growth Factor receptors: A role for the high affinity receptor site.* J Biol. Chem. 278(27):248808-17

Lee FS, MV Chao. 2001. Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. PNAS 98(6): 3555-60.

Levi-Montalcini R, 2002. *The Nerve Growth Factor 35 years later.* Science 237:1154-62.

Levitan TB, LK Kaczmarek. 2002. *The Neuron: Cell and Molecular Biology*, 3rd ed USA:Oxford University Press.

Liang D, S Bhatta, V Gerzanich, J.M Simard. *Cytotoxic Edema: Mechanism of Pathological Cell Swelling. Neurosurg Focus.* 2007; 22(5): E2.

Liu F, LD McCullough. 2011. *Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls.* J Biomed Biotechnol. 2011 doi:10.1155/2011/464701. [PMC free article][PubMed]

Mattson MP. 2000. Apoptotic and antiapoptotic synaptic signaling mechanism. Brain Path 10:300-12

McAllister AK, LC Kartz, DC Lo. 2000. Neurotrophins and synaptic plasticity. Annu. Rev. Neurosci 22:295-318

McCain J, BN Ames. 2005. *Is docosahexanoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals.* Am J Clin Nutr. Pp 82:281-95.

McGahan L, AM Hakim, Y Nakabeppu, GS Robertson GS. 2004. *Ischemia-induced CA neuronal death is preceded by elevated FosB and Jun expression and reduced NGFI-A and JunB levels.* Molecular Brain Research 56:146-61.

Mergenthaler P,U Dirnagland A Meisel. Pathophysiology of Stroke: Lessons from Animal Models. Metabolic Brain Disease. 2004; 19 (3-4): 151-167.

Miller S.D, J.C. Russel, H.E. MacInes, J. Abdelkrim and R.M. Fewster. 2010. *Multiple paternity in wild population of invasive Rattus species.*NewZeland Journal of Ecology 34(3): 360-362.

- Nakajima K, S Honda, Y Tohyama, Y Innai, S Kohsaka, I Kurihara. 2001. Neutrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res.* 65:322-31
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke. *Cerebral hypoxia* [internet]. 2012 [cited 2012 Mar 29]. Available from: <http://www.ninds.nih.gov/disorders/anoxia/anoxia.htm>.
- Neil F. 2003. *Stroke your complete exercise guide*, Human kinetics publishers, Dallas Texas, pp 8.
- Nguyen TL. 2010. *Neuroprotection Signaling Pathway of Nerve Growth Factor and Brain-Derived Neurotrophic Factor against Staurosporine Induced Apoptosis In Hippocampal H19-7/IGF-IR*. Korea: Department of Molecular Cell Biology, Samsung Biomedical Research Institute, Sungkyunkwan University School of Medicine.
- Nollet, L.M.L. 2002. *Handbook of Food Analysis: Physical Characterization and Nutrient Analysis*. Marcell Dekker Inc, New York.
- Patapoutian A, LF Reichardt. 2001. Trk receptors: Mediators of neurotrophin action. *Curr. Op.Neurobiol.* 11, pp. 272-80.
- Pereira CF, CR de Oliveira. 2000. *Oxidative glutamate toxicity involves mitochondria dysfunction and perturbation of intracellular Ca²⁺ homeostatis*. *Neuroscience Research Review* 36:23-34.
- Pinilla FG. *Brain food: the effects of nutrients on brain function. Science and society.* 2008; 9:568–78.
- Potter W.P. 2007. Rats and Mice : *Introduction and use In Research*. *Health Sciences Journal International*, Vol 28. Hlm. 59-62
- Prass K. 2003. *Hypoxia induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin*. *American Heart Association*. pp 34: 1981-86.
- Properzi F, Fawcett JW. 2004. Proteoglycans and brain repair. *News physiol. Sci.*19:33-8
- Rahardjo M and Hernani. 2005. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan, Penebar Swadaya*, Jakarta.
- Rahmawati E. 2017. *Studi Terapi Antosianin Ubi Jalar Ungu Pada Tikus Rattus norvegicus Model Stroke Iskemik Terhadap Ekspresi Beta Amyloid, VEGF dan Kadar BDNF pada Cerebellum*. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya.

- Rick M. 2003. *Correlation between Brain Reorganization, Ischemic Damage, and Neurologic Status after Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study*. The Journal of Neuroscience. Vol 23 No. 8: 510-517
- Robinson DK, F.H Rauscher, J.K Jens. 2000. Improved maze learning through early music exposure in rats. *Neurological Research*. Vol. 20.
- Rohrbough J, MS Grotewiel, RL Davis, K Broadie. 2003. *Integrin-mediated regulation of synaptic morphology, transmission, and plasticity*. J Neurosci 20: 6868-78
- Rosenberg GA. 2012. *Molecular Physiology and Metabolism of The Nervous System*. New York: Oxford University Press. p158.
- Rosidah. 2010. Potensi Ubi Jalar Ungu Sebagai Bahan Baku Industri Pangan. *TEKNUBUGA* volume 2 No.2
- Salton SRJ. 2003. *Neurotrophins, growth-factor-regulated genes and the control of energy balance*. The Mount Sinai Journal of Medicine 70(2): 93-100
- Sardari S, Pourmorad F, Tiemo A, Nam NH, Parang K. 2003. *Protein Kinases and their modulation in the CNS*. Current Medicinal Chemistry-CNS Agent 3(4): 314-64.
- Schwartz SJ, J.H Von Elbe, M.M. Giusti and Colorants. 2007. *Persistent Pain Is Dependent On Spinal Mitochondrial Antioxidant Levels*. *J Neurosci*. 2009 Jan 7; 29(1): 159-168
- Simpson PB, JT Rusell. 1998. Role of mitochondrial Ca regulation in neuronal and glial cell signaling. *Brain Research Review* 26: 72-81.
- Smith SE, G.C Fonarow, J.L Saver, J.P Broderick, D.O Kleindorfer, RL Sacco. 2012. *Relationship of National Institute of Health Stroke Scale to 30-day mortality medicare beneficiaries with acute ischemic stroke*. *Journal american heart association*. 1:42-50.
- Song HJ, CF Steven, FH Gage. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-45
- Soyuer F, 2005. *Ischemic Stroke: Motor Impairment and Disability with Relation to Age and Lesion Location*. *The Internet Journal of Neurology*. Pp 3(2): DOI: 10.5580/9b4.
- Spormann, T. M., Albert, F. W Rath, T., H Dietrich, F Will, J.P Stockis, G Eisenbrand, C Janzowski. 2008. Anthocyanin/Polyphenolic-Rich Fruit

Juices Reduces Oxidative Cell Damage in an Intervention Study with Patients on Hemodialysis. In : *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17 (12), 2008 : p. 3372-3380.

Strohmaier C, B Carter, R Urfer, Y.A Barde, G Dechant. 2004. *A splice variant of the neurotrophin receptor TrkB with increased specificity for BDNF*. *EMBO J* 15:3332-7.

Suda I, T Oki, M. Masuda, M Kobayashi, Y Nishibadan S Furuta. 2003. *Review: Physiological functionality of purple-fleshed seet potatoes containing anthocyanins and their utilization in foods*. *Japan Agricultural Research Quarterly* 37: 167-173.

Sul JY, G Orosz, RS Given, PG Haydon. 2004. *Astrocytic Connectivity in the Hippocampus*. *Neuron Glia Biology* 1:3-11

Suprpta DN, dkk. 2004. *Kajian Aspek Pembibitan, Budidaya dan Pemanfaatan umbi-umbian sebagai sumber pangan alternatif*. Laporan Hasil Penelitian. Kerjasama BAPEDA Propinsi Bali dengan Fakultas Pertanian UNUD.

Tabuchi A, H Sakaya, T Kisukeda, H Fushiki, M Tsuda. 2002. *Involvement of an upstream stimulating factor as well as cAMP responsive element binding protein in the activation of BDNF gene promoter* *I.J. Biol. Chem.* 277(39): 35920-31

Tao X, S Finkbeiner, DB Arnold, AJ Shaywitz, ME Greenberg. 2001. *Ca-influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor dependent mechanism*. *Neuron* 20:709-26.

Tator CH. 2002. *Strategies for recovery and regeneration after brain and spinal cord injury*. *Injury Prevention* 8 (Suppl IV):iv33-6

Terahara N and T. Matsui. 2008. *Structures and Functionalities of Acylated Anthocyanins*. *Functional Food and Health* 9: 90–101

Truong, V. D., Deighton, N., Thompson, R. T., McFeeters, R. F., Dean L.O., Pecota, K. V., Yencho, G.C. 2010. *Characterization of Anthocyanins and Anthocyanidins in Purple-Flesbed Sweetpotatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS*. In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2010 :p. 404-410.

Vaughan CJ, N Delanty. 2001. *Neuroprotective properties of statin in cerebral ischemia and stroke*. *Stroke* 30:1969-73.

- West AE, WG Chen, MB Daiva, RE Doimetsch, JM Koruhausser, AJ Shaywitz. 2001. Calcium regulation of neuronal gene expression. PNAS 98(20): 11024-31
- Wibowo S, A Gofir. 2001. Farmakoterapi Stroke Prevensi Primer dan Sekunder dalam Farmakoterapi dalam Neurologi. Jakarta : Salemba Medika. Hal 156-161
- Widowati, S., H Herawati, BAS Santosa dan H.A. Prasetia. 2004. Pengaruh Penggunaan Pati Ubi Jalar (*Ipomea batatas L*) HMT Terhadap Sifat Fungsional Rasbi (Beras Ubi Jalar).
- WHO. 2008. The Global Burden of Disease 2004 Update. WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland
- Wholfe J.A. 2003. Post Harvest Procedures: II. Processing. In Sweet Potato—an Untapped Food Source. UK University Press. Cambridge
- Xu W, IG Charles, S Moncada. 2005. Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. Cell Research 15 (1): 63-5.
- Yanita. 2011. Penentuan Aktivitas Antioksidan dan Kadar Senyawa Fenolat Total Pada Buah Anggur Merah dan Anggur Hijau [Skripsi]. Universitas Andalas. Padang
- Zieve D. *Stroke*. Los Angeles: National Library of Medicine. 2011.