

**Novel Terapi Stroke Iskemik Berbasis Penghambatan Cascade Glutamat
Menggunakan Ekstrak Beta-glukan dari *Saccharomyces sp* pada Tikus Wistar
Model Stroke Iskemik**

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum



Oleh:

Muhammad Unzila Rafsi Zulfikri

155070101111090

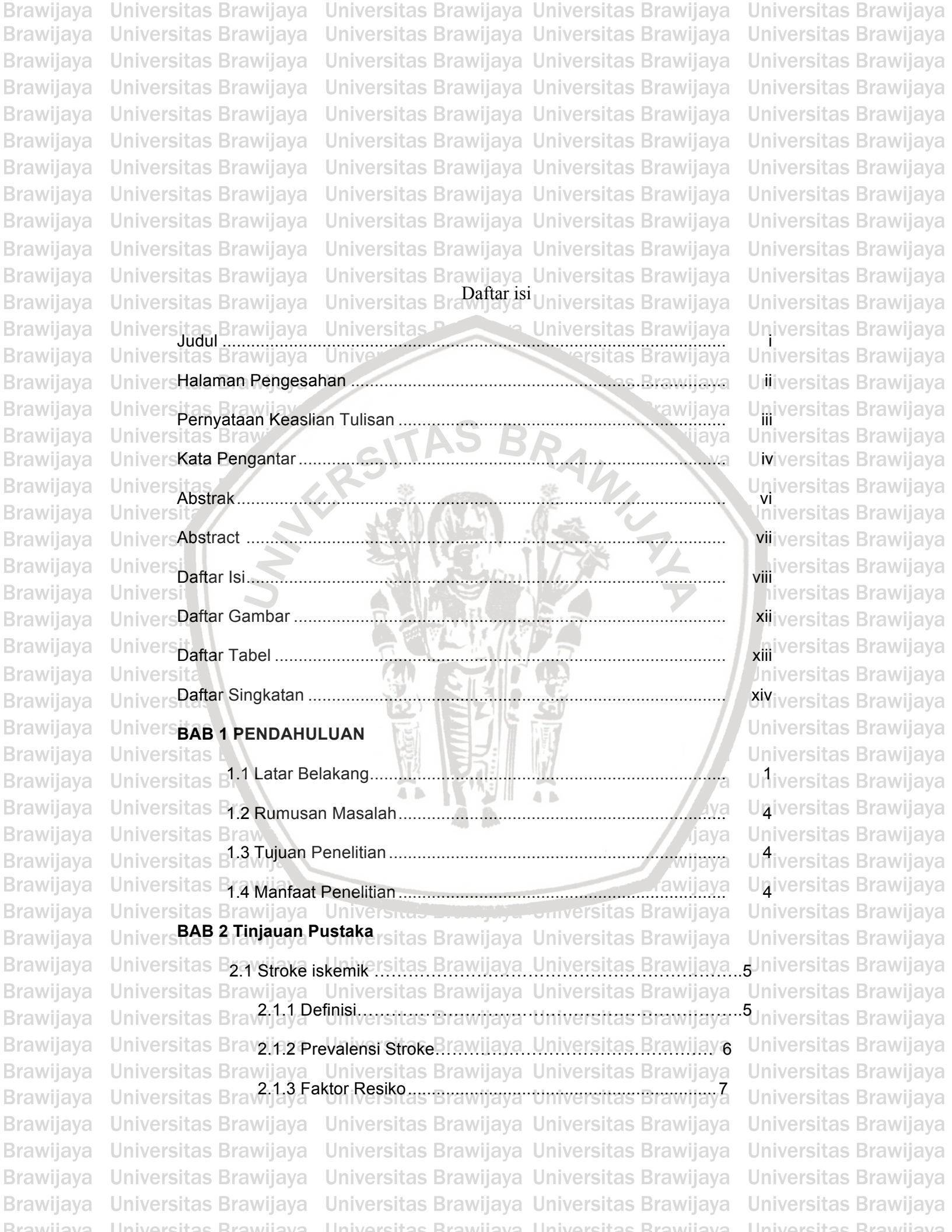
PROGRAM STUDI KEDOKTERAN

PROGRAM SARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

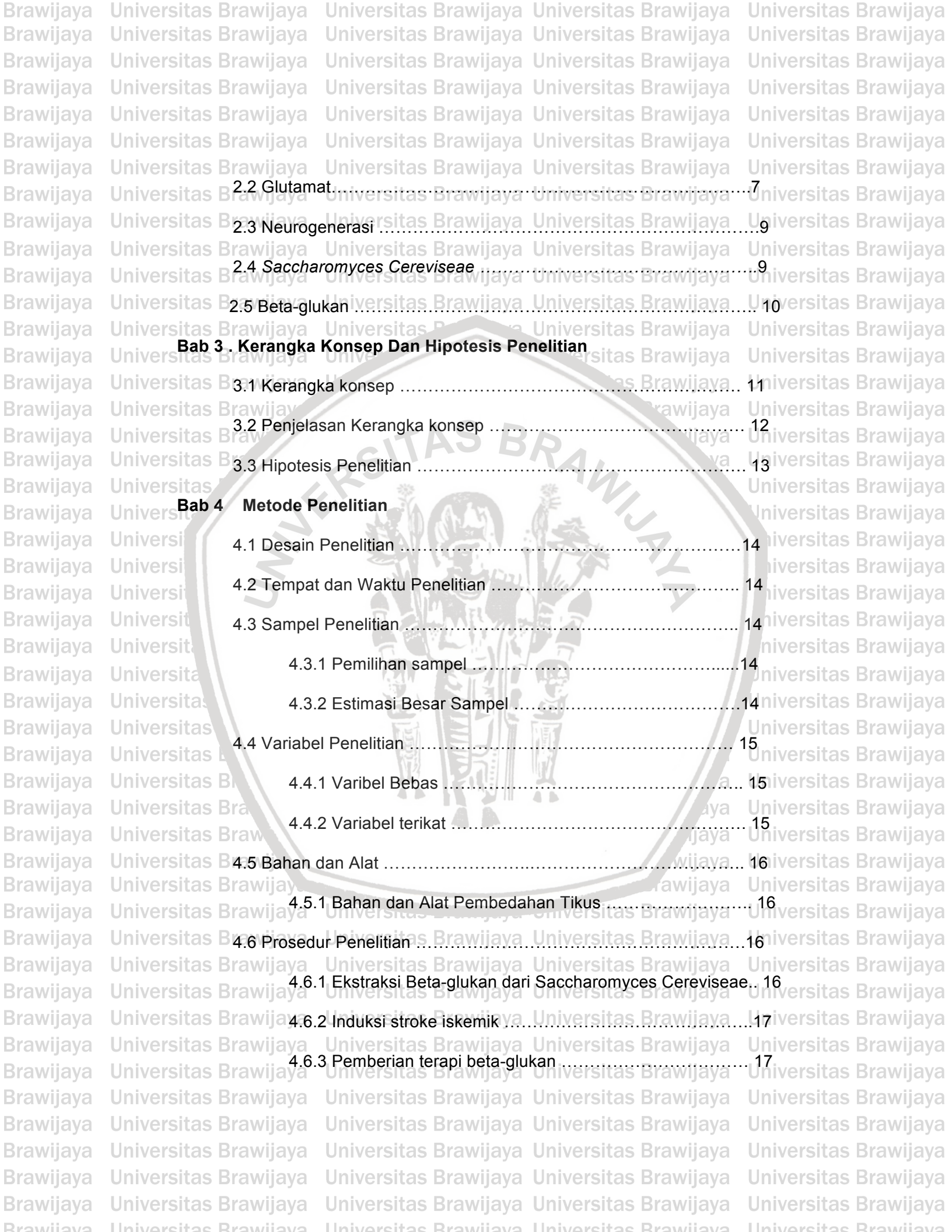
MALANG

2018

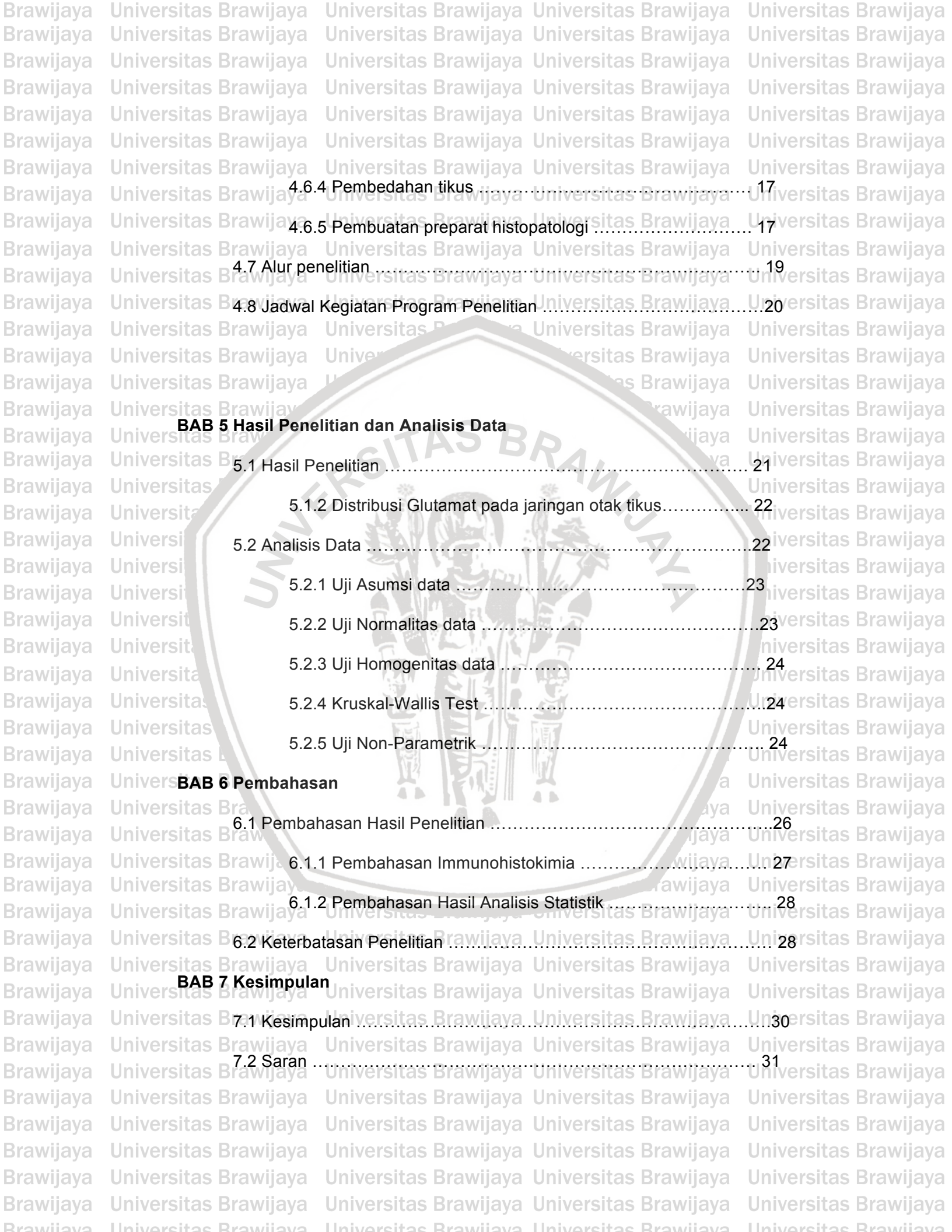


Daftar isi

Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	xii
Daftar Tabel	xiii
Daftar Singkatan	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 Tinjauan Pustaka	
2.1 Stroke iskemik	5
2.1.1 Definisi	5
2.1.2 Prevalensi Stroke	6
2.1.3 Faktor Resiko	7



2.2 Glutamat.....	7
2.3 Neurogenerasi	9
2.4 <i>Saccharomyces Cereviseae</i>	9
2.5 Beta-glukan	10
Bab 3 . Kerangka Konsep Dan Hipotesis Penelitian	
3.1 Kerangka konsep	11
3.2 Penjelasan Kerangka konsep	12
3.3 Hipotesis Penelitian	13
Bab 4 Metode Penelitian	
4.1 Desain Penelitian	14
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	14
4.3 Sampel Penelitian	14
4.3.1 Pemilihan sampel	14
4.3.2 Estimasi Besar Sampel	14
4.4 Variabel Penelitian	15
4.4.1 Varibel Bebas	15
4.4.2 Variabel terikat	15
4.5 Bahan dan Alat	16
4.5.1 Bahan dan Alat Pembedahan Tikus	16
4.6 Prosedur Penelitian	16
4.6.1 Ekstraksi Beta-glukan dari <i>Saccharomyces Cereviseae</i> ..	16
4.6.2 Induksi stroke iskemik	17
4.6.3 Pemberian terapi beta-glukan	17



4.6.4 Pembedahan tikus	17
------------------------------	----

4.6.5 Pembuatan preparat histopatologi	17
--	----

4.7 Alur penelitian	19
---------------------------	----

4.8 Jadwal Kegiatan Program Penelitian	20
--	----

BAB 5 Hasil Penelitian dan Analisis Data

5.1 Hasil Penelitian	21
----------------------------	----

5.1.2 Distribusi Glutamat pada jaringan otak tikus	22
--	----

5.2 Analisis Data	22
-------------------------	----

5.2.1 Uji Asumsi data	23
-----------------------------	----

5.2.2 Uji Normalitas data	23
---------------------------------	----

5.2.3 Uji Homogenitas data	24
----------------------------------	----

5.2.4 Kruskal-Wallis Test	24
---------------------------------	----

5.2.5 Uji Non-Parametrik	24
--------------------------------	----

BAB 6 Pembahasan

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian	26
---------------------------------------	----

6.1.1 Pembahasan Immunohistokimia	27
---	----

6.1.2 Pembahasan Hasil Analisis Statistik	28
---	----

6.2 Keterbatasan Penelitian	28
-----------------------------------	----

BAB 7 Kesimpulan

7.1 Kesimpulan	30
----------------------	----

7.2 Saran	31
-----------------	----

DAFTAR PUSTAKA

32

LAMPIRAN

35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Patofisiologi stroke.....

6

Gambar 2.2 Struktur Glutamat

8

Gambar 2.3 NMDA dan AMPA reseptor

9

Gambar 2.4 *Saccharomyces Cereviseae*

10

Gambar 5.1 Pengecatan Immunohistokimia Glutamat

21

Gambar 5.2 Grafik rerata distribusi glutamate

22

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Tabel Rerata Distribusi Glutamat

22

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**NOVEL TERAPI STROKE ISKEMIK BERBASIS PENGHAMBATAN CASCADE
GLUTAMAT MENGGUNAKAN EKSTRAK BETA-GLUKAN DARI *Saccharomyces
cerevisiae* PADA TIKUS WISTAR MODEL STROKE ISKEMIK**

Oleh:

Muhammad Unzila Rafsi Zulfikri

NIM 155070101111090

Memperoleh penghargaan *Gold Medal* dalam *International Invention & Innovative*

***Competition* 2018 pada 18 – 22 Oktober 2018**

Pembimbing I,

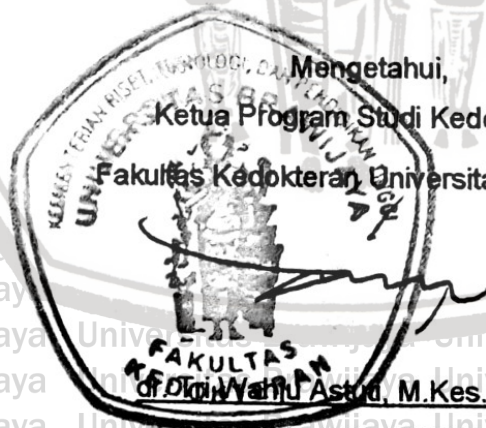


Wibi Riawan, S.Si, M.Biomed

NIP. 19770131 2005011001

Mengetahui,

**Ketua Program Studi Kedokteran,
Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya**



Dr. Wahyu Astuti, M.Kes., Sp.P(K)

NIP. 19631022 199601 2001

ABSTRAK

Rafsi,Unzila. 2018. **Novel Terapi Stroke Iskemik Berbasis Penghambatan Cascade Glutamat Menggunakan Ekstrak Beta-glukandari *Saccharomyces sp* pada Tikus Wistar Model Stroke Iskemik** Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Wibi Riawan S.si, M.Biomed.

Stroke iskemik merupakan suatu penyakit defisit neurologis yang disebabkan oleh gangguan pembuluh darah otak dan dapat menyebabkan mortalitas dan morbiditas yang tinggi. stroke iskemik menyebabkan nekrosis sel pada otak dengan salah satu jalur mekanismenya melalui induksi kaskade glutamate secara massif dan tidak terkontrol. Induksi glutamate secara massif ini dapat memperluas dan memperparah kerusakan yang diakibatkan stroke iskemik. *Saccharomyces cerevisiae* adalah khamir uniseluler yang merupakan galur potensial penghasil *Beta-glukan* yang berpotensi menghambat kaskade glutama t dan berdiferensiasi menjadi neuron sehingga dapat mengembalikan struktur dan fungsional otak. Tujuan dari penelitian ini adalah membuktikan potensi ekstrak beta-glukandari *S. cerevisiae* dalam menghambat distribusi glutamate dan memperbaiki histopatologi jaringan otak pada tikus model stroke iskemik. Penelitian ini adalah eksperimen murni dengan metode Randomized Post Test Only Controlled Group Design. Penelitian ini dilakukan secara in vivo menggunakan tikus model stroke iskemik yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3. Kelompok kontrol positif dan perlakuan diinduksi stroke iskemik dengan metode Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO). Kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 diterapi dengan larutan *Beta-glukan* dari ekstrak *Saccaromyces cerevisiae* 18, 36, 72 mg/kgBB setelah penginduksian selama 2 minggu. Tikus dibedah untuk pemeriksaan Ekspresi Glutamat dan pembuatan histopatologi jaringan darah pada minggu pertama dan kedua setelah terapi dilaksanakan. Hasil pengukuran Immunohistokimia untuk pengecatan glutamat diharapkan Setelah Kaskade glutamat dihambat akan menurunkan angka kerusakan yang diakibatkan oleh stroke iskemik. Dengan demikian, beta-glukan berpotensi menjadi terapi stroke iskemik yang efektif.

Kata kunci : Stroke Iskemik, *Beta-glukan*, Neuroregenerasi, Glutamat

ABSTRAC

Rafsi, Unzila. 2018. Novel Therapy of Ischemic Stroke Based on Inhibition of Glutamate Cascade Using Beta-Glucan Extract from *Saccharomyces sp* in Wistar Rats Ischemic Stroke Model. Final Task, Medical Study Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Advisors: (1) Wibi Riawan S.si, M.Biomed.

Ischemic stroke is a neurological deficit disease caused by a brain blood vessel disorder and can cause high mortality and morbidity. Ischemic stroke causes cell necrosis in the brain with one of its pathways through massive and uncontrolled induction of the glutamate cascade. This massive glutamate induction can expand and worsen the damage caused by ischemic stroke. *Saccharomyces cerevisiae* is a unicellular yeast which is a potential Beta-glucan-producing strain that has the potential to inhibit glutamate cascade and differentiate into neurons so that it can repair brain structure and function. The purpose of this study is to prove the potential of beta-glucan extract of *S. cerevisiae* in inhibiting glutamate distribution and improving histopathology of brain tissue in ischemic stroke mice. This research is a pure experiment with the Randomized Test Only Controlled Group Design method. This study was conducted in vivo using ischemic stroke models divided into 5 groups: negative control, positive control, treatment 1, treatment 2, and treatment 3. Positive control group and ischemic stroke-induced treatment with *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO) method. Treatment groups 1, 2 and 3 were treated with Beta-glucan extract from *Saccaromycesses cerevisiae* 18, 36, 72 mg / kgBW after induction for 2 weeks. Mice were dissected for examination of glutamate expression and histopathology of blood tissue in the first and second weeks after therapy was carried out. The results of immunohistochemical measurements for glutamate staining are expected after the glutamate cascade is inhibited will reduce the number of damage caused by ischemic stroke. Thus, beta-glucan has the potential to be an effective ischemic stroke therapy.

Keywords: Ischemic stroke, Beta-glucan, Neuroregeneration, Glutamate

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dewasa ini banyak penyakit yang masih belum ditemukan cara pengobatan yang optimal sehingga menyumbangkan angka kematian yang cukup signifikan.

Penyakit penyakit tersebut antara lain jantung koroner, stroke, ISPA dan penyakit paru obstruktif kronik. Secara Global, 15 juta orang terserang stroke setiap tahunnya, satu pertiga meninggal dan sisanya mengalami kecatatan permanen (stroke forum, 2015). Stroke merupakan penyakit kedua paling berbahaya di dunia.

Berdasarkan data statistik WHO tahun 2012, stroke mengakibatkan kematian 6,7 juta jiwa di dunia (WHO, 2012). Di kawasan Asia tenggara terdapat 4.4 juta orang mengalami stroke menurut who tahun 2010. Di Indonesia, stroke merupakan penyebab kematian pada 1.236.825 jiwa selama tahun 2013 dan merupakan penyebab kematian nomor 3 setelah jantung koroner dan tuberculosis (Badan Litbangkes Kementerian Kesehatan RI, 2013).

Stroke adalah suatu penyakit defisit neurologis akut yang disebabkan oleh gangguan pembuluh darah otak. Stroke dibagi menjadi dua yaitu stroke hemoragik dan stroke iskemik. (Ma et. Al, 2015), Sekitar 80 % kasus stroke merupakan stroke iskemik (Durukan et. al., 2007). Stroke hemoragik disebabkan karena pendarahan dan kebocoran pada pembuluh darah yang menyebabkan gumpalan darah di otak dan menekan sel-sel otak sehingga menyebabkan kematian sel-sel otak.

Sedangkan stroke iskemik disebabkan karena sirkulasi darah ke otak yang membawa nutrisi dan oksigen tersumbat oleh gumpalan darah (*thrombus*) atau

lemak dan menyebabkan pembengkakan pembuluh darah yang menekan sel-sel otak disekitarnya. (Ma et. al, 2015) .

Faktor resiko dari stroke dibagi menjadi 2 yaitu faktor resiko yang dapat diubah dan yang tidak dapat diubah. Menurut AHA tahun 2015 Faktor-faktor yang tidak dapat diubah terdiri atas faktor genetik dan ras, usia, jenis kelamin, dan riwayat stroke sebelumnya. Sedangkan Faktor risiko stroke yang dapat diubah adalah obesitas (kegemukan), hipertensi, hiperlipidemia, kebiasaan merokok, penyalahgunaan alkohol dan obat, dan pola hidup tidak sehat. Menurut penelitian yang dilakukan INTERHEART (Studi Global Model Case-Control) pada tahun 2007 – 2010 di 22 negara , menyebutkan bahwa faktor resiko terbesar dari stroke adalah hipertensi. Pasien stroke yang menderita hipertensi dengan tekanan darah 160/90 mmHg mempunyai resiko yang lebih besar (O'Donnell, 2010).

Penelitian akibat serangan stroke pada tingkat sel ditemukan fakta bahwa ketika terjadi stroke, di otak terjadi kaskade glutamat yang mengakibatkan glutamat meningkat di celah sinaps dan merangsang pembukaan ion channel sehingga Ca^{2+} secara berlebihan masuk kedalam sel dan menginduksi kematian sel (*exitotoxicity*). Namun selain itu sel merespon dengan beberapa mekanisme neuroprotektif untuk melindunginya, salah satunya adalah menyekresikan *growth factor* neurotropin. (Deb et. al., 2009) .

Daerah yang terkena stroke iskemik akan dibagi menjadi 2 daerah yaitu daerah daerah iskemik sentral dan penumbra skematik. Daerah iskemik sentral adalah daerah yang mengalami nekrosis atau pusat dari lesi stroke yang bersifat

irreversible. Daerah penumbra skematik adalah daerah yang belum terkena dampak dari nekrosis jaringan dan bersifat reversible. Daerah penumbra skematik ini pertama kali didefinisikan oleh Astrup pada tahun 1981 sebagai jaringan otak diperfusi pada tingkat dalam ambang gangguan fungsional dan integritas morfologi, yang memiliki kapasitas untuk pulih jika perfusi ditingkatkan. Daerah ini menjadi fokus untuk deteksi akurat dalam mengidentifikasi pasien yang memiliki probabilitas terapi yang baik dan menjadi fokus terapi pada penelitian kali ini (Karger AG, 2009).

Saat ini, terapi yang terbaik untuk stroke iskemik adalah menggunakan *recombinant tissue Plasminogen Activation* (rtPA). rtPA adalah satu-satunya obat yang disetujui yang telah menunjukkan manfaat yang signifikan pada pasien stroke ketika diberikan secara intravena kurang dari 4,5 jam setelah stroke. Namun kekurangan pada terapi ini adalah penggunaannya yang terbatas dan berbagai faktor resiko yang tinggi seperti perdarahan yang dapat menyebabkan kematian. (Fugate et al, 2015). Jadi peneliti ingin meneliti terapi alternatif yang relatif aman dan mempunyai sedikit resiko dengan menggunakan bahan alami.

Saccharomyces cerevisiae adalah mikrobia fakultatif yang menggunakan sistem aerob maupun anaerob untuk memperoleh energi dari proses pemecahan glukosa (Kartika dkk., 1992). *S. cerevisiae* termasuk khamir uniseluler yang tersebar luas di alam dan merupakan salah satu penghasil terbanyak beta-glukan, karena sebagian besar dinding selnya tersusun atas beta-glukan (Lee et al., 2001).

Kandungan Beta-glukan dalam *S. cerevisiae* memiliki potensi memobilisasi stem sel ke area yang mengalami kerusakan dengan meningkatkan GCS-F (*Granulocyte-colony stimulating factor*). GCS-F mampu meningkatkan pelepasan

HSCs (*Hematopoietic Stem cells*) yang terdapat pada *bone marrow* sehingga dapat berdeferensiasi menjadi sel-sel penyusun vaskuler, saraf dan sel-sel otak. (Rahayu et. al., 2015). Selain itu, Kandungan beta-glukan dalam *S. cerevisiae* memiliki potensi untuk meningkatkan kadar neurotropin di otak dan menurunkan glutamat. *Saccharomyces cerevisiae* memiliki potensi dalam mengobati stroke iskemik yang berperan dalam menurunkan kadar glutamat sehingga memiliki potensi yang besar dalam pengobatan stroke iskemik. Diharapkan beta-glukan dapat menjadi sebuah alternatif pengobatan yang mudah dijangkau terutama bagi masyarakat Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian terapi ekstrak beta-glukan dari *S. cerevisiae* dapat menurunkan distribusi glutamat di jaringan otak pada tikus model stroke iskemik?

1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui potensi beta-glukan dari *S. cerevisiae* dalam menurunkan distribusi glutamat di jaringan otak pada tikus model stroke iskemik?

1.4 Manfaat

Manfaat Aplikatif :

Dapat dijadikan sebagai pertimbangan perusahaan industri obat untuk menciptakan suatu alternatif baru dalam pengembangan terapi regeneratif Stroke Iskemik menggunakan beta-glukan dari *S. cerevisiae*.

BAB 2

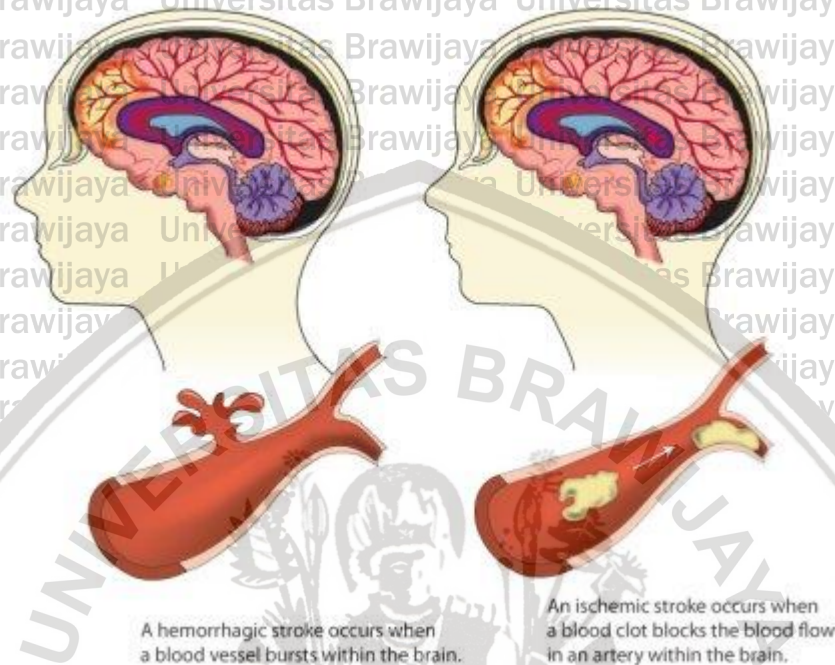
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Stroke Iskemik

2.1.1 Definisi

Stroke adalah kondisi gejala klinis yang cepat berupa gangguan fungsi serebral dengan *symtomp* yang berlangsung selama 24 jam. Secara patogenik, stroke melibatkan sekelompok proses heterogen. *Vessel occlusions* (ischemic stroke) menyumbang 85% dari semua stroke, sementara perdarahan intraserebral primer (stroke hemoragik) sebesar 15 %. Stroke Iskemia juga didefinisikan sebagai penurunan aliran darah yang cukup untuk mengubah fungsi sel normal. Jaringan otak sangat peka terhadap iskemia, sehingga bahkan periode iskemik singkat ke neuron dapat memulai serangkaian peristiwa kompleks yang pada akhirnya mungkin memuncak pada kematian seluler (Woodruff et al., 2011) .

Ketika stroke menyerang, bagian dari parenkim otak (inti) yang tidak mendapatkan nutrisi akan mengalami kematian dan daerah di luar inti secara kolateral membentuk daerah dengan potensi untuk dapat dipulihkan (penumbra). (Deb et. Al.,2009). Neurotrophin (NT) adalah *growth factor* yang sangat penting dalam petahanan dan pemeliharaan sel saraf. Ketika stroke menyerang, terjadi glutamat cascade yang diikuti oleh ekspresi NT sebagai respon fisiologis neuroprotektif dari ancaman kematian sel selanjutnya. (Deb et. Al.,2009) .



Gambar 2.1 Patofisiologi stroke iskemik

2.1.2 Prevalensi stroke

Menurut Riskesdas tahun 2013, Prevalensi stroke di Indonesia berdasarkan diagnosis tenaga kesehatan sebesar 7 per mil dan yang terdiagnosis tenaga kesehatan atau gejala sebesar 12,1 per mil. Prevalensi Stroke berdasarkan diagnosis nakes tertinggi di Sulawesi Utara (10,8%), diikuti DI Yogyakarta (10,3%), Bangka Belitung dan DKI Jakarta masing-masing 9,7 per mil. Prevalensi Stroke berdasarkan 92 terdiagnosis nakes dan gejala tertinggi terdapat di Sulawesi Selatan (17,9%), DI Yogyakarta (16,9%), Sulawesi Tengah (16,6%), diikuti Jawa Timur sebesar 16 per mil. Prevalensi stroke cenderung lebih tinggi pada masyarakat dengan pendidikan rendah baik yang didiagnosis nakes (16,5%) maupun diagnosis nakes atau gejala (32,8%). Prevalensi stroke di kota lebih tinggi dari di desa, baik

berdasarkan diagnosis nakes (8,2%) maupun berdasarkan diagnosis nakes atau gejala (12,7%). Prevalensi lebih tinggi pada masyarakat yang tidak bekerja baik yang didiagnosis nakes (11,4%) maupun yang didiagnosis nakes atau gejala (18%).

Prevalensi stroke berdasarkan diagnosis atau gejala lebih tinggi pada kuintil indeks kepemilikan terbawah dan menengah bawah masing masing 13,1 dan 12,6 per mil.

2.1.3 Faktor Resiko

Faktor resiko dari stroke dibagi menjadi 2 yaitu faktor resiko yang dapat diubah dan yang tidak dapat diubah. Faktor-faktor yang tidak dapat diubah terdiri atas faktor genetik dan ras, usia, jenis kelamin, dan riwayat stroke sebelumnya.

Sedangkan Faktor risiko stroke yang dapat diubah adalah obesitas (kegemukan), hipertensi, hiperlipidemia, kebiasaan merokok, penyalahgunaan alkohol dan obat, dan pola hidup tidak sehat. (AHA, 2015)

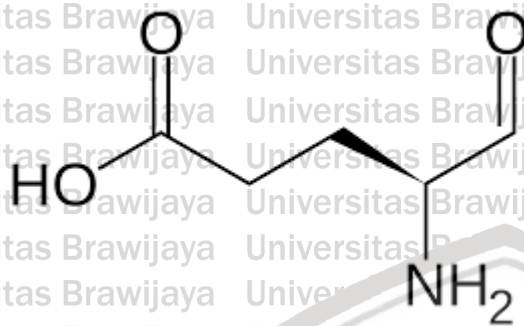
2.2 Glutamat

Glutamat merupakan salah satu sel neurotransmitter otak. Glutamat berperan sebagai *major excitatory* transmitter di otak, dan GABA sebagai *major inhibitory* transmitter di otak. Glutamat sendiri di reuptake di astrocyte yang kemudian diubah menjadi glutamin dan akan di lepaskan ke ruang ekstraseluler.

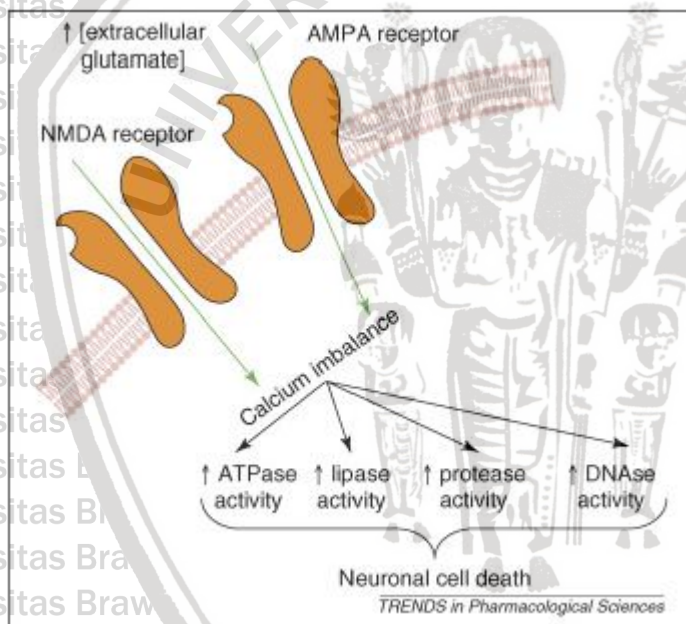
Pada Stroke iskemik terjadi penurunan suplai aliran darah di otak yang diikuti penurunan ATP. Deplesi akut ATP memicu kerusakan neuronal dari akumulasi L-glutamate yang berlebihan. Proses ini dinamakan *excitotoxicity*, melibatkan aktivasi reseptor-reseptor glutamate, akumulasi sitosol Ca^{2+} , aktivasi kaskade yang dipicu

oleh Ca^{2+} , generasi radikal bebas oksigen, dan kegagalan mitokondria. Akibatnya, beberapa fungsi terganggu atau menurun. kebutuhan energi untuk bahan bakar pompa Na^+ , K^+ , gradien ion tidak dapat dipertahankan (*maintained*) dan neurons menjadi didepolarisasi. Ini menimbulkan hilangnya “*neuronal excitability*” dan pembebasan (*release*) *glutamat* secara besar-besaran (masif). Kekurangan energi juga mengurangi *uptake* glutamate yang dilakukan oleh astrosit. Timbunan (*build-up*) *glutamate* yang berlebihan di sinaps, mempercepat kematian nekrotik dari berbagai neuron yang merupakan target sinaps. Akibat kegagalan energy pada mulanya fungsional dan berpotensi bersifat *reversible*. (Anurogo , 2014) .

Reseptor yang berperan dalam patofisiologi stroke iskemik adalah NMDA dan AMPA. Reseptor ini diekspresikan oleh astrosit dan oligodendrosit. Selama fase akut setelah stroke, overaktivasi sinyal dengan reseptor glutamat ini bersifat neurotoksik . Namun, beberapa aspek sinyal glutamergik ini juga bisa bermanfaat bagi otak yang terkena nekrosis. Contohnya , aktivasi dari reseptor NMDA yang diberikan dapat menyebabkan kelangsungan hidup sel. Aktivasi reseptor NMDA membuat kelangsungan hidup sel oleh aktivasi kinase CaM dan Ras-ERK1 / 2 (ekstraseluler signal-regulated kinase) dan selanjutnya ekspresi BDNF (faktor neurotropik yang diturunkan dari otak). Sebaliknya, aktivasi NMDA ekstrasinaps reseptor menonaktifkan jalur CREB dan menurunkan regulasi BDNF. Pada hewan yang kami teliti penyerapan glutamate agar menjaga glutamat ekstraseluler di bawah tingkat toksik diperankan oleh GLAST dan GLT-1 (pengangkut EAAT2) .



Gambar 2.2 Struktur Neurotransmitter Glutamat



Gambar 2.3 NMDA dan AMPA reseptor

2.3 Neuroregenerasi

Neuroregenerasi adalah proses dimana neuron dihasilkan dari sel-sel induk saraf dan sel-sel progenitor. Terbukti bahwa neuroregenerasi berlangsung hingga dewasa pada mamalia termasuk manusia. Neuroregenerasi aktif pada otak 4 mamalia pada dua bagian otak yaitu zona subventricular (SVZ) dari ventrikel lateral

dan subgranular zona (SGZ) dari dentate gyrus hipokampus (DG). (Faigle et. al., 2013)

2.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae termasuk khamir uniseluler yang tersebar luas di alam bersifat nonpatogenik dan non-toksik (Buckle dkk., 2007) *Saccharomyces cerevisiae* merupakan galur potensial penghasil beta-glukan, karena sebagian besar dinding selnya tersusun atas beta-glukan (Lee et al., 2001). Dalam sel *Saccharomyces cerevisiae* didapatkan 98 % (1,3 dan 1,6) beta-glukan dari berat kering jamur tersebut. Bahan inilah yang dipakai sebagai mobilisasi HCSs dari bone marrow ke otak serta menghambat produksi yang massif dari glutamat dan mencegah meluasnya area iskemik pada otak.

Kingdom: Fungi

Filum: Ascomycota

Subfilum: Saccharomycotina

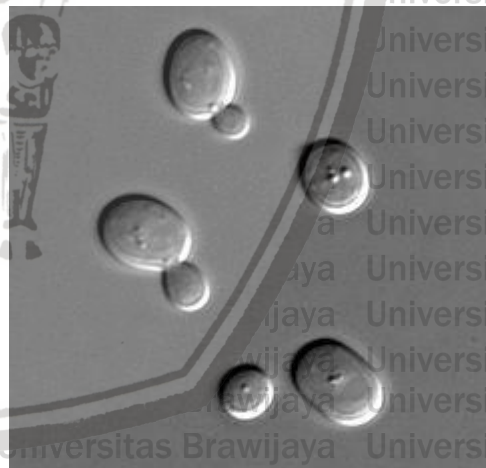
Kelas: Saccharomycetes

Ordo: Saccharomycetales

Famili: Saccharomycetaceae

Genus: *Saccharomyces*

Spesies: *S. cerevisiae*



Gambar 2.4 *Saccharomyces Cerevisiae*

2.5 β -glucan

β -glucan adalah polimer dari gugus glukosa yang terkandung pada beberapa jenis bakteri, jamur, dan tanaman (Petravic-Tominac et al., 2010; Bacic et al., 2009).

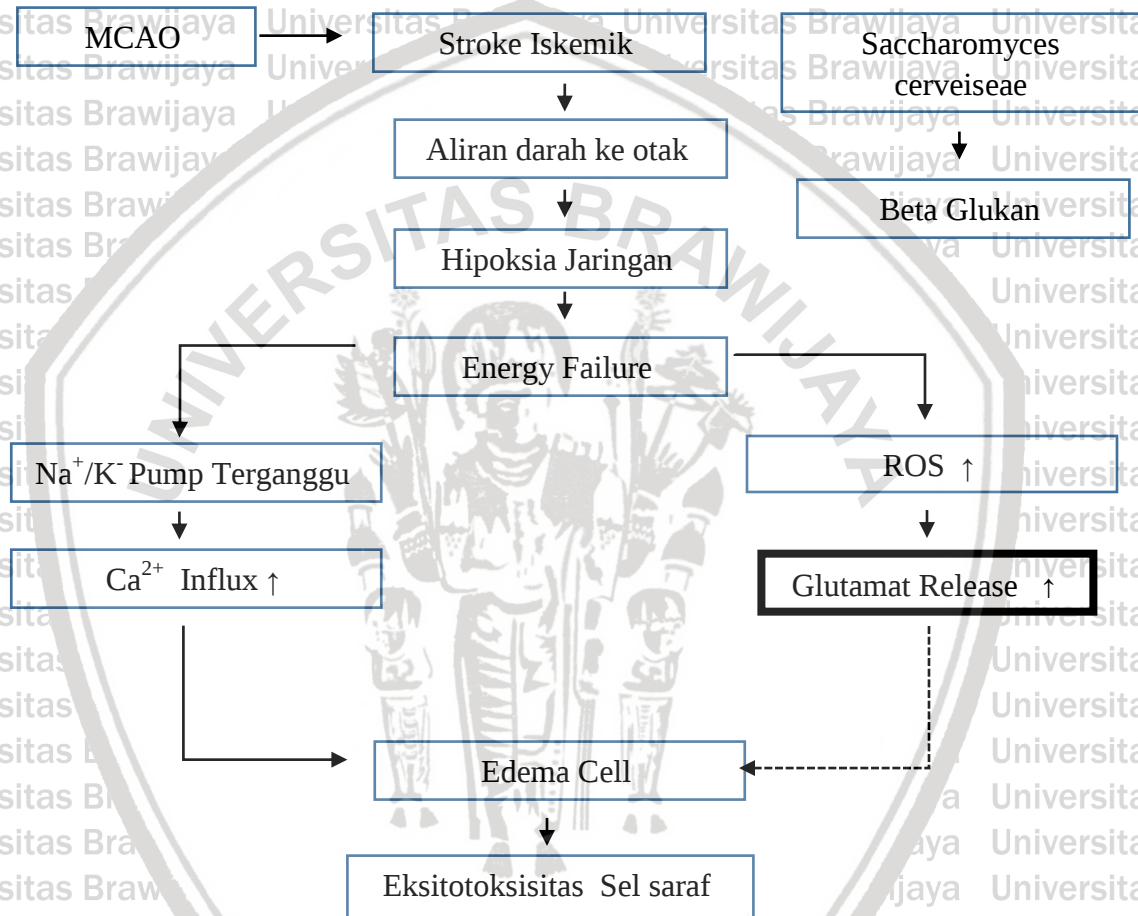
Monomer glukosa polimer alam ini, dihubungkan oleh suatu ikatan glikosidik β . Beta-glukan mampu meningkatkan GCS-F (*Granulocyte-colony stimulating factor*) yang memobilisasi HSCs ke jaringan yang membutuhkan.

Beta glucan memiliki efek antioxidant yang signifikan tinggi dibandingkan dengan polimer lain, tergantung dari ekstrak, metode dan konsentrasi yang diberikan. Secara khusus B-glucan yang diekstrak memiliki aktivitas penangkalan radikal bebas yang tinggi yang mampu menurunkan aktivitas ROS dan mencegah kerusakan jaringan iskemik secara permanen (Kofuji, 2012) .

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka konsep



Keterangan :

Glutamat Release ↑ : Variabel Yang diteliti

Edema Cell : Efek Meningkatkan

Ekstotoksitas Sel saraf : Efek Menghambat

3.2. Penjelasan kerangka konsep

Stroke iskemik yang kami lakukan dipicu oleh metode MCAO (*Middle cerebral artery occlusion*) pada arteri karotis. Suplai Darah dan O₂ menjadi tidak adekuat sehingga menimbulkan hipoksia jaringan otak. Hipoksia jaringan otak mengakibatkan kegagalan energi dan memicu hilangnya homeostasis sel ion, asidosis, peningkatan kadar kalsium intraseluler, excitotoxicity, toksisitas radikal bebas, generasi produk asam arakidonat, sitotoksitas sitokin-dimediati, aktivasi komplemen, gangguan penghalang darah-otak (BBB), aktivasi sel glial, dan infiltrasi leukosit. Segera setelah pengurangan atau penghentian aliran darah otak, pompa seluler yang bergantung pada energi gagal karena penurunan dalam generasi ATP yang bergantung pada glukosa, yang menghasilkan aliran banyak spesies ionik ke dalam sel. Hal ini menyebabkan pembengkakan seluler melalui osmosis dan depolarisasi seluler. Ion kalsium (Ca²⁺) memasuki sel melalui saluran ion yang bergantung pada tegangan dan ligand-gated, menghasilkan aktivasi sejumlah protease, kinase, lipase, dan endonuklease, memicu jalur apoptosis intrinsik dan berakhir dengan kematian sel. Selain itu otak juga merespon dengan mengeluarkan Glutamat yang dihasilkan melalui peningkatan aktivitas ROS (*Reactive oxidative stress*), yang merupakan neurotransmitter rangsang utama di otak, terakumulasi dalam ruang ekstraseluler mengikuti iskemia, dan mengaktifkan reseptornya. Reseptor yang teraktivasi dapat melalui NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) atau AMPA (α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate). Aktivasi reseptor glutamat terjadi secara masif dan menginduksi Ca influx yang

memperparah kerusakan jaringan pada otak. Semakin banyak glutamate yang

3.3. Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah pemberian terapi ekstrak beta-glukan dari *S. cerevisiae* dapat menurunkan distribusi glutamat di jaringan otak pada tikus model stroke iskemik.

keluar dapat mengakibatkan kematian sel yang semakin meluas.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (true experimental design) di laboratorium secara in vivo menggunakan rancangan Randomized Post Test Only Controlled Group Design.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi FK UB untuk pemeliharaan hewan coba dan pembedahannya dan di Laboratorium Biomedik FK UB untuk dan pemeriksaan variabel penelitian.

4.3. Sampel Penelitian

4.3.1 Pemilihan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus Wistar

1. Kriteria inklusi: jenis kelamin jantan, umur 7-9 minggu, berat badan 150-170 gram, belum mengalami perlakuan apapun atau belum mendapat asupan bahan kimia apapun, dan dalam keadaan sehat dengan ditandai bergerak aktif serta bulu tidak rontok.
2. Kriteria eksklusi: tikus yang mati selama perlakuan dan tidak sakit.

4.3.2 Estimasi Besar Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus wistar yang diinduksi metode middle cerebral artery occlusion (MCAO). Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut :

$$p(n-1) > 15 \quad p : \text{jumlah perlakuan}, n : \text{jumlah ulangan}$$

Pada penelitian ini $p = 4$ sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$4(n-1) > 15$$

$$n-1 > 15:4, n > 4,75$$

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan adalah 5

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah terapi dengan larutan ekstrak Beta-glukan yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (tikus wistar yang tidak diinduksi stroke iskemik dan tidak diterapi)
2. Kelompok 2: kelompok kontrol positif (tikus yang diinduksi iskemik tanpa diberikan terapi)
3. Kelompok 3: tikus yang diinduksi stroke dengan diberikan terapi Beta-glukan 18 mg/kgbb
4. Kelompok 4: tikus yang diinduksi Stroke dengan diberikan terapi Beta-glukan 36 mg/kgbb
5. Kelompok 5: tikus yang diinduksi Stroke dengan diberikan terapi Beta-glukan 72 mg/kgbb

4.4.2 Variabel Tergantung/ Terikat

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah :

1. Distribusi Glutamat

4.5 Bahan dan Alat

4.5.1 Bahan dan Alat Pembedahan Tikus

Pada penelitian ini digunakan sampel berupa ginjal tikus wistar. untuk menginduksi stroke dibutuhkan hecting set dan ketamine 1 botol . Untuk uji *invivo* dibutuhkan alat dan bahan berupa kandang tikus, sekam , sonde oral, xylazine-ketamin, Immunohistokimia kit anti glutamat, dan *hecting* set. Selain itu untuk pengukuran parameter neurotropin menggunakan metode imunohistokimia yang membutuhkan alat dan bahan seperti mikropipet, tabung sentrifugasi, sentrifugator, inkubator CO2, penangas air, mikroskop, kamera untuk foto mikroskop, sampel dengan konsentrasi, *fosfat buffer saline* (PBS) 1 x pH 7.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Ekstraksi Beta-glukandari *Saccharomycess cereviseae*

Saccharomyces cerevisiae disentrifugasi lalu difiltrasi dengan *lysis buffer* 5 kali. Kemudian diresuspensi dengan suhu 0°C. Dinding sel dilisiskan dengan *glass bead* di omnimixer selama 30 detik, kemudian diseparasi dengan sentrifugasi 3000 g selama 10 menit kemudian diambil fraksi dinding sel (pelet) dan fraksi sitoplasma larut (supernatan). Pelet diambil dan dicuci dengan akuades dan dilakukan sentrifugasi dingin 0°C 3000g selama 3 menit sebanyak masing-masing sebanyak 5 kali berurutan. Pelet dicuci dengan NaCl 5% dan disentrifugasi dingin dingin 0°C

3000g selama 3 menit sebanyak masing-masing sebanyak 5 kali berurutan. Pelet dicuci dengan NaCl 5% dan disentrifugasi dingin dingin 0°C 3000g selama 3 menit sebanyak masing-masing sebanyak 5 kali berurutan. Pelet dicuci dengan NaCl 5% dan disentrifugasi dingin dingin 0°C 3000g selama 3 menit sebanyak masing-masing sebanyak 5 kali berurutan. Pellet disimpan dalam freezer -40°C

4.6.2 Induksi Stroke Iskemik

Metode penginduksian stoke iskemik dilakukan dengan metode middle cerebral artery occlusion. Tikus dibius dengan Xylazine-Ketamin (*double anestesi*).

Setelah itu ligasi dengan cara membuat isisi sebesar 10 mm untuk menutup jalan arteri cerebral kanan dengan menjahit arteri menggunakan benang jahit. Setelah 2x 50 menit jahitan

4.6.3 Pemberian Terapi Beta-glukan Dari Ekstrak Kasar *Saccaromyces Cerevisae*

Saccharomyces cerevisiae dengan banyak dosis sebanyak 18 mg/kgBB; 36 mg/kgBB; 72 mg/kgBB untuk setiap kelompok A, B dan C kemudian dilarutkan dalam 5 cc aquades. Pemberian terapi diberikan ke tikus memakai sonde makan tikus.

4.6.4 Pembedahan Tikus

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan injeksi dengan ketamine. Taruh tikus yang sudah diberi anestesi di atas steroform, fiksasi, lalu bedah mulai dari perut. Potong bagian kepala kemudian mengambil sampel dari otak kanan dan jaringan darah.

4.6.5 Pengukuran Distribusi Glutamat

Penyakit neurodegeneratif seringkali dikarakterisasi dengan penumpukan glutamat dan yang berlebih. Lebih sedikitnya glutamat dapat digunakan sebagai indikator bahwa terjadi pemulihan sel-sel pada otak dan diukur dengan metode kolorimetri.

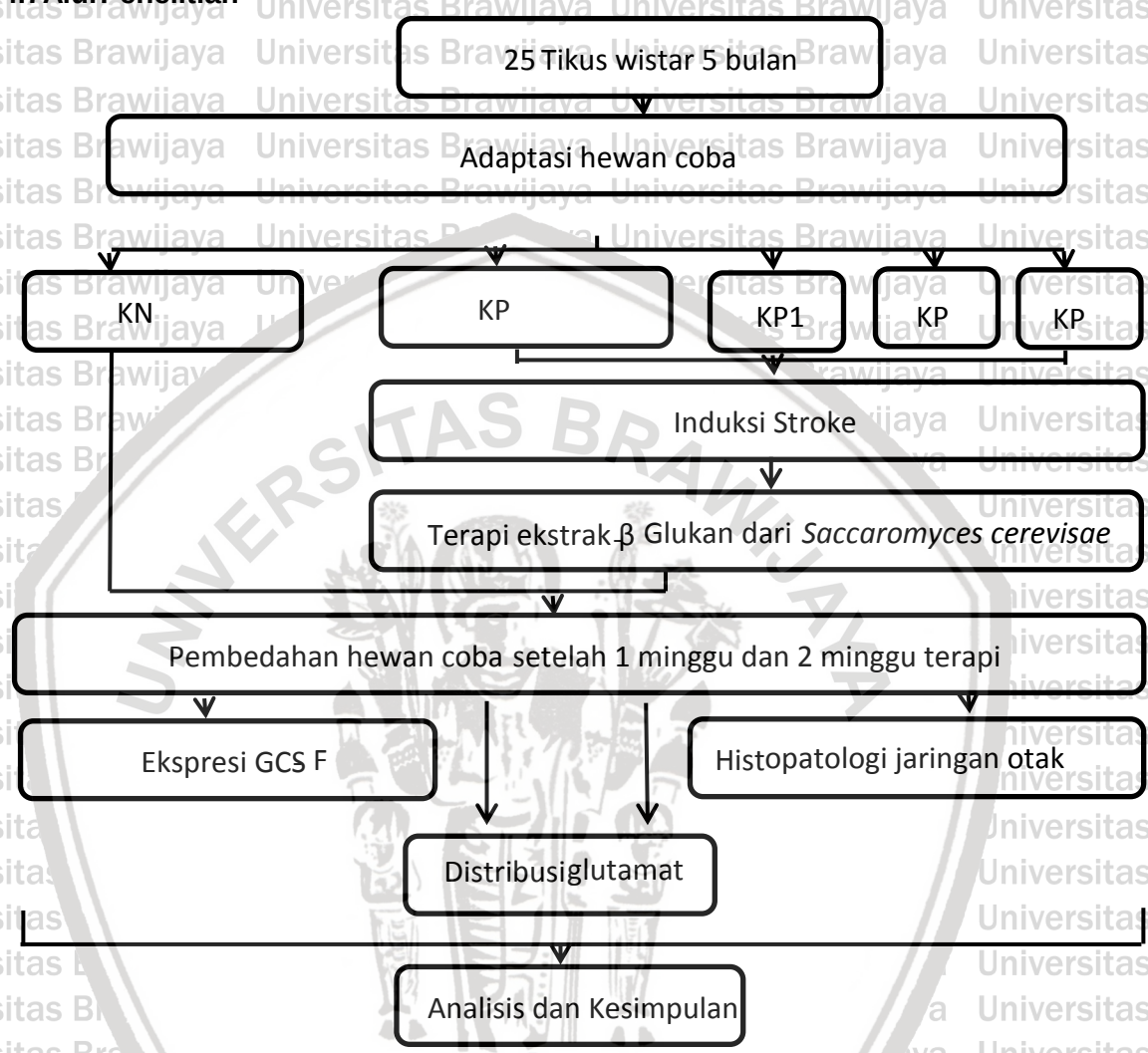
4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Anatomi Bagian Jaringan Otak

Pertama, proses *embedding* dengan memasukkan bagian organ dalam parafin cair yang telah disiapkan dalam wadah. Setelah beberapa jam maka parafin akan memadat dan bagian organ ada dalam blok parafin. Kedua, *Coating Object Glass*.

Prosesnya adalah melakukan perendaman object Glass menggunakan alkohol kadar 70% selama 24 jam, pengeringan, pencelupan kedalam 0,5% gelatin hangat.

Ketiga, pembuatan preparat organ, dengan mengatur ketebalan irisan diatas 10 μm yang kemudian organ diiris dengan ukuran 4 μm lalu dimasukkan ke dalam air suhu ruangan. asil irisan dipindah ke air hangat 3 - 400. Potongan yang bagus dikeringkan dan diletakkan diatas hotplate bersuhu 3 -40 hingga kering. Langkah terakhir adalah preparat disimpan kedalam inkubator suhu 9 ukuran 36-400C selama 1 hari. Kemudian diberi cat dengan warna Hematoxilin eosin (HE).

4.7 Alur Penelitian



Keterangan gambar:

KN: Kontrol Negatif

KP: Kontrol positif

KP 1: tikus yang diinduksi stroke dengan diberikan terapi Beta-glukan 18 mg/kgbb

KP 2: tikus yang diinduksi Stroke dengan diberikan terapi Beta-glukan 36 mg/kgbb

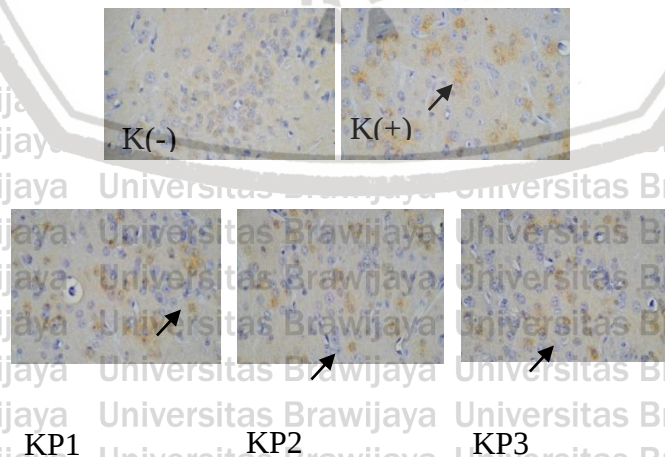
KP 3: tikus yang diinduksi Stroke dengan diberikan terapi Beta Glukan 72 mg/kgbb

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk melihat apakah pemberian terapi ekstrak beta-glukan dari *Saccharomyces cerevisiae* dapat menurunkan distribusi glutamat yang berlebihan pada jaringan otak tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan yang berusia 4 bulan model stroke iskemik. Induksi stroke pada tikus menggunakan metode MCAO (*Middle Cerebral Artery Occlusion*). Tikus dibagi menjadi 5 kelompok dengan 3 tikus pada tiap kelompok. Pada kelompok tikus yang diinduksi stroke menunjukkan tanda berupa hilangnya keseimbangan dan pada *ladder rung test* menunjukkan bahwa tikus tidak bergerak maju saat diberi stimulus. Selanjutnya, tikus diberi perlakuan terapi selama 2 minggu dan didiseksi untuk diambil jaringan otaknya. Dari setiap jaringan otak tikus akan diletakan pada preparat histologi dan dicek menggunakan pengecatan immunohistokimia. Pada setiap preparat akan dicek distribusi glutamat pada setiap kelompok tikus seperti pada gambar 5.1



Gambar 5.1 Pengecatan imunohistokimia Glutamat pada jaringan otak hewan

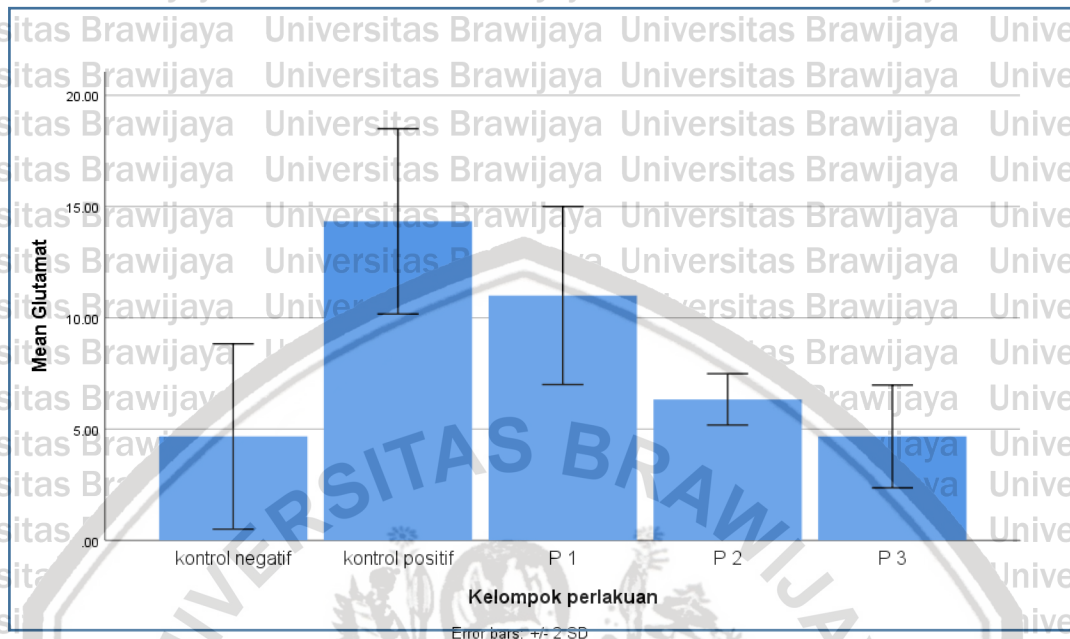
Keterangan : KN = Kontrol Negatif; KP = Kontrol Positif; P1 = Kelompok perlakuan terapi ekstrak beta-glukan 18 mg/kgBB; P2 = Kelompok perlakuan terapi ekstrak beta-glukan 36 mg/kgBB; P3 = Kelompok perlakuan terapi ekstrak beta-glukan 72 mg/kgBB

5.1.2 Distribusi Glutamat pada jaringan otak tikus stroke iskemik

5.1 Tabel Rerata Distribusi Glutamat

Kelompok	Rerata distribusi glutamat $\pm$ SD
KN	4,67 $\pm$ 2,08
KP	14,33 $\pm$ 2,08
P1	11 $\pm$ 2,0
P2	6,33 $\pm$ 0,577
P3	4,67 $\pm$ 4,22

Keterangan : KN = Kontrol Negatif; KP = Kontrol Positif; P1 = Kelompok perlakuan terapi ekstrak beta-glukan 18 mg/kgBB; P2 = Kelompok perlakuan terapi ekstrak beta-glukan 36 mg/kgBB; P3 = Kelompok perlakuan terapi ekstrak beta-glukan 72 mg/kgBB



Gambar 5.2 Grafik rerata distribusi glutamat pada tikus stroke iskemik

5.2 Analisis Data

Data pada penelitian ini dianalisis dengan *software* SPSS versi 18 dan output

analisis disertakan pada bagian lampiran. Berdasarkan hasil pengamatan distribusi glutamat pada tikus stroke iskemik didapatkan hasil rata-rata sebagai berikut : rata-rata pada kelompok kontrol negative yaitu $4,6 \pm 2,08$, kontrol positif yaitu $14,33 \pm 2,08$, perlakuan 1 (dosis terapi 18 mg/kgbb) 11 ± 2 , perlakuan 2 (dosis terapi 36 mg/kgbb) $6,3 \pm 0,5$, perlakuan 3 (dosis terapi 72 mg/kgbb) $4,6 \pm 1,1$.

Hasil pemeriksaan immunohisokimia pada table 5.1 didapatkan distribusi glutamat yang ditandai dengan warna kecoklatan pada sitoplasma sel. Gambaran distribusi glutamat pada preparat kontrol lebih banyak pada kontrol negatif dan berkurang pada preparat kelompok perlakuan seiring dengan peningkatan dosis terapi. Hasil pemeriksaan terlihat perbedaan signifikan pada kelompok kontrol positif dibanding dengan kelompok perlakuan 1, 2, dan 3.

5.2.1 Uji Asumsi Data

Sebelum data diatas dianalisis dengan uji statistik, data yang diperoleh perlu dilakukan pengujian asumsi data, yaitu uji normalitas distribusi data dan uji homogenitas data.

5.2.2 Uji Normalitas Distribusi Data

Pada penelitian ini, normalitas distribusi data diuji menggunakan *Saphiro wilk test*, karena jumlah sampel yang digunakan sedikit (kurang dari 50 sampel) (Sopiyudin, 2013). Hasil uji normalitas menggunakan *Saphiro wilk test* menunjukkan nilai signifikansi kurang dari α (0,05) pada kelompok perlakuan 2 dan 3 yang berarti distribusi data tidak normal. Data diatas tidak memenuhi syarat untuk penggunaan analisis parametrik dan harus menggunakan analisis non-parametrik.

5.2.3 Uji Homogenitas Ragam Data

Untuk mengetahui ada tidaknya heterogenitas ragam data, perlu dilakukan uji homogenitas ragam data menggunakan uji *Levene* (*Levene test homogeneity of variances*). Berdasarkan hasil uji *Levene*, didapatkan nilai signifikansi kedua data penelitian lebih dari α (0,05) yang menunjukkan bahwa data homogen.

5.2.4 Kruskal-Wallis Test

Kruskal wallis test dilakukan sebelum melakukan post hoc test pada uji non-parametrik karena sebaran data yang tidak normal. Pada *kruskal wallis test* didapatkan hasil signifikasi 0,22 ($p > 0,05$), sehingga terdapat perbedaan signifikan pada minimal 2 kelompok dan memenuhi syarat dilakukan *post hoc test*.

5.2.5 Uji Non-Parametrik

Data hasil penelitian menunjukkan sebaran data yang tidak normal pada kelompok perlakuan 2 dan 3 sehingga tidak memenuhi syarat dilakukan uji parametrik dan harus dilakukan uji non-parametrik. Untuk melihat perbedaan tiap kelompok dilakukan uji non-parametrik pada kelompok perlakuan 2 dan 3. Pada kelompok perlakuan kontrol negatif, positif dan perlakuan 1 dilakukan uji komparasi independent t-test karena sebaran data yang normal.

Antara kelompok kontrol negatif terhadap kelompok kontrol negatif didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) sehingga hipotesis *null* ditolak dan hipotesis alternatif diterima. Antara kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan 1 tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) sehingga hipotesis *null* diterima dan hipotesis alternatif tidak diterima. Antara kelompok kontrol positif terhadap kelompok perlakuan 2 didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) sehingga hipotesis *null* ditolak dan hipotesis alternatif diterima. Antara kelompok kontrol positif terhadap kelompok perlakuan 3 didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) sehingga hipotesis *null* ditolak dan hipotesis alternatif diterima.



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Penyumbatan *transient* atau permanen pada pembuluh darah dapat menyebabkan stroke iskemik yang berujung pada kerusakan permanen di tingkat sel dan jaringan pada otak (Shirley, 2014). Penyumbatan pada pembuluh darah menyebabkan hipoksia dan peningkatan aktivitas ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang membuat Ca^{2+} influx ke dalam sel meningkat. Peningkatan Ca^{2+} influx ke dalam sel menyebabkan edema sel dan peningkatan aktivitas GABA yang berujung pada ekspresi glutamat yang berlebihan (Anurogo, 2014). Produksi glutamat secara excessive menyebabkan kerusakan yang massif pada jaringan otak. Jika kerusakan tidak ditangani segera, dapat menyebabkan kerusakan *irreversible* dan berujung pada kecacatan bahkan kematian. Beta-glukan pada *saccharomyces cerevisiae* memiliki efek anti oksidan dan berpotensi menurunkan distribusi glutamat pada stroke iskemik melalui penghambatan aktivitas ROS. Penghambatan aktivitas ROS dapat menurunkan Ca^{2+} influx ke dalam sel dan menurunkan jumlah sel yang mengalami nekrosis. Pada saat terjadi penurunan jumlah sel yang mengalami nekrosis, beta-glukan juga meningkatkan potensi sel-sel neuroprotektif yang berfungsi untuk meregenerasi sel sehingga area nekrosis bisa ditekan dan area penumbra mengalami regenerasi. Melalui 2 potensi efek dari beta-glukan ini jaringan otak pada tikus stroke iskemik tidak mengalami kerusakan permanen.

Parameter penelitian kami diukur menggunakan 2 metode. Metode pertama yaitu melalui pengecatan menggunakan immunohistokimia dan kedua menggunakan analisis data statistik. Pengecatan immunohistokimia digunakan untuk melihat secara *direct* pada jaringan otak. Analisis statistik digunakan untuk melihat hasil pada uji data secara *computerize*.

6.1.1 Pembahasan Immunohistokimia

Pada hasil pengecatan kelompok kontrol positif menggunakan immunohistokimia terlihat distribusi glutamat yang masif pada jaringan otak dibandingkan dengan kontrol negatif (ditunjukkan dengan warna coklat pada sitoplasma). Hal ini membuktikan bahwa metode induksi stroke yang dilakukan pada tikus berhasil. Tanda lain yang dapat diamati pada tikus adalah saat dilakukan *ladder rung test*, tikus tidak bergerak maju saat diberi stimulus.

Didapatkan hasil immunohistokimia setelah perlakuan terapi yaitu pada preparat perlakuan 1 (dosis 18 mg/kgbb) dibandingkan dengan kontrol positif terlihat pengurangan distribusi glutamat ditandai dengan berkurangnya warna kecoklatan pada jaringan otak. Pada dosis perlakuan 2 (dosis 36 mg/kgbb) terlihat warna kecoklatan yang lebih sedikit dibandingkan dengan kontrol positif dan perlakuan 1. Pada dosis perlakuan 3 (72 mg/kgbb) didapatkan distribusi glutamat yang mengalami penurunan signifikan dibandingkan dengan kontrol positif dan perlakuan 1 dan 2. Data ini menunjukkan bahwa ekstrak beta-glukan dapat menurunkan distribusi glutamat secara signifikan pada dosis efektif yaitu 72 mg/kgbb.

6.1.2 Pembahasan Hasil Analisis Statistik

Pada pembahasan hasil statistik menunjukkan data yang tidak normal, ditunjukkan pada kelompok perlakuan 2 dan perlakuan 3 ($p < 0,05$). Pada uji homogenitas didapatkan data homogen ($p > 0,05$). Karena hasil analisis menunjukkan data tidak normal pada kelompok perlakuan 2 dan 3 maka dilakukan uji non-parametrik *mann-whitney*. Untuk kelompok dengan data normal dilakukan post hoc uji independent t. Dari uji post hoc bertujuan untuk mengetahui minimal ada perbedaan signifikan antara 2 kelompok yang berbeda.

Data dari hasil uji post hoc *independent t-test* disimpulkan bahwa: antara kelompok kontrol negatif dan positif terdapat perbedaan signifikan ($p=0,005$). Pada kelompok kontrol positif dengan Perlakuan 1(dosis 18 mg/kgbb) terdapat perbedaan yang tidak signifikan ($p=0,116$), kelompok kontrol positif dengan perlakuan 2 (dosis 36 mg/kgbb) terdapat perbedaan signifikan ($p=0,046$), dan kelompok kontrol positif dengan perlakuan 3 (dosis 72 mg/kgbb) terdapat perbedaan signifikan ($p=0,046$).

Dari hasil uji analisis menggunakan metode immunohistokimia dan analisis data menunjukkan bahwa pemberian ekstrak beta glucan dari *s. cerevisiae* terbukti menurunkan distribusi glutamat dan dosis maksimal dari pemberian terapi ini adalah 72mg/kgbb.

6.2 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini masih memiliki beberapa keterbatasan. Sedikitnya literatur maupun penelitian mengenai penggunaan stem sel untuk stroke maupun beta

glukan untuk neuroregenerasi, membuat hal-hal seperti dosis dan durasi terapi mengacu pada penyakit lain yang sudah terbukti dapat diterapi menggunakan beta glukan.

Pada penelitian ini digunakan ekstrak yang dimungkinkan terdapat senyawa lain yang dapat saling mempengaruhi kerja dari beta-glukan itu sendiri. Serta, untuk mengetahui kandungan beta-glukan pada ekstrak yang digunakan untuk penelitian ini, hanya dilakukan uji kualitatif FTIR. Dalam penelitian selanjutnya mungkin dapat dilakukan uji HPLC untuk mengetahui kadar kuantitatif dari ekstrak beta-glukan dari *Saccharomyces cerevisiae*.



BAB 7

KESIMPULAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan mengenai pemberian ekstrak beta-glukan terhadap distribusi glutamat, maka dapat disimpulkan bahwa

1. Pemberian terapi ekstrak beta-glukan dari *Saccharomyces cerevisiae* dapat menurunkan distribusi glutamat pada jaringan otak sehingga dapat mempercepat neurogenesis pada tikus model stroke iskemik.
2. Efek dosis pemberian terapi ekstrak beta glukan dari *Saccharomyces cerevisiae* pada tikus wistar model stroke iskemik meningkat sesuai dengan dosis yang diberikan dan efektif pada dosis 72 mg/kgBB.

7.2 Saran

Berikut ini merupakan saran-saran dari penelitian berdasarkan penelitian yang telah dilakukan ini:

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk mengetahui dosis toksik, dan efek samping sebelum dilanjutkan dengan *clinical trial* pada manusia untuk keperluan pengobatan medis pada masyarakat luas.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai dosis terapi beta glukan yang tepat sehingga dapat digunakan secara aman dan efektif pada manusia.



DAFTAR PUSTAKA

- Adusumilli, A., Ramakrishna, R. k., & Sambasiva, R. K. (2012). The clinical applications of hematopoietic growth factor - GCSF. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2(14), 1-10.
- Anurogo, Dito. 2014 . The Neuroscience of Glutamate . Medical Journal of Indonesia, X : 2010
- Berger C, Stauder A, Xia F, Sommer C, Schwab S (2008) Neuroprotection and glutamate attenuation by acetylsalicylic acid in temporary but not in permanent cerebral ischemia. *Exp Neurol* 210:543–8
- Besancon, Elaine. 2008. Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke . Elsevier, vol.29 No. 5
- Campos, Fransisco. 2011. Neuroprotection by glutamate oxaloacetate transaminase in ischemic stroke: an experimental study, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31: 1378–1386
- Castellanos M, Sobrino T, Castillo J (2006) Evolving paradigms for neuroprotection: molecular identification of ischemic penumbra. *Cerebrovasc Dis* 21(Suppl 2):71–9
- Deb, P., Sharma, S., & Hassan, K. M. (2010). Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology*, 17(3), 197–218, doi:10.1016/j.pathophys.2009.12.001
- Departemen Kesehatan. 2013. Infodatin situasi kesehatan jantung. (Online), (<http://www.depkes.go.id/download.php?file=download/pusdatin/infodatin/infodatin-jantung> diakses pada tanggal 3 Oktober 2018).
- Durukan, A., & Tatlisumak, T. (2007). Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 87(1), 179–197, doi:10.1016/j.pbb.2007.04.015

Fugate, J. E., & Rabinstein, A. A. (2015). Absolute and Relative Contraindications to IV rt-PA for Acute Ischemic Stroke. *The Neurohospitalist*, 5(3), 110–121. doi:10.1177/1941874415578532

hmann A, Maier-Hauff K, Schurer L, Lange M, Guggenbichler C, 10. Mehta,A.,etal., Excitotoxicity: Bridge to various triggers in Vogt W, Jacob K, Kempfski O. Release of glutamate and free fatty neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.032>.

Kofuji, K., Aoki, A., Tsubaki, K., Konishi, M., Isobe, T., & Murata, Y. (2012). Antioxidant Activity of β -Glucan. *ISRN Pharmaceutics*, 2012, 1–5. doi:10.5402/2012/125864

Lee, J.-N., Lee, D.-Y., Ji, I.-H., Kim, G.-E., Kim, H. N., Sohn, J., ... Kim, C.-W. (2001). Purification of Soluble β -Glucan with Immune-enhancing Activity from the Cell Wall of Yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(4), 837–841. doi:10.1271/bbb.65.837

Nadiya BytsAnatoly SamoylenkoHelge, W.E. 2006, "Cell Type Specific Signalling by Hematopoietic Growth Factors in Neural Cells", *Neurochemical research*, vol. 31, no. 10, pp. 1219-30.

O'Donnell, Xavier D. 2010. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*: 376; 112–23.

O'Donnell M, Yusuf S. 2009. Tackling the global burden of stroke: the need for large-scale international studies. *Lancet Neurol*; 8: 306–07.

Ochi H, Sakai K. Oxidative stress profile: OSP. *Rinsho Byori*. 2003;51(2):115–125.

Ruan, L., Huang, H., Jin, W., Chen, H., Li, X. & Gong, Q. 2013, "Tetrandrine Attenuated Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury and Induced Differential Proteomic Changes in a MCAO Mice Model Using 2-D DIGE". *Neurochemical research*, vol. 38, no. 9, pp. 1871-9.

Sharma, S., Deb Prabal . 2010, "Pathophysiologic Mechanism of Acute Ischemic Stroke : An Overview with Emphasis on Therapeutic Significance Beyond

Thrombolysis", *Journal of Pathophysiology*, vol. 17, pp. 197-218

Strong K, Mathers C, Bonita R. 2007. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol*; 6: 182–87.

Tsubaki K, Sugiyama H, Shoji Y. Barley β -glucan and its physiological function. *Allergy in Practice*. 2003;23(12):949–953.

Urdžíková, L., Jendelová, P., Glogarová, K., Burian, M., Hájek, M. & Syková, E. 2006, "Transplantation of Bone Marrow Stem Cells as well as Mobilization by Granulocyte-Colony Stimulating Factor Promotes Recovery after Spinal Cord Injury in Rats", *Journal of neurotrauma*, vol. 23, no. 9, pp. 1379-91.

Vetvicka V, Vetvickova J. An evaluation of the immunological activities of commercially available β 1,3-glucans. *The Journal of the American Nutraceutical Association*. 2007;10(1):25–31.

Woodruff, T. M., Thundiyil, J., Tang, S.-C., Sobey, C. G., Taylor, S. M., & Arumugam, T. V. (2011). Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 11. doi:10.1186/1750-1326-6-11

Woodward JR, Fincher GB, Stone BA. Water-soluble (1→3), (1→4)- β -D-glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. II. Fine structure. *Carbohydrate Polymers*. 1983;3(3):207–225