

**FLUORESENSI KALSIMUM PADA KULTUR SEL NEURONAL SH-SY5Y YANG
DIPAPAR DENGAN PILOCARPINE: MODEL EPILEPSI IN VITRO**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh:

Afiyfah Kiysa Waafi

NIM: 165070100111025

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2019

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**FLUORESENSI KALSIMUM PADA KULTUR SEL NEURONAL SH-SY5Y YANG
DIPAPAR DENGAN PILOCARPINE: MODEL EPILEPSI IN VITRO**

Oleh:

Afiyah Kiysa Waafi

NIM: 165070100111025

Telah diikutsertakan dalam
International Invention and Innovative Competition (InIIC) Series 2
Kuala Lumpur, 2 November 2019

Pembimbing I

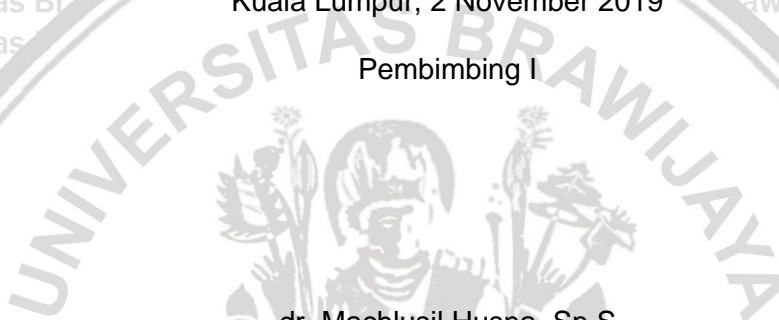
dr. Machlusil Husna, Sp.S

NIK. 197703062009122003

Mengetahui,
Ketua Progam Studi Kedokteran,

dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K)

NIP. 196310221996012001





KEPUTUSAN
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
NOMOR 345 TAHUN 2019

TENTANG

PEMBERIAN PENGHARGAAN KEPADA MAHASISWA BERPRESTASI
PESERTA PIMNAS XXXII DAN ATAU KOMPETISI NASIONAL
TINGKAT KEMENTERIAN / DIKTI / LIPI SERTA KOMPETISI INTERNASIONAL TAHUN
AKADEMIK 2019/2020

DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA,

- Menimbang :
- a. bahwa untuk peningkatan atmosfer akademik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya perlu di tingkatkan kegiatan-kegiatan kemahasiswaan yang bernuansa akademis;
 - b. bahwa dalam meningkatkan motivasi dan mendorong partisipasi para mahasiswa dalam kegiatan yang bernuansa tersebut perlu adanya penghargaan;
 - c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a dan b, perlu diterbitkan Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya tentang Pemberian Penghargaan Kepada Mahasiswa Berprestasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Peserta Pimnas XXXII dan atau Kompetisi Nasional Tingkat Kementerian/ DIKTI/ LIPI serta Kompetisi Internasional Tahun Akademik 2019/2020;
- Mengingat :
1. Undang-undang Nomor 20 Tahun 2003 Tentang Sistem Pendidikan Nasional Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78, Tambahan Lembar Negara Republik Indonesia Nomor 4301);
 2. Undang-undang Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 158, Tambahan Lembara Negara Republik Indonesia Nomor 5336);
 3. Peraturan Pemerintah Nomor 17 Tahun 2010 tentang Pengelolaan dan Penyelenggaraan Pendidikan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2010 Nomor 23, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5105) sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Pemerintah Nomor 66 Tahun 2010 tentang Pengelolaan dan Penyelenggaraan Pendidikan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2010 Nomor 112, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5157);
 4. Keputusan Mendiknas Republik Indonesia Nomor 232/U/2000 tentang Pedoman Penyusunan Kurikulum Pendidikan Tinggi dan Penilaian Hasil Belajar Mahasiswa;
 5. Keputusan Mendiknas Republik Indonesia Nomor 080/O/2002 tentang Statuta Universitas Brawijaya;



MEMUTUSKAN

- Menetapkan : KEPUTUSAN DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA TENTANG PEMBERIAN PENGHARGAAN KEPADA MAHASISWA BERPRESTASI FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA PESERTA PIMNAS XXXII DAN ATAU KOMPETISI NASIONAL TINGKAT KEMENTERIAN / DIKTI / LIPI SERTA KOMPETISI INTERNASIONAL TAHUN AKADEMIK 2019/2020.
- KESATU : Memberikan Penghargaan kepada Mahasiswa anggota Tim PIMNAS XXXII dan atau Kompetisi-kompetisi Nasional Tingkat Kementerian / DIKTI / LIPI serta Kompetisi Internasional Tahun Akademik 2019/2020 yang susunan anggotanya seperti tercantum dalam lampiran Surat Keputusan ini.
- KEDUA : Bentuk penghargaan berupa pembebasan para anggota Tim Mahasiswa dari kewajiban akademis pembuatan Karya Ilmiah Tugas Akhir regular, dengan tetap berkewajiban menyerahkan naskah karya ilmiah yang diikutinya oleh masing-masing mahasiswa.
- KETIGA : Memberikan nilai prestasi Akademis A pada Karya Ilmiah Tugas Akhir bagi setiap mahasiswa anggota TIM oleh karena capaian prestasi berskala nasional yang diperoleh pada PIMNAS XXXII dan atau Kompetisi-kompetisi Nasional Tingkat Kementerian / DIKTI / LIPI serta Kompetisi Internasional pada Tahun Akademik 2019/2020.
- KEEMPAT : Memberikan dana pembinaan kepada setiap kelompok dari Tim Mahasiswa sesuai dengan capaian prestasi pada PIMNAS XXXII dan Kompetisi Nasional serta Kompetisi Internasional.
- KELIMA : Menugaskan kepada lembaga-lembaga di lingkungan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang terkait dengan ini untuk menindaklanjuti keputusan ini.
- KEENAM : Keputusan Dekan ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Malang pada tanggal 01 November 2019



DEKAN
 WISNU BARLIANTO
 NIP. 197307262005011008

- Tembusan :
1. Rektor Universitas Brawijaya
 2. Segenap Wakil Dekan di Lingkungan FKUB
 3. Segenap Ka. Jur. dan KPS di Lingkungan FKUB
 4. Segenap Ka. Dep di Lingkungan FKUB
 5. Presiden BEM FKUB

9	Ihsanul Fikri	175070201111009	The 2nd World Invention Technology Expo	Internasional	Silver Award
10	Gerry Rinaldi	175070207111012	The 2nd World Invention Technology Expo	Internasional	Silver Award
11	Afiyah Kiyasa Waafi	165070100111025	International Invention & Innovative Competition (InIIC Series 2/2019)	Internasional	Bronze Award
12	Muhammad Syarif Utama	155070100111009	International Invention & Innovative Competition (InIIC Series 2/2019)	Internasional	Silver Award

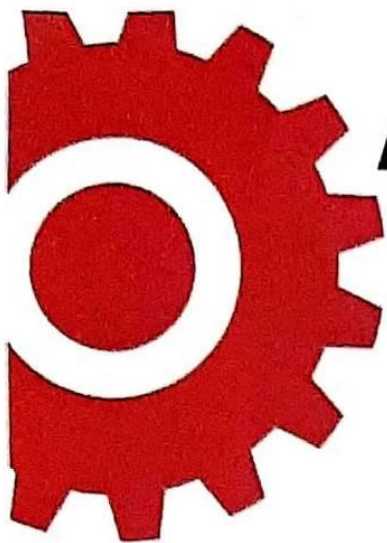


WISNU BARLIANTO
NIP 197307262005011008



Scanned with
CamScanner





Award Certificate

This is to certify that

DR. MACHLUSIL HUSNA, SP.S
AFIYFAH KIYSA WAAFI
MAULANA WILDAN SEPUTRA
MILLAH SHOFIAH

have achieved a

BRONZE AWARD

In

**INTERNATIONAL INVENTION & INNOVATIVE
COMPETITION (InIIC Series 2/2019)**

With a title:

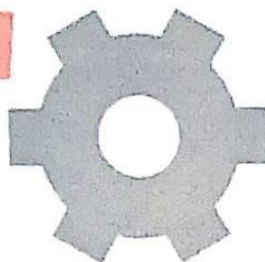
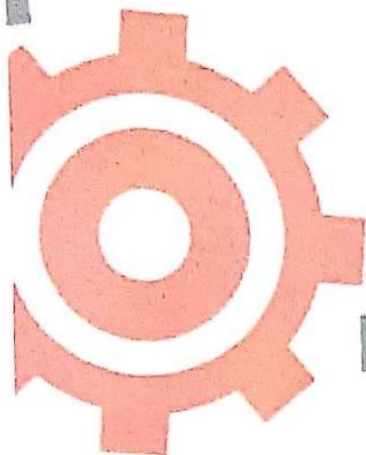
**"Calcium Fluorescence on SH-SY5Y Cell Culture
Induced by Pilocarpine: In-Vitro Epileptic Model"**

In category:

**HIGHER INSTITUTION STUDENTS
(SCIENCE, ENGINEERING & TECHNOLOGY)**

at

**Palace of The Golden Horses, Selangor
2 November 2019**



Md Nadzri Salleh
Director, MNNF Network



CS Scanned with
CamScanner

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Afiyfah Kiysa Waafi

NIM : 165070100111025

Program Studi : Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya,

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 21 Januari 2020

Yang membuat pernyataan,

Afiyfah Kiysa Waafi

NIM.165070100111025

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji bagi Allah SWT karena hanya dengan berkat seta kasih karunia-Nya penulis mampu menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul "Fluorosensi Kalsium pada Kultur Sel Neuronal SH-SY5Y yang Dipapar dengan Pilocarpine: Model Epilepsi *In-Vitro*". Dengan terselesaikannya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Dr.dr. Wisnu Barlianto, MSi.Med, Sp.A(K)., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
2. dr. Triwahju Astuti, M.Kes.,Sp.P(K)., selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. dr. Machlusil Husna, Sp.S sebagai pemilik penelitian payung dan sekaligus pembimbing pertama yang dengan sabar memberi nasehat keilmuan dan bantuan untuk penulis serta semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir.
4. Mbak Unil dan Mbak Helli selaku Laboran Lab Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya yang senantiasa membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan pengertian selama proses penelitian berlangsung.
5. Kedua orang tua penulis, dr. Mokhammad Hariyadi dan dr. Retno Rahayu Ismu Hartati yang telah memberikan dukungan, nasihat, dan doa yang tiada henti
6. Saudara-saudara kandung penulis, dr. Affa Kiysa Waafi, Affan Kaysa Waafi, S.T,M.Sc, dr. Afiyf Kaysa Waafi, Aiffah Kiysa Waafi, dan Affah Kiysa Waafi yang selalu memberikan semangat dan inspirasi
7. Sahabat-sahabat penulis, HUHA Team (Yunita, Kinah, Alya, Sidah, Nabila, Nisa, Fira, Pire, Ninda, dan Rumman) yang telah menjadi *support system*

penulis selama masa perkuliahan terutama saat proses penyusunan Tugas

Akhir ini.

8. Teman-teman seperjuangan Tim LSIH (Fira, Firena, Ninda, dan Rumman)

serta teman-teman PD-A dan Ps.Ked 2016 yang selalu membantu dan memberi dukungan kepada penulis.

9. Keluarga besar HMI FKUB yang selama ini memberikan inspirasi dan dukungan, serta keluarga besar BEM FKUB dan LPM Diagnostika yang selalu memberikan semangat kepada penulis

10. Sahabat yang ikut berjuang dalam perlombaan InIIC Series 2, Maulana Wildan dan Millah Shofiah atas bantuan besarnya hingga karya ini dapat mendapat penghargaan internasional

11. Dan semua pihak yang telah membantu menyelesaikan tugas akhir ini yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis membuka diri untuk segala kritik dan saran. Semoga Tugas

Akhir ini bermanfaat bagi pembaca khususnya profesi di bidang kesehatan.

Malang, 21 Januari 2020

Penulis

ABSTRAK

Waafi, Afiyfa Kiyasa. 2020. **Fluorosensi Kalsium pada Sel Neuronal SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine: Model Epilepsi *In-Vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Machlusil Husna, Sp.S

Epilepsi adalah salah satu penyakit neurologis yang memiliki angka prevalensi tinggi dan menyebabkan disabilitas serta mortalitas. Patogenesis epilepsi yang masih belum jelas menuntut pemahaman yang lebih besar, sehingga diharapkan dapat mengembangkan terapi epilepsi baru yang dapat mencegah proses epileptogenik atau memodifikasi progresifitas epilepsi. Model penelitian epilepsi saat ini yang menggunakan hewan coba memerlukan model binatang yang kronik dan rumit serta membutuhkan banyak waktu. Sedangkan penelitian epilepsi secara *in vitro* saat ini menggunakan metode pengukuran *patch clamp* dan *microelectrode array* yang cukup sulit secara teknis dan harganya mahal. Sel SH-SY5Y berasal dari sel neuroblastoma manusia yang dapat berdiferensiasi menjadi neuron yang memiliki fitur morfologi, neurokimia, dan elektrofisiologis yang sesuai. Pilocarpin yang digunakan sebagai agen prokonvulsan adalah suatu agonis muskarinik yang dapat menyebabkan suatu kondisi yang disebut *paroxysmal depolarizing shift* (PDS) yang ditandai dengan peningkatan kalsium. PDS akan mengganggu keseimbangan reseptor eksitatori dan inhibitori yang akan menyebabkan hipereksitabilitas. Penelitian ini dilakukan secara *in-vitro* dengan *Randomized Posttest Only Controlled Group Design* dengan tujuan untuk membuktikan kultur sel SH-SY5Y yang dipapar dengan pilocarpin dapat menjadi model epilepsi *in-vitro*. Pada penelitian ini sel SH-SY5Y yang dipapar pilocarpin dosis 0 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , dan 15 μM akan diukur fluorosensi kalsiumnya menggunakan mikroskop konfokal. Hasil uji komparasi menggunakan *One Way Anove* menunjukkan hasil yang signifikan ($p < 0.05$) pada perbandingan antar kelompok pada detik 13, 26, 39, 52, dan 65. Hasil penelitian juga menunjukkan pada dosis 5 μM menunjukkan dosis paling optimal dengan rata-rata fluorosensi kalsium yang paling tinggi.

Kata Kunci: Epilepsi, Fluorosensi Kalsium, Pilocarpin, Sel SH-SY5Y

ABSTRACT

Waafi, Afiyah Kiysa, 2020. **Calcium Fluorescence on SH-SY5Y Neuronal Cell**

Culture Induced by Pilocarpine: In-Vitro Epileptic Model. Final

Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University.

Supervisors: (1) dr. Machlusil Husna, Sp.S

Epilepsy is a neurological disease that has a high prevalence rate and can cause disability and mortality. The pathogenesis of epilepsy is still unclear, therefore requires a better understanding of it, so it is expected to develop new epilepsy therapy that can prevent epileptogenic processes or modify epileptic progression. The current epilepsy research model uses experimental animals that requires a chronic and complex animal model and a lot of time. Whereas in vitro epilepsy research is currently using patch clamp measurement methods and microelectrode arrays that are quite technically difficult and expensive. SH-SY5Y cells originate from human neuroblastoma cells which can be differentiated into neurons that have appropriate morphological, neurochemical and electrophysiological features. Pilocarpine as a proconvulsant agent is a muscarinic agonist that can cause an event called paroxysmal depolarizing shift (PDS). PDS then cause imbalance of excitatory and inhibitory receptors and will result in hiperexcitability. This study uses in-vitro method with Randomized Posttest Only Controlled Groups aimed to prove that SH-SY5Y cell culture induced by pilocarpin can be in vitro epileptic model. In this study the increase in calcium fluorescence in SH-SY5Y cells after exposure to pilocarpin in dose 0 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, dan 15 μ M will be measured using confocal microscope. Comparison study with One Way Anova showed that the comparison of all groups in the 13, 26, 39, 52, and 65 seconds are significant ($p < 0.05$). And from this study we can conclude that dosage 5 is the most optimal dose with the highest calcium fluorescence average.

Keywords: Calcium Fluorescence, Epilepsy, Pilocarpine, SH-SY5Y Cell

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
SK Dekan.....	iii
Sertifikat InLIC Series 2 2019.....	vi
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	vii
Kata Pengantar	viii
Abstrak	x
<i>Abstract</i>	xi
Daftar Isi.....	xii
Daftar Tabel.....	xvi
Daftar Gambar.....	xviii
Daftar Lampiran.....	xix
Daftar Singkatan.....	xx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.2.1 Subrumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademik.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Aksi Potensial.....	5
2.2 Epilepsi.....	7
2.2.1 Definisi Epilepsi.....	7
2.2.2 Klasifikasi Epilepsi.....	8
2.2.3 Etiologi Epilepsi.....	8
2.2.3.1 Idiopatik.....	8
2.2.3.2 Kriptogenik.....	8
2.2.4 Patofisiologi Epilepsi.....	9
2.3 Fluorosensi Kalsium.....	11
2.4 Sel Neuronal SH-SY5Y.....	12
2.5 Pilocarpine.....	13
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	15
3.1 Kerangka Konsep Peneliitian.....	16
3.2 Hipotesis.....	17
BAB 4 METODE PENELITIAN	18
4.1 Desain Penelitian.....	18
4.2 Sampel Penelitian.....	18
4.3 Besar Sampel Penelitian.....	18
4.4 Variabel Penelitian.....	19
4.5 Definisi Operasional.....	19
4.5.1 Pilocarpine.....	19
4.5.2 Fluorosensi Kalsium.....	19
4.5.3 Kultur Sel Neuronal SH-SY5Y.....	20
4.5.4 Model Epilepsi <i>In Vitro</i>	20



4.5.5 Aktivitas Epileptiform	21
4.6 Tempat dan Waktu Penelitian	21
4.7 Prosedur Penelitian	21
4.7.1 <i>Cell thawing</i> dan Penumbuhan Sel	21
4.7.2 Panen Sel	22
4.7.3 Subkultur	23
4.7.4 Pemberian Pilocarpine	24
4.7.5 Fluorosensi Kalsium	24
4.8 Alur Penelitian	25
4.9 Teknik Analisis Data	26
4.9.1 Uji Prasyarat Parametrik	26
4.9.2 Uji Komparasi	27
4.9.3 Uji Korelasi	27
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	28
5.1 Hasil Pengamatan Menggunakan Mikroskop Konfokal	28
5.2 Hasil Analisis Data Fluorosensi Kalsium Berdasarkan Waktu Rekaman	30
5.2.1 Hasil Uji Normalitas Data dan Homogenitas Varian	30
5.2.2 Hasil Uji <i>One Way Anova</i>	31
5.2.3 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i>	32
5.2.4 Hasil Uji Korelasi <i>Spearman</i>	35
5.3 Hasil Analisis Data Fluorosensi Kalsium Berdasarkan Dosis	41
5.3.1 Hasil Uji Normalitas Data dan Homogenitas Varian	36
5.3.2 Hasil Uji <i>One Way Anova</i>	37
5.3.3 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i>	38
5.3.4 Hasil Uji Korelasi <i>Spearman</i>	40



BAB 6 PEMBAHASAN	42
6.1 Pengaruh Dosis Pilocarpine pada Aktivitas Epileptiform	42
6.2 Pengaruh Waktu pada Aktivitas Epileptiform	45
6.3 Keterbatasan Penelitian	47
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	48
7.1 Kesimpulan	48
7.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	52



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Klasifikasi Epilepsi Berdasarkan Jenis Bangkitan.....	8
Tabel 5.1 Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro Wilk</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Waktu Rekaman.....	30
Tabel 5.2 Hasil Uji Homogenitas <i>Levene Statistic</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Waktu Rekaman.....	31
Tabel 5.3 Hasil Uji <i>One Way Anova</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Waktu Rekaman.....	32
Tabel 5.4 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Waktu Rekaman Detik 13.....	32
Tabel 5.5 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Waktu Rekaman Detik 26.....	33
Tabel 5.7 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Waktu Rekaman Detik 52.....	33
Tabel 5.8 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Waktu Rekaman Detik 65.....	34
Tabel 5.9 Hasil Uji Korelasi <i>Spearman</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Waktu Rekaman.....	36
Tabel 5.10 Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro Wilk</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Dosis Perlakuan.....	37
Tabel 5.11 Hasil Uji Homogenitas <i>Levene Statistic</i> Fluoroensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y Berdasarkan Dosis Perlakuan.....	37
Tabel 5.12 Hasil Uji <i>One Way Anova</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Dosis Perlakuan.....	38
Tabel 5.13 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Dosis Kontrol.....	39
Tabel 5.14 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel Sh-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Dosis 1 μM	39
Tabel 5.15 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i> Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Dosis 5 μM	39



Tabel 5.16 Hasil Uji *Post Hoc Tukey* Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Dosis 10 μ M.....39

Tabel 5.17 Hasil Uji *Post Hoc Tukey* Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Dosis 15 μ M.....40

Tabel 5.18 Hasil Uji Korelasi *Spearman* Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Dosis Perlakuan.....41



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 4.1 Alur Penelitian.....	25
Gambar 5.1 Hasil Pengamatan Mikroskop Konfokal pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berbagai Dosis.....	29
Gambar 5.2 Perbandingan Rata-Rata Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Antar Kelompok Perlakuan pada Setiap Detik Rekaman.....	35
Gambar 5.3 Perbandingan Rata-Rata Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Antar Kelompok Perlakuan Berdasarkan Dosis Perlakuan.....	40



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat Keterangan Kelaikan Etik.....	52
Lampiran 2. Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berbagai Dosis.....	53
Lampiran 3. Hasil SPSS Fluorosensi Kalsium Sel SH-SY5Y pada Detik 13.....	58
Lampiran 4. Hasil SPSS Fluorosensi Kalsium Sel SH-SY5Y pada Detik 26.....	61
Lampiran 5. Hasil SPSS Fluorosensi Kalsium Sel SH-SY5Y pada Detik 39.....	64
Lampiran 6. Hasil SPSS Fluorosensi Kalsium Sel SH-SY5Y pada Detik 52.....	67
Lampiran 7. Hasil SPSS Fluorosensi Kalsium Sel SH-SY5Y pada Detik 65.....	70
Lampiran 8. Hasil SPSS Fluorosensi Kalsium Sel SH-SY5Y pada Dosis Kontrol.....	73
Lampiran 9. Hasil SPSS Fluorosensi Kalsium Sel SH-SY5Y pada Dosis 1 μM	76
Lampiran 10. Hasil SPSS Fluorosensi Kalsium Sel SH-SY5Y pada Dosis 5 μM	79
Lampiran 11. Hasil SPSS Fluorosensi Kalsium Sel SH-SY5Y pada Dosis 10 μM	82
Lampiran 12. Hasil SPSS Fluorosensi Kalsium Sel SH-SY5Y pada Dosis 15 μM	85
Lampiran 13. Dokumentasi Penelitian.....	88
Lampiran 14. Dokumentasi Lomba InLIC Series 2 2019.....	89



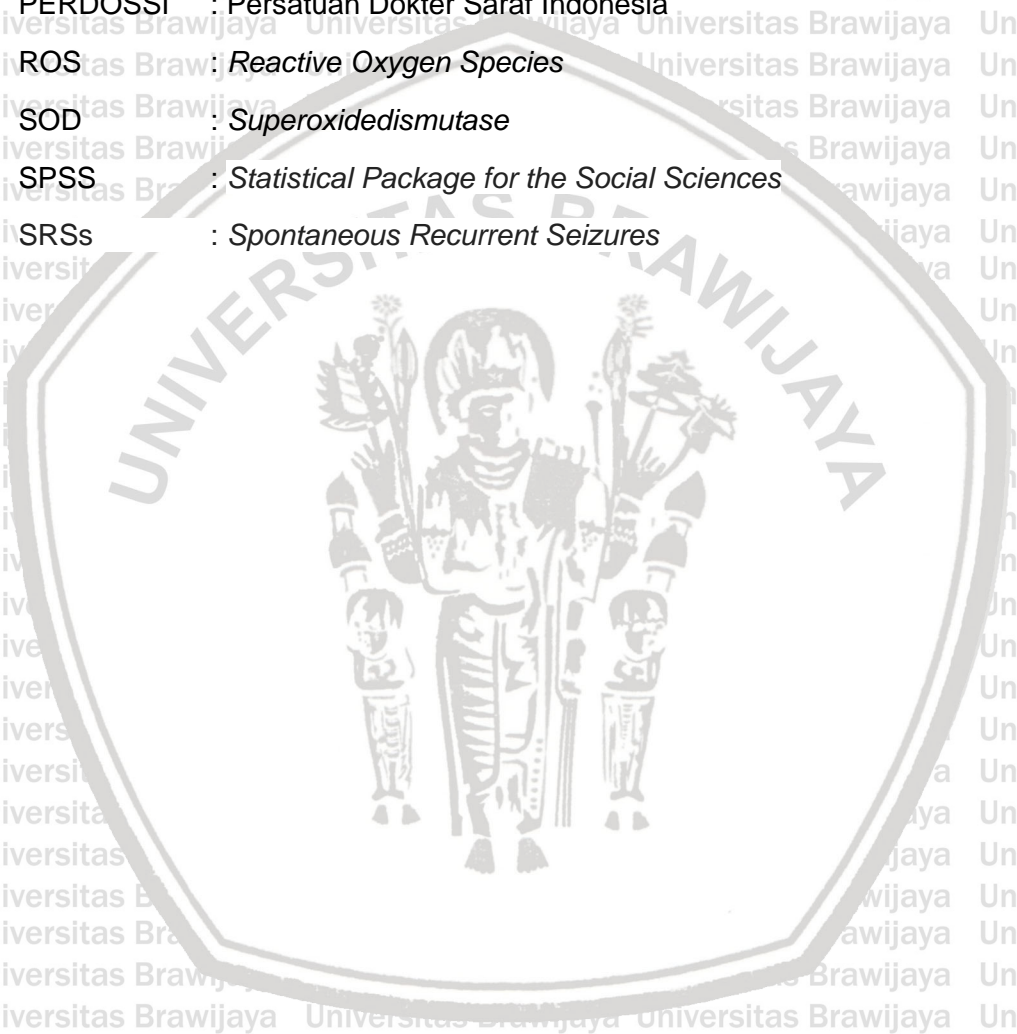


DAFTAR SINGKATAN

μM	: Mikrometer
AMPA	: <i>α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoxazolepropionic</i>
Ca ²⁺	: Ion Kalsium
Cl ⁻	: Ion Klorida
CO ₂	: Karbon Dioksida
COMT	: <i>Catechol-O-methyltransferase</i>
ddH ₂ O	: <i>Double-distilled water</i>
DG	: <i>Diacylglycerol</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EEG	: <i>Electroencephalography</i>
ER	: <i>Endoplasmic Reticulum</i>
GABA	: <i>Gamma-aminobutyric Acid</i>
HNC	: <i>Hippocampal Neuronal Culture</i>
HPx	: <i>hydroxiperoxide</i>
ILAE	: <i>International League Against Epilpesy</i>
IP ₃	: Inositoltrifosfat
K ⁺	: Ion Kalium
LAF	: <i>Laminar Air Flow</i>
LSIH	: Laboratorium Sentral Ilmu Hayati
MAO	: Monoaminoksidase
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEA	: <i>Microelectrode Array</i>
mg	: Miligram
ml	: Mililiter
Na ⁺	: Ion Natrium
NE	: Norepinefrin



- NMDA : Methyl-D-aspartat
- NO : Nitric Oxide
- OHSC : Organotypic Hippocampal Slice Culture
- PBS : Phosphate-buffered Saline
- PDS : Paroxysmal Depolarizing Shift
- PERDOSSI : Persatuan Dokter Saraf Indonesia
- ROS : Reactive Oxygen Species
- SOD : Superoxidedismutase
- SPSS : Statistical Package for the Social Sciences
- SRSs : Spontaneous Recurrent Seizures



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Epilepsi adalah salah satu penyakit neurologis yang memiliki angka prevalensi yang tinggi dan dapat menyebabkan disabilitas serta mortalitas (Ngugi *et al.*, 2011) Dalam studi epidemiologis ditemukan bahwa prevalensi epilepsi di negara berkembang mencapai 4-10 kasus per 1000 penduduk (Neligan dan Sander, 2015). Prevalensi epilepsi dilaporkan meningkat di negara tropis dan berkembang hingga mencapai 14-57 kasus per 1000 penduduk (Tellez-Zenteno dan Hernandez-Ronquillo, 2011).

Penegakan diagnosis dan pengetahuan tentang etiologi yang akurat sangat penting karena dapat membantu pengambilan keputusan medis dan/atau pembedahan, sehingga dapat menurunkan konsekuensi epilepsi refrakter seperti yang telah disebutkan (Skjei dan Dlugos, 2011; Shetty *et al.*, 2011, Laxer *et al.*, 2014) . Patogenesis epilepsi yang masih belum jelas hingga saat ini menuntut pemahaman yang lebih besar tentang hal tersebut, sehingga dapat diharapkan pengembangan terapi antiepilepsi baru yang dapat mencegah proses epileptogenesis atau memodifikasi progresifitas epilepsi, tidak hanya pengobatan epilepsi secara simtomatik (Yin *et al.*, 2013).

Penelitian di bidang epilepsi banyak menggunakan model binatang, baik untuk penelitian obat epilepsi maupun patofisiologis. Penelitian tersebut memerlukan model binatang kronik yang rumit dan memakan banyak waktu.

Untuk penelitian obat epilepsi membutuhkan skrining senyawa kandidat obat, dengan metode *high throughput screening* yang rumit dan mahal. Model epilepsi *in vitro* dapat digunakan untuk mengisi kebutuhan tersebut, dimana keluaran cukup bagus, dan hasilnya dapat digunakan untuk pemeriksaan selanjutnya secara *in vivo*. Model tersebut terutama bedasar pada pengukuran elektrofisiologis aktivitas epileptiform pada irisan otak dan kultur neuron (Pacico & Meur, 2014) dengan menggunakan berbagai zat prokonvulsan, yang sering dipakai adalah asam kainat dan pilocarpine. (Avoli & Jefferys, 2016). Pengukuran ini dilakukan dengan menggunakan *patch clamp* yang membutuhkan ketrampilan khusus, dan pengukuran terbaru banyak menggunakan *microelectrode array* (MEA) (Jäckel et al., 2017). Kedua metode tersebut cukup sulit secara teknis dan harganya mahal.

Pendekatan alternatif untuk mengukur aktivitas depolarisasi neuronal adalah dengan menggunakan fluoresensi untuk mengamati fluktuasi kadar kalsium intrasel yang menyertai depolarisasi neuronal, sehingga dapat digunakan untuk melihat aktivitas epileptiform pada kultur sel (Pacico & Meur, 2014). Salah satu kultur sel saraf manusia adalah sel SH-SY5Y. Sel SH-SY5Y berasal dari sel neuroblastoma manusia, yang dapat berdiferensiasi menjadi neuron yang memiliki fitur morfologi, neurokimia, dan elektrofisiologis yang sesuai. Kultur sel ini banyak dipakai untuk evaluasi cedera atau kematian neuron pada penyakit neurodegenerative, iskemia serebral, dan epilepsi (Feng et al., 2016; Sousa et al., 2013).

Berdasarkan hal tersebut di atas, peneliti bermaksud untuk menganalisis efek pemberian pilocarpine pada kultur sel SHSY-5Y yang dipapar dengan asam kainat terhadap fluoresensi kalsium sebagai model epilepsi *in vitro*.

1.1 Rumusan Masalah

Apakah kultur sel SH-SY5Y yang dipapar dengan pilocarpine dapat menjadi model epilepsi *in vitro* ?

1.2.1 Subrumusan Masalah

1. Apakah paparan pilocarpine pada kultur sel SH-SY5Y dapat memberikan gambaran fluoresensi kalsium yang menyerupai aktifitas epileptiform?
2. Berapa dosis pilocarpine yang paling optimal untuk menimbulkan gambaran fluoresensi kalsium yang menyerupai aktivitas epileptiform pada kultur sel SH-SY5Y?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa kultur sel SH-SY5Y yang dipapar dengan pilocarpine dapat menjadi model epilepsi *in vitro*

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan bahwa paparan pilocarpine pada kultur sel SH-SY5Y dapat memberikan gambaran fluoresensi kalsium yang menyerupai aktivitas epileptiform

2. Mendapatkan dosis pilocarpine yang paling optimal untuk menimbulkan gambaran fluoresensi kalsium yang menyerupai aktivitas epileptiform pada kultur sel SH-SY5Y

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk menambah wawasan ilmu pengetahuan sekaligus sebagai dasar untuk pengembangan penelitian selanjutnya dalam bidang epilepsi terkait dengan pemberian pilocarpine dengan menggunakan metode kultur sel neuronal SH-SY5Y dengan meninjau fluoresensi kalsium intraselular.

1.4.2 Manfaat Praktis

Pengembangan teknik yang dipakai dalam penelitian ini dapat digunakan untuk meneliti mengenai obat-obat epilepsi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Aksi Potensial

Penjalaran impuls saraf ditransmisikan melalui aksi potensial, yaitu perubahan cepat dari potensial membran yang menyebar sepanjang membran serabut saraf. Setiap potensial dimulai dengan perubahan tiba-tiba dari potensial negatif membran istirahat ke potensial positif dan berakhir dengan perubahan kembali ke potensial negatif yang berlangsung dengan cepat. Terdapat tiga tahap aksi potensial dalam penjalaran impuls saraf, yaitu tahap istirahat, tahap depolarisasi, dan tahap repolarisasi (Guyton, 2014).

Tahap Istirahat merupakan keadaan sebelum terjadi aksi potensial. Pada keadaan istirahat potensial membran sel saraf berkisar -90 milivolt. Kemudian pada tahap depolarisasi, membran sel menjadi mudah dilalui oleh ion natrium, sehingga ion-ion positif masuk ke intrasel dalam jumlah besar. Sehingga, potensial membran istirahat dari -90 milivolt akan naik ke arah positif karena masuknya ion-ion positif. Pada serabut saraf yang besar, banyak sekali ion positif natrium yang masuk, sehingga membran potensial menjadi "overshoot" di atas 0 milivolt. Pada serabut saraf yang lebih kecil, lebih sedikit ion yang masuk sehingga potensial membran sel saraf masih di bawah 0 milivolt. Setelah tahap depolarisasi, kanal natrium akan mulai menutup dan kanal kalium akan lebih terbuka sehingga akan terjadi difusi yang cepat ion kalium dari intrasel ke

ekstrasel dan potensial membran akan kembali seperti keadaan istirahat (Guyton, 2014).

Tahap depolarisasi dan repolarisasi sangat dipengaruhi oleh kanal natrum berpintu listrik dan kanal kalium. Kanal natrium berpintu listrik mempunyai dua pintu, yaitu pintu aktivasi di membran bagian luar dan pintu inaktivasi di membran bagian dalam. Saat keadaan istirahat, pintu aktivasi akan tertutup mempertahankan negativitas potensial membran. Ketika negativitas potensial membran berkurang dan mencapai titik potensial tertentu, biasanya diantara -70 milivolt hingga -50 milivolt, pintu aktivasi akan terbuka dan ion natrium akan masuk sehingga terjadi depolarisasi yang cepat. Setelah beberapa saat ion natrium masuk, pintu inaktivasi akan menutup sehingga menghalangi masuknya ion natrium ke intrasel dan akhirnya terjadi repolarisasi. Pintu inaktivasi tidak akan kembali terbuka sebelum potensial membran kembali seperti potensial membran istirahat (Guyton, 2014).

Pada keadaan istirahat kanal kalium berpintu listrik tertutup untuk mencegah keluarnya ion kalium ke ekstrasel dan mempertahankan potensial membran istirahat. Ketika negativitas potensial membran berkurang, kanal kalium berpintu listrik akan terbuka, tetapi dengan kecepatan yang lambat sehingga terbukanya kanal kalium berpintu listrik bersamaan dengan proses inaktivasi kanal natrium berpintu listrik. Bersamaan dengan berhentinya aliran masuk ion natrium, ion kalium akan dikeluarkan karena kanal kalium berpintu listrik yang terbuka. Hal tersebut akan mempercepat proses repolarisasi (Guyton, 2014).

Selain dua ion yang telah disebutkan terdapat peran dari ion-ion lain dalam mekanisme aksi potensial, termasuk ion kalsium. Hampir seluruh

membran sel tubuh memiliki kanal kalsium. Kalsium bekerja sama dengan natrium bahkan menggantikan natrium di beberapa sel dalam mekanisme aksi potensial. Di membran sel terdapat kanal kalsium berpintu listrik yang berespon terhadap pengurangan negativitas membran potensial. Terbukanya kanal kalsium berpintu listrik saat depolarisasi menghasilkan aliran masuk kalsium ke dalam intrasel sehingga membantu membran sel terdepolarisasi. Kanal kalsium berpintu listrik membuka dengan kecepatan 10 sampai 20 kali lebih lambat daripada kanal natrium berpintu listrik, sehingga kalsium berperan dalam mempertahankan aksi potensial sedangkan natrium berperan dalam menimbulkan aksi potensial (Guyton, 2014).

2.2 Epilepsi

2.2.1 Definisi Epilepsi

Epilepsi adalah keadaan kelainan otak dengan kecenderungan untuk menimbulkan bangkitan epileptik yang terus menerus dengan konsekuensi neurobiologis, kognitif, psikologis, dan sosial. Bangkitan epileptik yang dimaksud adalah tanda atau gejala yang berlangsung sesaat akibat aktivitas neuronal abnormal dan berlebihan di otak (PERDOSSI, 2014). Menurut ILAE 2014, definisi klinis dari epilepsi adalah sebagai berikut :

1. Minimal terdapat dua bangkitan tanpa provokasi atau reflek dengan jarak antar dua bangkitan lebih dari 24 jam
2. Satu bangkitan tanpa provokasi atau reflek dengan kemungkinan sebesar 60% akan terjadi bangkitan serupa dalam kurun waktu 10 tahun apabila terjadi bangkitan kedua
3. Sudah ditegakkan diagnosis sindrom epilepsi (ILAE, 2014).

2.2.2 Klasifikasi Epilepsi

Epilepsi terbagi menjadi dua bagian, yaitu epilepsi fokal dan epilepsi general. Pada epilepsi fokal bangkitan epileptik dimulai dari fokus yang terlokalisir di otak dan saat serangan bisa jadi tidak ada gangguan kesadaran. Epilepsi general terjadi pada daerah yang lebih luas pada kedua belahan otak dan saat serangan terdapat gangguan kesadaran (Munir, 2017). Tabel 2.1 menunjukkan klasifikasi epilepsi berdasarkan ILAE 1981.

2.2.3 Etiologi Epilepsi

2.2.3.1 Idiopatik

Tidak didapatkan lesi struktural di otak atau defisit neurologik. Diperkirakan terdapat predisposisi genetik dan berhubungan dengan usia (PERDOSSI, 2014).

2.2.3.2 Kriptogenik

Dianggap simptomatik tetapi penyebabnya belum diketahui. Contohnya adalah sindrom West, sindrom Lennox-Gastaut, dan epilepsi mioklonik. Gambaran klinisnya sesuai ensefalopati difus (PERDOSSI, 2014).

Tabel 2.1 Klasifikasi Epilepsi Berdasarkan Jenis Bangkitan

Klasifikasi	Subklasifikasi	Gejala yang mengikuti
Bangkitan parsial/fokal	Bangkitan parsial sederhana	Dengan gejala motorik
		Dengan gejala somatosensoris
		Dengan gejala otonom
		Dengan gejala psikis

	Bangkitan parsial kompleks	Bangkitan parsial sederhana diikuti penurunan kesadaran
	Bangkitan parsial yang menjadi umum sekunder	Bangkitan yang disertai gangguan kesadaran sejak awal bangkitan
		Parsial sederhana yang menjadi umum
		Parsial kompleks yang menjadi umum
Bangkitan umum/general	Lena (<i>absence</i>)	Tipikal lena
		Atipikal lena
	Mioklonik	
	Klonik	
	Tonik	
	Tonik Klonik	
Bangkitan yang tidak terklasifikasi	Atonik/astatik	

2.2.3.3 Simptomatik

Didapatkan lesi struktural pada otak, misalnya cedera kepala, infeksi sistem saraf pusat, kelainan kongenital, tumor otak, dan lain-lain (PERDOSSI, 2014).

2.2.4 Patofisiologi Epilepsi

Disregulasi dari keseimbangan eksitasi dan inhibisi yang disebabkan oleh berbagai penyebab dapat menyebabkan berbagai kelainan otak, termasuk

bermacam-macam tipe epilepsi. Pada epilepsi terjadi peningkatan yang persisten dari eksitasi sel saraf, meskipun penyebab dari kelainan tersebut belum diketahui secara pasti kecuali apabila terdapat trauma otak, kelainan metabolik, tumor otak, infeksi, stroke, inflamasi, dan hipoksia (Asgari, 2016).

Pada penelitian sebelumnya secara klinis dan eksperimental telah dibuktikan bahwa pada beberapa tipe epilepsi, penyebab terjadinya bangkitan adalah berkurangnya inhibisi dari neurotransmitter *gamma-aminobutyric acid* (GABA). Sebagai neurotransmitter utama yang memiliki sifat inhibisi GABA memegang peranan penting dalam mengontrol eksitabilitas sel saraf dengan mengaktivasi reseptornya di susunan saraf pusat. Reseptor GABA tipe A bersifat permeabel terhadap ion Cl⁻ dan merupakan reseptor yang memiliki sifat inhibisi dengan jumlah paling banyak di otak. Reseptor GABA mengontrol proses informasi basal di sistem saraf pusat dan mempengaruhi berbagai proses fisiologis dan patofisiologis. Reseptor dan neurotransmitter GABA saat ini banyak digunakan sebagai target dari obat anti-epilepsi (Asgari, 2016).

Berdasarkan penelitian sebelumnya ditemukan bahwa disfungsi dari kanal ion juga memegang peranan penting dalam patofisiologi epilepsi (Engelborghs *et al.*, 2000). Kanal natrium berpintu listrik merupakan kanal yang mempunyai peran penting pada eksitabilitas membran. Mutasi pada gen yang mengkode kanal ini dapat menjadi faktor utama terjadinya epilepsi (Xiang dan Jiang, 2013). Terdapat beberapa kasus mutasi genetik pada reseptor asetilkolin presinaps yang berfungsi untuk menginduksi pengeluaran GABA dengan mediator kalsium, sehingga pengeluaran kalsium yang dimediasi oleh asetilkolin menjadi berkurang dan pengeluaran GABA sebagai neurotransmitter penghambat juga berkurang. (Engelborghs *et al.*, 2000).

2.3 Fluoresensi Kalsium

Kalsium merupakan pembawa pesan intrasel yang mengatur berbagai fungsi sel, seperti sekresi, kontraksi, eksitabilitas selular dan ekspresi gen di semua sistem organ. Desain dan teknik fluoresensi indikator kalsium kurang lebih 30 tahun yang lalu membuka alternatif baru untuk meneliti sinyal kalsium intrasel berbasis pengambilan gambar dengan derajat resolusi temporal dan spasial yang tinggi. Teknik tersebut dapat dilakukan secara *in vivo* maupun *in vitro* (Russel, 2011).

Aktivitas neuron menginduksi influks kalsium melalui kanal kalsium berpintu listrik yang dapat diteliti menggunakan pewarnaan indikator kalsium (Tada *et al.*, 2014). Teknik fluoresensi dapat menilai fluktuasi level kalsium intrasel pada saat depolarisasi sel saraf (Pacico dan Le Meur, 2014). Pada beberapa dekade sudah dikembangkan berbagai macam indikator yang dapat menganalisis dinamika kalsium intrasel. Indikator fluoresensi kalsium sintetis saat ini menjadi bahan utama untuk meneliti fungsi dan dinamika sirkuit sel saraf dan mekanisme yang mendasarinya mulai dari resolusi sinap tunggal hingga resolusi sel tunggal (Tada *et al.*, 2014).

Pada penelitian sebelumnya secara *in vitro* menggunakan sel kultur SH-SY5Y yang diberikan paparan neurotransmitter eksitatorik, neurotoksin, dan oksidatif stress, yaitu glutamate, 6-hydroxydopamine, dan glucose oxidase, kalsium intrasel dievaluasi menggunakan teknik fluoresensi dengan pewarnaan *Fluo-3a* dan *JC-1*. Kadar kalsium intrasel dapat dievaluasi menggunakan *flowcytometry* (Sun *et al.*, 2015). Pada penelitian lain juga menggunakan teknik fluoresensi meneliti osilasi kalsium pada kultur korteks dan hipokampus tikus

laboratorium. Kultur primer dari korteks dan hipokampus tikus telah dibuktikan akan menimbulkan osilasi kalsium yang menyerupai hipersinkronisasi sel saraf pada aktivitas epileptiform. Pada penelitian ini menggunakan indikator fluoresensi kalsium *Fluo-4*. Dari hasil penelitian didapatkan data osilasi kalsium pada kultur sel yang muncul mulai hari 9-10 dengan pola yang bervariasi (Pacico dan Le Meur, 2014).

2.4 Sel Neuronal SH-SY5Y

Sel kultur SH-SY5Y merupakan derivat yang diambil dari biopsi sumsum tulang seorang perempuan usia 4 tahun dengan neuroblastoma. Sel SH-SY5Y dapat berdiferensiasi menjadi fenotip sel saraf yang berbeda-beda tergantung pada kondisi medium kultur dan prosedur diferensiasinya. Pada beberapa dekade, sel kultur SH-SY5Y digunakan menjadi model *in vitro* untuk mendeteksi efek dari toksin pada sel saraf, baik yang sudah matur maupun yang masih berkembang. Sel kultur SH-SY5Y juga merupakan sel yang paling sering digunakan untuk penelitian tentang penyakit Parkinson (Lundqvist, 2018).

Karakterisasi awal dari sel SH-SY5Y ini menunjukkan aktivitas sedang dari *dopamine- β -hydroxylase* dan kadar yang sangat rendah dari asetilkolin transferase, asetilkolinesterasi, dan butiril-kolinesterase, pelepasan noradrenalin basal, dan aktivitas tirosin hidroksilase. Tirosin hidroksilase adalah enzim yang mengubah tirosin menjadi *L-dopa*, prekursor dari dopamin, yang kemudian akan diubah menjadi noradrenalin oleh *dopamine- β -hydroxylase*. Meskipun keadaan tersebut tidak dapat diklasifikasikan sebagai murni dopaminergik, sel kultur SH-SY5Y ini telah banyak digunakan sebagai model *in vitro* untuk penelitian penyakit Parkinson (Xicoy *et al.*, 2017).

Sel kultur SH-SY5Y telah menjadi model yang sangat berguna dalam penelitian tentang fungsi sel saraf, termasuk sel kultur SH-SY5Y ini juga dapat mengepresikan kanal kalsium endogen. Pada penelitian sebelumnya dibuktikan adanya ekspresi kanal kalsium dengan berbagai sub tipe dan isoform kanal kalsium subunit 2.2 (Sousa *et al*, 2013). Sel kultur SH-SY5Y juga telah digunakan pada penelitian untuk melihat mekanisme terjadinya kematian sel setelah dipapar oleh neurotransmitter eksitatorik yang dapat menginduksi neurotoksisitas, neurotoksin, dan oksidatif stress. Sel kultur SH-SY5Y dipapar oleh glutamat, 6-*hydroxydopamine*, dan *glucose oxidase* kemudian dievaluasi proses apoptosis, kalsium intrasel, dan *receptor interacting protein kinase 1* dan 3 (Sun *et al.*, 2015).

2.5 Pilocarpine

Pilocarpine adalah suatu muskarinik agonis yang telah digunakan secara luas untuk menginduksi bangkitan pada hewan coba dengan administrasi sistemik atau intracerebral. Bangkitan yang diinduksi pilocarpine dikarakterisasikan dengan pola perubahan perilaku dan aktivitas elektrografik. Hipoaktivitas, tremor, pergerakan mioklonik pada kaki yang berprogres pada kejang mioklonik dengan salivasi, jatuh, dan akhirnya terjadi status epileptikus terjadi pada hewan coba yang dipapar oleh pilocarpine dengan berbagai dosis (Turski *et al.*, 1989).

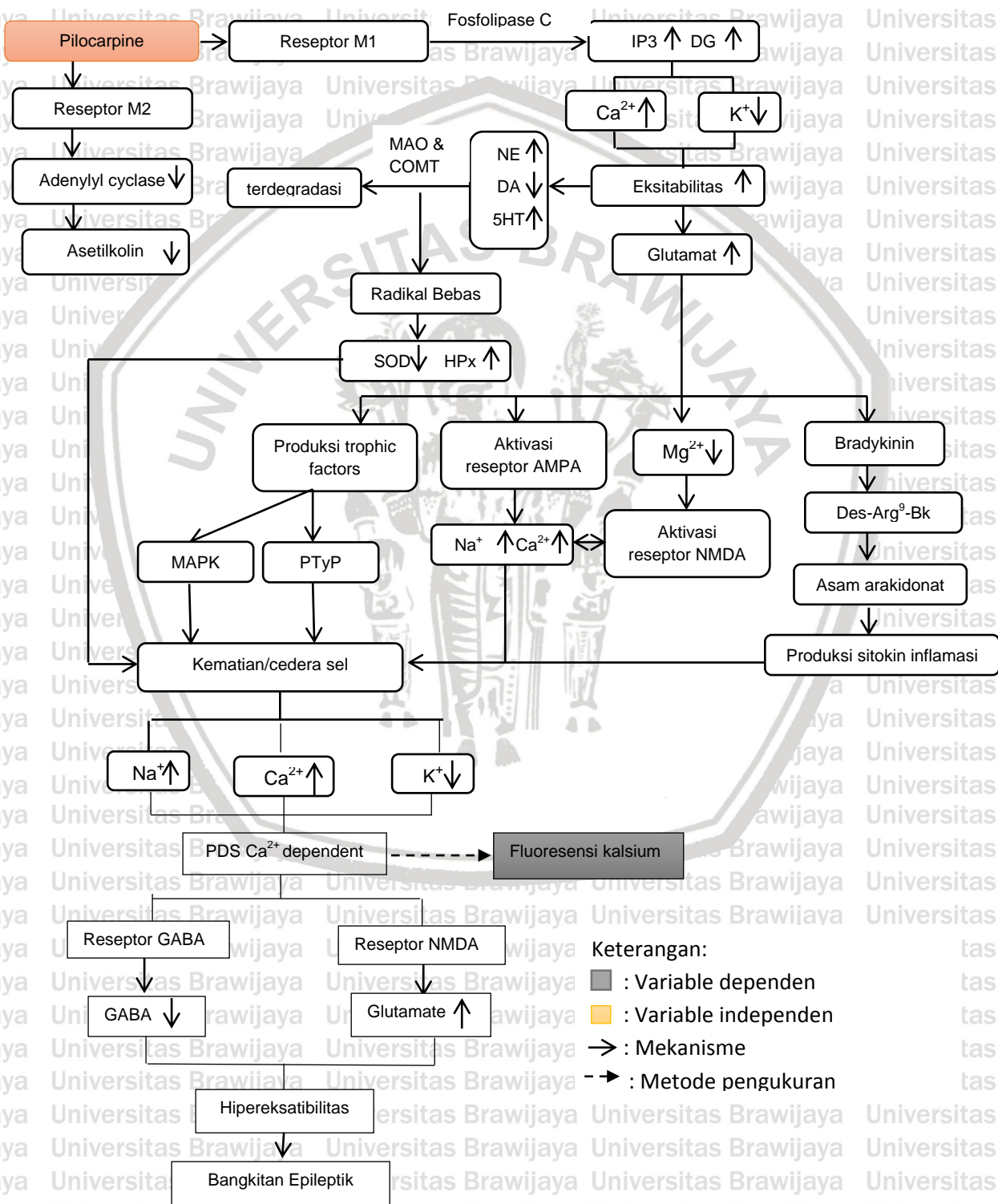
Pada penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa asetilkolin juga berperan dalam proses seluler yang mendasari epilepsi. Telah ditunjukkan bahwa eksitasi muskarinik-kolinergik di otak diakibatkan karena menurunnya konduktansi kalium yang bergantung pada voltase dan kalsium yang dimediasi

oleh konduktansi kalsium bergantung voltase dan natrium. Aksi asetilkolin ini menyebabkan masuknya ion kalsium dan natrium ke dalam sel saraf yang bertanggung jawab atas depolarisasi membran dan kejadian epileptik. Pada observasi klinis pada cairan serebrospinal pasien dengan epilepsi mengandung asetilkolin. Mekanisme asetilkolin yang menginduksi bangkitan epileptik inilah yang digunakan sebagai dasar penggunaan pilocarpine sebagai penginduksi epilepsi pada hewan coba (Turski *et al.*, 1989).

Kemampuan pilocarpine dalam menginduksi status epileptikus bergantung pada aktivasi reseptor M1, karena pada penelitian dengan tikus yang diblok reseptor M1 pemberian pilocarpine tidak membangkitkan kejang. Sebagai tambahan, status epileptikus yang diinduksi pilocarpine dapat diblok dengan pemberian sistemik antagonis muskarinik, yaitu atropine. Penelitian lain mendukung bahwa setelah kejang diinisiasi oleh reseptor M1, kejang akan dipertahankan dengan aktivasi reseptor NMDA (Curia *et al.*, 2008).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN



3.1 Uraian Kerangka Konsep

Pilocarpin adalah suatu agonis muskarinik yang dapat menginduksi reseptor muskarinik M1 dan M2. Perlekatan pilocarpin dengan reseptor M1 akan mengaktivasi fosfolipase C yang akan mereproduksi diacylglycerol (DG) dan inositoltrifosfat (IP3) yang akan mengakibatkan perubahan arus Ca^{2+} dan K^{+} yang akan meningkatkan eksitabilitas otak. Eksitabilitas otak akan menyebabkan peningkatan penggunaan norepinefrin (NE) dan serotonin (5HT) serta penurunan penggunaan dopamin (DA). Setelah menempel di reseptor masing-masing monoamine tersebut akan didegradasi oleh MAO dan COMT serta dalam prosesnya akan menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas tersebut ditandai dengan penurunan *superoxidedismutase* (SOD) dan peningkatan *hydroperoxide* (HPx). Radikal bebas tersebut bisa menyebabkan cedera sel otak (Scorza *et al.*, 2008).

Peningkatan kalsium akan menginduksi peningkatan produksi glutamate. Peningkatan glutamat pada reseptor AMPA akan meningkatkan influx kalsium dan natrium serta menurunkan produksi magnesium yang berfungsi menghambat reseptor NMDA, sehingga reseptor tersebut akan aktif dan ikut berperan meningkatkan influk kalsium dan natrium ke sel postsinaps dan menginduksi *excitotoxicity* dan kematian sel. Selain itu, peningkatan glutamate juga meningkatkan ekspresi *trohic factors* di hipokampus dan menyebabkan aktivasi MAPK dan PTyP. Aktivasi tersebut akan menyebabkan modifikasi ekspresi genetic dan berhubungan dengan proses apoptosis. Jumlah glutamate yang berlebihan juga mengakibatkan aktivasi jalur kinin. Produksi bradikinin akan menginduksi produksi sitokin inflamasi yang menyebabkan cedera dari sel otak (Scorza *et al.*, 2008).

Kematian sel akan menyebabkan konsentrasi ion disekitar sel akan terganggu, dimana akan didapatkan kenaikan ion natrum dan kalsium serta penurunan ion kalium. Keadaan ion tersebut akan menyebabkan kondisi yang disebut *paroxysmal depolarizing shift* (PDS). PDS kemudian akan mengaktifkan reseptor GABA, sehingga GABA sebagai neurotransmitter inhibitory menjadi turun kadarnya dan juga mengaktifkan reseptor NMDA, sehingga glutamate sebagai neurotransmitter eksitatorik akan berlebihan jumlahnya. Gangguan mekanisme-mekanisme inhibitorik dan eksitatorik ini akibat perubahan kanal ion, atau akibat cedera neuron dan sinaps inhibitorik, dapat menyebabkan terbentuknya fokus kejang. Selain itu, jika sirkuit eksitatorik lokal ditingkatkan oleh reorganisasi jaringan neuron setelah cedera otak, sinkronisasi kelompok-kelompok neuron dapat terjadi (McPhee dan Ganong, 2011).

Pada penelitian ini kadar kalsium yang asumsinya akan meningkat setelah pemberian pilocarpin diukur fluoresensinya. Pengukuran fluoresensi ini dilakukan pada kultur sel neuronal SH-SY5Y yang telah diberikan asam kainat sebelumnya dengan berbagai dosis. Prediksinya kadar kalsium akan semakin meningkat seiring dengan penambahan dosis pilocarpin hingga batas dosis optimal tertentu yang akan diteliti juga nantinya.

3.2 Hipotesis

1. Fluoresensi kalsium pada kultur sel SH-SY5Y yang dipapar dengan pilocarpine menyerupai gambaran gelombang epilepsi
2. Dosis pilocarpine berkolerasi positif terhadap gambaran epilepsi pada sel neuronal hingga dosis optimal

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian menggunakan desain eksperimen sejati (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vitro* dengan *Randomized Posttest Only Controlled Group Design, single blind*, pada kultur sel neuronal SH-SY5Y yang dipapar dengan pilocarpine.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah kultur sel SH-SY5Y. Terdapat dua kelompok sampel, yaitu kelompok sampel dengan perlakuan dan kelompok sampel tanpa perlakuan. Pada kelompok sampel dengan perlakuan akan diberikan pilocarpine berbagai dosis yaitu 1 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM .

4.3 Besar Sampel Penelitian

Penentuan besarnya sampel penelitian dihitung dengan menggunakan rumus besaran sampel menurut Federer (Badriyah, 2016) untuk penelitian eksperimental yaitu : $(t - 1)(n - 1) \geq 15$, dimana t adalah jumlah perlakuan/treatment sedangkan n adalah jumlah sampel. Berdasarkan rumus di atas, jumlah sampel per kelompok adalah 5.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian tahap satu adalah pilocarpine berbagai dosis, dan variabel terikat adalah fluoresensi kalsium.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Pilocarpine

Pilocarpine 100 mg dengan kemurnian $\geq 98\%$. Dalam penggunaannya diencerkan sampai mencapai dosis yang akan digunakan (sesuai petunjuk pabrik). Dosis yang digunakan adalah 1 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM .

Pemberian dilakukan secara *bath application* selama 48 jam.

4.5.2 Fluoresensi Kalsium

Untuk fluoresensi kalsium digunakan *Ca tracker* yaitu Fluo-4 (abcam).

Pengukuran fluoresensi dilakukan segera setelah prosedur *bath application* dengan pilocarpine dengan eksitasi 484 nm dan emisi 515 nm. Pengukuran fluoresensi secara kualitatif dan semikuantitatif menggunakan *confocal laser scanning microscope*.

Penghitungan fluoresensi kalsium dilakukan selama satu menit dengan interval 13 detik. Dilakukan selama satu menit karena dirasa telah cukup untuk menunjukkan gambaran epileptiform yang terjadi dalam *millisecond* (Stafstrom, 1998). Sedangkan interval 13 detik karena keterbatasan alat yang membutuhkan waktu dalam satu kali *scanning* lapang pandang selama 13 detik. Meskipun sebenarnya aktivitas epileptiform lebih terlihat pada interval *millisecond*.

4.5.3 Kultur Sel Neuronal SH-SY5Y

Kultur Sel Neuronal SH-SY5Y merupakan turunan sel neuroblastoma manusia yang sering digunakan sebagai model *in vitro* pada penelitian neuronal. *Human neuroblastoma SH-SY5Y cells* (The European Collection of Cell Culture) dibiakkan pada Roswell Park Memorial Institute medium dengan penisilin-streptomisin 1 %, Fetal bovine serum 10%, L-glutamin 1%, dan media DMEM dan disimpan pada suhu 37C/5% CO₂; 2 ml accutase digunakan untuk inkubasi (*passage*) sel-sel setiap 3-5 hari ketika pertumbuhan sel mencapai konfluensi 90% (Sun *et al.*, 2016).

4.5.4 Model Epilepsi *in Vitro*

Epilepsi pada manusia dikaitkan dengan kejadian PDS (*paroxysmal depolarizing shift*), yaitu proses depolarisasi yang memanjang dan diikuti oleh fluktuasi kadar intensitas Ca²⁺ yang disebabkan oleh beberapa aksi potensial yang menyebabkan depolarisasi yang sangat besar dan terjadi secara paroksismal. Sehingga, model epilepsi *in Vitro* dapat diwakili dengan gambaran yang menunjukkan aktivitas epileptiform berupa peningkatan dan fluktuasi kadar intensitas Ca²⁺ intraseluler (Stafstrom, 1998).

Pemaparan agen prokonvulsan pilocarpine dapat meniru patogenesis epilepsi yang terjadi pada manusia dengan menyebabkan pola kadar Ca²⁺ yang secara dinamis meningkat saat *influx* Ca²⁺ terjadi dan menurun ketika terjadi respon seluler dengan *efflux* K⁺, kemudian akan terjadi peningkatan kadar Ca²⁺ intraseluler kembali saat pola tersebut berulang (Stafstrom, 1998).

4.5.5 Aktivitas Epileptiform

Aktivitas epileptiform yang dimaksud pada penelitian ini yaitu apabila terjadi peningkatan dan fluktuasi kadar intensitas kalsium intraseluler yang terjadi akibat depolarisasi yang terjadi sangat besar saat aktivitas PDS. Sedangkan fluktuasi kadar intensitas kalsium intraseluler terjadi akibat depolarisasi yang sangat besar tersebut terjadi secara paroksismal pada aktivitas PDS.

4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Proses kultur dan pengukuran semua parameter terkait dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang. Waktu pengerjaan penelitian mulai bulan April sampai Agustus 2019.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Cell Thawing dan Penumbuhan Sel

1. Disiapkan media kultur berupa penisilin-streptomisin 1 % (1 ml), Fetal bovine serum 10% (10 ml), L-glutamin 1% (2 mM), dan media DMEM. Media yang telah dicampur difilter dengan membran ukuran 0,2 μm .
2. Sel dikeluarkan dari nitrogen cair atau freezer -80°C dan dilakukan thawing dengan *water batch* hingga mencair.
3. Suspensi sel diambil dengan mikropipet dan sel dimasukkan setetes demi setetes ke dalam media kultur yang telah disiapkan.
4. Conical tube ditutup dengan rapat dan disentrifugasi pada

kecepatan 1500 rpm selama 3 menit dengan suhu 24-25°C.

5. Conical tube dibawa ke LAF kemudian disterilkan bagian luarnya dengan alkohol 70%.

6. Conical tube dibuka dan supernatan (media kultur) dituang ke dalam pembuangan.

7. Ditambahkan 4 ml media kultur baru dan dilakukan sentrifugasi kedua dengan 1500 rpm selama 3 menit dengan suhu 24-25°C.

8. Sel ditransfer ke dalam flask kultur masing-masing 2 ml.

9. Ditambahkan media kultur 5 ml pada masing-masing flask kultur.

10. Kondisi sel diamati dengan mikroskop cahaya kemudian sel dimasukkan ke dalam inkubator CO² 5%.

11. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan viabilitasnya, jika sel tumbuh baik maka dapat dilakukan sub kultur. Sub kultur dilakukan jika sel sudah confluent. Jika belum maka media diganti dan dilakukan inkubasi kembali.

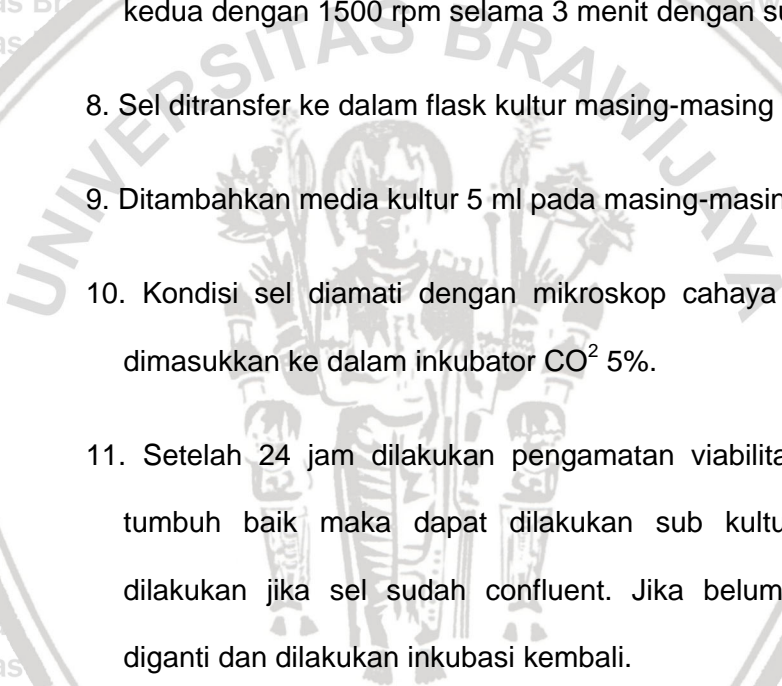
4.7.2 Panen Sel

1. Sel diambil dari inkubator CO² dan diamati kondisi sel dibawah mikroskop. Panen sel dilakukan setelah sel 80% confluent.

2. Media dibuang dengan menggunakan pipet pasteur steril.

3. Sel dicuci 2 kali dengan PBS.

4. Ditambahkan acutase secara merata dan ditunggu selama 2



menit untuk melepaskan sel dari flask.

5. Ditambahkan media kultur untuk menginaktifkan acutase.

Resuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu (tidak menggerombol).

6. Keadaan sel diamati di mikroskop. Resuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol.

7. Sel yang telah lepas satu-satu ditransfer ke dalam conical steril baru.

4.7.3 Subkultur

1. Media di dalam flask dibuang dan sel dicuci dengan PBS 15 ml sebanyak 2 kali.

2. Ditambahkan accutase secara merata dan ditunggu selama 2 menit untuk melepaskan sel dari flask.

3. Sel yang sudah terlepas diambil $\pm 300 \mu\text{l}$ dan dimasukkan ke dalam conical yang lain. Ditambahkan 7 ml media kultur dan resuspensi kembali, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 3 menit.

4. Pellet dire suspensi dengan media kultur, kemudian dimasukkan ke dalam flask. Sel diamati di bawah mikroskop lalu dimasukkan inkubator.

5. Selanjutnya pembiakan sel dilakukan dengan mengganti media kultur secara berkala sehingga diperoleh kerapatan sel yang

diinginkan.

4.7.4 Pemberian Pilocarpine

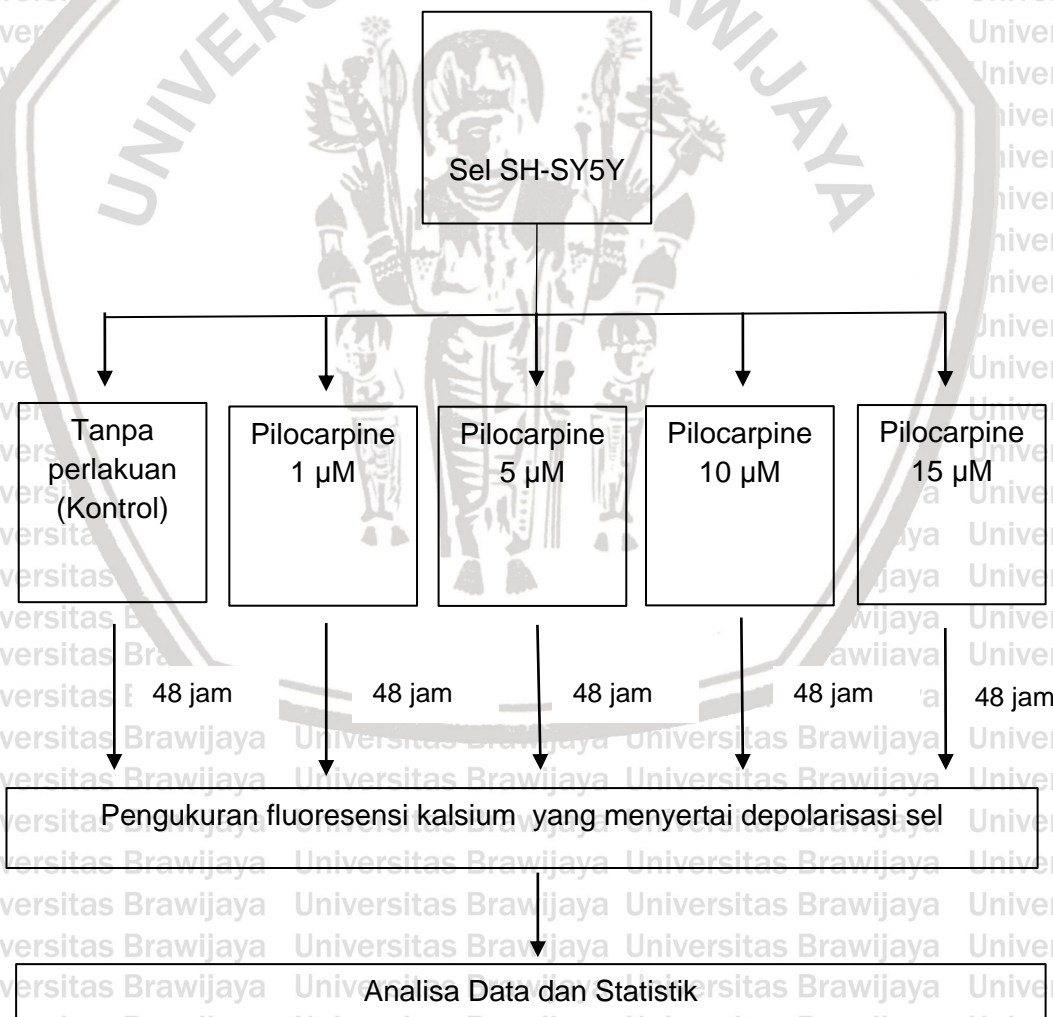
Pada penelitian ini, pemberian pilocarpine dilakukan secara *bath application*, setelah diencerkan dengan air sesuai petunjuk pabrik hingga mencapai konsentrasi 1 μM , 5 μM , 10 μM , dan 15 μM selama 48 jam.

4.7.5 Fluoresensi kalsium

1. Melakukan ekulibrasi semua material dan reagen dalam suhu ruangan sebelum digunakan, kocok perlahan
2. Melakukan dua kali untuk semua standar, kontrol, dan sampel
3. Menambahkan 100 μL Fluo-4 AM *dye-loading solution* dalam cawan petri sel.
4. Melakukan inkubasi dalam inkubator sel selama 1 jam, dan kemudain inkubasi dalam suhu ruangan selama 15-30 menit
5. Catatan : jika pemeriksaan memerlukan suhu 37°C. eksperimen segera dilakukan tanpa inkubasi pada suhu ruangan
6. Menyiapkan plat dengan HHBS atau buffer yang diinginkan
7. Melakukan *calcium flux assay* dengan monitor intensitas fluoresens pada Ex/Em maksimal = 490/ 525 nm
8. Hasil fluoresensi kalsium akan dirubah dalam bentuk angka dengan satuan arbitrary unit menggunakan *confocal laser scanning microscope*.

4.8 Alur Penelitian

Kultur sel yang matur diberi perlakuan pemberian pilocarpine secara *bath application* selama 48 jam. Sampel kultur dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kelompok tanpa perlakuan, kelompok dengan dosis pilocarpine 1 μM , 5 μM , 10 μM , dan 15 μM . Setelah itu dilakukan pengukuran fluoresensi kalsium secara kualitatif (foto pendaran) dan semikuantitatif (angka dengan satuan AU) menggunakan confocal laser scanning microscope. Hasil pengukuran dicatat dan dianalisis secara statistik.



Gambar 4.1: Alur Penelitian

4.9 Teknik Analisis Data (Pedhazur, 1982; Santoso, 2005)

Dalam penelitian ini teknik analisis data yang dilakukan yaitu uji normalitas data sampel dengan uji *Shapiro-Wilk* dan uji komparasi digunakan uji *One Way Anova* jika data terbukti terdistribusi normal dan menggunakan uji *Kruskal Wallis* jika data tidak terdistribusi normal. Semua penghitungan dilakukan dengan bantuan piranti lunak (*soft-ware*) *SPSS for Windows 25*. Secara lengkap dijelaskan di bawah ini.

4.9.1 Uji Prasyarat Parametrik

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan maka dipilih pendekatan uji statistik yang digunakan yaitu uji statistika parametrik. Sebelum dilakukan analisis data dengan menggunakan uji pada statistika parametrik, maka data akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik, yaitu data sampel dari variabel terukur diuji terlebih dahulu apakah data tersebar atau terdistribusi normal. Uji normalitas data dalam penelitian ini digunakan uji *Shapiro-Wilk*. Pada uji ini kriteria keputusan dengan melihat nilai probabilitas kesalahan empirik pada nilai Sig atau dikenal dengan *p-value*. Jika nilai Sig atau *p-value* menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$, maka disimpulkan data terdistribusi normal, sehingga uji parametrik dapat digunakan. Sedangkan jika nilai Sig atau *p-value* menunjukkan nilai yang lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$, maka disimpulkan data tidak terdistribusi normal, sehingga uji parametrik tidak dapat digunakan (Santoso, 2005). Selanjutnya uji statistik nonparametrik merupakan

pilihan alternatif kedua bila pada prasyarat uji statistik parametrik tidak terpenuhi.

4.9.2 Uji Komparasi

Teknik analisis data uji Anova satu jalur (*independent one way Anova*) ini digunakan untuk membandingkan atau komparasi antara lebih dari 2 kelompok sampel yang bebas (*independent*). Teknik ini digunakan untuk membandingkan dua nilai rerata variabel terukur (data berskala rasio) dengan ketentuan bahwa data termasuk data parametric apabila data tidak terdistribusi normal maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* (Santoso, 2005). Adapun kriteria keputusan berdasarkan nilai Sig atau *p-value*, jika $p\text{-value} > \alpha = 0.05$ maka disimpulkan tidak ada perbedaan yang bermakna antar dua kelompok yang dibandingkan, dan jika $p\text{-value} < \alpha = 0.05$ maka disimpulkan ada perbedaan yang bermakna antar dua kelompok yang dibandingkan.

4.9.3 Uji Korelasi

Uji korelasi tidak lain adalah menguji ada atau tidak adanya tingkat keeratan hubungan dua variabel terukur (minimal berskala interval), yaitu korelasi antara dua variabel respon. Dalam penelitian ini digunakan uji korelasi *Pearson* jika data terdistribusi normal, tetapi jika tidak maka digunakan uji *Spearman's rho*. Kriteria keputusan berdasarkan nilai Sig atau *p-value*, jika $p\text{-value} > \alpha = 0.05$ maka disimpulkan tidak ada korelasi yang bermakna antar dua variabel, dan jika $p\text{-value} < \alpha = 0.05$ maka disimpulkan ada korelasi yang bermakna antar dua variabel.

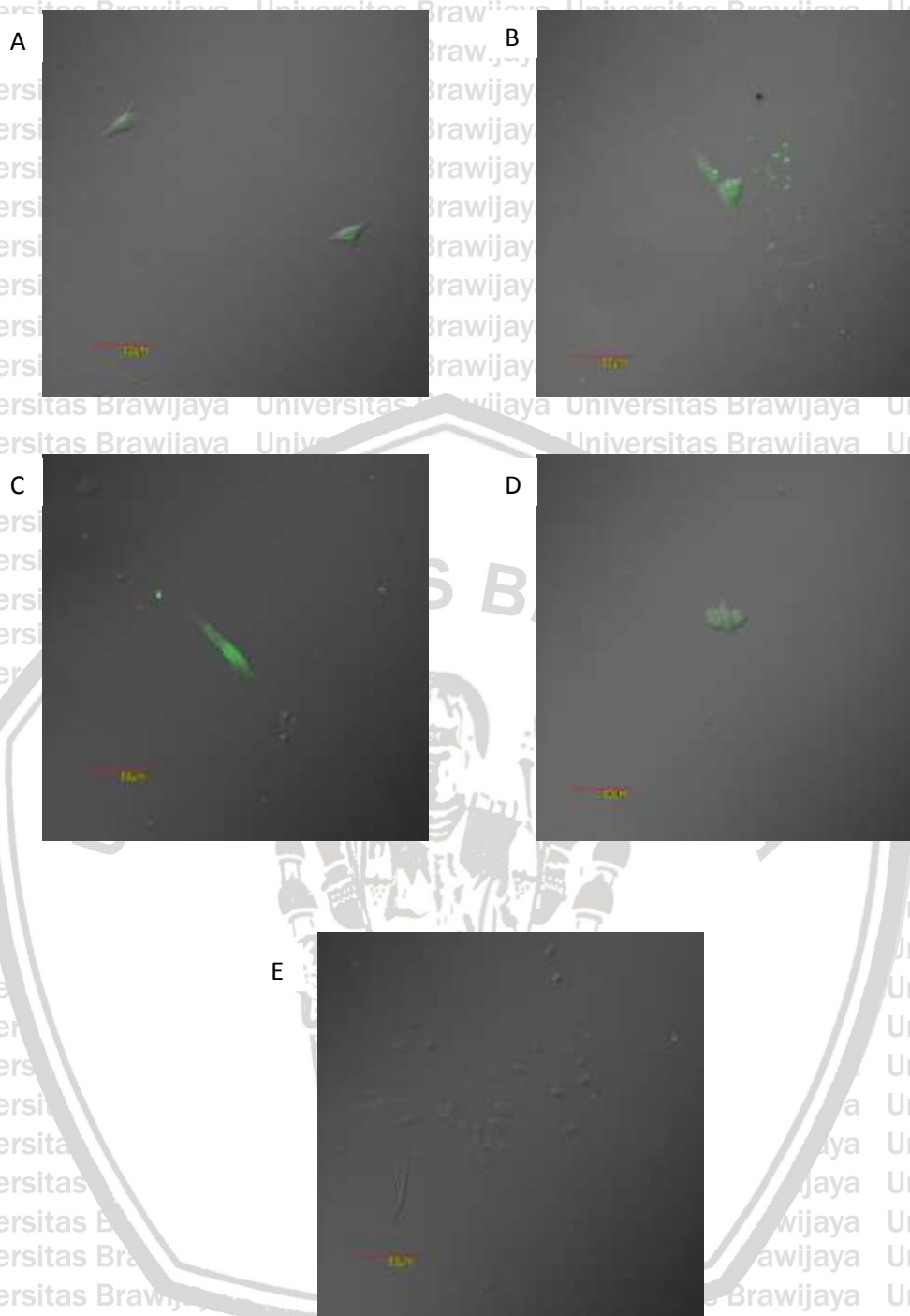
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini menggunakan rancangan eksperimental murni (*True Experiment Design*) di laboratorium secara *in vitro* dengan *Randomized Post Test Controlled Group Design* yang bertujuan untuk membuktikan bahwa paparan pilocarpin pada kultur sel SH-SY5Y dapat menyebabkan fluoresensi kalsium yang menyerupai aktivitas epileptiform, serta untuk mendapatkan dosis pilocarpin yang paling optimal untuk menimbulkan gambaran aktivitas epileptiform. Sel neuronal SH-SY5Y yang sudah diberi perlakuan diamati menggunakan mikroskop konfokal. Data yang diperoleh dianalisis diawali dengan uji normalitas *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene Statistic*. Dilakukan uji *One-Way Anova* jika sebaran data normal dan homogen, serta uji nonparametrik (*Kruskal-Wallis*) jika sebaran data tidak normal atau tidak homogen.

5.1. Hasil Pengamatan Menggunakan Mikroskop Konfokal

Setelah diberi paparan pilocarpin selama 48 jam, kultur sel neuronal SH-SY5Y diberi pewarnaan menggunakan Fluo-4 kemudian diamati fluoresensi kalsiumnya dibawah mikroskop konfokal. Fluorosensi kalsium ditandai dengan pendaran bewarna hijau pada sel dan direkam pada detik 13,26,39,52, dan 65. Hasil pengamatan disajikan pada gambar 5.1.



Gambar 5.1: Hasil Pengamatan Mikroskop Konfokal pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berbagai Dosis

Keterangan: A=Fluorosensi kalsium pada sel SH-SY5Y tanpa paparan pilocarpine,
 B=Fluorosensi kalsium pada sel SH-SY5Y yang dipapar pilocarpine 1 μM,
 C=Fluorosensi kalsium pada sel SH-SY5Y yang dipapar pilocarpine 5 μM,
 D=Fluorosensi kalsium pada sel SH-SY5Y yang dipapar pilocarpine 10 μM,
 E=Fluorosensi kalsium pada sel SH-SY5Y yang dipapar pilocarpine 15 μM

Pada gambar 5.1 dapat dilihat bahwa pada setiap detik rekaman terdapat peningkatan pendaran fluoresensi kalsium pada dosis 1 μM , 5 μM , 10 μM lebih terang apabila dibandingkan dengan kontrol, akan tetapi pada dosis 15 μM pendaran fluoresensi kalsium lebih redup apabila dibandingkan dengan kontrol.

Pada dosis 5 μM didapatkan pendaran fluoresensi kalsium paling terang. Hasil pengamatan pada mikroskop konfokal, juga dapat dilihat pada setiap dosis terjadi penurunan dan peningkatan fluoresensi kalsium dalam setiap detik rekaman.

5.2 Hasil Analisis Data Fluoresensi Kalsium Berdasarkan Waktu Rekaman

Dilakukan analisis data fluoresensi kalsium pada setiap waktu rekaman, yaitu detik 13,26,39,52,65 untuk melihat perbandingan keefektifan pemberian dosis pilocarpin pada peningkatan fluoresensi kalsium sel neuronal SH-SY5Y.

5.2.1 Hasil Uji Normalitas Data dan Homogenitas Varian

Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* digunakan untuk mengetahui normalitas distribusi data. Hasil uji normalitas disajikan pada tabel 5.1. Dari hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* didapatkan nilai signifikansi > 0.05 pada semua kelompok di setiap waktu rekaman, sehingga dapat disimpulkan data terdistribusi normal.

Tabel 5.1: Hasil Uji Normalitas *Shapiro-Wilk* Fluoresensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Waktu Rekaman

Kelompok	p-value				
	Detik 13	Detik 26	Detik 39	Detik 52	Detik 65
Kontrol	0.119	0.728	0.761	0.483	0.508
Dosis 1 μM	0.678	0.537	0.537	0.552	0.524
Dosis 5 μM	0.23	0.261	0.281	0.329	0.27
Dosis 10 μM	0.862	0.897	0.914	0.353	0.38
Dosis 15 μM	0.316	0.628	0.835	0.823	0.465

Setelah dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk*, dilakukan uji homogenitas varian menggunakan uji *Levene Statistic* untuk mengetahui homogenitas sampel penelitian. Hasil uji homogenitas disajikan pada tabel 5.2. Hasil uji homogenitas data fluorosensi kalsium didapatkan nilai signifikansi > 0.05 pada semua waktu rekaman, sehingga dapat disimpulkan bahwa data homogen.

Tabel 5.2: Hasil Uji Homogenitas *Levene Statistic* Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Waktu Rekaman

Waktu Rekaman	p-value
Detik 13	0.23
Detik 26	0.231
Detik 39	0.239
Detik 52	0.224
Detik 65	0.257

5.2.2 Hasil Uji *One-Way Anova*

Setelah uji normalitas dan uji homogenitas didapatkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen, langkah selanjutnya adalah melakukan uji komparasi dengan uji *One-Way Anova*. Hasil uji *One-Way Anova* disajikan pada tabel 5.3. Pada uji *One-Way Anova* didapatkan nilai signifikansi < 0.05 pada semua waktu rekaman, sehingga dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang signifikan pada salah satu atau lebih perbandingan rata-rata antar kelompok di semua waktu rekaman.

Tabel 5.3: Hasil Uji *One-Way Anova* Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Waktu Rekaman

Waktu Rekaman	p-value
Detik 13	0.000
Detik 26	0.005
Detik 39	0.000
Detik 52	0.000
Detik 65	0.000

5.2.3 Hasil Uji *Post Hoc Tukey*

Setelah dilakukan uji *One-Way Anova* dilakukan uji *Post Hoc Tukey* untuk melihat signifikansi perbandingan rata-rata fluorosensi kalsium antar kelompok. Uji *Post Hoc Tukey* pada waktu rekaman detik 13 disajikan pada tabel 5.4, detik 26 pada tabel 5.5, detik 39 pada tabel 5.6, detik 52 pada tabel 5.7, dan detik 65 pada tabel 5.8.

Tabel 5.4: Hasil Uji *Post Hoc Tukey* Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Waktu Rekaman Detik 13

	Kontrol	Dosis 1 μM	Dosis 5 μM	Dosis 10 μM	Dosis 15 μM
Kontrol		0.496	0.000	0.692	0.833
Dosis 1 μM	0.496		0.000	0.997	0.094
Dosis 5 μM	0.000	0.000		0.000	0.000
Dosis 10 μM	0.692	0.997	0.000		0.172
Dosis 15 μM	0.833	0.094	0.000	0.172	

Tabel 5.5: Hasil Uji *Post Hoc Tukey* Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Waktu Rekaman Detik 26

	Kontrol	Dosis 1 μM	Dosis 5 μM	Dosis 10 μM	Dosis 15 μM
Kontrol		0.556	0.000	0.782	0.741
Dosis 1 μM	0.556		0.000	0.995	0.081
Dosis 5 μM	0.000	0.000		0.000	0.000
Dosis 10 μM	0.782	0.995	0.000		0.167
Dosis 15 μM	0.741	0.081	0.000	0.167	

Tabel 5.6: Hasil Uji *Post Hoc Tukey* Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Waktu Rekaman Detik 39

	Kontrol	Dosis 1 μM	Dosis 5 μM	Dosis 10 μM	Dosis 15 μM
Kontrol		0.513	0.000	0.748	0.727
Dosis 1 μM	0.513		0.000	0.994	0.067
Dosis 5 μM	0.000	0.000		0.000	0.000
Dosis 10 μM	0.748	0.994	0.000		0.143
Dosis 15 μM	0.727	0.067	0.000	0.143	

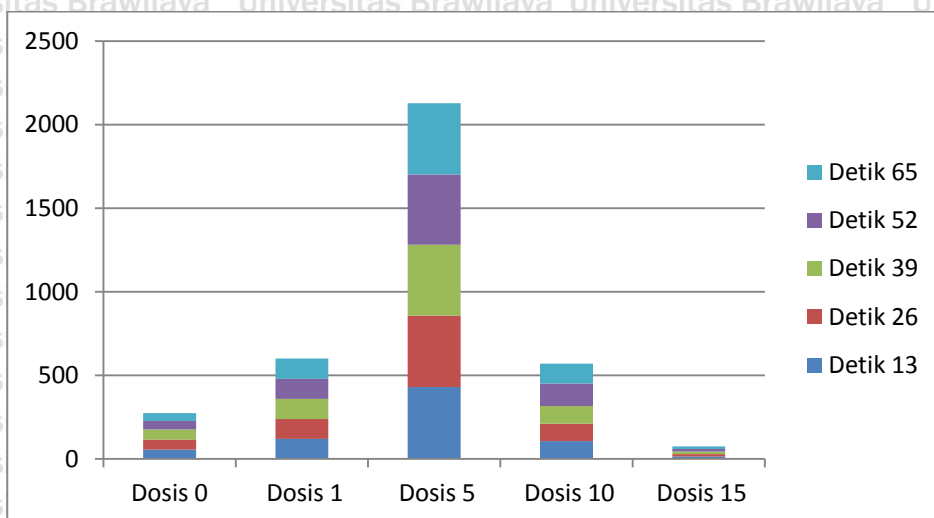
Tabel 5.7: Hasil Uji *Post Hoc Tukey* Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Waktu Rekaman Detik 52

	Kontrol	Dosis 1 μM	Dosis 5 μM	Dosis 10 μM	Dosis 15 μM
Kontrol		0.281	0.000	0.135	0.853
Dosis 1 μM	0.281		0.000	0.992	0.045
Dosis 5 μM	0.000	0.000		0.000	0.000
Dosis 10 μM	0.135	0.992	0.000		0.018
Dosis 15 μM	0.853	0.045	0.000	0.018	

Tabel 5.8: Hasil Uji *Post Hoc* Tukey Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Waktu Rekaman Detik 65

	Kontrol	Dosis 1 μM	Dosis 5 μM	Dosis 10 μM	Dosis 15 μM
Kontrol		0.282	0.000	0.310	0.905
Dosis 1 μM	0.282		0.000	1.000	0.059
Dosis 5 μM	0.000	0.000		0.000	0.000
Dosis 10 μM	0.310	1.000	0.000		0.066
Dosis 15 μM	0.905	0.059	0.000	0.066	

Pada detik ke 13 (tabel 5.4) didapatkan bahwa perbandingan rata-rata fluorosensi kalsium pada kelompok dosis 5 μM dibandingkan dengan semua kelompok lain adalah signifikan ($p < 0.05$). Pada detik ke 26 (tabel 5.5), detik ke 39 (tabel 5.6), dan detik ke 65 (tabel 5.8) juga didapatkan hasil yang sama, yaitu perbandingan rata-rata fluorosensi kalsium kelompok dosis 5 μM dibandingkan semua kelompok adalah signifikan. Sedangkan pada detik ke 52 (tabel 5.7), didapatkan nilai yang signifikan pada perbandingan rata-rata fluorosensi kalsium kelompok dosis 5 μM dengan semua kelompok lain dan pada perbandingan rata-rata fluorosensi kalsium kelompok dosis 15 μM dengan kelompok dosis 1 μM dan dosis 10 μM . Gambar 5.2 menunjukkan perbandingan rata-rata fluorosensi kalsium antar kelompok perlakuan pada setiap detik rekaman.



Gambar 5.2: Perbandingan Rata-Rata Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Antar Kelompok Perlakuan Pada Setiap Detik Rekam

Keterangan: Dosis 0=Kontrol, Dosis 1=Perlakuan pilocarpine 1 μM , Dosis 5=Perlakuan pilocarpine 5 μM , Dosis 10=Perlakuan pilocarpine 10 μM , Dosis 15=Perlakuan pilocarpine 15 μM

5.2.4 Hasil Uji Korelasi Spearman

Setelah dilakukan uji komparasi *One-Way Anova* dan *Post Hoc Tukey*, dilakukan uji korelasi menggunakan uji *Spearman* untuk melihat korelasi kenaikan dosis dengan fluoresensi kalsium pada setiap kelompok di setiap waktu rekaman. Hasil uji korelasi *Spearman* disajikan pada tabel 5.9. Dari hasil uji korelasi *Spearman* didapatkan nilai signifikansi >0.05 pada setiap detik rekaman, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada korelasi antara kenaikan dosis dengan fluoresensi kalsium.

Tabel 5.9: Hasil Uji Korelasi Spearman Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Waktu Rekaman

Waktu rekaman	p-value
Detik 13	0.197
Detik 26	0.204
Detik 39	0.117
Detik 52	0.420
Detik 65	0.319

5.3 Hasil Analisis Data Fluorosensi Kalsium Berdasarkan Dosis Pilocarpine

Dilakukan analisis data fluorosensi kalsium pada setiap kelompok perlakuan, untuk melihat apakah ada fluktuasi fluorosensi kalsium terhadap setiap dosis pilocarpine, yaitu dosis kontrol, dosis 1 μM , dosis 5 μM , dosis 10 μM , dosis 15 μM .

5.3.1 Hasil Uji Normalitas Data dan Homogenitas Varian

Uji normalitas digunakan untuk mengetahui distribusi data. Uji yang digunakan adalah uji normalitas *Shapiro Wilk*. Hasil uji normalitas dapat dilihat pada tabel 5.10. Dari hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikansi $p > 0.05$ pada setiap kelompok dosis di setiap waktu rekaman. Sehingga dapat disimpulkan bahwa data terdistribusi normal.

Tabel 5.10: Hasil Uji Normalitas Shapiro Wilk Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Dosis Perlakuan

Waktu rekaman	p-value				
	Kontrol	Dosis 1 μM	Dosis 5 μM	Dosis 10 μM	Dosis 15 μM
Detik 13	0.119	0.678	0.230	0.862	0.316
Detik 26	0.728	0.537	0.261	0.897	0.628
Detik 39	0.761	0.424	0.281	0.914	0.835
Detik 52	0.483	0.552	0.329	0.353	0.823
Detik 65	0.508	0.524	0.270	0.380	0.465

Setelah dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk*, dilakukan uji homogenitas varian menggunakan uji *Levene Statistic* untuk mengetahui homogenitas sampel penelitian. Hasil uji homogenitas disajikan pada tabel 5.11. Hasil uji homogenitas data fluorosensi kalsium didapatkan nilai signifikansi > 0.05 pada semua kelompok dosis, sehingga dapat disimpulkan bahwa data homogen.

Tabel 5.11: Hasil Uji Homogenitas Levene Statistic Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y Berdasarkan Dosis Perlakuan

Dosis	p-value
Kontrol	0.832
Dosis 1 μM	1.000
Dosis 5 μM	1.000
Dosis 10 μM	0.915
Dosis 15 μM	0.976

5.3.2 Hasil Uji *One-Way Anova*

Setelah didapatkan data yang terdistribusi normal dan homogen, langkah selanjutnya adalah melakukan uji komparasi dengan uji *One-Way Anova*. Hasil uji *One-Way Anova* disajikan pada tabel 5.12. Pada uji *One-Way*

Anova didapatkan nilai signifikansi >0.05 pada semua waktu rekaman, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan pada semua perbandingan rata-rata antar kelompok di semua waktu rekaman.

Tabel 5.12: Hasil Uji *One-Way Anova* Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Dosis Perlakuan

Dosis	p-value
Kontrol	0.345
Dosis 1 μM	1.000
Dosis 5 μM	1.000
Dosis 10 μM	0.860
Dosis 15 μM	0.876

5.3.3 Hasil Uji *Post Hoc Tukey*

Setelah dilakukan uji *One-Way Anova* dilakukan uji *Post Hoc Tukey* untuk melihat signifikansi perbandingan rata-rata fluorosensi kalsium antar kelompok. Uji *Post Hoc Tukey* pada dosis kontrol ditampilkan pada tabel 5.13, dosis 1 μM pada tabel 5.14, dosis 5 μM pada tabel 5.15, dosis 10 μM pada tabel 5.16, dan dosis 15 μM pada tabel 5.17. Dari hasil uji analisis *post hoc tukey* didapatkan bahwa perbandingan rata-rata antar kelompok dosis tidak signifikan. Gambar 5.3 menunjukkan perbandingan rata-rata antar kelompok dosis.

Tabel 5.13: Hasil Uji *Post Hoc* Tukey Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Dosis Kontrol

	Detik 13	Detik 26	Detik 39	Detik 52	Detik 65
Detik 13		0.947	0.959	0.967	0.852
Detik 26	0.947		1.000	0.656	0.439
Detik 39	0.959	1.000		0.688	0.469
Detik 52	0.967	0.656	0.688		0.996
Detik 65	0.865	0.439	0.469	0.996	

Tabel 5.14: Hasil Uji *Post Hoc* Tukey Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Dosis 1 μM

	Detik 13	Detik 26	Detik 39	Detik 52	Detik 65
Detik 13		1.000	1.000	1.000	1.000
Detik 26	1.000		1.000	1.000	1.000
Detik 39	1.000	1.000		1.000	1.000
Detik 52	1.000	1.000	1.000		1.000
Detik 65	1.000	1.000	1.000	1.000	

Tabel 5.15: Hasil Uji *Post Hoc* Tukey Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Dosis 5 μM

	Detik 13	Detik 26	Detik 39	Detik 52	Detik 65
Detik 13		1.000	1.000	1.000	1.000
Detik 26	1.000		1.000	1.000	1.000
Detik 39	1.000	1.000		1.000	1.000
Detik 52	1.000	1.000	1.000		1.000
Detik 65	1.000	1.000	1.000	1.000	

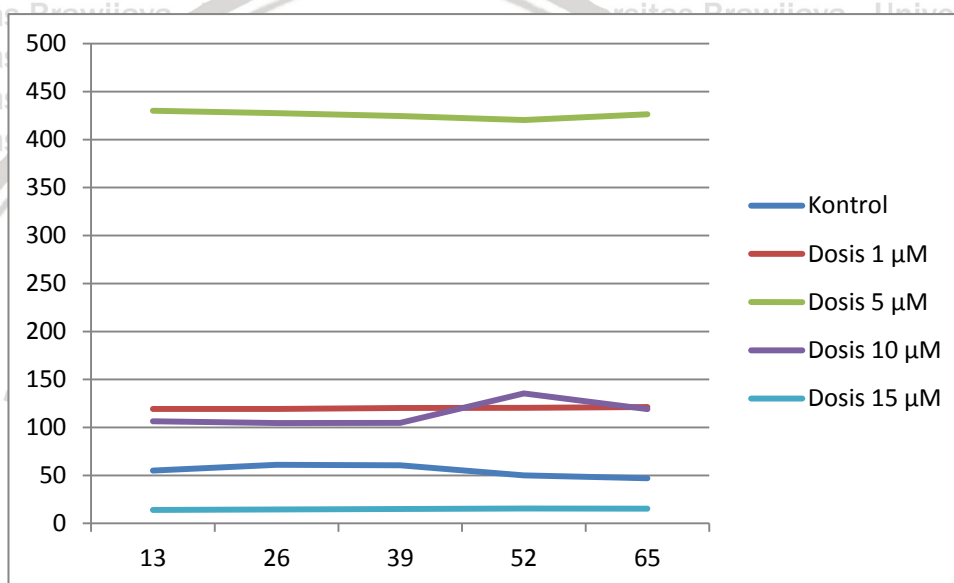
Tabel 5.16: Hasil Uji *Post Hoc* Tukey Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Dosis 10 μM

	Detik 13	Detik 26	Detik 39	Detik 52	Detik 65
Detik 13		1.000	1.000	0.904	0.995
Detik 26	1.000		1.000	0.883	0.992
Detik 39	1.000	1.000		0.886	0.992
Detik 52	0.904	0.883	0.886		0.987
Detik 65	0.995	0.992	0.992	0.987	



Tabel 5.17: Hasil Uji *Post Hoc* Tukey Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine pada Dosis 15 μ M

	Detik 13	Detik 26	Detik 39	Detik 52	Detik 65
Detik 13		0.998	0.979	0.878	0.915
Detik 26	0.998		0.999	0.967	0.982
Detik 39	0.979	0.999		0.995	0.999
Detik 52	0.878	0.967	0.995		1.000
Detik 65	0.915	0.982	0.999	1.000	



Gambar 5.3: Perbandingan Rata-Rata Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Antar Kelompok Perlakuan Berdasarkan Dosis Perlakuan

Keterangan: Sumbu X: waktu rekaman (detik), Sumbu Y: Fluorosensi Kalsium (AU)

5.3.4 Hasil Uji Korelasi Spearman

Uji korelasi *Spearman* digunakan untuk melihat korelasi lama waktu rekaman dengan fluorosensi kalsium pada setiap kelompok di setiap waktu rekaman. Hasil uji korelasi *Spearman* disajikan pada tabel 5.17. Dari hasil uji korelasi *Spearman* didapatkan nilai signifikansi >0.05 pada setiap detik

rekaman, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada korelasi antara kenaikan dosis dengan fluorosensi kalsium.

Tabel 5.18: Hasil Uji Korelasi Spearman Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berdasarkan Dosis Perlakuan

Dosis	p-value
Kontrol	0.204
Dosis 1 μM	0.682
Dosis 5 μM	0.550
Dosis 10 μM	0.575
Dosis 15 μM	0.442



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB 6

PEMBAHASAN

Aktivitas epileptiform terjadi salah satunya ditandai dengan adanya fluktuasi kalsium intraseluler pada sel neuron. Fluktuasi kalsium intraseluler yang menyertai depolarisasi neuron dapat dipantau dengan mengukur fluoresensi kalsium sebagai pendekatan alternatif (Pacico dan Meur, 2014). Pada penelitian ini didapatkan efek pada sel neuronal SH-SY5Y setelah diberikan perlakuan pilocarpine berbagai dosis. Efek yang didapatkan dilihat dengan mengukur fluoresensi kalsium menggunakan mikroskop konfokal.

Pilocarpine sebagai agen prokonvulsan dapat menginduksi reseptor muskarinik dan menimbulkan runtutan kejadian yang pada akhirnya akan mengakibatkan hipereksitabilitas dan bangkitan epileptik. Hipereksitabilitas ini disebabkan karena ketidakseimbangan antara neurotransmitter inhibisi dan neurotransmitter eksitatorik pada sel neuron (Scorza *et al*, 2008). Sel neuronal SH-SY5Y berasal dari sel neuroblastoma yang dapat merepresentasikan kondisi fisiologis dari sel neuron otak (Lundqvist, 2018). Pada penelitian sebelumnya sel neuronal SH-SY5Y digunakan untuk penelitian penyakit saraf lainnya, seperti Alzheimer, Parkinson, dan penelitian tentang patogenesis epilepsy (Xicoy *et al.*, 2017).

6.1 Pengaruh Dosis Pilocarpine pada Aktivitas Epileptiform

Pada penelitian digunakan empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol, dosis 1 μM , dosis 5 μM , dosis 10 μM , dan dosis 15 μM . Masing-masing kelompok perlakuan direkam pada lima waktu yang berbeda, yaitu pada detik 13,

26, 39, 52, dan 65. Dari hasil penelitian didapatkan rata-rata fluorosensi kalsium mengalami peningkatan seiring meningkatnya dosis pada kelompok kontrol, dosis 1 μM , dan dosis 5 μM kemudian mengalami penurunan seiring meningkatnya dosis pada dosis 10 μM dan dosis 15 μM . Fluorosensi kalsium paling tinggi didapatkan pada kelompok dosis 5 μM dan paling rendah pada kelompok dosis 15 μM .

Dari hasil uji *One Way Anova* didapatkan perbandingan rata-rata fluorosensi kalsium yang signifikan pada setiap detik rekaman. Dari hasil uji *Post hoc Tukey* dapat diketahui bahwa pada setiap detik rekaman perbandingan rata-rata fluorosensi kalsium antara dosis perlakuan dengan dosis kontrol yang signifikan terdapat pada dosis 5 μM , sedangkan pada dosis lain tidak signifikan.

Pada detik ke 52 juga didapatkan perbandingan rata-rata fluorosensi kalsium yang signifikan pada dosis 15 μM dibandingkan dengan dosis 1 μM dan dosis 10 μM . Dari analisis data dapat diketahui bahwa peningkatan fluorosensi kalsium paling optimal terjadi pada kelompok perlakuan dosis 5 μM . Pada uji korelasi *Spearman* didapatkan hasil yang tidak signifikan, ini berarti tidak ada korelasi antara peningkatan dosis dengan fluorosensi kalsium yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan dari data hasil penelitian, seiring peningkatan dosis terjadi peningkatan dan penurunan fluorosensi kalsium.

Pada dosis 10 μM dan dosis 15 μM terjadi penurunan fluorosensi kalsium dibandingkan dengan dosis 5 μM dimungkinkan terjadi karena dosis pilocarpine yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kematian sel seketika sehingga tidak terjadi peningkatan kalsium intraseluler. Beberapa penelitian pada hewan coba membandingkan dosis pilocarpine antara 100-400 mg/kg. Semakin tinggi dosis pilocarpine ternyata semakin meningkatkan angka mortalitas hewan coba. Pada

dosis 400 mg/kg pilocarpine dapat menginduksi status epileptikus pada 83%

hewan coba dengan angka mortalitas sebesar 100% (Curia *et al*, 2008).

Dijelaskan oleh Reddy dan Kuruba (2013) bahwa pemberian pilocarpine dengan dosis tinggi dapat menyebabkan kerusakan neuron otak yang ekstensif.

Kerusakan neuron ditandai dengan penyusutan badan sel neuron dengan edema neutrofil.

Penelitian oleh Nagarkatti *et.al* (2009) menunjukkan bahwa pada tikus model epilepsi yang diinduksi oleh pilocarpine sebagai prokonvulsan didapatkan

aktivitas epileptiform pada EEG (*Electroencephalography*). Kemudian dilakukan

pengamatan pada jaringan hipokampus tikus dan didapatkan peningkatan

kalsium yang signifikan pada kelompok yang diinduksi pilocarpine dan tidak

didapatkan peningkatan yang signifikan pada kelompok kontrol. Penelitian lain

menggunakan *Organotypic hippocampal slice culture* (OHSC) sebagai salah satu

alternatif untuk mengamati aktivitas epileptiform secara *in-vitro*. OHSC diberikan

perlakuan pilocarpine 0.1-5 mM selama 4 jam hingga 7 hari. Dari hasil penelitian

didapatkan aktivitas spontan yang menyerupai kejang pada 31 dari 35 kultur dan

19 dari 31 kultur didapatkan aktivitas epileptiform (Poulsen *et al*, 2002).

Pemberian pilocarpine secara sistemik pada tikus model epilepsi

menyebabkan perubahan elektrografis yang dibagi menjadi tiga periode, yaitu

periode akut yang menyebabkan terjadinya status epileptikus, periode laten atau

periode diam yang ditandai dengan fase interiktal pada EEG, dan periode

spontaneous recurrent seizures (SRSs) atau kejang spontan rekuren (Scorza *et*

al, 2008). Pada periode laten terjadi pembentukan sirkuit hipereksitabilitas yang

menjadi penyebab terjadinya SRSs. Epilepsi terjadi pada periode SRSs, yaitu 15

hingga 25 hari setelah fase laten pada tikus model epilepsi yang diinduksi oleh

pilocarpine (Arzimanoglou *et al*, 2002). Pada periode akut setelah pemberian pilocarpine didapatkan peningkatan regulasi ekspresi kanal kalsium *T-type* yaitu kanal $Ca_v3.2$. Peningkatan tersebut dapat diamati di hipokampus, talamus, korteks, dan struktur striata dari otak hewan coba. Peningkatan regulasi ekspresi kanal kalsium tersebut menjelaskan peningkatan arus kalsium intraseluler pada hewan coba yang diinduksi epilepsi menggunakan pilocarpine (Cain dan Snutch, 2012).

6.2 Pengaruh Waktu pada Aktivitas Epileptiform

Aktivitas epileptiform ditandai dengan terjadi fluktuasi kadar kalsium intraseluler dari waktu ke waktu yang digambarkan melalui fluktuasi fluoresensi kalsium. Namun, pada penelitian ini fluktuasi fluoresensi kalsium terbatas hingga detik 65 saja dan pengukuran dilakukan dalam interval waktu 13 detik. Oleh karena itu, analisis fluktuasi fluoresensi kalsium pada penelitian ini kurang optimal karena keterbatasan durasi dan interval waktu rekaman.

Pada kelompok dosis yang sama dilakukan pengamatan dan analisis statistik dari waktu ke waktu rekaman (detik 13, 26, 39,52, dan 65). Hal ini dilakukan untuk melihat apakah ada fluktuasi fluoresensi kalsium selama 65 detik rekaman. Pada kelompok perlakuan kontrol dan dosis $1 \mu\text{M}$, tidak terlihat adanya fluktuasi dari waktu ke waktu. Pada dosis $5 \mu\text{M}$ terjadi fluktuasi, yaitu terjadi penurunan seiring waktu pada detik 13 (430.05 AU), 26 (427.49 AU), 39 (424.52 AU), dan 52 (420.39 AU) setelah itu terjadi peningkatan pada detik 65 (426.37 AU). Pada dosis $10 \mu\text{M}$ juga terjadi fluktuasi, yaitu penurunan fluoresensi kalsium dari detik 13 (106.43 AU) ke detik 26 (104.57 AU) kemudian terjadi peningkatan seiring waktu pada detik 39 (104.79 AU) dan detik 52 (135.50 AU) penurunan

kembali pada detik 65 (119.06 AU). Fluktuasi fluoresensi kalsium terjadi pada dosis 15 μM , yaitu peningkatan seiring waktu pada detik 13 (14.08 AU), 26 (14.56 AU), 39 (14.98 AU), 52 (15.59 AU), kemudian turun pada detik 65 (15.43 AU). Pada analisis statistik didapatkan hasil yang tidak signifikan pada perbandingan rata-rata fluoresensi kalsium di semua kelompok perlakuan.

Pada penelitian secara *in vitro* menggunakan *hippocampal slice* pemberian pilocarpine 10 μM dilaporkan menyebabkan timbulnya aktivitas epileptiform. Namun, pada penelitian *in vitro* lain menggunakan otak marmot yang terisolasi pemberian pilocarpine dengan dosis 100-800 μM tidak menunjukkan adanya aktivitas epileptiform. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa peningkatan permeabilitas pada sawar darah otak pada otak marmot yang terisolasi dapat meningkatkan tingkat penetrasi obat dan dapat menyebabkan terjadinya aktivitas epileptiform (Uva *et al*, 2008).

Pada hewan coba model epilepsi yang diinduksi pilocarpine, peningkatan regulasi kanal kalsium yang mengakibatkan peningkatan kalsium intraseluler diamati setiap 50 milidetik. Observasi dilakukan terus menerus hingga hari ke 50 setelah periode akut untuk melihat efek pilocarpine pada kondisi kronis (Cain dan Snutch, 2012). Pemberian pilocarpine dapat memberikan efek periode akut berupa aktivitas kejang yang didefinisikan sebagai status epileptikus dan efek periode kronis sebagai *Spontaneous Recurrent Seizures* (SRSS) (Scorza *et al*, 2008).

Aktivitas epileptiform didefinisikan sebagai periode *spiking* dengan frekuensi 3-120 kali/menit dan berlangsung minimal 30 detik pada gambaran EEG (Castro *et al*, 2012). *Hippocampal Neuronal Culture* (HNC) digunakan

sebagai alternatif penelitian epilepsi *in-vitro*, pada penelitian tersebut dilakukan pengamatan pada kalsium intraseluler selama 40 menit untuk mengevaluasi kadar kalsium intraseluler dari waktu ke waktu. Pengamatan fluoresensi kalsium dilakukan pada penelitian tersebut sebagai metode pendekatan alternatif pengamatan kalsium intraseluler. Pada kultur sel saraf hipokampus yang diinduksi epilepsi didapatkan peningkatan kadar basal kalsium intraseluler dan perpanjangan waktu pengembalian kadar kalsium ke normal (Pal *et al*, 2000).

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini adalah durasi rekaman yang terlalu pendek, yaitu hanya 65 detik dan interval waktu rekaman yang terlalu lebar (13 detik) karena keterbatasan alat dan keterbatasan dalam penggunaan *software*.

Sedangkan aktivitas epileptiform lebih optimal diamati dalam interval *millisecond*.

BAB 7**KESIMPULAN DAN SARAN****7.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemaparan pilocarpine berbagai dosis terhadap kultur sel neuronal SH-SY5Y dapat memberikan gambaran fluoresensi kalsium yang menyerupai aktivitas epileptiform, yaitu peningkatan intensitas kalsium disertai fluktuasi dari waktu ke waktu
2. Dosis pilocarpine 5 μM merupakan dosis paling optimal yang dapat memberikan gambaran aktivitas epileptiform pada kultur sel neuronal SH-SY5Y
3. Tidak ada korelasi terhadap peningkatan dosis pilocarpine terhadap fluoresensi kalsium pada kultur sel neuronal SH-SY5Y

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan peneliti menyarankan hal-hal sebagai berikut:

1. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas epileptiform pada sel SH-SY5Y yang dipapar oleh pilocarpine dengan interval waktu perekaman fluoresensi kalsium lebih singkat, yaitu dalam interval milidetik (*millisecond*)
2. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas epileptiform pada sel SH-SY5Y yang dipapar oleh pilocarpine dengan durasi perekaman fluoresensi kalsium lebih lama

DAFTAR PUSTAKA

Arzimanoglou, A., Hirsch, E. and Nehlig, A. 2002. 'Epilepsy and neuroprotection : An illustrated review', (October).

Asgari, A. (2016) 'Acta Persica Pathophysiological Pathophysiology of epilepsy', *Acta Persica Pathophysiol*, 1(2), pp. 1–2.

Cain, S.M. and Snutch, T.P., 2010. Voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Epilepsia*, 51, pp.11-11

Castro OW, Santos VR, Pun RYK, McKlveen JM, Batie M, Holland KD, et al. (2012) Impact of Corticosterone Treatment on Spontaneous Seizure Frequency and Epileptiform Activity in Mice with Chronic Epilepsy. *PLoS ONE* 7(9): e46044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046044>

Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S., & Avoli, M. 2008. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of neuroscience methods*, 172(2), 143–157. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.04.019

Engelborghs, S. et al. 2000. 'Review article Pathophysiology of epilepsy', *Acta neurologica belga*, 100, pp. 201–213. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11233674>.

Feng, C. et al. 2016. 'Lycopene protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against hydrogen peroxide-induced death via inhibition of oxidative stress and mitochondria-associated apoptotic pathways', *Molecular Medicine Reports*, 13(5), pp. 4205–4214. doi: 10.3892/mmr.2016.5056.

Ganong, William F; McPhee, Stephen J. 2011. epilepsi. In dr. F. Dany (Ed.), *Patofisiologi Penyakit* (5th ed., pp. 191–194). Jakarta: Buku Kedokteran EGC.

Guyton, Arthur; Hall, J. 2014. Fisiologi Kedokteran. In E. Isfandiary (Ed.), *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran* (12th ed., pp. 63–66). Singapore: Elsevier Ltd.

Hern, L. 2012. 'A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy', 2012. doi: 10.1155/2012/630853.

International League Against Epilepsy (ILAE). 2014. *Definition of Epilepsy*.

Lundqvist, J., .2018. *Neuroblastoma SH-SY5Y and neural progenitor C17. 2 cell lines as models for neurotoxicological studies* (Doctoral dissertation, Department of Neurochemistry, Stockholm University).

Munir, Badrul. 2017. *Neurologi Dasar* (Edisi Kedua, pp. 187-192). Jakarta: Sagung Seto.

Nagarkatti, N., Deshpande, L.S. and DeLorenzo, R.J., 2009. Development of the calcium plateau following status epilepticus: role of calcium in epileptogenesis. *Expert review of neurotherapeutics*, 9(6), pp.813-824.

Neligan, A. and Sander, J. W. 2003. 'The incidence and prevalence of epilepsy', pp. 1–8.

Ngugi, A. K., Kariuki, S. M., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Sander, J. W., & Newton, C. R. 2011. Incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*, 77(10), 1005-12.

Pacico, N. and Meur, A. M. Le .2014. 'New in vitro phenotypic assay for epilepsy: Fluorescent measurement of synchronized neuronal calcium oscillations', *PLoS ONE*, 9(1). doi: 10.1371/journal.pone.0084755.

Pal, S., Limbrick Jr, D.D., Rafiq, A. and DeLorenzo, R.J., 2000. Induction of spontaneous recurrent epileptiform discharges causes long-term changes in intracellular calcium homeostatic mechanisms. *Cell Calcium*, 28(3), pp.181-193.

Persatuan Dokter Saraf Indonesia (PERDOSSI). 2014. *Pedoman Tatalaksana Epilepsi*. Jakarta : PERDOSSI

Poulsen, Frantz & Jahnsen, Henrik & Blaabjerg, Morten & Zimmer, Jens. 2002. Pilocarpine-induced seizure-like activity with increased BDNF and neuropeptide Y expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain research*. 950. 103-18. 10.1016/S0006-8993(02)03009-3.

Reddy, D.S. and Kuruba, R., 2013. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *International journal of molecular sciences*, 14(9), pp.18284-18318.

Russell J. T. (2011). Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology. *British journal of pharmacology*, 163(8), 1605-25.

Scorza, F. A. *et al.* 2009. 'The pilocarpine model of epilepsy: What have we learned?', *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 81(3), pp. 345–365. doi: 10.1590/S0001-37652009000300003.

Sousa, S. R. *et al.* 2013. 'Expression and Pharmacology of Endogenous Cav Channels in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells', *PLoS ONE*, 8(3). doi: 10.1371/journal.pone.0059293.

Stafstrom CE. Back to Basics: The Pathophysiology of Epileptic Seizures: A Primer For Pediatricians. *Pediatr Rev.* 1998;19(10):342-351. doi:10.1542/pir.19-10342

Sun, X. *et al.* 2016. 'Stimulus-dependent neuronal cell responses in SH-SY5Y neuroblastoma cells', *Molecular Medicine Reports*, 13(3), pp. 2215–2220. doi: 10.3892/mmr.2016.4759.

Tada, M., Takeuchi, A., Hashizume, M., Kitamura, K., & Kano, M. 2014. A highly sensitive fluorescent indicator dye for calcium imaging of neural activity in vitro and in vivo. *The European journal of neuroscience*, 39(11), 1720-8.

Turski, Lechoslaw & Ikonomidou, Chrysanthy & A. Turski, Waldemar & Bortolotto, Zuner & Cavalheiro, Esper. 1989. Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: A novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*. 3. 154 - 171. doi:10.1002/syn.890030207.

Uva, L., Librizzi, L., Marchi, N., Noe, F., Bongiovanni, R., Vezzani, A., ... de Curtis, M. 2008. Acute induction of epileptiform discharges by pilocarpine in the in vitro isolated guinea-pig brain requires enhancement of blood-brain barrier permeability. *Neuroscience*, 151(1), 303–312. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.10.037

Xicoy, H., Wieringa, B. and Martens, G. J. M. 2017. 'The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review', *Molecular Neurodegeneration*. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13024-017-0149-0.

Xiang, J. and Jiang, Y. 2014. 'Regulation of Cu-Zn superoxide dismutase on SCN2A in SH-SY5Y cells as a potential therapy for temporal lobe epilepsy', *Molecular Medicine Reports*, 9(1), pp. 16–22. doi: 10.3892/mmr.2013.1790.