

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

Afiyfa Kiysa Waafi¹, Machlusil Husna²

¹Program Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas
Brawijaya

²Departemen Neurologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRAK

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 fluoresensi 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 fluoresensi kalsium yang paling tinggi.

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

CALCIUM FLUORESCENCE ON SH-SY5Y NEURONAL CELL CULTURE INDUCED BY PILOCARPINE: *IN-VITRO* EPILEPTIC MODEL

Afiyfh Kiysa Waafi¹, Machlusil Husna²

¹ Student of Medical Degree Program, Faculty of Medicine

Universitas Brawijaya

² Department of Neurology, Faculty of Medicine Universitas

Brawijaya

ABSTRACT

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 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , dan 15 μM 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

Pendahuluan

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 progresitas epilepsi, tidak hanya pengobatan epilepsi secara simptomatik (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*.

Bahan dan Metode

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. Sel SH-SY5Y dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol, kelompok pilocarpine dosis 1 μM , 5 μM , 10 μM , dan 15 μM . Besarnya sampel penelitian dihitung dengan menggunakan rumus besaran sampel menurut Federer 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 adalah 5.

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.

Untuk fluoresensi kalsium digunakan Ca tracker yaitu Fluo-4 (abcam). Pengukuran fluoresensi dilakukan segera setelah prosedur *bath application* dengan asam kainat dengan eksitasi 484 nm dan emisi 515 nm. Pemeriksaan ion kalsium setelah dilakukan pengecatan menggunakan Fluo-4 dengan menggunakan confocal laser scanning microscopy (CLSM) untuk memvisualisasikan pendaran (fluorescence) dari panjang gelombang kalsium yang sensitif terhadap fluophore.

Human neuroblastoma SH-SY5Y cells (The European Collection of Cell Culture) di biakkan pada Roswell Park Memorial Institute medium dengan 15% FBS (Foetal Bovine Serum) dan 2nM L-glutamine dan disimpan pada suhu 37C/5% CO₂; 0,25% trypsin/EDTA digunakan untuk inkubasi (passage) sel-sel setiap 3-5 hari dengan dilusi 1:5 atau ketika mencapai konfluensi 90%. RNA diekstraksi pada inkubasi (passage) ke 29.

Prosedur dalam penelitian ini adalah cell thawing dan penumbuhan sel dengan media kultur berupa penisilin-streptomisin 1 % (1 ml), Fetal bovine serum qualified 10% (10 ml), glutamin (2mM), glukosa (21mM), bikarbonat (38mM) dan media MEM. Media yang telah dicampur difilter dengan membran ukuran 0,2 μm dan

kemudian disimpan dalam inkubator CO₂.

Sel diamati pertumbuhannya setiap hari dibawah mikroskop cahaya. Setelah sel mencapai konfluensi 80% dilakukan panen sel dan dilanjutkan dengan

subkultur untuk memperbanyak sel.

Dilakukan perbanyakan sel sampai diperkirakan jumlahnya cukup untuk dilakukan intervensi. Setelah jumlah sel cukup, sel yang sudah siap dipindahkan

ke well-24 untuk selanjutnya diberi

pemaparan pilocarpine sesuai kelompok perlakuan. Pemaparan dengan pilocarpine

dilakukan selama 48 jam. Setelah itu, dilakukan pewarnaan sel untuk melihat

fluoresensi kalsium yang terlihat pada sel dan pengukuran kadar Ca²⁺ menggunakan

Fluo4 kemudian dilakukan pengamatan dibawah mikroskop konfokal untuk melihat

fluoresensi kalsium dan kadar Ca²⁺ dengan menggunakan software Olympus

Fluoview Ver.4.2a dan diambil data pada detik ke- 13, 26, 39, 52, dan 65.

Selanjutnya uji statistik dilakukan setelah data hasil penelitian didapatkan

untuk mengetahui apakah hipotesis penelitian dapat diterima. Uji statistik

dilakukan dengan menggunakan program SPSS versi 25 untuk windows.

Langkah awal uji statistik yaitu

melakukan uji normalitas Shapiro-wilk Test dan uji homogenitas Levene Test

Homogeneity of Variances. Kedua uji tersebut dikatakan signifikan apabila nilai

($p > 0,05$) yang menandakan data tersebut parametrik. Apabila data tersebut

parametrik maka selanjutnya dilakukan uji

komparasi menggunakan One-Way

ANOVA, sedangkan apabila data non parametric dilakukan uji komparasi

dengan Kruskal-Wallis untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna antara

suatu kelompok data dengan kelompok data lainnya dalam keseluruhan data.

Hasilnya dikatakan ada perbedaan bermakna apabila nilai ($p < 0,05$). Uji Post

Hoc LSD untuk data parametric dan uji Mann-Whitney untuk data non parametrik

digunakan untuk membandingkan dua data secara berpasangan yaitu kelompok

perlakuan satu dan lainnya untuk mengetahui pada perbandingan kelompok

perlakuan mana yang memiliki perbedaan bermakna. Hasilnya dikatakan signifikan

apabila ($p < 0,05$). Setelah itu dilakukan uji korelasi Spearman untuk mengetahui ada

tidaknya hubungan yang bermakna antara variabel bebas dan terikat serta seberapa

kuat hubungan tersebut. Uji Korelasi Pearson dikatakan bermakna apabila nilai

signifikansi ($p < 0,05$) dan kekuatan hubungan dilihat dari angka koefisien

korelasi.

Hasil

Fluoresensi kalsium ditandai dengan pendaran berwarna hijau pada sel dan direkam pada detik 13,26,39,52, dan

65. Hasil pengamatan disajikan pada gambar 1. Pada gambar 5.1 dapat dilihat

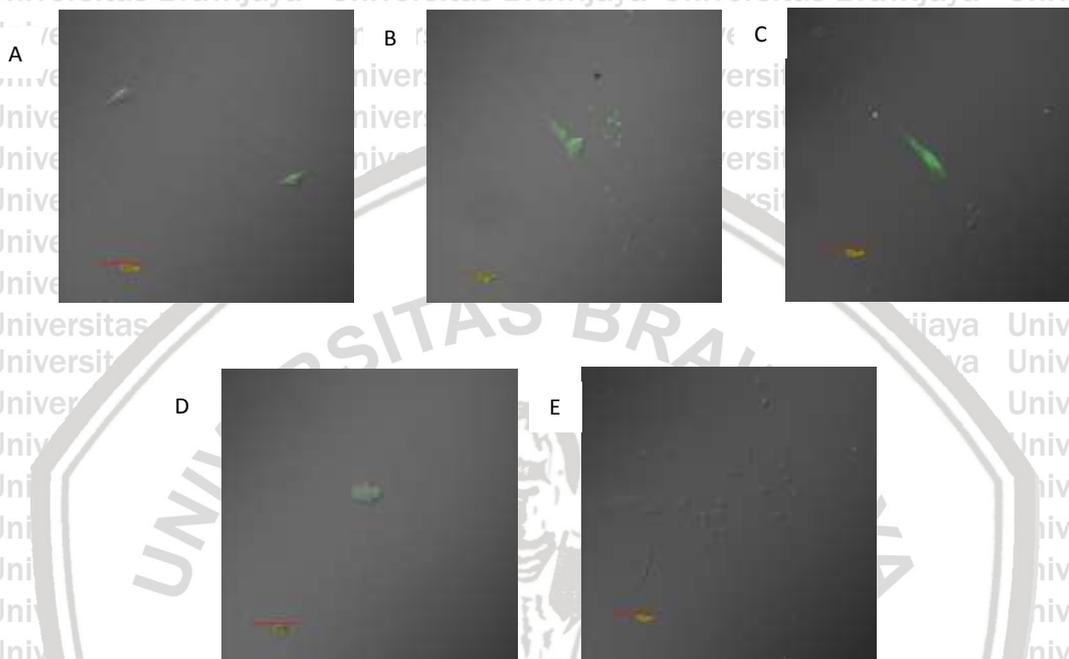
bahwa pada setiap detik rekaman terdapat peningkatan pendaran fluoresensi kalsium

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.

kalsium pada kelompok dosis 5 μM dibandingkan dengan semua kelompok lain adalah signifikan ($p < 0.05$). Pada detik ke 26, detik ke 39, dan detik ke 65 juga didapatkan



Gambar 1: Hasil Pengamatan Mikroskop Konfokal pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Berbagai Dosis. Kontrol Negatif (A), Dosis 1 μM (B), Dosis 5 μM (C), Dosis 10 μM (D), Dosis 15 μM (E)

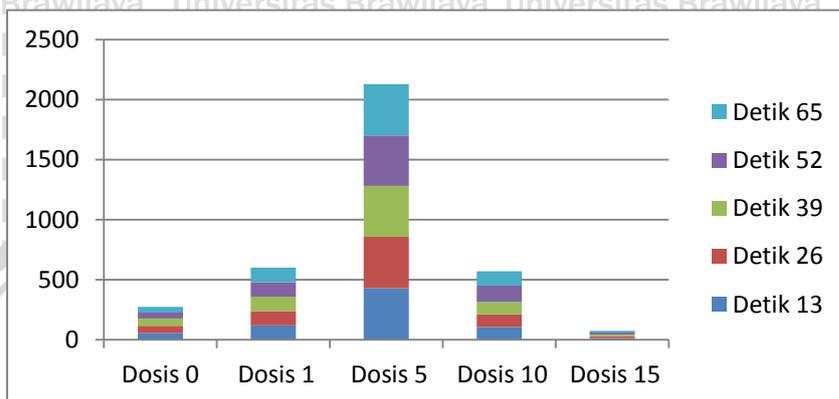
Data fluoresensi kalsium dianalisis menggunakan SPSS berdasarkan waktu rekaman dan berdasarkan dosis perlakuan. Pada analisis SPSS berdasarkan waktu rekaman, didapatkan hasil pada uji komparasi menggunakan *One Way Anova*, pada setiap detik rekaman perbandingan rata-rata fluoresensi kalsium antar kelompok perlakuan yang signifikan ($p < 0.05$). Pada hasil *post hoc tukey* detik ke 13 didapatkan bahwa perbandingan rata-rata fluoresensi

perbandingan rata-rata fluoresensi kalsium kelompok dosis 5 μM dibandingkan semua kelompok adalah signifikan. Sedangkan pada detik ke 52, didapatkan nilai yang signifikan pada perbandingan rata-rata fluoresensi kalsium kelompok dosis 5 μM dengan semua kelompok lain dan pada perbandingan rata-rata fluoresensi kalsium kelompok dosis 15 μM dengan kelompok dosis 1 μM dan dosis 10 μM . Gambar 2 menunjukkan perbandingan rata-rata

fluorosensi kalsium antar kelompok perlakuan pada setiap detik rekaman. Dari hasil uji korelasi Spearman didapatkan hasil yang tidak signifikan, artinya tidak ada korelasi antara kenaikan dosis dengan fluorosensi kalsium.

Pembahasan

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



Gambar 2: Perbandingan Rata-Rata Fluorosensi Kalsium pada Sel SH-SY5Y yang Dipapar Pilocarpine Antar Kelompok Perlakuan Pada Setiap Detik Rekaman

Analisis data fluorosensi kalsium berdasarkan dosis perlakuan ditujukan untuk melihat fluktuasi fluorosensi kalsium dalam setiap dosis pada dari waktu ke waktu. Dari hasil analisis data fluorosensi kalsium berdasarkan dosis perlakuan, didapatkan perbandingan yang tidak signifikan pada uji komparasi *One Way Anova*, hal ini berarti perbandingan rata-rata fluorosensi kalsium dalam setiap kelompok dari waktu ke waktu rekaman tidak bermakna. Hasil uji korelasi Spearman juga didapatkan hasil yang tidak signifikan.

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 .

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).

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 fluorosensi 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 fluorosensi kalsium selama 65 detik rekaman. Pada kelompok perlakuan kontrol dan dosis 1 μM , tidak terlihat adanya fluktuasi dari waktu ke waktu.

Pada dosis 5 μM 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 μM juga terjadi fluktuasi, yaitu penurunan fluorosensi 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 fluorosensi 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 fluorosensi 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).

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

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