

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Di Indonesia penyakit stroke merupakan penyebab kematian nomor 1 yaitu sebesar 15,4% dari seluruh kematian (Risikesdas, 2007). Stroke di dunia 87% nya disebabkan karena stroke iskemia, 10% nya stroke perdarahan intraserebral, dan 3% nya stroke perdarahan subarachnoid (Roger *et al.*, 2012). Stroke iskemik terjadi bila pembuluh darah yang memasok darah ke otak tersumbat oleh gumpalan darah atau sumbatan lain sehingga sel-sel di daerah *injury* tidak menerima oksigen dan glukosa yang dibutuhkan (Zieve, 2011). Padahal otak memiliki tingkat metabolisme yang tinggi namun memiliki kapasitas kecil untuk penyimpanan energi (Gilman, 2007). Sehingga selama kejadian iskemik, otak tidak dapat menghasilkan ATP yang cukup karena berkurangnya oksigen serta glukosa yang masuk (Lo *et al.*, 2005). Dalam keadaan ATP yang rendah, Na^+/K^+ -ATPase tidak dapat bekerja (Bano *et al.*, 2005). Pompa Na^+/K^+ -ATPase berfungsi menjaga gradien ion yang bertanggungjawab terhadap potensial membran sel saraf dan berperan dalam 70% dari metabolisme di otak (Atri *et al.*, 2009).

Penurunan aktivitas Pompa Na^+/K^+ -ATPase mengakibatkan masuknya ion Na^+ , Cl^- , dan air dan keluarnya ion K^+ ke ekstraseluler secara berlebihan sehingga terjadi membran depolarisasi neuron dan astroglia (Bano *et al.*, 2005). Dampak dari depolarisasi ini adalah terjadi edema sitotoksik dan terjadi pengeluaran glutamat ke ekstraseluler dalam jumlah banyak (Breton dan Rodriguez, 2012).



Transportasi glutamat diperankan oleh astrosit. Depolarisasi dari astrosit mengakibatkan pembengkakan astrosit sehingga astrosit yang seharusnya berperan dalam pengambilan glutamat pada akhirnya akan mengakibatkan pelepasan glutamat (*reversed uptake*) (Hazell, 2007). Peningkatan kadar glutamat ekstraseluler mengakibatkan aktivasi reseptor NMDA (subunit NR2C dan NR2D) yang pada akhirnya akan membuka *voltage-gated calcium-channel* dan mengakibatkan influk Ca^{2+} yang berlebihan serta masuknya Na^+ , Cl^- , dan air ke dalam sel sehingga memperparah edema sitotoksik yang terjadi (Nakka *et al.*, 2008).

Peningkatan masuknya Ca^{2+} ke dalam mitokondria sel neuron dapat menyebabkan disfungsi mitokondria dimana terjadi peningkatan transpor elektron mitokondria dan peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) seperti radikal superoksida (O_2^-) (Sureda, 2000). Radikal superoksida (O_2^-) selanjutnya akan berikatan dengan nitrogen oksida yang dihasilkan dari aktivasi NMDA membentuk peroksinitrit (ONOO^-). ONOO^- yang merupakan oksidan yang poten (Woodruff *et al.*, 2011), dapat merusak struktur lipid, protein, DNA sel, dan menyebabkan apoptosis sel (Dongoran, 2007). Pembentukan ROS (*reactive oxygen species*) bersifat neurotoxin, merusak DNA sel dan menyebabkan kerusakan endotel sawar darah otak sehingga permeabilitasnya akan meningkat (Khatri *et al.*, 2012). Permeabilitas endotel sawar darah otak yang meningkat akan mengakibatkan edema vasogenik. Edema sitotoksik yang terjadi pada fase awal dan edema vasogenik yang terjadi pada fase lambat setelah stroke iskemik berlangsung, digunakan untuk menentukan volume infark dari otak.

Salah satu upaya yang dilakukan untuk mengurangi volume infark yang terjadi setelah stroke iskemik adalah dengan memanfaatkan polifenol

resveratrol. Resveratrol mampu melewati sawar darah otak dan bekerja pada sistem saraf pusat (SSP) (Quincozes-Santos dan Gottfried, 2011). Resveratrol memiliki banyak fungsi dalam menghambat pembengkakan atau edema sel neuron dengan cara mengembalikan aktivitas pompa Na^+/K^+ -ATPase kembali normal (Simao *et al.*, 2011), meningkatkan aktivitas astrosit untuk meng-uptake glutamat, menurunkan kadar Ca^{2+} intraseluler pada neuron dan menghambat faktor pro-apoptotik pada eksitotoksisitas (Moldzio *et al.*, 2013). Selain itu, resveratrol juga menghambat pembentukan ROS, NO, dan peroksidasi lipid (Simao *et al.*, 2011). Namun, fungsi utama dari resveratrol adalah dengan meningkatkan pelepasan faktor neurotropik (NGF, GDNF, dan BDNF) dan meningkatkan ekspresi reseptor tirosin kinase, TrkA dan TrkB (Valderrama *et al.*, 2009). Ikatan antara faktor neurotropik dan Trk membuat Trk teraktivasi (Zhang *et al.*, 2012). Reseptor segera mengalami proses autofosforilasi kemudian menghasilkan fosforilasi dari subtrat dan Ras yang teraktivasi. Ras-GTP menginduksi Raf isoform untuk memasuki membran plasma diikuti oleh fosforilasi dari MEK1/2 dan kemudian ERK1/2 (Qi dan Elion, 2005). Jalur ERK1/2 berperan dalam plastisitas otak dimana ERK1/2 mengatur proliferasi, diferensiasi, meiosis, dan pembelajaran serta memori di sel saraf sehingga terjadi regenerasi sel saraf (Cavanaugh *et al.*, 2008).

Resveratrol merupakan komponen alami dari *Vitis vinifera*. yang melimpah di bagian kulit dan biji anggur, tetapi tidak di daging anggur dan terdapat juga di epidermis daun tanaman anggur, terutama anggur merah. Kadar resveratrol pada anggur cukup tinggi yaitu 0,24 -1,5 gram dalam setiap 160 gram anggur merah (Hidgon, 2005).

Penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak biji dan kulit anggur (*Vitis vinifera*) dapat meregenerasi sel saraf pusat dengan mengurangi volume infark pada tikus yang diinduksi stroke iskemik ini merupakan sebuah penelitian eksperimental laboratorik menggunakan *post-test only control group design*. Pada penelitian ini dilakukan 5 macam perlakuan terhadap 30 ekor hewan coba tikus jantan strain Wistar (*Rattus norvegicus*) selama 2 minggu. Perbedaan perlakuan tersebut terletak pada penginduksian stroke dan pemberian dosis ekstrak biji dan kulit anggur.

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi efek beberapa dosis ekstrak kulit dan biji anggur yaitu 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB dalam mengurangi volume infark otak setelah induksi stroke iskemik. Dengan mengurangi volume infark diharapkan ekstrak biji dan kulit anggur dapat membantu memperbaiki regenerasi sel saraf otak.

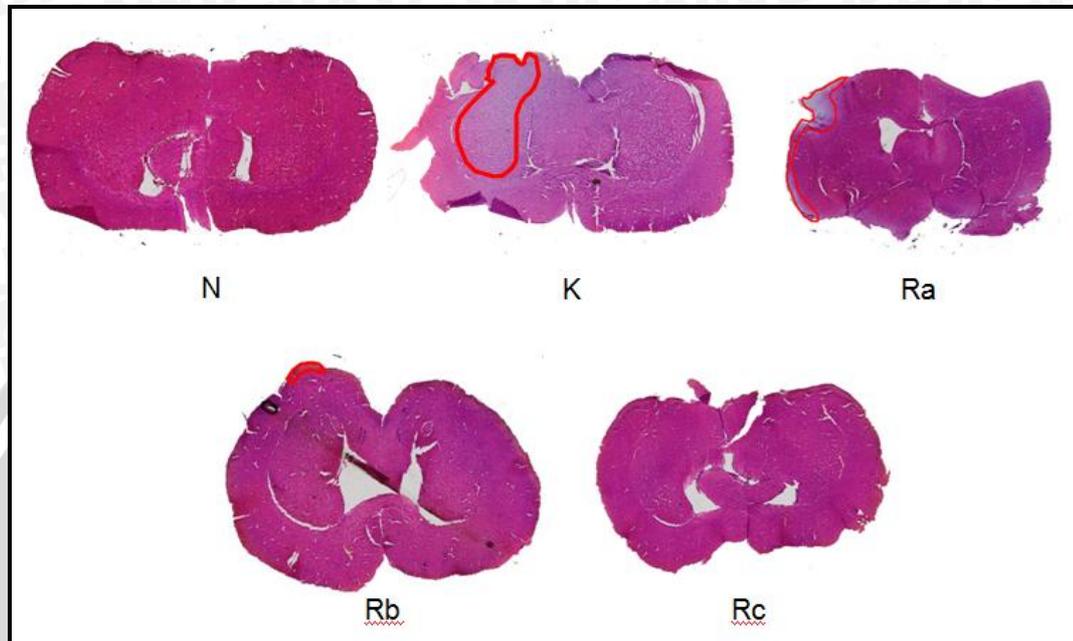
Penginduksian stroke sendiri menggunakan metode *Unilateral Carotid Artery Occlusion* dan sehari setelahnya kadar MMP9 dari serum darah tikus diukur menggunakan ELISA kit. Didapatkan hasil rerata kadar MMP9 kelompok yang tidak diinduksi stroke (N) sebesar 0,582 ng/ml dan kelompok yang diinduksi stroke (K, Ra, Rb, Rc) sebesar 0,707 ng/ml. Hal ini menunjukkan bahwa penginduksian stroke iskemik telah berhasil dilakukan. Selanjutnya, kelompok Ra, Rb, Rc masing-masing diberikan ekstrak biji dan kulit anggur selama 2 minggu dengan masing-masing dosis secara berurutan sebesar 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB. Setelah pemberian ekstrak selama 2 minggu, tikus kemudian dieuthanasia dan dibedah otaknya. Kemudian otak tikus dipotong-potong mulai dari kiasma optikum hingga ke bagian frontal dari otak dengan ketebalan masing-masing potongan 10 μ m. Potongan otak ke-1, ke-21,

ke-41, dan ke-61 dibuat preparatnya dengan pengecatan hematoksi eosin. Selanjutnya dilakukan perhitungan volume infark dengan rumus $(L1+L21+L41+L61)*200\mu\text{m}$. di mana L adalah luas area infark dan angka di belakang L menunjukkan potongan slide ke berapa.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rerata volume infark pada tikus yang tidak diberi ekstrak (K) lebih tinggi daripada rerata volume infark pada tikus yang diberi ekstrak (Ra, Rb, Rc). Kelompok K (induksi stroke tanpa pemberian ekstrak) memiliki rerata volume infark sebesar $63960149.450 \pm 26835017.440 \mu\text{m}^3$. Kelompok Ra (induksi stroke + ekstrak 50mg/kgBB) memiliki rerata sebesar $49533004.925 \pm 36458729.234 \mu\text{m}^3$, kelompok Rb (induksi stroke + ekstrak 100mg/kgBB) sebesar $49512981.750 \pm 35055126.103 \mu\text{m}^3$, dan kelompok Rc (induksi stroke + ekstrak 200mg/kgBB) sebesar $8782341.925 \pm 8743553.714 \mu\text{m}^3$. Menurut analisa uji SPSS, rerata volume infark kelompok Ra dan Rb tidak berbeda secara signifikan dengan rerata kelompok K meskipun volume infark kelompok Ra dan Rb mengalami penurunan. Sebaliknya, rerata volume infark kelompok Rc berbeda secara signifikan dengan kelompok K. Hal ini berarti dosis efektif ekstrak kulit dan biji anggur dalam mengurangi infark volume adalah 200 mg/kgBB. Hasil analisis data dari penelitian ini menunjukkan bahwa hipotesis penelitian terbukti, yang berarti ada pengaruh perlakuan (pemberian ekstrak biji dan kulit anggur berbagai dosis) terhadap penurunan volume infark.

Dari gambaran makroskopis otak menggunakan metode pengecatan Hemaktosilin dan Eosin juga didapatkan korelasi yang positif dengan hasil dari analisa data. Gambar 6.1 menunjukkan daerah infark pada berbagai kelompok perlakuan. Daerah infark ditandai dengan daerah yang berwarna merah

muda pucat hingga putih. Seluruh gambaran makroskopis didapatkan dari potongan ke-21 dari kiasma optikum.



Gambar 6.1 Gambaran Infark Otak

Pada gambaran makroskopis kelompok N (tidak diinduksi stroke) tidak didapatkan area infark. Gambaran makroskopis kelompok K (induksi stroke tanpa pemberian ekstrak) menunjukkan area infark yang lebih luas dibandingkan kelompok Ra dan Rb dan gambaran makroskopis kelompok Rc tidak didapatkan area infark sama sekali, dengan kata lain gambaran makroskopis kelompok Rc sama dengan gambaran makroskopis kelompok N. Hal ini sesuai dengan hasil analisa data dimana rerata volume infark Rc secara signifikan berbeda dengan kelompok K.

Pada penelitian-penelitian sebelumnya juga menunjukkan hasil bahwa resveratrol dapat menurunkan volume infark setelah terjadi stroke iskemik. Penelitian yang dilakukan oleh Shin dan kawan-kawan membuktikan pemberian resveratrol selama fase akut stroke iskemik dapat mengurangi cedera otak pada tikus. Volume infark menurun secara bermakna pada kedua jenis kelamin mencit dengan dosis resveratrol yang berbeda (5 mg/kg untuk pria dan 1 mg/kg untuk perempuan) dimana resveratrol diberikan 3 jam setelah stroke iskemik. Administrasi resveratrol 6 jam setelah stroke iskemik juga efektif untuk mengurangi volume infark secara signifikan (Shin *et al.*, 2010). Begitu juga dengan penelitian lain yang dilakukan oleh Chao dan kawan-kawan yang bertujuan untuk membuktikan efek neuroprotektif dari resveratrol melalui penurunan volume infark. Tikus jantan dibagi menjadi tiga kelompok yaitu operasi sham, pengobatan iskemia, dan pengobatan iskemia dikombinasikan dengan pemberian resveratrol (kelompok diberi resveratrol, 30 mg/kg secara intraperitoneal selama 7 hari). Iskemia otak diinduksi dengan menggunakan MCAO. Studi ini menunjukkan bahwa volume infark secara signifikan berkurang pada kelompok yang diobati dengan resveratrol dibandingkan dengan kelompok iskemia (Li *et al.*, 2010).

Hasil dari penelitian ini yang menggunakan ekstrak biji dan kulit anggur yang mengandung resveratrol dan penelitian-penelitian sebelumnya yang menggunakan isolat resveratrol menunjukkan penurunan dalam volume infark otak tikus yang diinduksi stroke iskemik. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak biji dan kulit anggur yang banyak mengandung resveratrol memiliki potensi untuk mengurangi volume infark setelah terjadi stroke iskemik. Dengan berkurangnya volume infark menunjukkan bahwa terjadi regenerasi dari sel saraf otak.

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran

Penelitian ini meneliti tentang efek pemberian ekstrak kulit dan biji anggur (*Vitis vinifera*) sebagai terapi rehabilitasi pasca stroke iskemik. Untuk menilai hasil dari penelitian ini, variabel tergantung yang diamati adalah volume infark. Penilaian volume infark bertujuan untuk melihat apakah ekstrak kulit dan biji anggur mampu mengurangi volume infark. Hasil yang didapatkan adalah pemberian ekstrak kulit dan biji anggur mampu menurunkan volume infark secara signifikan.

Sesuai dengan hasil yang telah didapatkan dari penelitian ini, maka ekstrak kulit dan biji anggur merupakan kandidat pengobatan alternatif yang poten untuk pasien setelah mengalami stroke iskemik. Namun, untuk bisa diaplikasikan ke manusia, penelitian ini masih memerlukan penelitian-penelitian lanjutan. Sehingga, penelitian ini juga bisa dijadikan dasar teori dan bahan pertimbangan bagi peneliti lain untuk melakukan penelitian lanjutan dengan pembahasan yang lebih mendalam terkait dengan efek ekstrak kulit dan biji anggur dalam mengobati kerusakan akibat stroke iskemik. Selain itu, penelitian ini juga bisa dijadikan sebagai bahan pertimbangan bagi pasien untuk memilih macam pengobatan yang hendak digunakan.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini mengevaluasi volume infark otak hewan coba setelah diberikan perlakuan dan pemeliharaan selama 2 minggu. Jadi, yang dievaluasi dari penelitian ini hanyalah gambaran makroskopis otak dengan area infark setelah pemberian ekstrak kulit dan biji anggur saja. Perbandingan volume infark yang digunakan dalam penelitian ini adalah perbandingan dengan kelompok N dan K, yaitu kelompok yang tidak diinduksi stroke dan tidak mendapat ekstrak,

dan kelompok yang hanya diinduksi stroke tanpa menerima ekstrak. Idealnya, terdapat perbandingan antara volume infark setelah penginduksian stroke dan setelah pemberian terapi dengan ekstrak kulit dan biji anggur. Perbandingan yang ideal seharusnya juga dilakukan dari masing-masing objek penelitian. Dengan kata lain, didapatkan hasil berupa data pre-sonde dan pasca-sonde dari masing-masing objek penelitian.

Ekstrak kulit dan biji anggur, menurut literatur, mengandung resveratrol. Resveratrol merupakan senyawa polifenol tanaman yang memiliki peran penting dalam mengurangi volume infark setelah terjadi stroke iskemik. Penelitian ini hanya melihat perbaikan yang terjadi setelah pemberian ekstrak, berdasarkan mekanisme penghambatan terjadinya edema yang diperankan oleh resveratrol. Dalam ekstrak kulit dan biji anggur, mengandung banyak sekali zat-zat lain yang mungkin juga memiliki pengaruh yang baik dalam mengurangi volume infark setelah stroke iskemik. Penelitian ini hanya melakukan pengecekan kandungan resveratrol dalam ekstrak menggunakan uji TLC. Uji ini merupakan uji kualitatif yang digunakan untuk mengetahui keberadaan zat tertentu dalam suatu ekstrak. Idealnya, dilakukan suatu uji yang dapat mengukur kadar resveratrol dalam ekstrak secara kuantitatif. Selain itu, sebaiknya perlu dilakukan pengecekan kadar zat-zat lain yang ditemukan dalam ekstrak kulit dan biji anggur. Tujuannya adalah untuk mengetahui keberadaan dan jumlah zat lain yang terkandung dalam ekstrak. Tidak menutup kemungkinan akan ditemukan zat lain yang memiliki kerja yang sinergis dengan kerja resveratrol, atau bahkan memiliki cara kerja yang bersifat antagonis dengan resveratrol.