

RESEARCH ARTICLE

REGENERASI NEURON OTAK SEBAGAI TERAPI REHABILITASI PASCA STROKE DENGAN MENGGUNAKAN EKSTRAK KULIT DAN BIJI ANGGUR (VITIS VINIFERA) DALAM MENGINDUKSI ERK1/2 PATHWAY

BRAIN NEURON REGENERATION IN POST-STROKE REHABILITATION TREATMENT USING GRAPE PEEL AND SEED EXTRACT (VITIS VINIFERA) IN INDUCING ERK1/2 PATHWAY

Zanella Yolanda Lie*, Meliantha Tandiono*, Lucy Pricillia*, Astrid Nandikasari Lukito*, Cakra Parindra Gasmara*

*Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

pISSN : 2407-6724 • eISSN : 2442-5001 • <http://dx.doi.org/10.21776/ub.mnj.2016.002.01.4> • MNJ.2016;2(1):19-23
• Received 10 April 2015 • Reviewed 10 June 2015 • Accepted 10 July 2015

ABSTRAK

Latar belakang. Stroke iskemik menyebabkan hipoksia jaringan otak dan neuron otak akan rusak. Kemampuan bertahan dan plastisitas yang dimiliki neuron diaktifkan melalui ERK1/2 *pathway*. Ekstrak kulit dan biji anggur (*Vitis vinifera*) menginduksi pengeluaran *neurotrophic factor* yang berkontribusi dalam mekanisme ERK1/2 *pathway*.

Tujuan. Membuktikan bahwa ekstrak kulit dan biji anggur mampu meregenerasi sel saraf pusat baik dinilai dari segi anatomis maupun fungsi fisiologis.

Metode. Desain eksperimental murni dengan sampel penelitian adalah hewan model 20 tikus strain Wistar jantan usia 8-10 minggu yang diinduksi stroke dengan cara oklusi arteri karotis interna dan eksterna.

Hasil. Perbaikan tersebut dilihat dari empat parameter yaitu skor *cylinder test*, skor *ladder rung walking test*, luas infark volume dan jumlah neuron yang rusak.

Simpulan. Hasilnya dosis 50mg/kgBB efektif dalam memperbaiki hasil dari keempat parameter.

Kata kunci: Anggur, ERK1/2 *pathway*, regenerasi neuron, resveratrol, stroke

ABSTRACT

Background. Ischemic stroke can cause hypoxia in brain tissue and damage the neuron. The defense ability and plasticity is activated by ERK1/2 *pathway*. Grape peel and seed extract (*Vitis vinifera*) can induce release neurotrophic factor that contribute in ERK1/2 *pathway* mechanism.

Objective. To prove that grape peel and seed extract can regenerate neuron in anatomical and functional view.

Methods. This research use true experimental design with sample in this research is 20 male 8-10 weeks old wistar strain rats which are induced stroke by internal and external carotid artery occlusion method.

Results. The repairment is monitored from four parameters, namely cylinder test score, ladder rung walking test score, extensive infarct volume, and number of damaged neuron.

Conclusion. The result is 50mg/KgBW is effective in repairing neuron. It is seen from the result of improvement in four parameters explained above.

Keywords: Alzheimer's disease, antibodies, beta amyloid

Korespondensi: lucy_pricillia@yahoo.com

PENDAHULUAN

Stroke merupakan penyakit yang dicirikan dengan hilangnya sirkulasi darah ke otak secara mendadak dan menyebabkan penurunan fungsi neurologis,¹ di mana 87% disebabkan karena stroke iskemik atau sumbatan.² Prevalensi stroke di dunia adalah 30.7 juta.³ Di Indonesia, stroke merupakan penyebab utama kematian, yaitu sebanyak 15.4% dari seluruh kematian.⁴ Dari 15 juta pasien stroke setiap tahunnya, 5 juta di antaranya akan meninggal dan 5 juta di antaranya akan hidup dengan kecacatan permanen.⁵ Stroke iskemik terjadi bila pembuluh darah yang memberikan suplai darah ke otak tersumbat, sehingga sel-sel di area tersebut tidak mendapatkan nutrisi.⁶ Proses ini akan menyebabkan kecacatan dan penurunan fungsi yang permanen.⁷

Stroke iskemik akan menyebabkan hipoksia dan sel saraf atau neuron otak akan mengalami kerusakan. Namun demikian, neuron otak memiliki plastisitas, yang berpotensi untuk melakukan adaptasi pada perubahan dan mengkompensasi hilangnya fungsi pada bagian lain otak untuk membuat fungsi otak kembali normal.⁷ Plastisitas diaktifkan melalui jalur ERK 1/2. Jalur ERK 1/2 berlimpah di sistem saraf pusat dan dapat diaktifkan selama proses iskemik otak oleh faktor-faktor pertumbuhan, sebagai contohnya NGF (*Nerve Growth Factor*) dan BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*).^{8,9}

Terapi untuk stroke yang digunakan saat ini adalah antiplatelet, antikoagulan, dan trombolitik. Namun, obat-obatan ini tidak dapat meregenerasi neuron otak yang telah rusak¹⁰. Jika kerusakan neuron otak dapat diregenerasi, hasilnya akan lebih baik, dan dengan demikian akan memberikan kesempatan yang lebih besar untuk memperbaiki anatomi dan fungsi dari neuron otak.

Resveratrol merupakan komponen polifenol herbal yang dapat ditemukan pada anggur dan kacang. Ekstrak resveratrol dapat menurunkan insiden gangguan neurologis yang terkait usia, termasuk stroke.¹¹ Resveratrol dapat memperbaiki kematian sel neuron otak akibat stroke.¹² Resveratrol juga dapat meinduksi pelepasan GDNF (*Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor*) dan BDNF, yang memiliki peran dalam perkembangan dan kemampuan neuron otak untuk hidup.¹³

Kandungan resveratrol yang paling banyak ditemukan adalah pada anggur (*Vitis vinifera*), terutama pada kulit dan bijinya. Kandungan

resveratrol pada ekstrak kulit dan biji anggur adalah 3.854 mg/ml dan 3.923 mg/ml.¹⁴ Resveratrol dapat menembus sawar darah otak yang bersifat selektif permeabel.¹⁵ Tanaman anggur sendiri dapat tumbuh dengan baik pada segala cuaca dan relative mudah ditemukan di Indonesia.

Karena peran anggur yang mengandung resveratrol dapat memperbaiki anatomi dan fungsi neuron otak, penelitian diperlukan untuk membuktikan fungsi kulit dan biji anggur dalam meningkatkan regenerasi neuron otak pada hewan coba yang diinduksi stroke. Sebagai kesimpulan, terdapat alternatif baru terapi regeneratif neuron otak menggunakan ekstrak kulit dan biji anggur di masa depan.

METODE PENELITIAN

Sampel. Sampel menggunakan 30 tikus dengan strain Wistar, berumur 8-10 minggu, dan berat 100-150 gram. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Universitas Brawijaya, Malang dan akan dilakukan selama 2 bulan. Penelitian ini telah disetujui oleh komite etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Induksi Stroke. Induksi stroke akan dilakukan dengan mengoklusi arteri karotis eksterna dan interna. Prosedur induksi stroke akan dilakukan dalam 5 tahap. Tahap pertama ialah, tikus difiksasi dalam posisi supine, kemudian dilakukan anestesi dengan ketamin 40 mg/kgBB, rambut bagian leher dicukur dan disterilisasi dengan alkohol 70% dan dilakukan antiseptik. Kemudian, dilakukan insisi pada leher 2-3 cm. kemudian, mencari arteri karotis interna dan eksterna yang berlokasi di trakea. Kemudian dilakukan ligasi arteri karotis eksterna dan interna selama 45 menit dengan menggunakan benang prolene 6.0. Kemudian, skar insisi dijahit dengan benang catgut, dan dilakukan antiseptik, dan ditutup dengan kasa steril dan tikus diberikan dextrose 10% .

ELISA MMP-9. Dilakukan pengambilan darah jantung tikus dan serum darah dari hasil sentrifugasi darah. Serum darah kemudian dianalisis dengan Mouse Total MMP-9 Quantikine ELISA kit (R&D systems, United States of America). MMP-9 akan menentukan tikus ini mengalami stroke atau tidak. Dari hasil pengukuran MMP-9, semakin tinggi konsentrasi MMP-9, semakin tinggi kemungkinan tikus ini mengalami stroke.

Ladder Rung Walking Test. Pada test ini, tikus akan berjalan melalui besi-besi berbentuk cilinder yang diatur secara reguler dengan jarak yang bervariasi sepanjang 1 meter. Tikus berjalan di atasnya, dengan kaki kanan dan kaki kiri bergantian, kemudian akan diobservasi pergerakan kakinya. Tikus yang tergelincir menandakan bahwa penurunan fungsi motorik pada tikus¹⁶.

Cylinder Test. Pada test ini, tikus akan ditempatkan pada tempat berbentuk silinder yang transparant dengan tinggi 50 cm dan diameter 12 cm. Kemudian pergerakan kaki kanan, pergerakan kaki kiri, dan kedua kaki diobservasi dan dicatat¹⁶.

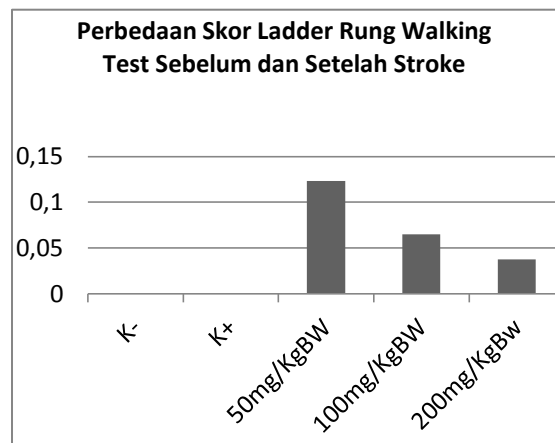
Volume Infark. Volume infark merupakan volume area otak yang mengalami kerusakan oleh karena stroke. Area infark ditandai dengan area yang lebih pucat daripada daerah sekitarnya. Volume infark dihitung dengan rumus: $(L1+L21+L41+L61) \times 200 \mu\text{m}$. L merupakan daerah dengan area infark dan angka di belakang L merupakan nomer potongan slide, sebagai contoh L21 berarti area permukaan infark potongan slide ke 21. L dihitung dengan menggunakan CellSens® Digital Imaging Software. Irisan pertama dimulai dari kiasma optikus, dan jarak di antara potongan slide ialah 10 μm .

Jumlah Neuron yang Rusak. Jumlah neuron yang rusak dikarakteristik dengan adanya nuklei piknotik, vakuolisasi, sitoplasma sitotoksik, dan kolegenasi matriks. Kemudian dihitung jumlah neuron yang rusak dari setiap potongan slide dengan menggunakan ImageJ1 software. Jumlah dari neuron yang rusak dihitung per lapangan pandang dengan pembesaran 400x. Jumlah dari neuron yang rusak dalam 10 lapang pandang dijumlahkan dan hasilnya dirata-rata pada setiap kelompok.

Analisis Statistik. Hasilnya dianalisis dengan mengguankan SPSS 17. Perbedaan antar kelompok dikonfirmasi dengan ANOVA. Semua data ditampilkan sebagai rata-rata dan $p < 0.05$ berarti secara statistik signifikan.

HASIL PENELITIAN

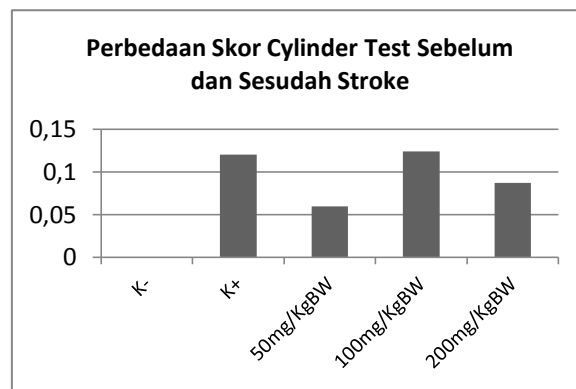
Fungsi motorik: Ladder Rung Walking Test



Gambar 1. Perbedaan skor ladder rung walking test sebelum dan setelah stroke.

Gambar 1 diatas menunjukkan rata-rata perbedaan nilai dari masing-masing kelompok dan hasilnya adalah, kelompok kontrol positif tidak menunjukkan perbaikan dalam fungsi motorik. Pada kelompok dosis pertama (50mg/kgBB) dari kulit anggur dan biji ekstrak perbedaan skor adalah 0,12. Pada kelompok dosis kedua (100mg / kgBB) perbedaan skor adalah 0,06, yang berarti bahwa ada peningkatan fungsi motorik pada kelompok ini. Dalam kelompok ketiga dosis (200mg/kgBB), dengan perbedaan skor 0,038, menunjukkan adanya perbaikan tetapi tidak sebesar kelompok dosis pertama (50mg/kgBB) dan dosis kedua (100mg/kgBB), $p = 0,001$ ($p < 0,05$).

Fungsi motorik: Cylinder Test

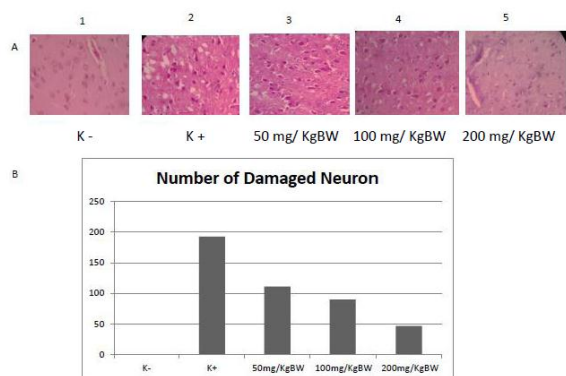


Gambar 2. Perbedaan skor cylinder test sebelum dan setelah stroke.

Gambar 2 diatas menunjukkan rata-rata perbedaan nilai dari masing-masing kelompok dan hasilnya adalah kelompok kontrol positif, kelompok dosis pertama (50mg / kgBB), kelompok dosis kedua (100mg / kgBB), dan kelompok dosis ketiga (200mg / kgBB), menunjukkan perbaikan fungsi motorik dengan perbedaan skor yang

berurutan 0,12; 0,06; 0,12; dan 0,09. $p = 0.319$ ($p > 0,05$).

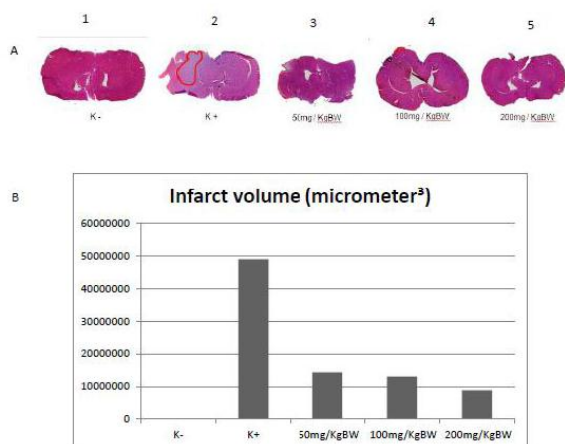
Penilaian anatomi: Jumlah Neuron yang Rusak



Gambar 3. Hasil potongan otak dan diagram hasil neuron otak yang rusak.

Gambar 3A (1) menunjukkan morfologi neuron otak yang normal. Gambar 3A (2) menunjukkan neuron otak yang rusak. Gambar 3A (3,4,5) menunjukkan peningkatan morfologi neuron otak setelah pemberian ekstrak. Hal ini berarti ekstrak kulit dan biji anggur dapat meningkatkan morfologi neuron otak yang infark mendekati normal. Gambar 3B menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol negatif tidak ada neuron yang rusak sama sekali. Pada kelompok kontrol positif ada 193 neuron yang rusak. Pada kelompok dosis pertama (50mg / kgBB) ada 111 neuron rusak. Pada kelompok dosis kedua (100mg / kgBB) ada 90 neuron yang rusak. Pada kelompok dosis ketiga (200mg / kgBB) ada 47 neuron yang rusak. $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

Penilaian Anatomi: Volume Infark



Gambar 4. Hasil potongan otak dan diagram hasil volume infark otak

Gambar 4A (1) menunjukkan irisan otak normal ditandai dengan tidak ada daerah yang pucat, semua daerah berwarna merah. Gambar 4A (2) menunjukkan daerah pucat yang luas ditandai dengan garis batas berwarna merah. Gambar 4A (3, 4, 5) menunjukkan daerah pucat lebih kecil dari (2) yang ditandai dengan garis batas berwarna merah. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit dan biji anggur dapat membantu mengurangi volume infark. Gambar 4B menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol negatif tidak ada daerah infark sama sekali. Pada kelompok kontrol positif volume infark adalah $48998112.950\mu\text{m}^3$. Pada kelompok dosis pertama (50mg/kgBB) volume infark adalah $14334585.175\mu\text{m}^3$. Pada kelompok dosis kedua (100mg/kgBB) volume infark adalah $13047749.250\mu\text{m}^3$. Pada kelompok dosis ketiga (200mg/kgBB) volume infark adalah $8782341.925\mu\text{m}^3$ $p = 0,027$ ($p < 0,05$).

Analisis keempat parameter setelah pemberian ekstrak kulit dan biji anggur, berkorelasi satu sama lain dengan hasil sebagai berikut: 1) Semakin tinggi skor ladder rung walking test, maka jumlah neuron yang rusak juga lebih banyak, dengan korelasi = 0,629 dan $p = 0,009$ ($p < 0,05$); 2) Semakin tinggi skor ladder rung walking test, maka volume infark lebih luas, dengan korelasi = 0,505 dan $p = 0,046$ ($p < 0,05$); 3). Semakin luas volume infark maka jumlah neuron yang rusak lebih banyak, dengan korelasi = 0,589 dan $p = 0,016$ ($p < 0,05$).

Pada penelitian selanjutnya dapat dilakukan dengan metode yang berbeda dalam menginduksi stroke dalam hewan coba. Metode induksi stroke diharapkan dapat memberikan lokasi otak yang lebih spesifik sehingga dapat memberikan hasil pengobatan pasca stroke yang lebih baik pula. Penelitian ini juga dapat ditindaklanjuti pada penelitian tentang efek samping dari ekstrak biji dan kulit anggur terhadap hewan coba. Hal ini akan dapat berujung pada penelitian yang lebih lanjut jika diterapkan pada manusia yang terkena stroke.

SIMPULAN

Fungsi Motoris. Pada tes *ladder rung walking* ditemukan bahwa ada perbedaan yang signifikan pada kelompok dosis 50 mg/KgBB dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Penilaian Anatomis. Berdasarkan volume infark otak pada hewan coba, ketiga dosis ekstrak kulit dan biji anggur memiliki tingkat efektifitas yang sama

dalam menurunkan volume infark. Berdasarkan jumlah neuron yang rusak, perbedaan yang signifikan ditemukan dari ketiga dosis jika dibandingkan dengan kontrol positif jadi pemberian ketiga dosis ekstrak dapat menurunkan jumlah neuron yang rusak jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cruz-Flores, S., Rabinstein A, Biller J, Elkind MS, Griffith P, Gorelick PB, et al. Racial-ethnic disparities in stroke care : the American experience : a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *American Stroke Association. Stroke*. 2006,42(7): 2091-116
2. Roger, V.L., Go A.S., Lloyd-Jones, D.M., Benjamin E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., et al. Heart disease and stroke statistics-2012 update : a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012,125(1):e2-220.
3. World Health Organization: The International Agenda for Stroke Marc Fisher, MD, University of Massachusetts. Stroke AHA/ ASA. Norrving B. 1st Global Conferences on Healthy Lifestyles and Noncommunicable Diseases Control. 2011, Moscow
4. Riset Kesehatan Dasar: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan, 2007, Jakarta Republik Indonesia.
5. Yayasan Stroke Indonesia. 2011. Jakarta, Republik Indonesia.
6. Zieve, D: Stroke. Neurosurgery, Cedars-Sinai Medical Center. National Library of Medicine. Los Angeles. 2011.
7. Caplan, A: Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J cell physiol*. 2007,213(2): 341-347.
8. Cavanaugh, J., Lin, E., Leak, R.K., Perez, R.G., Zigmond, M.J.: Rapid activation of ERK by 6-hydroxydopamine promotes survival of dopaminergic cells. *Journal Neurosci Res*. 2008,86(1):108-117.
9. Nguyen T.L., Kim, C.K., Cho, J.H., Lee, K.H., Ahn, J.Y.: Neuroprotection signaling pathway of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor against staurosporine induced apoptosis in hippocampal H19-7/IGF-IR. Korea: Department of Molecular Cell Biology, Samsung Biomedical Research Institute, Sungkyunkwan University School of Medicine. 2010.
10. Mayo Clinic: Stroke: Treatment and Drug. <http://mayoclinic.com/health/stroke/DS00150/DSECTION=treatments-and-drugs>. 2012. Accessed in 30 October 2012
11. Bastianetto, S. Quirion, R: Resveratrol and red wine constituents: evaluation of their neuroprotective properties. *Pharm. News*. 2001, (8):33-38.
12. Wang, Y.J., He, F, Li X.L.: The neuroprotection of resveratrol in the experimental cerebral ischemia. Department of Neurology, Tiantan Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing. Europe PubMed Central. 2003,83(7):534-536.
13. Zhang, F., Lu, Y.F., Wu, Q., Liu, J., Shi, J.S.: Resveratrol promotes neurotrophic factor release from astroglia. China : Department of Pharmacology and Key Lab of Basic Pharmacology of Guizhou, Zunyi Medical College, 563099. 2012.
14. Ghafoor, K., Al-Jumaihi, F., Choi, Y.H: Effects Of Grape (*Vitis Labrusca* B.) Peel And Seed Extracts On Phenolics, Antioxidants and Anthocyanins In Grape Juice. *Pakbs*. 2011, 43(3):1581-1586.
15. Jalil, EC., de Oliveira, A.C., Gräf, S., Bhatia, H.S., Hüll, M., Muñoz, E., Fiebich, B.L.: Resveratrol potentially reduces prostaglandin E2 production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *Journal of Neuroinflammation*. 2007, (4):25 doi:10.1186/1742-2094-4-25.
16. Schaar, K.L., Brenneman, M.M., Savitz, S.I.: Functional Assessment in The Rodent Stroke Model. *Experimental & Translational Stroke Medicine* (2):13, 2010. doi:10.1186/2040-7378-2-13.