

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

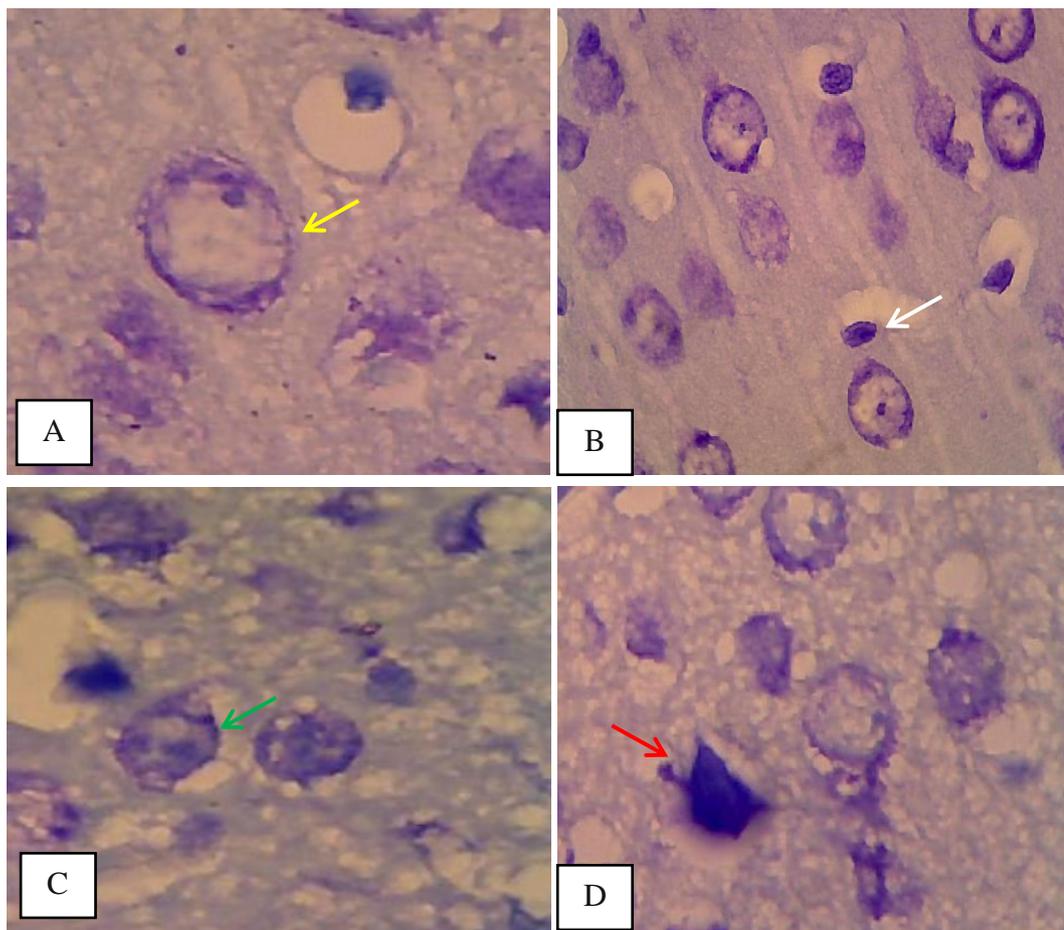
Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2018 sampai Mei 2018 dan sudah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan nomor protokol **29/Ka.kom.Et/70/KE/V/2016**

4.1.1 Hasil Pengamatan pada Area Kortek Cerebri

Penelitian ini merupakan penelitian BCCAO yang meliputi oklusi selama 5 menit, 10 menit, dan 20 menit menunjukkan hasil yang cukup signifikan yang dapat mempengaruhi jumlah sel neuroglia korteks serebri tikus wistar. Total preparat yang diteliti terdapat 23 buah dengan menggunakan pengecatan *toluidin blue* dan sampel yang diambil terdapat 4 kelompok penelitian yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Pembagian kelompok tersebut meliputi kelompok kontrol atau *shame operated*, kelompok perlakuan BCCAO 5 menit, kelompok BCCAO 10 menit, kelompok BCCAO 25 menit. Selama penelitian 23 preparat otak bagian korteks serebri telah diamati dan dihitung jumlah selnya sesuai kriteria pada metode penelitian sebelumnya. Preparat masing-masing diberi nomor dan diacak oleh orang lain sehingga peneliti dalam menghitung tidak mengetahui preparat masing-masing kelompok sehingga dapat mengurangi bias.

Pengambilan foto untuk lapang pandang preparat menggunakan mikroskop dengan lapang pandang yang memenuhi peta stereotaxis otak tikus. Sel neuroglia otak tikus bagian korteks serebri diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x menggunakan mikroskop CX 21 yang terhubung dengan kamera optilab dan perangkat komputer yang memiliki *Software Image Raster & Optilab Viewer*. Perhitungan sel neuroglia sesuai dengan area dari sel neuroglia yang terdapat pada korteks serebri sesuai dengan peta stereotaxis dan memiliki kriteria antara lain bentuk sel bulat, utuh dan memiliki anak inti yang jelas. Semua pengambilan lapang pandang

selalu dimulai dari tepi sampai semua bagian telah terlewati dan diambil beberapa foto lapang pandang dari setiap preparat. Lapang pandang setiap preparat diambil sebanyak 20x sehingga terdapat 20 lapang pandang yang tercitrakan setiap preparat. Selanjutnya lapang pandang tersebut yang diamati hanya 10 lapang pandang yang dihitung menurut ganjil genap sehingga dapat mengurangi bias.



Gambar 8. Hasil pengamatan sel neuroglia korteks serebri. (A) gambaran histologi sel neuroglia korteks serebral kelompok 1 (*shame operated*) perbesaran 1000x, (B) gambaran histologi sel neuroglia korteks serebral kelompok 2 (BCCAO durasi 5 menit), (C) gambaran histopatologi sel neuroglia kelompok 3 (BCCAO durasi 10 menit), (D) gambaran histopatologi sel neuroglia kelompok 4 (BCCAO durasi 20 menit). Gambar yang ditunjukkan panah kuning adalah sel neuron, gambar yang ditunjukkan oleh panah putih adalah sel neuroglia (sel yang dihitung), gambar yang ditunjukkan oleh panah hijau adalah sel neuron yang intinya mulai mengalami kondensasi, gambar yang ditunjukkan panah merah adalah sel yang mengalami nekrosis.

4.1.2 Analisis Data Penelitian

Perangkat lunak yang digunakan untuk menganalisis data yaitu perangkat lunak statistik SPSS. Data yang diperoleh meliputi kelompok *shame operated*, durasi BCCAO 5 menit, durasi 10 menit, durasi 20 menit lalu dianalisis dengan menggunakan metode *One Way Analysis of Variance (ANOVA)*. Awalnya, data dari seluruh prepat yang berjumlah 24 dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk Test* karena data yang digunakan kurang dari 50. Hasil yang didapatkan pada uji normalitas tersebut antara lain ; kelompok *shame operated* $p=0,442$, kelompok BCCAO durasi 5 menit $p= 0,378$, kelompok BCCAO durasi 10 menit $p= 0,202$, dan kelompok BCCAO dengan durasi 20 menit $p=0,305$ maka disimpulkan bahwa semua kelompok memiliki distribusi data yang normal karena nilai $p>0,05$. Selanjutnya dilakukan penilaian variasi homogenitas datanya yang terdistribusi normal. Penilaian tersebut dilakukan dengan menggunakan uji *Lavene*. Terdapat hasil dengan signifikansi sebesar $p=0,315$ sehingga data dapat diinterpretasikan memiliki variasi yang sama karena nilai $p>0,05$.

Tabel 2. Rerata Jumlah Neuron.

| Kelompok | Rerata Jumlah Neuroglia | SD | ANOVA |
|-----------------------|-------------------------|--------|-------|
| <i>Sham Operated</i> | 18 | 0,6132 | |
| Durasi BCCAO 5 Menit | 19,34 | 0,5125 | 0,029 |
| Durasi BCCAO 10 Menit | 19,67 | 0,3983 | |
| Durasi BCCAO 20 Menit | 9 | 0,3962 | |

Selanjutnya, data yang menunjukkan hasil uji normalitas dan hasil uji varian yang signifikan yaitu $P>0,05$ akan dilakukan uji *One-Way (ANOVA)*. Data diatas telah memenuhi persyaratan untuk dilakukan uji *one-way ANOVA* dan didapatkan hasilnya adalah $p=0.029$ (signifikan jika $P<0,05$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa data tersebut bermakna, yang artinya terdapat pengaruh durasi BCCAO terhadap jumlah sel neuroglia pada korteks serebral pasca reperfusi 24 jam pada *rat stroke model*, sehingga dalam hal ini H_0 ditolak dan H_1 di terima. Karena data awal

menunjukkan hasil variansi sama (uji *Lavene* $p > 0,05$) maka selanjutnya dilakukan tes *Post Hoc Bonferroni*. Hasil yang didapatkan meliputi kelompok *shame operated* dengan kelompok durasi 5 menit $p=1$; kelompok *shame operated* dengan durasi 10 menit $p=1$; kelompok *shame operated* dengan durasi 20 menit $p=0,157$; kelompok durasi 5 menit dengan kelompok durasi 10 menit $p=1$; kelompok durasi 5 menit dengan kelompok durasi 20 menit $p=0,060$; kelompok durasi 10 menit dengan kelompok durasi 20 menit $p=0,047$. Hal ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan antara kelompok dengan durasi 10 menit dengan kelompok dengan durasi 20 menit ($p < 0,05$). Oleh karena hasil tersebut, secara klinis dapat disimpulkan bahwa terdapat jumlah perbedaan jumlah sel neuroglia krotoks serebral pada kelompok durasi 10 menit dengan kelompok durasi 20 menit.

Tabel 3. Hasil Analisa dengan Uji *Post-Hoc Bonferroni*

| Kelompok | <i>Sham Operated</i> | Durasi BCCAO 5 Menit | Durasi BCCAO 10 Menit | Durasi BCCAO 20 Menit |
|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Sham Operated</i> | | 1,000 | 1,000 | 0,157 |
| Durasi BCCAO 5 Menit | 1,000 | | 1,000 | 0,060 |
| Durasi BCCAO 10 Menit | 1,000 | 1,000 | | 0,047 |
| Durasi BCCAO 20 Menit | 0,157 | 0,060 | 0,047 | |

4.2 Pembahasan

Penelitian BCCAO ini telah mendapatkan hasil signifikan ($p < 0,05$) dengan menggunakan uji test *One-way ANOVA*. Kemudian jika di uji dengan *Post-Hoc Bonferroni* kelompok BCCAO durasi 10 menit terhadap kelompok BCCAO durasi 20 menit memiliki hasil yang paling signifikan dibandingkan dengan kelompok lain. Sementara pada durasi BCCAO 5 menit tidak didapatkan hasil yang signifikan. Dalam hal ini disimpulkan semakin lama durasi BCCAO maka nilai signifikansinya kurang dari 0,05 dan semakin ada perbedaan dari kelompok *shame operated*.

Dalam penelitian BCCAO yang dilakukan oleh Wang tahun 2002 penggunaan teknik BCCAO dengan durasi 5 menit untuk menginduksi *global cerebral ischemic* pada hewan gerbil didapatkan hasil positif adanya sel *neuronal delayed death* yang diamati secara histologi dengan menggunakan penanda GFAP dan isolectin B4. Sebaliknya pada penelitian ini durasi 5 menit sel neuroglia pada korteks serebral tampak masih banyak dan bahkan semakin bertambah jumlahnya. Secara anatomis terdapat perbedaan vaskularisasi sirkulus wilisi antara gerbil dengan hewan coba wistar yang digunakan dalam penelitian ini. Sirkulus wilisi gerbil inkomplit sehingga jika terjadi iskemia akan menyebabkan kerusakan yang lebih tinggi pada otak gerbil dibandingkan otak wistar. Hal ini menjadi dasar mengapa terdapat perbedaan hasil dengan penelitian ini.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Zahra (2017) terdapat pengaruh yang signifikan antar durasi iskemia terhadap jumlah korteks prefrontalis tikus (*Rattus norvegicus*) pasca ligasi transien arteri carotis comunis bilateral. Durasi iskemia pada penelitian ini dilakukan selama 10 menit dan 20 menit menunjukkan perubahan jumlah neuroglia pada daerah tersebut. Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Wildan (2018) dengan teknik ligasi BCCAO yang dilakukan di daerah striatum tikus (*Rattus norvegicus*) dengan menghitung jumlah neuroglia terdapat hasil yang bermakna pada durasi 5 menit, 10 menit, dan 20 menit. Pada penelitian ini didapatkan penurunan jumlah neuroglia di daerah striatum tikus yang dihitung pasca ligasi dengan reperfusi 24 jam.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Tajiri (2004) iskemi otak tikus menggunakan BCCAO dengan durasi 15-18 menit yang akan menyebabkan kerusakan neuron yang luas dan akan diikuti oleh penurunan jumlah sel neuroglia. Menurut Iwasaki *et al.* (1989) juga menyatakan durasi BCCAO selama 30 menit dapat menyebabkan kerusakan neuron yang signifikan di hipokampus dan korteks serebri. Aktivasi glutamate yang berlebihan pada keadaan pasca stress oksidatif pada otak selama 4-6 jam menjadi penyebab perubahan morfologi astrosit khususnya bagian inti. Inti tersebut akan mengalami pembengkakan dan nucleoplasma akan pucat.

Kemudian setelah 16-18 jam akan terjadi proses kematian astrosit. Jika hal ini berlangsung terus menerus dapat menyebabkan kematian semua astrosit dalam 24-30 jam (Chen *et al.* 2000).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Abraham & Lazar (2000) menunjukkan bahwa ligasi yang dilakukan selama 20 menit dengan reperfusi 24 jam terdapat penurunan yang berarti pada jumlah neuroglia dan menyebabkan peningkatan pada skar glia. Durasi teknik BCCAO selama 10 dan 15 menit tidak menunjukkan aktivitas mikroglia yang ringan sehingga tidak terjadi penurunan jumlah neuroglia. Ligasi dengan teknik BCCAO 2-VO selama 20 menit dengan durasi reperfusi 1 jam juga mengakibatkan iskemia yang ditandai peningkatan secara cepat aktivasi mikroglia yang signifikan dan akan memuncak pada 5 jam setelah reperfusi kemudian aktivitas mikroglia akan menurun setelah 24 jam pasca iskemia dan akan kembali ke kondisi sebelum iskemia setelah 72 jam. Aktivitas neuroglia masih dapat dideteksi sampai semua debris dibersihkan. Penurunan bermakna sel neuroglia terjadi akibat interaksi pada proses akumulasi ROS dan autofagi pada keadaan stroke iskemik (Wang *et al.*, 2018). Akumulasi ROS akan menginduksi proses autofag selama cedera iskemik pada jaringan otak. Kompleks protein seperti P53, HIF, HRF2, FOXO3 dan PERK akan memicu proses autofagi yang teraktivasi dari akumulasi ROS yang ada pada keadaan stroke iskemik.

Penurunan jumlah neuroglia juga dihasilkan dari proses nekrosis dan apoptosis. Proses nekrosis diperantarai oleh *receptor-interacting serine/threonine-protein 1* (RIP1). RIP1 akan berinteraksi dengan kompleks protein yang terdiri dari RIP3, RIP1, *Phosphoglycerate mutase family member 5* (PGAM5), *mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL), *autophagy-related genes 5* (Atg5), Atg 12 dan protein P62. Kompleks protein tersebut dapat menginduksi nekrosis. Sedangkan proses apoptosis dapat dipicu oleh jalur intrinsik (mitokondria) ataupun jalur ekstrinsik (death receptor) dan diperantarai oleh RIP1, caspase 8, *Fas-associated death domain* (FADD) dan *TNF- α receptor-associated death domain* (TRADD) sehingga menginduksi apoptosis

Mekanisme awal setelah iskemia tidak terdapat perubahan yang signifikan terhadap astrosit (Sulkowski *et al.*, 2002). Peristiwa tersebut akan menjadi kematian sel pada astrosit melalui jalur apoptosis sel saat terjadi iskemia berat, tetapi terdapat penelitian lain yang menyatakan bahwa kematian astrosit dapat melalui jalur non-apoptosis (Chu *et al.*, 2007). *Petito et al* (1998) menyatakan bahwa oligodendrosit akan mengalami kematian sel paling cepat diantara sel neuron dan sel neuroglia lainnya.

Kematian sel berhubungan erat dengan aktivitas neuroglia. Aktivitas neuroglia dapat ditunjukkan oleh imunohistokimia yang terdapat pada keadaan kerusakan neuro (Schmidt-Kastner *et al.*, 1998). Astroglisis reaktif merupakan peristiwa peningkatan aktivitas astrosit yang dapat diketahui dengan ditemukannya *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (Sugawara *et al.*, 2002). Penelitian yang dilakukan oleh Sulkowski (2002) menunjukkan bahwa iskemia global pada tikus dengan durasi 15 menit dengan reperfusi 24 jam akan ditemukan juga peningkatan GFAP, dimana protein tersebut akan memuncak jumlahnya setelah 3 hari dan akan menurun setelah 7 hari kecuali pada daerah peri infark.

Oligodendrosit tidak memiliki kemampuan yang tinggi untuk memanggil peroksida sehingga mengakibatkan penurunan CNP-Positif yang berperan terhadap perlindungan sel. Sehingga oligodendrosit yang berada pada *white matter* dan cortex sangat rentan terhadap iskemia (*Petito et al.*, 1998). Reoksigenasi yang terjadi segera setelah cedera iskemia di banyak akson dan terjadi reeliminasi akson yang cedera di sum sum tulang belakang mengakibatkan peningkatan CNP-postif. CNP-positif mengalami peningkatan akan terlihat setelah 1 hari reperfusi dengan durasi 10 menit iskemia (Sugawara *et al.* 2002).

Dalam kondisi seperti cedera neuron akan mengalami inflamasi seperti yang terjadi juga pada teknik BCCAO. Ligasi dengan teknik BCCAO akan menurunkan aliran darah ke otak sebanyak 50% dari jumlah awal (Abraham& Lazar., 2000). Proses inflamasi yang disebabkan oleh ligasi dengan teknik BCCAO berperan untuk mengaktifkan mikroglia dan akan berperan sebagai

makrofag di sistem saraf pusat. Mikroglia yang teraktivasi dapat dideteksi dengan marker ED1 (Huang et al., 2014). Mikroglia yang teraktivasi dapat menyebabkan kematian sel dan pembentukan jaringan infark (Huang et al., 2014)

Mikroglia aktif memiliki 2 tipe, yaitu *classically activated* (M1) dan *alternatively activated* (M2) yang akan berpindah ke daerah hemisfer cortex serebral. Mikroglia tipe M1 akan memperparah cedera karena tipe ini diaktifkan oleh LPS (lipopolisakarida) dan IFN- γ yang dapat menginduksi NF- κ B dan meningkatkan sitokin proinflamasi lainnya seperti TNF- α , IL-12, IL-5, IL-1 β dan metabolit oksidatif NO. Akan tetapi mikroglia tipe M2 cenderung akan mencegah inflamasi, membantu perbaikan dan penyembuhan jaringan dengan cara aktivasi oleh IL-4 dan IL-13 yang berperan dalam hal tersebut (Kim et al., 2016).

Astrogliosis reaktif akan teraktivasi pada keadaan dimana terjadi kerusakan neuron yang berfungsi untuk memperbaiki sel neuron yang rusak. Astrogliosis akan memperbaiki neuron yang rusak dengan cara memutuskan jalur aksonal neuron yang rusak dari neuron yang normal dan mengisolasi sel neuron yang rusak tersebut dari sel neuron yang sehat. Astrosit akan menjadi hipertrofi setelah berproliferasi dan mengakibatkan peningkatan ekspresi GFAP. Penumpukan ekspresi GFAP yang disebabkan astrogliosis reaktif yang terjadi secara terus menerus akan menyebabkan perubahan struktur jaringan dan membentuk skar (Sofroniew & Vinters, 2010; Hirayama & Koizumi, 2017). Selain membentuk skar glia, astrosit juga dapat menginduksi pelepasan sitokin, kemokin, iNOS (nitric oxide synthase) dan respon imun Th2 (anti-inflamasi). Pada kondisi stroke iskemia, iNOS ditemukan pada astrogliosis reaktif di hippocampus dalam studi yang pernah dilakukan, astrosit berperan dalam proses inflamasi berhubungan dengan *TNF-like weak inducer of apoptosis* (TWEAK). TWEAK dapat terdeteksi di neuron, astrosit dan sel endotel dan akan meningkatkan respon pro-inflamasi pada astrosit berikatan dengan reseptor Fn14 dimana reseptor tersebut berperan untuk menurunkan terjadinya cedera iskemia (Kim et al., 2016).

Menurut penelitian Hung *et al* (2014) menyatakan bahwa gliosis yang reaktif akan meningkatkan ekspresi GFAP pada keadaan iskemia yang parah, pembentukan skar glia pada keadaan ini disebabkan karena adanya molekul matriks ekstraseluler berupa *chondroitin sulphate proteoglycans* (CSPG) dan adanya aktivasi mikroglia yang berada di sekitar lokasi cedera. Pada prosesnya pembentukan skar glia akan sangat membantu untuk merombak jaringan rusak serta mengendalikan respon imun lokal dengan memblokir daerah yang cedera. Pada fase akut ini blokade glia terhadap cedera berfungsi mencegah infeksi dan penyebaran kerusakan sel, menjaga keseimbangan ekstralukuler dan keseimbangan cairan, melawan radikal bebas dan mencegah inflamasi. Kemudian akan mengaktifkan revaskularisasi yang akan meningkatkan pemberian nutrisi dan proses metabolisme jaringan saraf. Pada fase kronis skar glia akan mencegah perbaikan sistem saraf pusat dengan cara menjadi penghalang untuk regenerasi akson sehingga mencegah pemulihan fungsi sistem saraf pusat (SSP) dengan mengeluarkan *growth-inhibitory* berupa CSPG oleh astrosit yang akan mencegah pertumbuhan aksonal dan ekstensi neurosit (Huang *et al.*, 2014; Sofroniew & Vinters, 2010).

Dalam literature sebelumnya dijelaskan beberapa proses penyebab rusaknya neuron tersebut yaitu diakibatkan oleh terdapatnya radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul memiliki valensi lektron tidak berpasangan dan bersifat sangat aktif dalam berikatan dengan molekul lain seperti DNA dan lipid. Hubungan ini akan menyebabkan kerusakan sel yang parah karena diakibatkan adanya proses oksidasi yang bersifat irreversibel terhadap sel sel seperti DNA, protein dan lipid. Pada awalnya sel-sel neuron di dalam jaringan otak akan bertahan dalam waktu 10 menit selanjutnya akan mengalami apoptosis karena diakibatkan karena hipoksia jaringan. Hal ini akan memicu proses dari astrogliosis yang akan menggantikan fungsi-fungsi neuron yang telah mengalami kematian. Namun, semakin lama akan terjadi reoksigenasi yang akan menghasilkan NOX, dimana enzyme tersebut prooksidan yang akan memperparah stress oksidative dan kerusakan iskemik otak (Chen, H. 2011). Oleh karena itu skar glia yang kronis akan memperburuk keadaan sel dalam

rentan waktu 20 menit hingga 5 jam dan akan terjadi penurunan jumlah neuroglia dalam rentan waktu tersebut.