

**PENGARUH EKSTRAK AIR AKAR *ACALYPHA INDICA* LINN  
(AKAR KUCING) TERHADAP NEUROGENESIS  
PADA KULTUR JARINGAN HIPOKAMPUS TIKUS  
PASCA HIPOKSIA**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
MAGISTER BIOMEDIK (M<sub>Biomed</sub>)**

**SOPHIE YOLANDA  
0706304454**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM STUDI PASCA SARJANA ILMU BIOMEDIK  
JAKARTA  
MEI 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Sophie Yolanda  
NPM : 0706304454  
Tanda tangan :



Tanggal : 14 Mei 2010

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Sophie Yolanda  
NPM : 0706304454  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul Tesis : Pengaruh ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn (akar kucing) terhadap neurogenesis pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr. Nurhadi Ibrahim, PhD

Pembimbing II : drg. Endang Winiati Bachtiar, MBiomed, PhD

Penguji I : DR. drg. Sri Redjeki, MS

Penguji II : Drs. Yulhasri, MS

Penguji III : Drs. Kusmardi, MS

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 2010

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

  
(Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi)

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur dihadapan Tuhan Yang Maha Esa, karena hanya dengan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan ini. Tesis ini dilaksanakan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di Program Magister Ilmu Biomedik dengan judul Pengaruh ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn (akar kucing) terhadap neurogenesis pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia.

Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang setulusnya atas segala bentuk bantuan dan dukungan, baik berupa materi, gagasan, bimbingan maupun koreksi tulisan, karena berkat bantuannya, tesis ini dapat terselesaikan. Ucapan terima kasih ini terutama ditujukan untuk:

1. dr. Nurhadi Ibrahim, PhD sebagai dosen pembimbing pertama dalam tesis dan sebagai ketua kekhususan Fisiologi Program Magister Ilmu Biomedik FKUI. Terima kasih atas semua saran, bimbingan dan dukungan alat dan bahan penelitian yang diberikan selama penulis melakukan penelitian dan mengerjakan tesis.
2. drg. Endang Winiati Bachtiar, MBiomed, PhD sebagai dosen pembimbing kedua dalam tesis, yang telah bersedia meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan bimbingan dan saran pada penelitian dan penulisan tesis ini.
3. DR. drg. Sri Redjeki, MS sebagai penguji pertama tesis ini yang telah banyak memberikan saran dan masukan untuk penyempurnaan tesis ini.
4. Drs. Yulhasri, MS dan Drs. Kusmardi, MS sebagai penguji kedua dan ketiga tesis saya yang telah banyak memberikan masukan dan perbaikan untuk hasil tesis yang lebih baik.
5. DR. dr. Ratna Sitompul, SpM(K) sebagai dekan FKUI dan Prof. dr. Menaldi Rasmin, SpP(K), FCCP sebagai Dekan periode 2004-2008 yang telah menerima penulis sebagai mahasiswa Program Magister Ilmu Biomedik.
6. DR. rer. physiol. dr. Septelia Inawati W sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang turut membantu penulis dalam menyelesaikan pendidikannya.
7. dr. Ermita Ilyas, MS sebagai Kepala Departemen Fisiologi Kedokteran FKUI, yang telah mendorong penulis untuk cepat menyelesaikan pendidikan dan meringankan beban kerja penulis selama penyelesaian penelitian dan penulisan tesis ini.
8. Seluruh staf pengajar dan karyawan di Departemen Fisiologi Kedokteran FKUI. Terima kasih atas kecerewetannya terhadap penulis, sehingga tetap bersemangat

dalam menjalani pendidikan S2 sambil menunaikan tugas-tugas pekerjaan di Departemen.

9. Mbak Dessy dan Mbak Maisaroh atas bantuan dan bimbingannya selama penelitian penulis di Laboratorium *Oral Biology* FKG-UI.
10. dr. Julia Rahadian sebagai rekan peserta Program Magister Ilmu Biomedik dan rekan penelitian yang telah membantu saya selama penelitian.
11. Seluruh keluarga penulis, Papa, Mama, dan adik yang tidak lelah memberikan dukungan dan doa untuk penyelesaian studi penulis.
12. Suami tercinta yang sangat berperan dalam dukungan moril, pengertian, dan doa untuk penyelesaian studi penulis.
13. Teman-teman yang tidak bisa disebutkan namanya satu persatu, semua guru yang telah mendidik semenjak kecil hingga sekarang, serta semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Dengan rendah hati penulis menyadari bahwa tidak ada karya yang sempurna selain karya-Nya. Oleh karena itu kepada segenap pembaca karya ini, penulis menghaturkan penghargaan dan ucapan terima kasih.

Jakarta, 14 Mei 2010

Sophie Yolanda

## HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sophie Yolanda  
NPM : 0706304454  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Departemen : Fisiologi Kedokteran  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis karya : Tesis

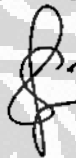
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Pengaruh ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn (akar kucing) terhadap neurogenesis pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya .

Dibuat di : Jakarta  
Pada tanggal : 14 Mei 2010  
Yang menyatakan



(Sophie Yolanda)

## ABSTRAK

Nama : Sophie Yolanda  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Judul : Pengaruh ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn (akar kucing) terhadap neurogenesis pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia

**Latar Belakang:** Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita *stroke* terbesar di Asia. Terapi utama untuk *stroke* iskemik adalah pemberian trombolitik, namun jendela terapeutiknya hanya 3 jam, dan terapi ini juga memiliki risiko transformasi hemoragik, sehingga hanya 2% penderita *stroke* di Amerika yang mendapatkan terapi ini. Terapi neurorestoratif akan meningkatkan perkembangan sel-sel saraf baru (neurogenesis) pada jaringan otak iskemik pasca *stroke*. Salah satu pendekatan terapi neurorestoratif yang aman adalah dengan memobilisasi populasi sel punca dewasa endogen yang sudah ada secara fisiologis di sistem saraf pusat sehingga dapat berintegrasi dan berpartisipasi dalam sirkuit neural yang fungsional. Mobilisasi sel punca ini dapat ditingkatkan dengan cara menurunkan respon inflamasi. Tanaman akar kucing atau *Acalypha indica* Linn merupakan tanaman perdu yang banyak tumbuh di pinggir jalan atau ladang yang tak terawat dan dapat dijumpai di setiap daerah di Indonesia. Secara tidak sengaja ditemukan rebusan akar kucing tersebut dapat memulihkan kelumpuhan saraf akibat *stroke*. Acalyphin dan stigmasterol yang terkandung dalam akar kucing bersifat anti inflamasi dengan membentuk kompleks inhibitor PLA<sub>2</sub> yang merupakan prekursor inflamasi penting pada *stroke*.

**Tujuan:** Mengamati pengaruh pemberian ekstrak air akar kucing terhadap neurogenesis pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia.

**Metode:** Studi eksperimental *in vitro* pada kultur primer jaringan sel saraf tikus *Sprague Dowley* dewasa yang dipajankan terhadap hipoksia dengan gas 5% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> balans selama 24 jam. Selain kelompok kontrol, ekstrak air *Acalypha indica* Linn ditambahkan pada sel saraf pasca hipoksia pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL. Setelah inkubasi selama 90 jam, tingkat neurogenesis diukur dengan MTT untuk viabilitas relatif sel dan BrdU untuk proliferasi sel.

**Hasil:** Viabilitas relatif sel dan tingkat proliferasi sel pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia dengan pemberian ekstrak air akar kucing pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kontrol ( $p < 0,01$ ).

**Kesimpulan:** Ekstrak air *Acalypha indica* Linn dapat meningkatkan neurogenesis pasca hipoksia *in vitro* pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL.

**Kata kunci:** neurogenesis, hipoksia, *Acalypha indica* Linn (akar kucing)

## ABSTRACT

Name : Sophie Yolanda  
Study Program : Biomedical Science  
Title : The influence of *Acalypha indica* Linn root water extract towards neurogenesis in hippocampal tissue culture post hypoxia

**Background:** Indonesia has the biggest stroke patients in Asia. The principal therapy for ischemic stroke is thrombolytic therapy, but the therapeutic window is only 3 hours and this therapy also holds hemorrhagic risk, so only 2% of stroke patients in America can have this therapy. Neurorestorative therapy will increase neurogenesis in ischemic brain tissue post stroke. One of the approaches for safe neurorestorative therapy is by mobilization of endogen adult stem cells that physiologically already exist in the central nervous system so that they may integrate and participate in a functional neural circuit. The mobilization of the stem cells can be achieved by lowering the inflammatory response. *Acalypha indica* Linn (*akar kucing*) is a common plant that can be found at the side of the road or fields and can be found all over Indonesia. Accidentally, the decoction of the root can cure the paralysis caused by stroke. Acalyphin and stigmasterol contained within the root is anti-inflammatory by forming a PLA<sub>2</sub> inhibitory complex which is an important inflammatory precursor in stroke.

**Objective:** To observe the influence of *Acalypha indica* Linn root water extract towards neurogenesis in hippocampal tissue culture post hypoxia.

**Method:** Experimental in-vitro study using primary neuronal cell culture of adult *Sprague-Dowley* rat exposed to hypoxia with 5% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> balance gas for 24 hours. Except the control group, *Acalypha indica* Linn root water extract is added with dosage of 10 mg/mL, 15 mg/mL, and 20 mg/mL. After 90 hours of incubation, neurogenesis is measured MTT assay for relative cell viability and BrdU for cell proliferation.

**Result:** Relative cell viability and cell proliferation of rat hippocampal tissue culture with *Acalypha indica* Linn root water extract with dosage of 10 mg/mL, 15 mg/mL, and 20 mg/mL is significantly higher than control ( $p < 0,01$ ).

**Conclusion:** *Acalypha indica* Linn root water extract with dosage of 10 mg/mL, 15 mg/mL, and 20 mg/mL can increase neurogenesis post hypoxia *in vitro*.

**Keywords:** neurogenesis, hypoxia, *Acalypha indica* Linn



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS .....	vi
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
A. LATAR BELAKANG .....	1
B. RUMUSAN MASALAH.....	3
C. TUJUAN PENELITIAN.....	3
C.1. Tujuan Umum .....	3
C.2. Tujuan Khusus .....	4
D. HIPOTESIS.....	4
E. MANFAAT PENELITIAN.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	5
A. HIPOKSIA SEREBRI .....	5
B. NEURODEGENERASI PADA HIPOKSIA SEREBRI .....	5
B.1. Eksitotoksisitas.....	5
B.2. Pembentukan Radikal Bebas.....	7
B.3. Inflamasi .....	8
C. NEUROGENESIS PASCA HIPOKSIA SEREBRI.....	11
C.1. <i>Neural Stem Cells</i> .....	11
C.2. Proliferasi Neuronal.....	13
C.3. Migrasi Neuronal.....	15
C.4. Peran Faktor Transkripsi, Gen dan Faktor Pertumbuhan pada Neurogenesis.....	16
C.5. Neurogenesis dan Pemulihan Fungsional .....	17
D. TERAPI NEURORESTORATIF PASCA HIPOKSIA SEREBRI.....	19
D.1. Terapi Genetik.....	20
D.2. Terapi Selular .....	22
D.2.1. Terapi Selular Eksogen .....	23
D.2.2. Terapi Selular Endogen.....	25
D.2.3. Mobilisasi Sel Punca Endogen .....	27
E. AKAR KUCING ( <i>Acalypha indica</i> Linn) .....	28
F. PEMERIKSAAN VIABILITAS SEL DENGAN METODE 3-(4,5- DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-2,5-DIPHENYL TETRAZOLIUM BROMIDE (MTT).....	31
G. PENGAMATAN PROLIFERASI SEL MENGGUNAKAN 5-BROMO-2'- DEOXY-URIDINE (BrdU) ASSAY .....	32
H. KERANGKA TEORI.....	34

I. KERANGKA KONSEP .....	34
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>35</b>
A. RANCANGAN PENELITIAN .....	35
B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN .....	35
C. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN .....	35
C.1. Alat penelitian .....	35
C.2. Bahan Penelitian .....	36
D. POPULASI PENELITIAN .....	37
D.1. Subjek Penelitian .....	37
D.2. Sampel Penelitian .....	37
D.3. Besar Sampel .....	37
E. ALUR PENELITIAN .....	39
F. DEFINISI OPERASIONAL .....	40
G. VARIABEL PENELITIAN .....	40
H. CARA KERJA .....	41
I. ANALISIS DATA .....	45
<b>BAB 4 HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>46</b>
A. VIABILITAS RELATIF SEL .....	46
B. TINGKAT PROLIFERASI SEL .....	48
<b>BAB 5 PEMBAHASAN .....</b>	<b>51</b>
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>57</b>
A. KESIMPULAN .....	57
B. SARAN .....	57
DAFTAR REFERENSI .....	59
LAMPIRAN .....	64
RIWAYAT HIDUP .....	80
DRAFT ARTIKEL .....	81

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Mekanisme Kematian Sel pada Hipoksia Serebri .....	6
Gambar 2.	PLA <sub>2</sub> s pada Neuron dan Astrosit.....	9
Gambar 3.	Aktivasi Iskemik Kaskade AA.....	10
Gambar 4.	Respon Inflamasi pada <i>Stroke</i> .....	11
Gambar 5.	Neurogenesis pada SVZ (I, III) dan DG (I, II).....	12
Gambar 6.	Posisi Sel pada Proliferasi.....	14
Gambar 7.	Neurogenesis Pasca Hipoksia Serebri .....	15
Gambar 8.	Peran MMPs pada migrasi dan diferensiasi NSC .....	16
Gambar 9.	<i>Neurovascular Niche</i> .....	17
Gambar 10.	Pengaruh Faktor Pertumbuhan pada Proliferasi, Migrasi, dan Diferensiasi NSC .....	17
Gambar 11.	Tingkatan Fungsi Neuron .....	19
Gambar 12.	Fungsi Neurogenesis.....	19
Gambar 13.	Pendekatan Terapi Selular pada <i>Stroke</i> .....	23
Gambar 14.	Akar Kucing.....	29
Gambar 15.	Struktur Kimia Acalyphin dan Stigmasterol.....	30
Gambar 16.	Interaksi Acalyphin dengan Asam-asam Amino pada Situs Aktif sPLA <sub>2</sub> Ular Berbisa <i>Russell</i> (a) dan Pankreas Sapi (b) .....	31
Gambar 17.	Interaksi Stigmasterol dengan Asam-asam Amino pada Situs Aktif sPLA <sub>2</sub> Ular Berbisa <i>Russell</i> .....	31
Gambar 18.	Prinsip Pemeriksaan BrdU.....	33
Gambar 19.	Hasil Kultur Sel Saraf Jaringan Hipokampus hari ke-10.....	46
Gambar 20.	Rata-rata Viabilitas Relatif Sel.....	47
Gambar 21.	Rata-rata Absorbansi Pemeriksaan BrdU .....	49

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Karakteristik Klinis dan Imunohistologis Pasien <i>Stroke</i> .....	18
Tabel 2. Beberapa Penelitian Terapi Genetik Pasca <i>Stroke</i> Iskemik.....	21
Tabel 3. Berbagai Sumber Sel untuk Terapi Selular <i>Stroke</i> .....	22
Tabel 4. Interaksi Acalyphin dan Stigmasterol pada Situs Aktif sPLA <sub>2</sub> Ular Berbisa <i>Russell</i> dan Pankreas Sapi .....	30
Tabel 5. Variabel Penelitian.....	41
Tabel 6. Rata-rata Viabilitas Relatif Sel .....	47
Tabel 7. Transformasi Log <sub>10</sub> Data Rata-rata Viabilitas Relatif Sel.....	48
Tabel 8. Hasil Uji Kemaknaan Rata-rata Viabilitas Relatif Sel Antar Kelompok Perlakuan.....	48
Tabel 9. Rata-rata Absorbansi Pemeriksaan BrdU.....	49
Tabel 10. Hasil Uji Kemaknaan Rata-rata Absorbansi Pemeriksaan BrdU Antar Kelompok Perlakuan.....	50

## DAFTAR SINGKATAN

5-HPETE	: 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid
AA	: Arachidonic acid
AIF	: Apoptosis-inducing factor
AMPA	: $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
Apaf-1	: Apoptotic protease activating factor-1
ASIC	: Acid-sensing ion channel
ATP	: Adenosine triphosphate
Bax	: Bcl-2-antagonist x protein
Bcl-2	: B cell lymphoma leukemia 2 protein
BDNF	: Brain-derived neurotrophic factor
bFGF	: Basic fibroblast growth factor
BrdU	: 5-bromo-2'-deoxy-uridine
BSA	: Bovine Albumin Serum
COX	: Cyclooxygenase
CREB	: c-AMP response binding element
Cytc	: Cytochrome c
DG	: Dentate gyrus
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	: Deoxyribonucleic acid
EAATs	: Excitatory amino acid transporters
EGF	: Epidermal growth factor
eNOS	: Endothelial nitric oxide synthase
FBS	: Fetal Bovine Serum
fEPSPs	: field excitatory post-synaptic action potentials
GABA	: Gamma-aminobutyric acid
G-CSF	: Granulocyte colony-stimulating factor
GDNF	: Glial cell line-derived neurotrophic factor
HGF	: Hepatocyte growth factor
HIF-1	: hypoxia inducible factor 1
HSF	: Heat shock factor
HUCBC	: Human umbilical cord blood cell
ICAM-1	: Intracellular adhesion molecule-1
IL-1	: Interleukin-1
INM	: Interkinetic nuclear migration
iNOS	: Inducible nitric oxide synthase
LGE	: Lateral ganglionic eminence
LOX	: Lipoxygenase
LTA4	: Leukotriene A4

LTB4	: Leukotriene B4
LTC4	: Leukotriene C4
LTD4	: Leukotriene D4
LTE4	: Leukotriene E4
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MCA	: Middle cerebral artery
MMP	: Matrix metalloproteinase
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- $\kappa$ B	: Faktor transkripsi
NGF	: Nerve growth factor
NMDA	: N-methyl-D-aspartic acid
nNOS	: Neuronal nitric oxide synthase
NO	: Nitric oxide
NOS	: Nitric oxide synthase
NSC	: Neural stem cell
NT2N	: Neuroteratocarcinoma
PARP	: Poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	: Phosphate Buffer Saline
Penn-Strep	: Penicillin-Streptomycin
PERV	: Porcine endogenous retrovirus
PGH2	: Prostaglandin H2
PGI2	: Prostacyclin
PLA <sub>2</sub>	: Phospholipase A <sub>2</sub>
PUMA	: p53-upregulated modulator of apoptosis
RMS	: Rostral migratory stream
ROS	: Reactive oxygen species
rt-PA	: recombinant tissue-type plasminogen activator
SDF-1 $\alpha$	: Stromal-derived factor 1 $\alpha$
SGZ	: Subgranular zone
SSP	: Susunan saraf pusat
SVZ	: Subventricular zone
tBid	: Truncated Bid
TGF- $\beta$	: Transforming growth factor $\beta$
Timp1	: Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
TNF $\alpha$	: Tumor necrosis factor $\alpha$
tPA	: Tissue plasminogen activator
TXA2	: Tromboxane A2
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
VZ	: Ventricular zone

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

*Stroke* merupakan salah satu penyebab utama kematian dan kecacatan di Amerika Serikat.<sup>1</sup> Di Indonesia belum ada angka pasti insidens *stroke*, namun dari salah satu artikel disebutkan bahwa saat ini Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita *stroke* terbesar di Asia.<sup>2</sup> Apabila tidak ada upaya penanggulangan *stroke* yang lebih baik maka jumlah penderita *stroke* pada tahun 2020 diprediksikan akan meningkat 2 kali lipat.<sup>2</sup> Secara umum *stroke* diklasifikasikan menjadi *stroke* hemoragik dan *stroke* iskemik. *Stroke* hemoragik terjadi bila terdapat perdarahan intrakranial yang paling sering disebabkan oleh kebocoran pembuluh darah pada hipertensi,<sup>3</sup> sedangkan *stroke* iskemik akut disebabkan oleh thrombosis atau emboli.<sup>1</sup>

Saat ini terapi utama untuk *stroke* iskemik adalah pemberian trombolitik,<sup>1</sup> sebab inilah satu-satunya pendekatan terapi yang menunjukkan peningkatan fungsi neurologis.<sup>4</sup> Sayangnya, jendela terapeutik untuk terapi ini sangat singkat, yaitu 3 jam,<sup>1</sup> sehingga sebagian besar pasien *stroke* iskemik tidak dapat diterapi dengan pemberian trombolitik karena sempitnya jendela terapeutik.<sup>5</sup> Selain itu, terapi ini juga memiliki risiko transformasi hemoragik, sehingga hanya 2% penderita *stroke* di Amerika yang mendapatkan terapi ini.<sup>4,5,6</sup> Karena itulah diperlukan terapi yang memiliki jendela terapi yang lebih lama dan secara aktif meningkatkan fungsi neurologis untuk mengembalikan dan mengoptimalkan fungsi otak, yaitu terapi neurorestoratif.<sup>4,5,6</sup>

Terapi neurorestoratif akan meningkatkan perkembangan sel-sel saraf baru (neurogenesis) pada jaringan otak iskemik pasca *stroke*.<sup>5</sup> Pada sebagian besar otak mamalia dewasa, terdapat sel-sel punca (*stem cells*) yang dapat memperbaharui diri pada regio-regio otak tertentu, yaitu pada zona subgranular (SGZ) girus dentata (DG) hipokampus dan zona subventrikular (SVZ) ventrikel lateral.<sup>4,7,8,9,10</sup> Sel-sel punca ini dapat memperbaharui diri sepanjang kehidupan, sehingga kemampuan neurogenesis tetap ada pada otak dewasa, dan dapat distimulasi baik dengan berbagai faktor fisiologis maupun patologis seperti hipoksia.<sup>9,10,11</sup> Neurogenesis dapat diukur dengan berbagai cara, namun cara yang umum adalah dengan menghitung viabilitas sel,

misalnya dengan hitung sel menggunakan metode *trypan blue* atau MTT, dan dengan menganalisis proliferasi sel, misalnya dengan menggunakan pemeriksaan BrdU.

Berbagai percobaan telah membuktikan kemampuan neurogenesis otak dewasa pasca hipoksia serebri, antara lain oleh Jiang *et al*<sup>7</sup>, Jin *et al*<sup>8</sup>, Tanaka *et al*<sup>9</sup>, dan Yagita *et al*<sup>10</sup>. Semua penelitian tersebut menunjukkan peningkatan neurogenesis pada otak dewasa yang mengalami hipoksia dibandingkan kontrol. Pada manusia, neurogenesis yang diinduksi oleh *stroke* telah dilaporkan oleh Jin *et al*<sup>11</sup>. Walaupun terdapat peningkatan neurogenesis secara alamiah pasca hipoksia serebral, namun peningkatan ini tidak sebanding dengan kerusakan yang telah terjadi.<sup>12</sup>

Salah satu penyebab kematian sel pada *stroke* adalah proses inflamasi.<sup>6,13</sup> Pada proses ini, terjadi aktivasi enzim fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) yang akan menghasilkan asam arakidonat (AA).<sup>14,15</sup> AA akan dimetabolisme melalui jalur *cyclooxygenase* (COX) yang akan mengubah AA menjadi prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), yang merupakan prekursor prostaglandin dan kemudian akan dimetabolisme menjadi berbagai eikosanoid. Seluruh eikosanoid ini akan meningkatkan permeabilitas sawar darah otak dan pada akhirnya menyebabkan edema otak.<sup>15</sup> Inflamasi telah terbukti mengganggu neurogenesis basal maupun pasca hipoksia.<sup>16,17</sup>

Salah satu pendekatan terapi neurorestoratif yang aman adalah dengan memobilisasi populasi sel punca dewasa endogen yang sudah ada secara fisiologis di sistem saraf pusat sehingga dapat berintegrasi dan berpartisipasi dalam sirkuit neural yang fungsional.<sup>18</sup> Mobilisasi sel punca ini dapat ditingkatkan dengan cara meningkatkan faktor pertumbuhan, menurunkan respon inflamasi, dan memperbaiki kondisi lingkungan pasien.<sup>19</sup> Saat ini terapi neurorestoratif masih tergolong mahal dan sulit didapatkan di Indonesia.

Tanaman akar kucing atau *Acalypha indica* Linn merupakan tanaman perdu yang banyak tumbuh di pinggir jalan atau ladang yang tak terawat dan dapat dijumpai di setiap daerah di Indonesia dengan nama yang berbeda-beda, antara lain kucing-kucingan, bunga anting-anting, atau rumput bolong-bolong.<sup>20</sup> Tanaman ini dinamai akar kucing karena akarnya disenangi kucing yang sedang sakit. Beberapa saat setelah dimakan dimuntahkan kembali bersama isi perutnya, dan kucing tersebut akan tampak membaik. Atas dasar itulah pada awalnya masyarakat dengan coba-coba memanfaatkan rebusan akar kucing untuk mengobati dirinya saat menderita sakit perut. Secara tidak sengaja, ternyata rebusan akar kucing tersebut dapat memulihkan kelumpuhan saraf akibat *stroke*.<sup>20</sup>



Kandungan bahan aktif yang bermanfaat dari tanaman ini masih belum dapat diidentifikasi dengan baik. Beberapa bahan kimia yang telah berhasil diidentifikasi antara lain adalah *kaempferol* (flavonoid), *beta-sitosterol*, HCN, *gamma-sitosterol*, dan *Acalyphin*.<sup>21</sup> Nirmal *et al* telah membuktikan bahwa *Acalyphin* dan *stigmasterol* bersifat anti inflamasi dengan membentuk kompleks inhibitor PLA<sub>2</sub> yang merupakan prekursor inflamasi penting.<sup>22</sup> Seperti telah disebutkan di atas, penurunan respon inflamasi dapat meningkatkan mobilisasi sel punca dewasa yang sudah ada secara fisiologis di sistem saraf pusat.<sup>18,19</sup>

Efek neuroprotektor dan neuroterapinya telah dibuktikan oleh Purwaningsih *et al* secara *eks vivo* maupun *in vivo* pada dosis 15-20 mg/mL. Purwaningsih *et al* meneliti efek neuroprotektor dan neuroterapi akar kucing pada otot katak yang diberikan pelumpuh otot, dengan aktivitas listrik otot tersebut sebagai parameter yang diukur.<sup>20</sup> Pada susunan saraf pusat (SSP), efek neuroterapinya telah dibuktikan oleh Suswati secara *in vivo* pada dosis 400-500 mg/kgBB. Suswati meneliti efek neuroterapi akar kucing pada otak tikus pasca hipoksia serebri, dengan jumlah sel rusak pada hipokampus sebagai parameter yang diukur.<sup>23</sup>

Walaupun secara empiris tanaman ini telah dimanfaatkan untuk menyembuhkan kelumpuhan pada penderita pasca *stroke*, belum ada bukti ilmiah mengenai pengaruh ekstrak akar kucing terhadap neurogenesis sel-sel saraf pasca *stroke*. Oleh sebab diperlukan penelitian untuk mengetahui bagaimana pengaruh pemberian ekstrak akar kucing terhadap neurogenesis pasca hipoksia serebri secara *in vitro*.

## B. RUMUSAN MASALAH

Bagaimana neurogenesis pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia dengan pemberian ekstrak air akar kucing pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL?

## C. TUJUAN PENELITIAN

### C.1. Tujuan Umum

Mengamati pengaruh pemberian ekstrak air akar kucing terhadap neurogenesis pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia.

## C.2. Tujuan Khusus

1. Membandingkan dan menganalisis viabilitas relatif sel antara:
  - kultur jaringan hipokampus tikus pada 90 jam pasca hipoksia tanpa pemberian ekstrak air akar kucing
  - kultur jaringan hipokampus tikus pada 90 jam pasca hipoksia dengan pemberian ekstrak air akar kucing pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL
2. Membandingkan dan menganalisis tingkat proliferasi sel antara:
  - kultur jaringan hipokampus tikus pada 90 jam pasca hipoksia tanpa pemberian ekstrak air akar kucing
  - kultur jaringan hipokampus tikus pada 90 jam pasca hipoksia dengan pemberian ekstrak air akar kucing pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL

## D. HIPOTESIS

1. Viabilitas relatif sel pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia dengan pemberian ekstrak air akar kucing pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL akan berbeda bermakna dengan viabilitas relatif sel pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia tanpa pemberian ekstrak air akar kucing.
2. Tingkat proliferasi sel pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia dengan pemberian ekstrak air akar kucing pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL akan berbeda bermakna dengan tingkat proliferasi sel pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia tanpa pemberian ekstrak air akar kucing.

## E. MANFAAT PENELITIAN

1. Memberikan informasi mengenai pengaruh pemberian ekstrak akar kucing terhadap terhadap neurogenesis pasca hipoksia.
2. Memberikan data tambahan untuk penelitian biomedik selanjutnya pada tingkat gen atau molekuler yang berhubungan dengan pengaruh pemberian ekstrak akar kucing terhadap terhadap neurogenesis pasca hipoksia.
3. Melalui riset ini diharapkan ekstrak akar kucing dapat menjadi salah satu pilihan terapi neurorestoratif terhadap *stroke* iskemik pada penerapan di klinik kelak.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. HIPOKSIA SEREBRI

Hipoksia serebri terjadi saat suplai darah terputus dari otak, yang paling sering terjadi pada *stroke*. Pada manusia, terdapat dua jenis hipoksia serebri:<sup>13</sup>

- Hipoksia global sementara (*transient global ischemia*), terjadi bila terdapat kegagalan sirkulasi umum, misalnya pada gagal jantung.
- Hipoksia fokal yang panjang (*focal prolonged ischemia*), terjadi bila suatu area yang terbatas di otak kehilangan suplai darahnya, disebabkan oleh sumbatan atau rupturnya suatu arteri, secara umum diasosiasikan sebagai *stroke*.

#### B. NEURODEGENERASI PADA HIPOKSIA SEREBRI

Hipoksia serebri merupakan salah satu bentuk kerusakan (*injury*) pada otak yang akan menyebabkan proses-proses yang sangat merusak beberapa sel sehingga sel-sel ini akan mati dengan cepat. Pada hipoksia fokal, sel-sel yang paling terpengaruh ini akan menjadi area nekrosis pada pusat lesi yang biasanya tidak dapat diselamatkan. Area di sekitar nekrosis pusat lesi ini disebut penumbra, dan area ini mengandung sel-sel yang kematiannya tidak secepat area pusat nekrosis, yaitu sekitar 2-3 hari. Mekanisme kematian sel pada area ini bukanlah nekrosis, melainkan apoptosis dan kaskade perubahan sekunder yang mengikuti peristiwa hipoksia itu sendiri. Perubahan sekunder yang mengikuti terjadinya hipoksia serebri adalah:<sup>6,13</sup>

- Eksitotoksisitas
- Pembentukan radikal bebas
- Inflamasi

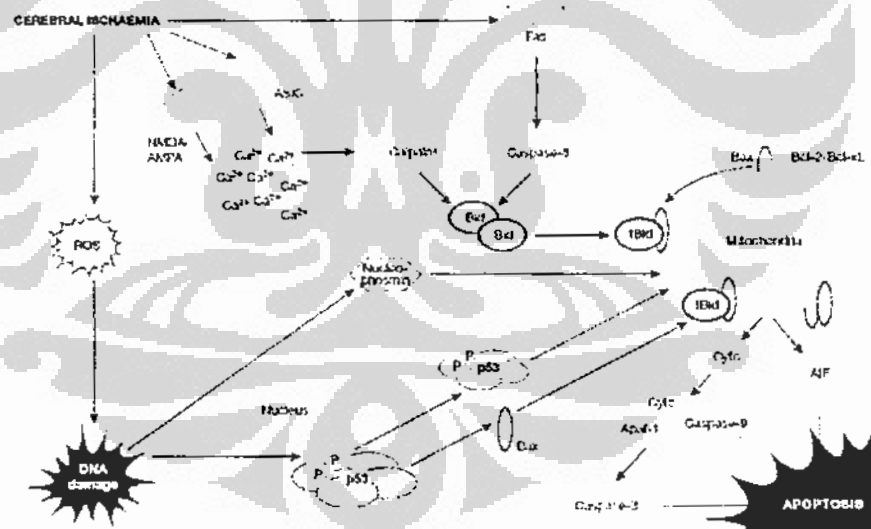
##### B.1. Eksitotoksisitas

Kaskade eksitotoksisitas dimulai saat astrosit melepaskan simpanan glutamat intraselularnya, yang pada astrosit jumlahnya jauh lebih banyak daripada di neuron. Pada keadaan normal, astrosit akan membuang glutamat dari lingkungan ekstraselular melalui transporter asam amino eksitatorik (*excitatory amino acid transporters/EAATs*), yang menukar dua ion natrium dan satu glutamat dengan satu ion kalium dan hidroksil. Pada hipoksia, otak

mulai kehabisan *adenosine triphosphate* (ATP), sehingga gradien konsentrasi transmembran dari natrium dan kalium berkurang, potensial membran menghilang, dan pH intraselular turun. Semua perubahan ini pada akhirnya akan menyebabkan tidak bekerjanya EAATs, sehingga konsentrasi glutamat di lingkungan ekstraselular menjadi sangat tinggi. Tingginya konsentrasi glutamat ekstraselular akan mendepolarisasi neuron, mencetuskan potensial aksi, dan melepaskan lebih banyak glutamat, sehingga terjadilah lingkaran setan dari rangkaian peristiwa ini.<sup>13,24</sup>

Peningkatan glutamat ekstraselular akan menyebabkan terbukanya kanal *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDA) dan *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid* (AMPA), sehingga menyebabkan peningkatan konsentrasi ion kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intraselular.<sup>13</sup>

Selain kanal NMDA, saat ini juga diketahui terdapat kanal ion sensitif asam (ASIC) yang membentuk kelas baru *pH-dependent ion channel coupled receptors* yang juga terlibat dalam gangguan homeostasis kalsium setelah penurunan pH ekstraselular pada hipoksia serebri (lihat Gambar 1).<sup>6</sup>



Gambar 1. Mekanisme Kematian Sel pada Hipoksia Serebri<sup>6</sup>

Kelebihan (*overload*)  $\text{Ca}^{2+}$  intraselular, bersama dengan akumulasi spesies oksigen reaktif (ROS) dan aktivasi reseptor kematian Fas, akan mengaktifasi caspase 8 atau calpain dan memediasi pembelahan Bid menjadi Bid yang terpotong (tBid), yang akan mengintegrasikan berbagai jalur apoptosis di mitokondria. Pada membran mitokondria, tBid berinteraksi dengan *Bcl-2-antagonist x protein* (Bax), yang pada keadaan normal dihambat

oleh *B cell lymphoma leukemia 2 protein* (Bcl-2). Dimer tBid dan Bax membentuk pori-pori di membran luar mitokondria, sehingga melepaskan sitokrom c (cytc) yang akan mengeksekusi kematian sel yang tergantung caspase, atau melepaskan *apoptosis-inducing factor* (AIF) yang akan mengeksekusi kematian sel yang tidak tergantung caspase.<sup>6</sup>

Setelah dilepaskan ke sitosol, cytc akan membentuk kompleks dengan *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) dan procaspase-9 untuk membentuk apoptosome, yang akan mengaktifkan caspase eksekutor, seperti caspase 3. Sedangkan setelah dilepaskan ke sitosol, AIF akan bertranslokasi secara cepat ke nukleus dan di sana akan memediasi fragmentasi *deoxyribonucleic acid* (DNA) dalam skala besar dan kematian sel yang tidak tergantung caspase melalui kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA dalam skala besar.<sup>6,25</sup>

## B.2. Pembentukan Radikal Bebas

Radikal bebas adalah suatu molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan, sehingga menjadi tidak stabil dan dapat bereaksi dengan molekul yang bersebelahan secara bebas. Radikal bebas di otak yang dominan adalah anion superoksida ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan radikal hidroksil ( $OH^\cdot$ ).<sup>13</sup>

Pada hipoksia serebri, *overloading*  $Ca^{2+}$  akan meningkatkan aktivitas *nitric oxide* (NO) sintase neuronal, sehingga terjadi penganakuran NO. NO bekerja melalui dua mekanisme. Mekanisme pertama terjadi pada konsentrasi NO yang tinggi, yaitu melalui reaksi dengan ROS untuk membentuk radikal peroksinitrit yang sangat toksik ( $NO + O_2^- \rightarrow ONOO^\cdot$ ). Kombinasi peningkatan radikal bebas dan NO menyebabkan oksidasi lipid, protein, dan asam nukleat yang luas. Mekanisme kedua terjadi pada konsentrasi NO yang rendah, yaitu melalui inhibisi produksi ATP di mitokondria dengan inhibisi enzim cytc. Rendahnya konsentrasi ATP akan menyebabkan hal-hal yang telah disebutkan di sub bab B.1.<sup>13</sup>

Pada neuron, kerusakan asam nukleat (atau DNA) akan menyebabkan beberapa hal:<sup>6</sup>

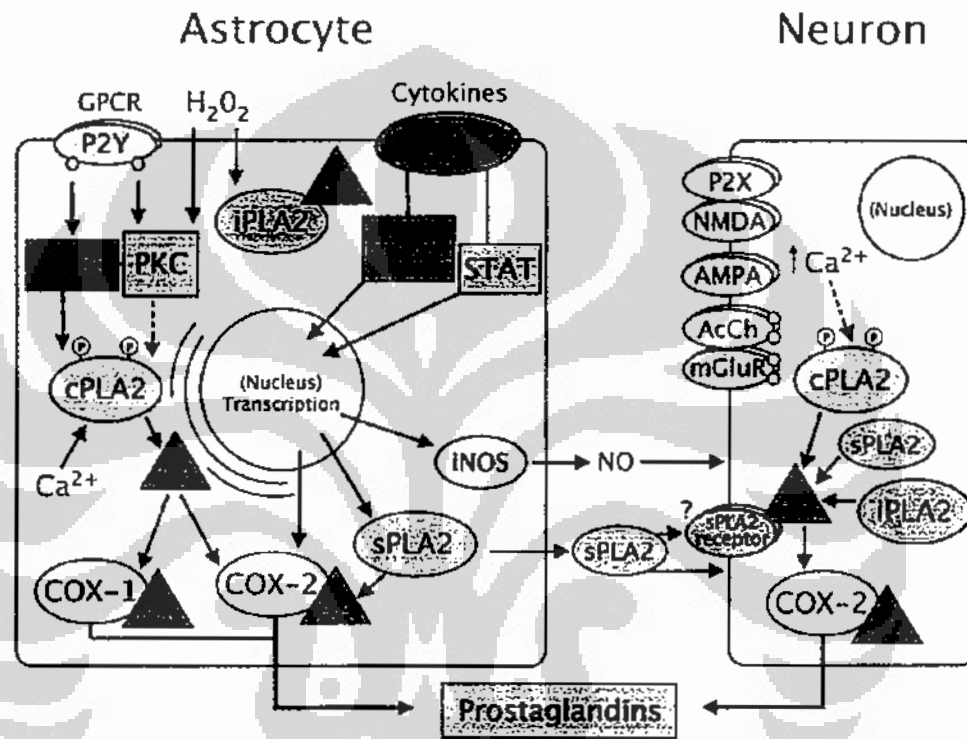
- Fosfoprotein nukleolar *nucleophosmin* dapat berkontribusi pada aktivasi Bax, dengan demikian menghubungkan sinyal kematian sel dari jalur apoptosis nukleus dan mitokondria.
- Peningkatan produksi p53 yang akan memediasi kematian sel terprogram baik melalui transkripsi Bax, *p53-upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) atau Noxa, maupun kerusakan mitokondria dan aktivasi caspase yang terjadi berikutnya.

### B.3. Inflamasi

Inflamasi akan meningkatkan ekspresi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B yang akan meningkatkan ekspresi gen-gen sitokin (seperti TNF $\alpha$  dan IL-1), molekul adhesi (seperti ICAM-1), mediator inflamasi prostanoide, dan NO.<sup>6,26</sup> Faktor-faktor ini akan memediasi penarikan dan penempelan neutrofil pada sel endotel. Pasca hipoksia serebri, neutrofil terlihat menempel pada dinding pembuluh darah jaringan sekitarnya dalam hitungan menit, dan mulai memasuki jaringan dalam waktu 1-2 jam. Selain itu, faktor-faktor ini juga menginisiasi degranulasi neutrofil, melepaskan enzim-enzim proteolitik seperti cathepsins, gelatinases, elastases, yang memiliki kemampuan untuk merusak sel-sel sekitarnya dan matriks ekstraselular. Akumulasi neutrofil akan mengganggu aliran darah dan bila terekstrasvasasi ke parenkim otak akan memproduksi sitokin dan *chemokine* pro-inflamasi dan mengalami ledakan respiratorik (*respiratory burst*) yang akan menyebabkan produksi radikal bebas yang sangat toksik.<sup>6,13,26</sup> NO diproduksi oleh enzim *NO synthase* (NOS) dengan paling tidak 3 bentuk (*isoform*): *neuronal NOS* (nNOS), *endothelial NOS* (eNOS), dan *inducible NOS* (iNOS).<sup>26</sup>

Seperti telah disebutkan pada sub bab B.1, kegagalan energi akan menyebabkan kelebihan Ca<sup>2+</sup> intraselular yang pada akhirnya juga akan mengaktivasi enzim PLA<sub>2</sub>. Enzim PLA<sub>2</sub> adalah sekelompok enzim yang mengkatalis hidrolisis membran gliserofosfolipid pada posisi *sn*-2, yang akan menghasilkan AA.<sup>14,15</sup> Enzim PLA<sub>2</sub> diklasifikasi dalam 5 kelompok: PLA<sub>2</sub> yang disekresi (sPLA<sub>2</sub>s), PLA<sub>2</sub> sitosol yang dependen Ca<sup>2+</sup> (cPLA<sub>2</sub>s), PLA<sub>2</sub>

yang independen terhadap  $\text{Ca}^{2+}$  (iPLA<sub>2</sub>s), PAF asetilhidrolase, dan PLA<sub>2</sub> lisosom.<sup>27</sup> Dari lima kelompok ini, sPLA<sub>2</sub>s dianggap sebagai PLA<sub>2</sub>s inflamatorik,<sup>22</sup> namun cPLA<sub>2</sub>s dan iPLA<sub>2</sub>s juga berperan dalam proses inflamasi dan terdapat pada neuron maupun astrosit serta dapat diaktifkan oleh berbagai faktor lain selain kelebihan  $\text{Ca}^{2+}$  intraselular, seperti ROS, sitokin, dan pengaktifan jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan fosfokinase C (PKC) melalui reseptor P2Y di astrosit (lihat Gambar 2).<sup>28</sup>

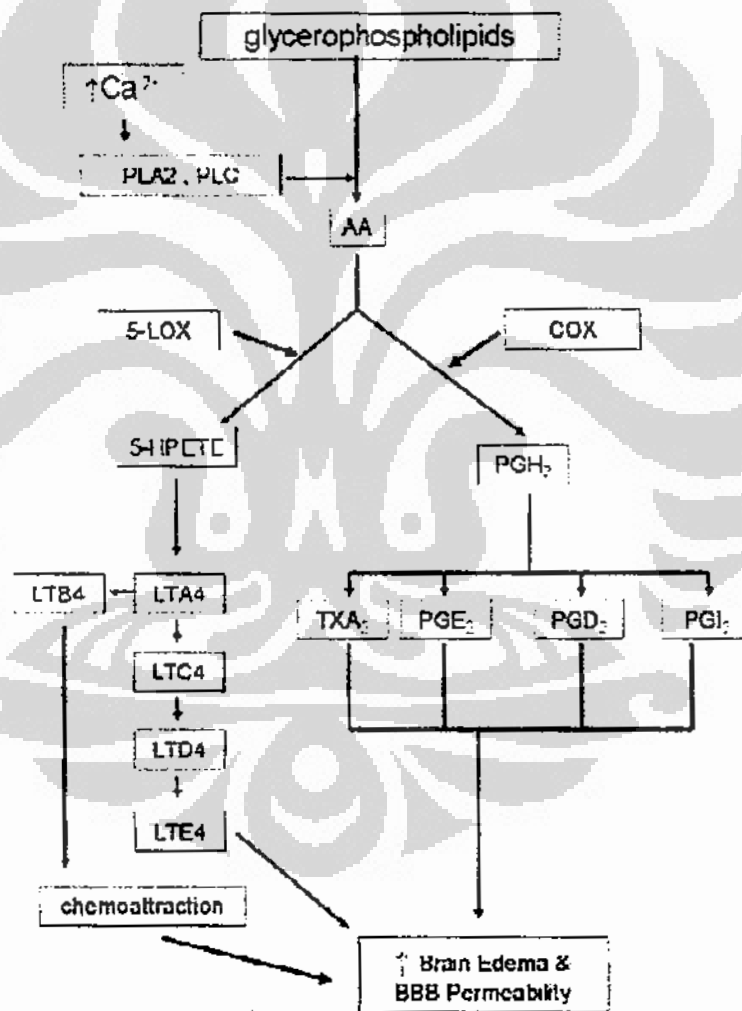


Gambar 2. PLA<sub>2</sub>s pada Neuron dan Astrosit<sup>28</sup>

AA akan dimetabolisme melalui 2 jalur, jalur *cyclooxygenase* (COX) dan *lipooxygenase* (LOX).<sup>15</sup> Jalur COX akan mengubah AA menjadi PGH<sub>2</sub>, yang merupakan prekursor prostaglandin dan kemudian akan dimetabolisme menjadi berbagai eikosanoid, termasuk prostasiklin (PGI<sub>2</sub>), tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaglandin E<sub>2</sub> dan prostaglandin D<sub>2</sub>. Seluruh eikosanoid ini akan meningkatkan permeabilitas sawar darah otak dan pada akhirnya menyebabkan edema otak. Jalur LOX akan mengubah AA menjadi 5-*hydroperoxyicosatetraenoic acid* (5-HPETE) yang kemudian akan dimetabolisme menjadi leukotrien A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) dan B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). LTA<sub>4</sub> diubah menjadi leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), leukotrien D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>), dan leukotrien E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>). Seluruh leukotrien ini berperan dalam memediasi kemotraksi, edema otak, dan peningkatan permeabilitas sawar darah otak (lihat Gambar 3).<sup>15</sup>

Saat ini terdapat bukti-bukti kuat bahwa *inducible NOS* (iNOS) dan *Cyclooxygenase 2* (COX-2) merupakan mediator inflamasi yang dominan.<sup>6,29</sup> Peningkatan ekspresi COX-2 juga akan meningkatkan terbentuknya ROS.<sup>29</sup>

Setelah 24 jam pertama, tipe sel inflamasi utama bergeser dari neutrofil menjadi makrofag. Terdapat dua sumber makrofag pada hipoksia serebri: dari darah (bila terdapat kerusakan parah dari pembuluh darah dan terdapat peningkatan permeabilitas kapiler), dan dari otak sendiri dalam bentuk mikroglia. Makrofag juga diinisiasi oleh faktor-faktor yang menginisiasi neutrofil, dan efeknya terhadap sel-sel otak juga sama seperti neutrofil.<sup>13</sup>

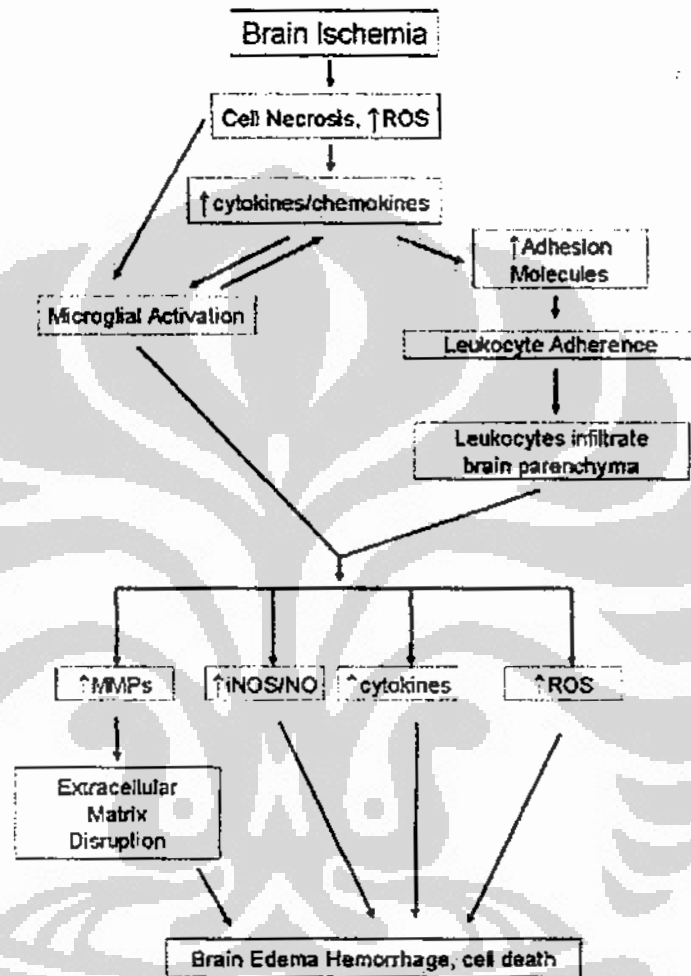


**Gambar 3. Aktivasi Iskemik Kaskade AA<sup>15</sup>**

Mikroglia juga memproduksi *tissue plasminogen activator* (tPA) yang fungsinya mengubah plasminogen menjadi plasmin, enzim proteolitik yang mendegradasi matriks ekstraseluler dan molekul permukaan. Sebagian besar



protease di otak akan diaktifkan oleh plasmin, sehingga tPA merupakan awal dari kaskade protease.<sup>13</sup> Salah satu protease yang penting adalah *matrix metalloproteinases* (MMPs) (lihat Gambar 4).<sup>15</sup> Induksi MMP2 dan MMP9 diduga berhubungan dengan kerusakan sawar darah otak dan kerusakan neuron pasca hipoksia serebri.<sup>26</sup>



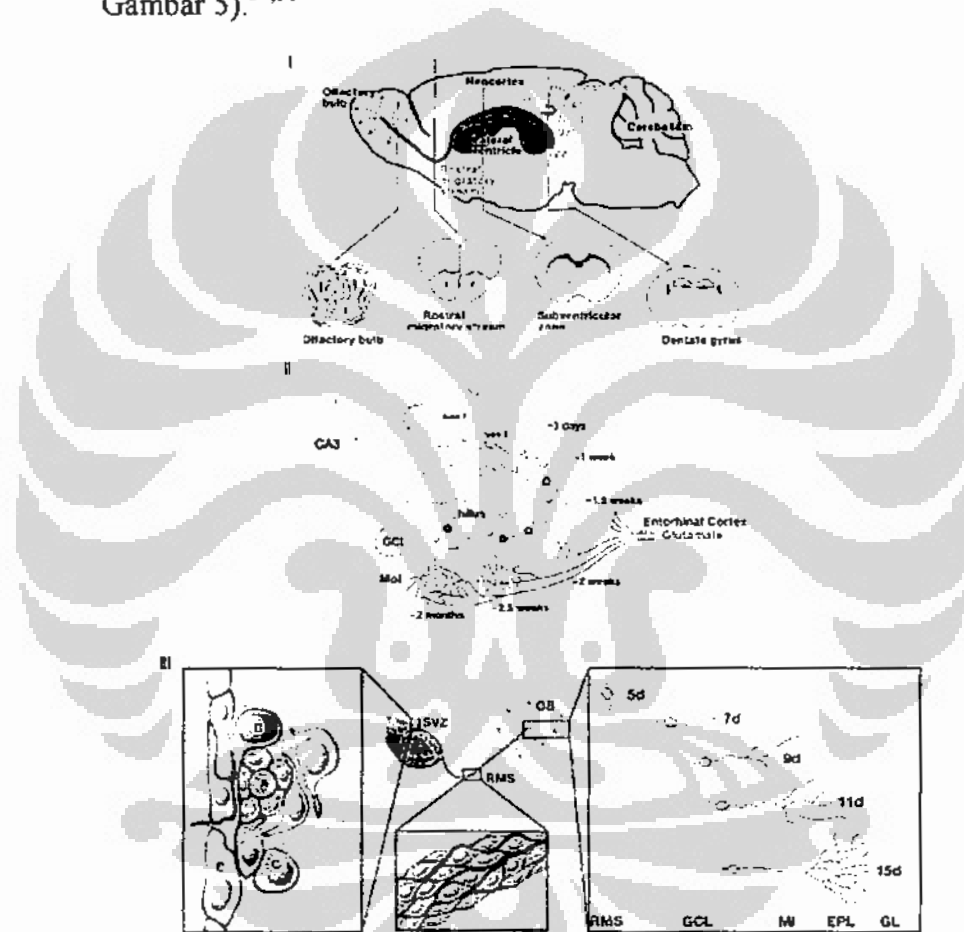
Gambar 4. Respon Inflamasi pada Stroke<sup>15</sup>

## C. NEUROGENESIS PASCA HIPOKSIA SEREBRI

### C.1. Neural Stem Cells

Pada sebagian besar otak mamalia dewasa, neuron-neuron tidak diregenerasi setelah kematian sel. Namun, terdapat sel-sel punca (*stem cells*) yang dapat memperbaharui diri pada regio-regio otak tertentu, yaitu pada zona subgranular (SGZ) girus dentata (DG) hipokampus dan zona subventrikular (SVZ) ventrikel lateral, sepanjang kehidupan,<sup>4,7-10</sup> sehingga kemampuan neurogenesis tetap ada pada otak dewasa, dan dapat distimulasi baik dengan

berbagai faktor fisiologis seperti faktor pertumbuhan, stress, olahraga, pembelajaran, dan perbaikan lingkungan, maupun dengan faktor-faktor patologis seperti hipoksia, epilepsi, dan neurodegenerasi.<sup>9,10,11</sup> Sel-sel pada SGZ bermigrasi ke lapisan sel granular hipokampus, di sana menjadi sel-sel granular dentate dan berhubungan dengan proses belajar, sedangkan sel-sel pada SVZ akan bermigrasi ke bulbus olfaktorius, di sana menjadi neuron granular dan periglomerular dan berhubungan dengan proses penghidu (lihat Gambar 5).<sup>30,31</sup>



Gambar 5. Neurogenesis pada SVZ (I, III) dan DG (I, II)<sup>30</sup>

SVZ mengandung populasi sel yang heterogen:<sup>4</sup>

- Sel tipe A: Neuroblast yang membelah relatif sering
- Sel tipe B: Astrosit yang membentuk perbatasan glial antara neuroblast yang bermigrasi dengan striatum (B2), dan antara neuroblast yang bermigrasi dengan sel ependim (B1). Sel tipe B2 merupakan *stem cell* yang relatif tidak aktif.
- Sel tipe C: Sel yang paling aktif berproliferasi

Pada SGZ, terdapat 2 tipe sel progenitor neural:<sup>30, 32</sup>

- Sel tipe 1 (atau sel tipe B): menunjukkan sifat elektrofisiologis seperti astrosit, memiliki prosesus radial yang merentang sepanjang lapisan sel granular dan bercabang-cabang pada lapisan molekular dalam.
- Sel tipe 2: sel progenitor yang tingkat proliferasinya tinggi, prosesusnya pendek.

Hipoksia global menginduksi neurogenesis pada DG; sedangkan hipoksia fokal juga meningkatkan jumlah neuron-neuron baru pada SVZ sisi yang iskemik. *Stroke* secara selektif meningkatkan jumlah sel tipe A dan C. Sel tipe B diduga berperan sebagai *neural stem cells* (NSC).<sup>4</sup> Suatu sel dapat dikatakan sebagai NSC bila memiliki ciri-ciri:<sup>30</sup>

- Sel-sel pre-diferensiasi: memiliki potensi untuk membelah, belum dalam tahap akhir diferensiasi, dan dapat terus membelah sepanjang hidup
- Dapat memperbaharui diri: dapat membelah untuk membentuk salinan multipel dari dirinya sendiri
- Multipotensial: memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi sebagai respon terhadap sinyal yang berbeda-beda menjadi berbagai garis keturunan (*lineage*) yang berkomitmen (*committed*)

NSC dewasa adalah sel-sel pada sistem saraf dewasa dengan ciri-ciri NSC, sehingga dapat memperbaharui diri dan berdiferensiasi menjadi semua tipe sel neural, termasuk neuron, astrosit, dan oligodendrosit.<sup>30</sup>

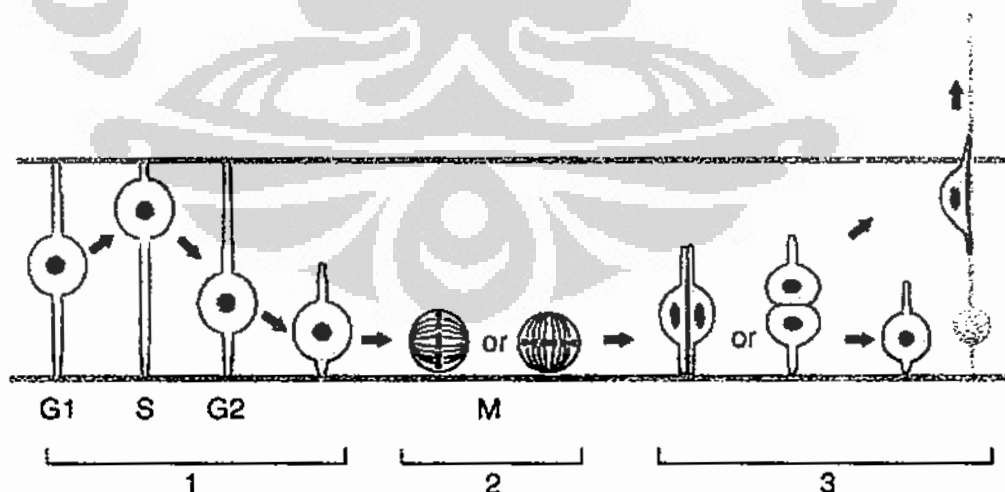
## C.2. Proliferasi Neuronal

Pada neurogenesis embrionik, replikasi sel-sel DNA terjadi di segmen luar (basal) zona ventrikular (VZ), kemudian bergerak ke daerah apikal VZ untuk bermitosis menuju permukaan ventrikular.<sup>4</sup> Sel mengalami fase-fase proliferasi dengan gerakan yang khas, sehingga sel mempunyai lima posisi (lihat Gambar 6):<sup>33</sup>

- Posisi 1 : sel pada zona ventrikular menjulurkan sebuah prosesus yang menjangkau ke arah pia.
- Posisi 2 : Nukleus sel bermigrasi ke atas dari permukaan ventrikular ke arah permukaan pia, DNA sel direplikasi.

- Posisi 3 : Nukleus yang telah mengandung dua instruksi genetik yang sama persis kembali ke permukaan ventrikular.
- Posisi 4 : Sel menarik kembali tangannya dari permukaan pia.
- Posisi 5 : Sel membelah diri menjadi dua.

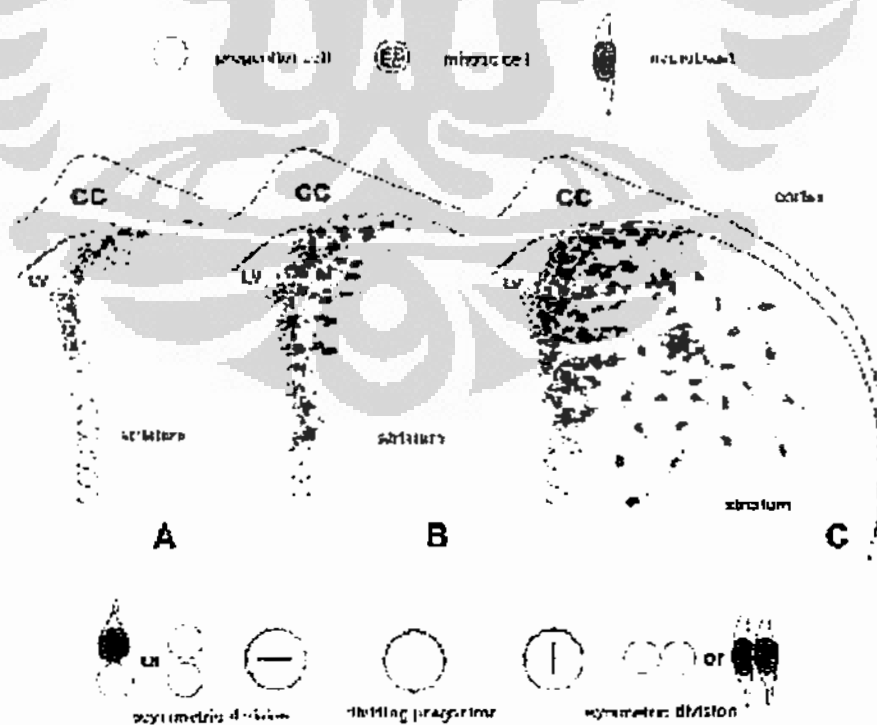
Model migrasi nuklear interkinetik (INM) ini akan menghasilkan pembelahan prekursor neuronal secara vertikal (simetris) dan horisantal (asimetris).<sup>4,33,34</sup> Kedua sel anak dari sel prekursor yang membelah diri secara simetris akan tetap berada di VZ untuk membelah diri lagi. Sel anak di basal dari sel prekursor yang membelah diri secara asimetris akan bermigrasi dari VZ ke *cortical plate*, dan sel lainnya yang berada di apikal akan tetap berada di VZ untuk membelah diri lagi.<sup>4,33</sup> Pada otak tikus dewasa, 55% sel membelah secara asimetris dan 40% secara simetris. Empat hari pasca *stroke*, proporsi sel yang membelah secara simetris menjadi 60%, sedangkan 14 hari pasca *stroke* proporsi sel yang membelah secara simetris turun menjadi 47%. Data ini kemungkinan menunjukkan terjadinya peningkatan sementara pembelahan sel secara simetris untuk menambah simpanan sel-sel progenitor yang akan meningkatkan neurogenesis.<sup>4</sup> Pada *stroke*, ekspresi gen sinyal *notch* meningkat. Protein *notch-1* akan menjadi bagian dari sel anak yang bermigrasi pada pembelahan asimetris masa embrional, sehingga pada *stroke*, jalur sinyal pada masa embrional juga terlibat.<sup>33,35</sup>



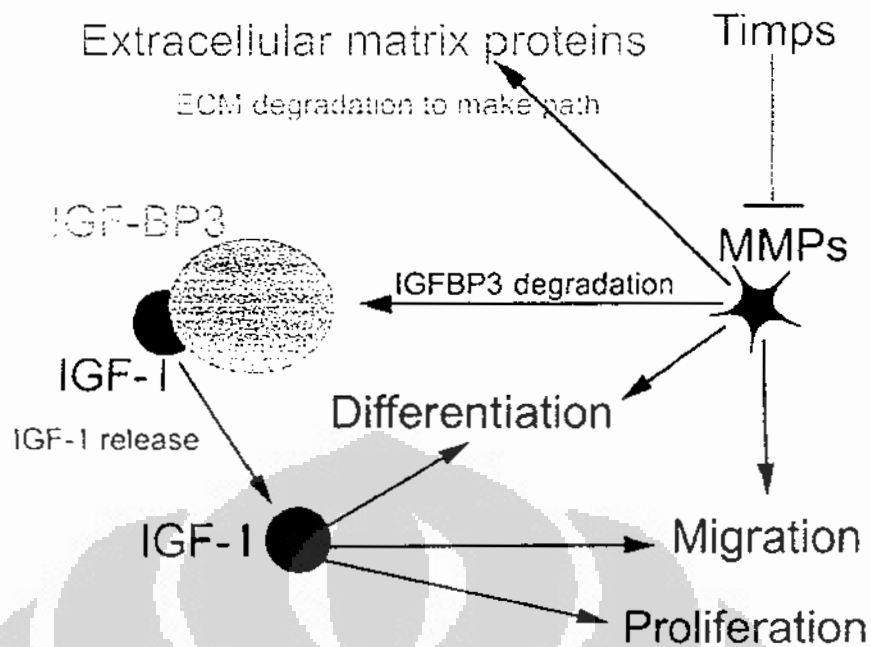
Gambar 6. Posisi Sel pada Proliferasi<sup>33</sup>

### C.3. Migrasi Neuronal

Pada SGZ, neuron-neuron baru akan bermigrasi ke lapisan sel granular hipokampus, di mana neuron-neuron tersebut akan menjadi sel-sel granular dentate. Sedangkan neuroblast pada SVZ hewan dewasa bermigrasi melalui jalur *rostral migratory stream* (RMS), sebagai rantai yang melewati terowongan yang dibentuk oleh astrosit menuju bulbus olfaktorius, di mana neuroblast akan berdiferensiasi menjadi neuron granular dan periglomerular.<sup>30</sup> Dalam keadaan normal, neuroblast yang bermigrasi diselubungi oleh prosesus astrosit, dan lokalisasi sel astrosit tipe B2 membentuk perbatasan glial antara neuroblast yang bermigrasi dengan striatum. Pasca *stroke*, neuroblast di SVZ bermigrasi ke regio penumbra dari striatum. Di regio ini neuroblast yang bermigrasi beragregasi, kemudian menyebar dan menjalani banyak proses dan percabangan (lihat Gambar 7). Migrasi neuroblast ini tidak diselubungi oleh prosesus astrosit dan perbatasan oleh sel astrosit tipe B2 terpecah oleh *stroke* sehingga memungkinkan terjadinya migrasi neuroblast ke striatum. *Stroke* juga meningkatkan kecepatan migrasi neuroblast.<sup>4</sup> Hal ini kemungkinan disebabkan oleh peningkatan ekspresi MMP2 dan *tissue inhibitor of metalloproteinase 1* (Timp1) (lihat Gambar 8).<sup>34,35</sup>



**Gambar 7. Neurogenesis Pasca Hipoksia Serebri<sup>4</sup>**

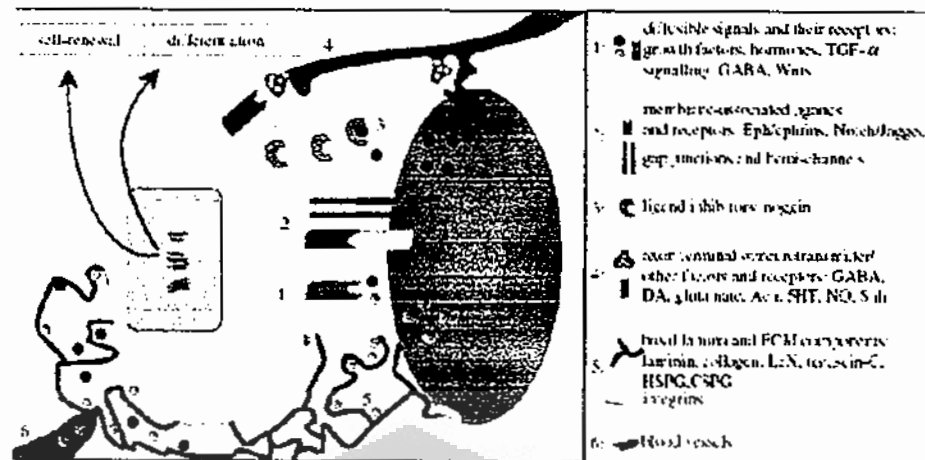


**Gambar 8. Peran MMPs pada migrasi dan diferensiasi NSC<sup>34</sup>**

#### C.4. Peran Faktor Transkripsi, Gen dan Faktor Pertumbuhan pada Neurogenesis

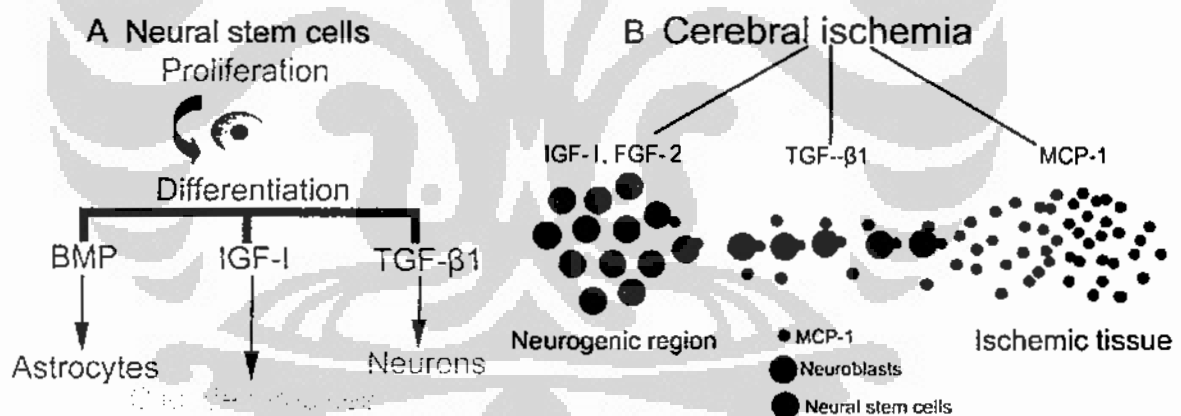
Sebagian besar neuroblast baru akan mati melalui mekanisme apoptosis dan hanya sedikit yang bertahan setelah 6 minggu pasca *stroke*. Agar neuroblast dapat bertahan, lingkungannya haruslah reseptif, menyediakan dukungan tropik dan mengarahkan sel neuroblast untuk berintegrasi dengan jaringan. Lokasi neuroblast hasil neurogenesis yang berpasangan (*coupled*) dengan angiogenesis disebut juga *neurovascular niche*, menyediakan lingkungan yang kondusif untuk neuroblast (lihat Gambar 9).<sup>4,36</sup>

Sel-sel endotel yang baru terbentuk dari proses angiogenesis akan melepaskan faktor-faktor neurogenik seperti *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF). Faktor-faktor ini memiliki sifat angiogenik dan *chemotactic* dan meningkatkan kemampuan neuroblast untuk bertahan.<sup>4,37</sup>



Gambar 9. Neurovascular Niche<sup>36</sup>

Faktor pertumbuhan berperan penting pasca hipoksia serebri dengan meningkatkan keberlangsungan hidup dan menstimulasi proliferasi NSC endogen. Seperti telah ditulis di atas, NSC dapat berdiferensiasi menjadi neuron, astrosit, atau oligodendrosit.<sup>34</sup> Faktor pertumbuhan yang berbeda akan mempengaruhi NSC untuk berdiferensiasi menjadi jenis sel yang berbeda pula (lihat Gambar 10).<sup>34</sup>



Gambar 10. Pengaruh Faktor Pertumbuhan pada Proliferasi, Migrasi, dan Diferensiasi NSC<sup>34</sup>

### C.5. Neurogenesis dan Pemulihan Fungsional

Berbagai percobaan telah membuktikan kemampuan neurogenesis otak dewasa pasca hipoksia serebri, antara lain:

- Jiang *et al*<sup>7</sup> meneliti neurogenesis pada korteks otak tikus dewasa pasca oklusi sementara arteri serebri media (MCA)
- Jin *et al*<sup>8</sup> meneliti neurogenesis pada SGZ, DG, dan SVZ rostral pasca hipoksia serebri fokal pada tikus

- Tanaka *et al*<sup>9</sup> meneliti neurogenesis pasca hipoksia global sementara pada hipokampus tikus dewasa
- Yagita *et al*<sup>10</sup> meneliti neurogenesis oleh sel-sel progenitor pada hipokampus tikus dewasa dengan hipoksia

Semua penelitian di atas menunjukkan peningkatan neurogenesis pada otak dewasa dibandingkan kontrol.

Lebih jauh lagi, neurogenesis pasca hipoksia serebri pada otak dewasa telah dibuktikan bukan hanya bersifat anatomis, namun juga fungsional, antara lain:

- Nakatomi *et al*<sup>38</sup> meneliti regenerasi neuron piramidal hipokampus tikus pasca hipoksia otak. Pada penelitian ini didapatkan sifat elektrofisiologis dari sinaps neuron hasil regenerasi berupa *field excitatory post-synaptic action potentials* (fEPSPs).
- Hou *et al*<sup>39</sup> meneliti integrasi fungsional neuron hasil regenerasi pada striatum pasca hipoksia serebri pada otak tikus dewasa. Pada penelitian ini ditunjukkan bahwa neuron-neuron baru memiliki vesikel sinaptik yang teraktivasi, dan sinaps-sinaps ini memiliki sifat elektrofisiologis.

Pada manusia, neurogenesis yang diinduksi oleh *stroke* telah dilaporkan oleh Jin *et al*<sup>11</sup> yang meneliti neurogenesis pada potongan biopsi otak penderita *stroke* iskemik (lihat Tabel 1).<sup>11</sup>

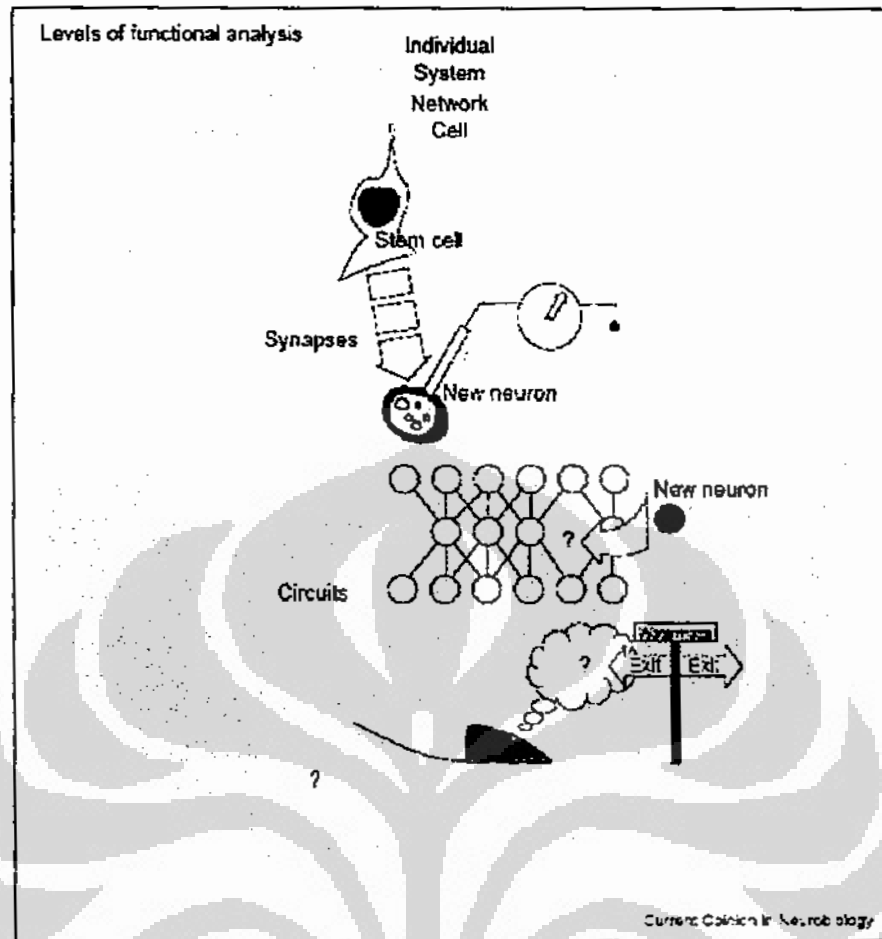
**Tabel 1. Karakteristik Klinis dan Imunohistologis Pasien *Stroke***<sup>11</sup>

Patient no.	Age, yr	Sex	Main symptoms	Duration, d	Stroke location	Ki-67(+), cells per mm <sup>2</sup> (mean ± SEM)	Ki-67/DCX(+), cells per mm <sup>2</sup> (mean ± SEM)
1	65	M	R hemianopia R hemiparesis R hemisensory loss	40	L parietal	36 ± 7	6 ± 6
2	45	M	Headache Aphasia	14	L temporo-occipital	62 ± 24	11 ± 7
3	54	F	Headache L hemiparesis	38	R parietal	109 ± 21	11 ± 3
4	66	M	L hemiparesis L hemisensory loss	42	R parietal	48 ± 10	11 ± 3
5	34	M	Headache	5	R occipital	11 ± 3	3 ± 3
6	74	F	R hemiparesis	32	L parietal	112 ± 12	17 ± 8

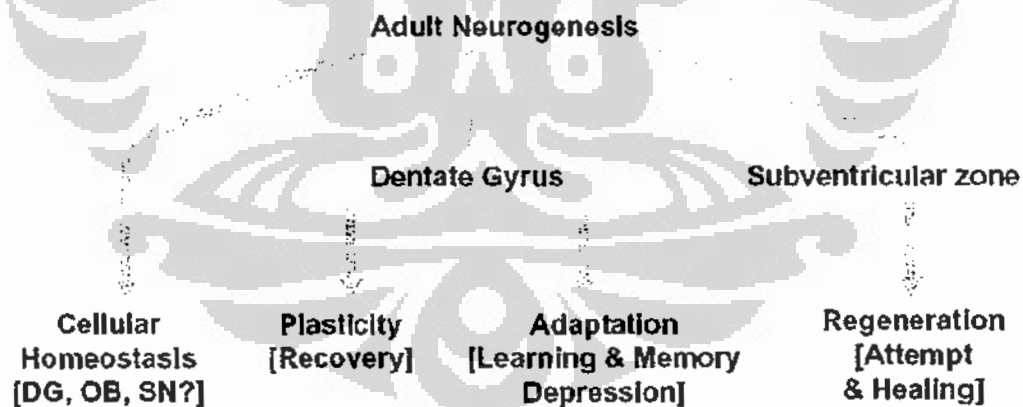
Cells were counted in three × 400 fields from the cortical ischemic penumbra, per patient. Duration is the time from onset of symptoms to biopsy. M, male; F, female; R, right; L, left.

Tujuan akhir dari neurogenesis adalah peningkatan fungsi neurologis. Fungsi pada neurogenesis dewasa dapat dipandang pada 3 tingkat: selular, jaringan, dan sistem (lihat Gambar 11).<sup>32</sup> Pada akhirnya, sel-sel baru ini dapat berperan pada proses homeostasis, plastisitas, adaptasi, dan regenerasi (lihat Gambar 12).<sup>40</sup>





Gambar 11. Tingkatan Fungsi Neuron<sup>32</sup>



Gambar 12. Fungsi Neurogenesis<sup>40</sup>

#### D. TERAPI NEURORESTORATIF PASCA HIPOKSIDA SEREBRI

Walaupun terdapat peningkatan neurogenesis secara alamiah pasca hipoksia serebri, namun peningkatan ini tidak sebanding dengan kerusakan yang telah terjadi.<sup>12</sup> Hanya 0,2% neuron baru yang dibentuk dari keseluruhan jumlah neuron yang mati pada hipoksia serebri.<sup>40</sup>

Seperti telah ditulis di atas, saat ini terapi utama untuk *stroke* adalah pemberian trombolitik dengan *recombinant tissue-type plasminogen activator* (rt-PA),<sup>1</sup> namun hanya 2% penderita *stroke* yang dapat diterapi dengan rt-PA.<sup>4,6</sup> Terapi neuroprotektif juga tidak memberikan hasil yang memuaskan. Kurang efektifnya terapi-terapi di atas memberikan ruang untuk pengembangan terapi neurorestoratif sebagai terapi kronik *stroke*. Pada bidang ini, terapi genetik dan selular memiliki potensial untuk meningkatkan hasil terapi fase penyembuhan pasca hipoksia serebri. Sayangnya, sampai saat ini, sebagian besar terapi ini masih dalam tahap uji pre-klinis.<sup>19</sup>

#### D.1. Terapi Genetik

Terdapat dalil bahwa patofisiologi molekuler *stroke* dapat diubah dengan ekspresi gen-gen kunci pada jangka waktu, populasi sel, dan jumlah yang tepat sehingga respon alami terhadap kerusakan hipoksik di otak juga berubah. Terapi genetik berfokus dalam mekanisme penghantaran gen, ekspresi transgen pada daerah iskemik, dan apakah produk gen tersebut dapat mengubah nasib sebuah neuron yang akan mengalami kematian sel (proteksi) atau meningkatkan perkembangan neuron-neuron baru (restoratif).<sup>19</sup>

Beberapa penelitian terapi genetik yang telah dilakukan dengan tujuan neuroproteksi memiliki beberapa landasan strategi, antara lain (lihat Tabel 2):<sup>19,41</sup>

##### 1. Perbaikan penyediaan energi

Meningkatnya akses sel terhadap ketersediaan sumber energi ekstraselular dapat meningkatkan jumlah ATP untuk fungsi selular. Ekspresi berlebihan (*overexpression*) dari transpoter glukosa Glut-1 oleh vektor ampikon virus herpes simpleks atau adenovirus telah menunjukkan neuroproteksi terhadap hipoksia dan eksitotoksisitas *in vitro*. Secara *in vivo*, neuroproteksi neuron striatal terjadi bila vektor diinjeksikan intrastriatal sebelum *stroke*.

##### 2. Pengurangan ketersediaan kalsium intraseluler

Menurunnya ketersediaan kalsium intraseluler dapat melawan efek kalsium yang menyebabkan kematian sel pasca *stroke*. Calbindin D28K berperan sebagai dapar kalsium intraseluler, dan transfer gen calbindin dengan vektor virus herpes melalui injeksi intraserebral sebelum *stroke*

telah menunjukkan hasil berupa meningkatnya ketahanan hidup neuron-neuron striatal.

### 3. Penghapusan efek radikal bebas/*reactive oxygen species* (ROS)

Ekspresi berlebihan dari HSP 70 telah terbukti melindungi sel dari berbagai kondisi yang dapat merusak sel, termasuk hipoksia serebri. Penghantaran HSP 70 dilakukan melalui injeksi intrastriatal sebelum *stroke* dengan vektor virus herpes.

### 4. Pengurangan sinyal sitokin pro-inflamasi

Usaha pengendalian respon inflamasi pada hipoksia serebri dilakukan dengan ekspresi berlebihan dari antagonis reseptor interleukin-1 yang diadministrasikan ke ventrikel sebelum 5 hari *stroke* dengan vektor adenovirus.

### 5. Inhibisi mediator apoptosis

Intervensi jalur apoptosis dilakukan dengan penghantaran *neuronal apoptosis-inhibitory protein* dan Bcl-2 yang akan menghambat pelepasan cytc melalui injeksi langsung ke striatum 30 menit pasca *stroke* dengan vektor virus herpes.

Terapi genetik untuk tujuan neurorestoratif belum berkembang sepesat terapi genetik neuroproteksi. Namun, terapi genetik neurorestoratif menyimpan banyak potensial untuk memperbaiki hasil terapi *stroke* pada tahap penyembuhan. Sejumlah faktor pertumbuhan yang penting untuk pertumbuhan neuron telah diidentifikasi, di antaranya *transforming growth factor-β* (TGF-β), *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), *hepatocyte growth factor* (HGF), bFGF, dan *epidermal growth factor* (EGF).<sup>19,41,42,43</sup>

**Tabel 2. Beberapa Penelitian Terapi Genetik Pasca *Stroke* Iskemik<sup>41</sup>**

Brain ischemia	Gene	Location	Author
Calbindin D28K	Herpes simplex virus	Striatum	Yenari <i>et al.</i> (2001a, b)
Glucose transporter	Plasmid	Striatum	Lawrence <i>et al.</i> (1996)
HSP72	Herpes simplex virus	Striatum	Hoehn <i>et al.</i> (2001)
Interleukin-1 receptor antagonist	Adenovirus	Lateral ventricle	Yang <i>et al.</i> (1997)
Interleukin-10	Adenovirus	Lateral ventricle	Ooboshi <i>et al.</i> (2002)
Transforming growth factor-β1	Adenovirus	Lateral ventricle	Pang <i>et al.</i> (2001)
Glial cell line-derived neurotrophic factor	Adenovirus	Cortex	Kitagawa <i>et al.</i> (1999)
Hepatocyte growth factor	HVJ liposome complex	Caudate putamen	Hayashi <i>et al.</i> (2001)
Bcl-2	Adeno-associated virus	Hippocampus	Shimazaki <i>et al.</i> (2000)
Neuronal apoptosis inhibitory protein	Adenovirus	Hippocampus	Xu <i>et al.</i> (1997)
Cyclooxygenase-1	Adenovirus	Lateral ventricle	Liu <i>et al.</i> (2002)
Redox-inducible antioxidant protein	Adenovirus	Caudate putamen	Yang <i>et al.</i> (2001)

Walaupun terapi genetik memiliki potensial yang besar, namun terdapat beberapa keterbatasan pada metode ini, antara lain:<sup>19</sup>

- Terdapatnya selisih waktu antara administrasi gen dengan ekspresinya setidaknya selama 12-24 jam karena diperlukannya waktu untuk ekspresi sebuah gen.
- Risiko prosedural berkaitan dengan metode administrasi gen dengan injeksi langsung seperti infeksi, perdarahan, dan respon imun berkaitan dengan vektor.

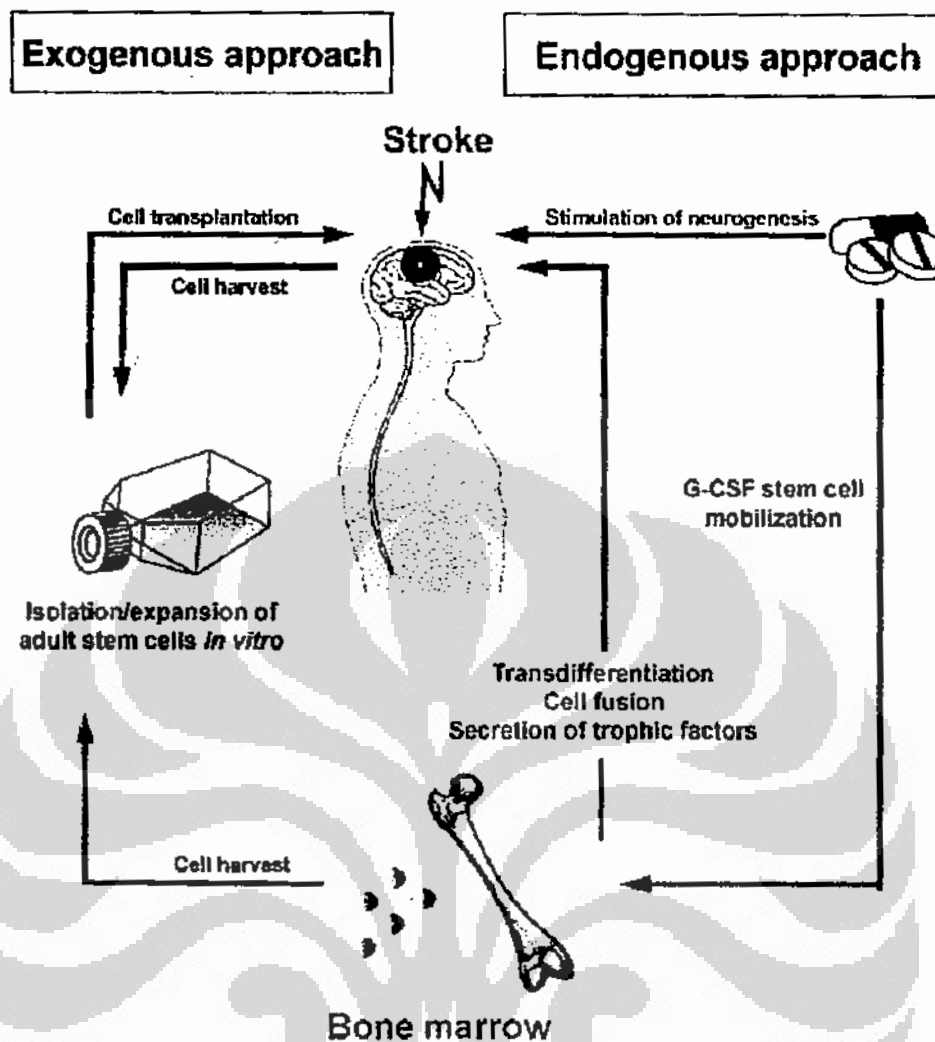
## D.2. Terapi Selular

Dasar dari terapi selular adalah mendukung neuron-neuron yang masih berpartisipasi dalam proses pensinyalan neural namun berisiko terhadap kematian sel pasca *stroke* (suportif) atau merekonstruksi sirkuit neural yang hilang dengan administrasi sumber sel yang dapat berintegrasi dan berpartisipasi dalam sirkuit neural yang fungsional (regeneratif).<sup>19</sup> Karena sumber sel untuk terapi ini berasal dari sel punca/*stem cell*, pada beberapa literature terapi selular disebut juga dengan terapi sel punca/*stem cell therapy*.

Berdasarkan sumber selnya, pendekatan terapi selular diklasifikasikan menjadi terapi selular eksogen yang sumber selnya berasal bukan dari pasien dan terapi endogen yang sumber selnya berasal dari pasien sendiri (lihat Tabel 3 dan Gambar 13).<sup>18,19,44</sup> Dari segi tujuan dan metode, tujuan dari terapi selular endogen adalah mengeksploitasi populasi sel punca dewasa yang sudah ada secara fisiologis di SSP maupun di sistem hematopoietik. Sedangkan pada terapi selular eksogen, sel punca atau sel prekursor dari SSP atau sistem hematopoietik diadministrasikan secara lokal atau sistemik setelah purifikasi dan propagasi pada kultur.<sup>18</sup>

**Tabel 3. Berbagai Sumber Sel untuk Terapi Selular *Stroke*<sup>44</sup>**

Cell Type	Description	Potential Advantages	Potential Disadvantages
NT2N LGE	Immortalized cell line Fetal pig	Unlimited supply long-term safety Abundant supply	Lineage restricted Lineage restricted P.g infections
BMSC	Bone marrow	Can be taken from patient	Painful extraction Intravenous approach may affect other organs
HUCBC	Umbilical cord blood cells	Alternative source to bone marrow	Incomplete studies
Adipose NSC	Stromal stem cells Neural stem cells	Abundant source Extraction from the patient	Incomplete studies Incomplete studies



Gambar 13. Pendekatan Terapi Selular pada Stroke<sup>18</sup>

#### D.2.1. Terapi Selular Eksogen

Sumber sel eksogen dapat berasal dari.<sup>12,18,19,44</sup>

- *Immortalized cell line*

Telah banyak penelitian menggunakan *cell lines* yang dianggap memiliki kapasitas yang baik untuk berdiferensiasi menjadi garis keturunan neural/*neural lineage* (neuron, astrosit, dan oligodendrosit). Beberapa dari *cell lines* tersebut adalah MHP36, C17.2, NT2N (*neuroteratocarcinoma*).

Keterbatasan penggunaan *immortalized cell line* antara lain adalah sifatnya yang dapat menimbulkan kanker/*cancerous* (pada NT2N) dan terbatasnya garis keturunan yang dapat dihasilkan.

- Xenotransplatasi sel saraf fetus babi

Sel-sel *lateral ganglionic eminence* (LGE) fetus babi dari striatum primordial yang diinjeksikan ke striatum dan korteks tikus setelah infark serebri menunjukkan ketahanan hidup *graft* >80% 12 minggu setelah prosedur, dan sel-sel donor berdiferensiasi menjadi sel-sel neural, menunjukkan pembentukan sinaps/sinaptogenesis, dan mengekspresikan penanda asam gamma-aminobutirat (GABA). Perbaikan fungsional juga terjadi pada tikus-tikus ini.

Keterbatasan penggunaan xenotransplatasi sel saraf fetus babi antara lain adalah reaksi imunologik *host* terhadap *graft* yang disebabkan oleh glikoprotein *1,2-galactosyl-terminated* yang diekspresikan oleh sel saraf fetus babi yang akan mengaktifkan sistem komplemen *host*, kemungkinan transmisi *porcine endogenous retrovirus* (PERV) dari babi ke manusia, dan terbatasnya garis keturunan yang dapat dihasilkan.

- Sel punca embrionik

Sel-sel ini diperoleh dari *cell line* sel punca embrionik. NSC dari *cell line* ini telah berhasil diisolasi dan diekspansi *in vitro* sebagai *neurosphere*, kemudian ditransplantasikan ke ventrikel tikus yang sudah tua. Dalam waktu 1 bulan, sel-sel ini telah bermigrasi ke korteks dan hipokampus ipsilateral maupun kontralateral, dan menunjukkan diferensiasi neuronal. Tes Morris *water maze* juga menunjukkan peningkatan memori spasial pada binatang yang diterapi.

Keterbatasan penggunaan sel punca embrionik antara lain adalah permasalahan etik yang sampai saat ini menjadi perdebatan.

- Progenitor sel saraf fetus manusia

Sel-sel hipokampus dari fetus manusia telah berhasil di-*graft* dan bertahan hidup pada model hipoksia tikus. Jaringan fetus manusia yang diimplantasikan pada tikus 3 minggu pasca *stroke* dapat mengembangkan hubungan aferen dan eferen dengan sel *host*.

Keterbatasan penggunaan sel punca embrionik antara lain adalah permasalahan etik yang sampai saat ini menjadi perdebatan.

- Sel punca yang berasal dari darah tali pusat

Sel punca yang berasal dari darah tali pusat/*human umbilical cord blood cells* (HUCBCs) *in vitro* telah berhasil berdiferensiasi menjadi sel neuron dan glia setelah penambahan asam retinoat ke medium kultur. Sebuah penelitian menunjukkan HUCBCs yang diinjeksikan ke ekor tikus 1-7 hari pasca *stroke* dapat bermigrasi ke lokasi lesi dan berdiferensiasi menjadi sel neuronal dan glia. Secara fungsi dan perilaku juga terjadi perbaikan pada tikus-tikus ini.

#### D.2.2. Terapi Selular Endogen

Sumber sel endogen dapat berasal dari:<sup>18,19,44</sup>

- NSC manusia dewasa/*adult-derived NSC*

Sel-sel SVZ dan hipokampus dari otak manusia dewasa dapat diekspansikan secara *in vitro* seperti *neurosphere* dan dapat berdiferensiasi menjadi ketiga garis keturunan neuronal. Pada penelitian lain, bulbus olfaktorius manusia dari spesimen pembedahan dipanen untuk mendapatkan prekursor neural, yang kemudian diekspansikan secara *in vitro* seperti *neurosphere*, dan dapat berdiferensiasi menjadi ketiga garis keturunan neuronal.

- Sel punca hematopoietik

Sel punca hematopoietik dapat bersumber dari sum-sum tulang, darah tali pusat, maupun sel darah tepi (sel-sel CD34+).

Sum-sum tulang mengandung sel punca hematopoietik dan non-hematopoietik (mesenkim). Berbagai penelitian telah membuktikan bahwa sel punca hematopoietik dapat bermigrasi dan mengekspresikan penanda fenotipik berbagai sel dari jaringan terdiferensiasi, termasuk otak. Sayangnya, frekuensi transdiferensiasi sel punca hematopoietik menjadi neuron sangatlah rendah. Meskipun begitu, penggunaan sel punca sum-sum tulang dapat berkontribusi secara tidak langsung terhadap

regenerasi SSP karena sel punca ini berfungsi sebagai sumber sel mikroglia dan endotel yang beregenerasi pasca *stroke*, yang dapat menjadi vehikulum terapi genetik pasca infark serebri. Meskipun begitu, sebuah penelitian yang menilai kemungkinan aplikasi implantasi sel punca dari sumsum tulang secara langsung pasca *stroke* melaporkan perbaikan fungsi neurologis pada binatang yang diterapi.

Keterbatasan penggunaan sel punca sum-sum tulang adalah prosedur ekstraksinya yang menyakitkan bagi pasien dan administrasi secara intravena dapat mempengaruhi organ lain.

Sel-sel CD34+ yang berasal dari darah tali pusat yang diadministrasikan secara intravena pasca MCAO pada tikus imunodefisiensi akan mempromosikan neovaskularisasi dan neurogenesis dengan perbaikan fungsi.

Sel CD34+ akan meningkat 3 kali lipat di darah perifer setelah hipoksia serebri akut, menunjukkan mekanisme perbaikan tubuh yang, sayangnya, tidak adekuat. Isolasi sel punca hematopoietik dari darah tepi dapat dilakukan tanpa risiko maupun efek samping, dan mobilisasinya dapat ditingkatkan dengan penambahan *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), sehingga darah tepi dapat menjadi sumber sel punca hematopoietik yang baik.

- Sel adiposa manusia

Jaringan adiposa ternyata juga mengandung sel stroma yang pluripoten. Kultur primer dari jaringan ini menghasilkan sel-sel hematopoietik, perisit, sel endotel, dan sel otot polos. Beberapa pasase dalam kultur menghasilkan sel stroma yang menghasilkan penanda molekul permukaan sel punca menseskimal, sel-sel ini juga mengekspresikan nestin menunjukkan potensi untuk berkembang menjadi garis keturunan neural. Sel stroma adiposa dapat diarahkan diferensiasinya menjadi sel neural dengan penambahan *5-azacytidine/nerve growth factor* (NGF)/BDNF/bFGF. Sebuah penelitian menunjukkan perbaikan



fungsi motorik dan somatosensorik 7 hari pasca *stroke* pada kelompok binatang yang diterapi.

### D.2.3. Mobilisasi Sel Punca Endogen

Strategi ini menggunakan sel punca dan sel progenitor endogen yang telah dimiliki pasien dan telah terbukti meningkatkan aktivitasnya pasca hipoksia serebri.<sup>19</sup> Selain lebih aman, metode ini juga tidak memerlukan suplai donor sel punca, tidak menimbulkan risiko trauma operasi dan kemungkinan penolakan *graft*. Konsep dasar dari pendekatan terapi ini adalah dengan menstimulasi lingkungan mikro (*microenvironment*) dari *host* untuk meningkatkan neurogenesis.<sup>12</sup>

Terdapat beberapa cara untuk meningkatkan mobilisasi sel punca endogen:

- Meningkatkan faktor pertumbuhan

Terdapat banyak faktor pertumbuhan yang dapat memobilisasi sel punca, salah satunya yang telah mendapat banyak perhatian adalah G-CSF, yang saat ini sudah merupakan obat yang diijinkan oleh FDA. G-CSF memobilisasi sel-sel progenitor dari sum-sum tulang menuju darah perifer (sel CD34+), di mana dari sana sel-sel ini dapat menuju ke otak dan memiliki sifat protektif dan restoratif. Pasien yang diterapi dengan G-CSF juga menunjukkan perbaikan fungsi neurologis yang lebih baik.<sup>12,45</sup>

Faktor pertumbuhan lain yang juga dapat meningkatkan neurogenesis antara lain adalah GDNF,<sup>41,46</sup> BDNF,<sup>47</sup> EGF,<sup>48</sup> dan FGF-2.<sup>49</sup>

Selain itu, VEGF juga telah terbukti meningkatkan neurogenesis melalui peningkatan angiogenesis sehingga menyediakan *neurovascular niche* yang baik untuk perkembangan sel neuron.<sup>50</sup>

- Menurunkan respon inflamasi

Aktivasi mikroglia yang diasosiasikan dengan inflamasi telah terbukti mengganggu neurogenesis basal maupun pasca hipoksia.<sup>16,17</sup> Inhibisi dari proses inflamasi akan meningkatkan

neurogenesis, yang dapat dilakukan antara lain dengan administrasi minosiklin<sup>51</sup> dan indometasin<sup>52</sup> sebagai agen antiinflamasi. Administrasi minosiklin juga akan meningkatkan fungsi neurologis berupa peningkatan kemampuan koordinasi motorik, pembelajaran dan memori spasial.<sup>51</sup>

Selain agen antiinflamasi, respon inflamasi dapat dihambat dengan penghambatan faktor transkripsi NF- $\kappa$ B yang dibutuhkan untuk proses inflamasi melalui inhibisi koaktivatornya *poly(ADP-ribose) polymerase* (PARP).<sup>53</sup>

- Stimulasi/perbaiki kondisi lingkungan sekitar  
Perbaiki kondisi lingkungan dari pasien, di antaranya interaksi sosial, aktivitas fisik volunteer dan bervariasi, pengenalan objek baru) dapat meningkatkan neurogenesis pasca hipoksia serebri.<sup>54</sup>

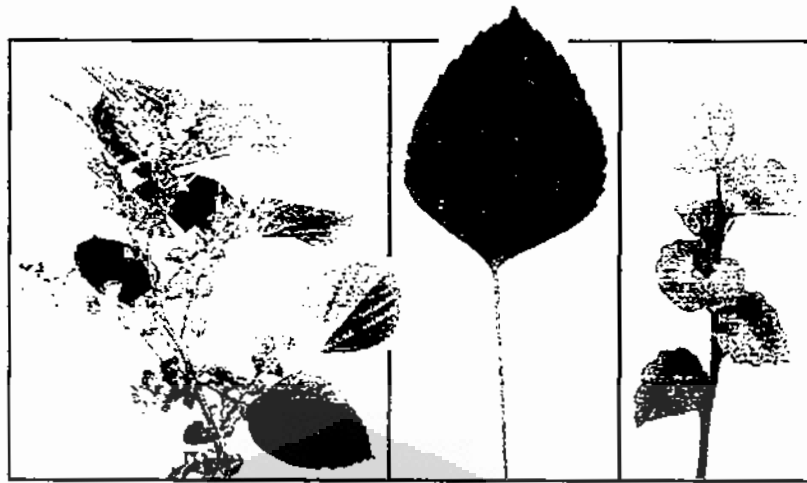
#### E. AKAR KUCING (*Acalypha indica* Linn)

Tanaman akar kucing atau *Acalypha indica* Linn merupakan tanaman perdu yang banyak tumbuh di pinggir jalan atau ladang yang tak terawat dan dapat dijumpai di setiap daerah di Indonesia dengan nama yang berbeda-beda, antara lain kucing-kucingan, bunga anting-anting, atau rumput bolong-bolong. Tanaman ini dapat tumbuh liar dengan tinggi 30-80 cm, berdaun tipis oval menyerupai bayam dengan panjang 3-6 cm, bergigi di pinggirnya, dan berbunga mirip anting-anting dengan warna hijau (lihat Gambar 14).<sup>20,55</sup>

Secara taksonomi tumbuhan, akar kucing digolongkan sebagai berikut:<sup>20</sup>

Divisi : Spermatophyta  
Subdivisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledoneae  
Famili : Euphorbiceae  
Genus : *Acalypha*

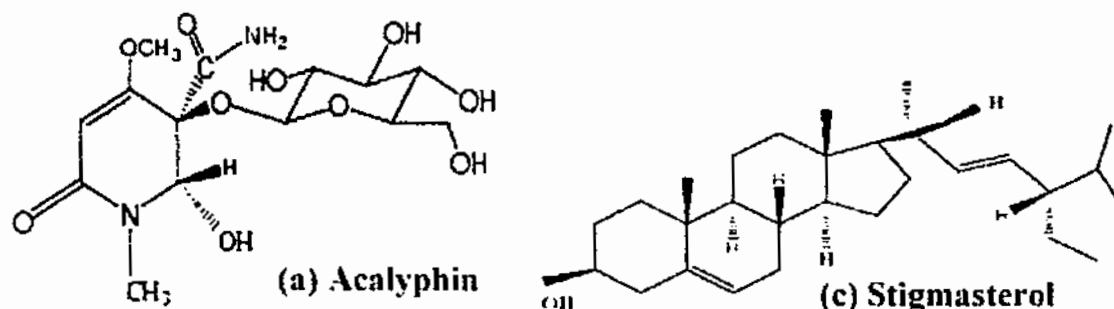
Tanaman ini dinamai akar kucing karena akarnya disenangi kucing yang sedang sakit. Beberapa saat setelah dimakan dimuntahkan kembali bersama isi perutnya, dan kucing tersebut akan tampak membaik. Atas dasar itulah pada awalnya masyarakat dengan coba-coba memanfaatkan rebusan akar kucing untuk mengobati dirinya saat menderita sakit perut. Secara tidak sengaja, ternyata rebusan akar kucing tersebut dapat memulihkan kelumpuhan saraf akibat *stroke*.<sup>20</sup>



**Gambar 14. Akar Kucing**

Secara ilmiah, beberapa manfaat lain dari tanaman ini juga telah dibuktikan, antara lain sebagai pencahar, antihelmintik, ekspektoran, emetik, antimikroba, kontrasepsi (antifertilitas),<sup>56</sup> antimalaria<sup>57</sup> dan diuretik.<sup>58</sup> Efek neuroprotektor dan neuroterapinya telah dibuktikan oleh Purwaningsih *et al* secara *eks vivo* maupun *in vivo* pada dosis 15-20 mg/mL. Purwaningsih *et al* meneliti efek neuroprotektor dan neuroterapi akar kucing pada otot katak yang diberikan pelumpuh otot, dengan aktivitas listrik otot tersebut sebagai parameter yang diukur.<sup>20</sup> Pada SSP, efek neuroterapinya telah dibuktikan oleh Suswati secara *in vivo* pada dosis 400-500 mg/kgBB. Suswati meneliti efek neuroterapi akar kucing pada otak tikus pasca hipoksia serebri, dengan jumlah sel rusak pada hipokampus sebagai parameter yang diukur.<sup>23</sup> Sebagai ekstrak air (dibuat dengan air distilasi), dosis letalnya adalah 50 mg/mL pada pemajanan selama 24 jam, dan menurun hingga 45 mg/mL pada pemajanan selama 48 jam.<sup>59</sup>

Kandungan bahan aktif yang bermanfaat dari tanaman ini masih belum dapat diidentifikasi dengan baik. Beberapa bahan kimia yang telah berhasil diidentifikasi antara lain adalah *kaempferol* (flavonoid) yang terdiri dari mauritianin, clitorin, nicotiflorin and biorobin, *beta-sitosterol*, HCN, *gamma-sitosterol*, dan Acalyphin (lihat Gambar 15).<sup>21,22,60</sup> Berdasarkan uji fitokimia ekstrak akar dari tanaman akar kucing yang dilakukan di FKUI, ditemukan alkaloid, saponin, dan tanin, dengan stigmasterol sebagai bahan aktifnya.<sup>20</sup>



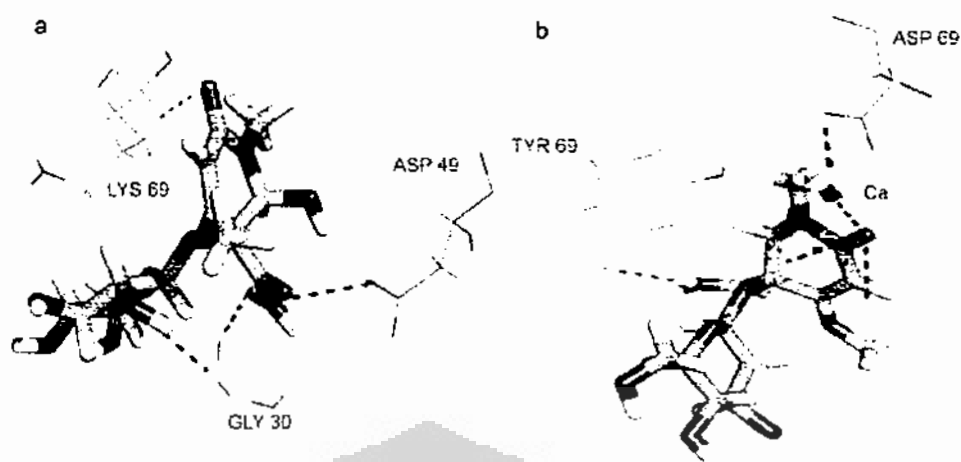
Gambar 15. Struktur Kimia Acalyphin dan Stigmasterol<sup>22</sup>

Nirmal *et al* telah membuktikan bahwa Acalyphin dan stigmasterol bersifat anti inflamasi dengan membentuk kompleks inhibitor sPLA<sub>2</sub>. Pada penelitian ini Nirmal *et al* menggunakan sPLA<sub>2</sub> dari ular berbisa *Russell* dan pankreas sapi. Acalyphin menunjukkan interaksi dengan gugus Asp-49, Lys-69, dan Gly 30 dari situs aktif sPLA<sub>2</sub> ular berbisa *Russell*, dan dengan ion Ca<sup>2+</sup> dari situs aktif sPLA<sub>2</sub> pankreas sapi. Stigmasterol berinteraksi dengan His 48 dari situs aktif sPLA<sub>2</sub> ular berbisa *Russell* (lihat Tabel 4, Gambar 16, dan Gambar 17).<sup>22</sup> Seperti telah disebutkan di atas, penurunan respon inflamasi dapat meningkatkan mobilisasi sel punca dewasa yang sudah ada secara fisiologis di sistem saraf pusat.<sup>18,19</sup>

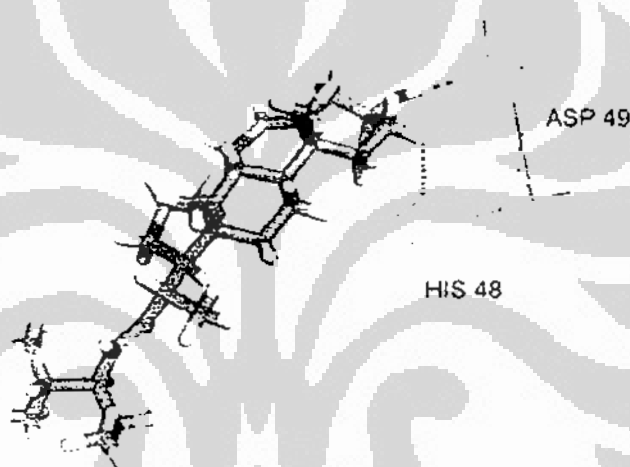
Tabel 4. Interaksi Acalyphin dan Stigmasterol pada Situs Aktif sPLA<sub>2</sub> Ular Berbisa *Russell* dan Pankreas Sapi<sup>22</sup>

Ligand with <i>Russell's</i> viper PLA <sub>2</sub> and bovine pancreatic PLA <sub>2</sub>	Interaction in the active site	Distance (Å)		
		D...A	D-E	E...A
Acalyphin-viper PLA <sub>2</sub>	Asp 49 C=O...H-N*	3.16	0.97	2.18
	Gly 30C=O...E-N*	3.30	1.09	2.63
	Lys 69 C-H...O-C*	3.17	1.09	2.51
Acalyphin-bp PLA <sub>2</sub>	Ca <sup>2+</sup> ...O=C*	2.38		
Chlorogenic acid-viper PLA <sub>2</sub>	Asp 49 C=O...H-C*	2.69	0.97	1.74
	Lys 69 N-H...O=C*	3.13	1.01	2.32
	Trp A31 C=O...H-O*	3.10	1.23	1.91
Stigmasterol-viper PLA <sub>2</sub>	Asp 49 C=O...H-O*	2.64	0.97	1.66
	His 48 N <sup>δ</sup> ...H-C*	3.49	1.09	2.94
Curcumin-viper PLA <sub>2</sub>	Asp 49C=O...H-C*	3.31	1.09	2.55
	Gly 30 C=O...H-C*	3.42	1.08	2.56
Tectoridin-viper PLA <sub>2</sub>	Asp 49 C=O...O-H*	3.49	0.96	2.62
	Lys 69N-E...H-O*	3.13	1.02	2.13
Gracilin A-Viper PLA <sub>2</sub>	Asp 49C=O...H-C*	3.25	1.09	2.64
	Trp 31C=O...E-C*	3.55	1.09	2.47
Gracilin A-bp PLA <sub>2</sub>	Ca <sup>2+</sup> ...O=C*	2.41		
	Tyr 69 H-O...O=C*	3.30		
Aplysulphurin 1-Viper PLA <sub>2</sub>	Asp 49 O...H-C*	3.69	1.09	2.88
	His 48 N <sup>δ</sup> ...H-C*	3.17	1.09	2.94
	Gly 30 C=O...H-C*	3.69	1.09	2.66
Aplysulphurin 1-bp PLA <sub>2</sub>	Ca <sup>2+</sup> ...O=C*	2.41		
	Asp 49 C=O...H-C*	2.81	1.09	2.10
	Gly 30 N-H...O=C*	2.48	1.01	2.10

\*-Ligand



**Gambar 16. Interaksi Acalyphin dengan Asam-asam Amino pada Situs Aktif sPLA<sub>2</sub> Ular Berbisa *Russell* (a) dan Pankreas Sapi (b)<sup>22</sup>**



**Gambar 17. Interaksi Stigmasterol dengan Asam-asam Amino pada Situs Aktif sPLA<sub>2</sub> Ular Berbisa *Russell*<sup>22</sup>**

#### **F. PEMERIKSAAN VIABILITAS SEL DENGAN METODE 3-[4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL]-2,5-DIPHENYL TETRAZOLIUM BROMIDE (MTT)**

Dasar dari pemeriksaan MTT adalah mengukur aktivitas sel hidup melalui aktivitas enzim dehidrogenase mitokondria. Cincin tetrazolium dari 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) akan dipecah oleh enzim dehidrogenase mitokondria sel yang hidup dan menghasilkan kristal formazan ungu MTT. Kristal formazan ini bersifat tidak larut air, namun dapat menjadi larut dengan penambahan *acidified isopropanol*. Warna larutan yang terbentuk dapat diukur secara spektrofotometri/ELISA.

Berdasarkan prinsip tersebut, semakin tinggi absorbansi dari warna larutan yang terbentuk mencerminkan semakin tingginya jumlah kristal formazan yang terbentuk dan menunjukkan semakin tingginya jumlah sel yang hidup. Viabilitas relatif sel dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{viabilitas relatif (\%)} = \frac{\text{absorbansi (perlakuan)}}{\text{absorbansi (kontrol)}} \times 100$$

Maka absorbansi sebagai hasil pemeriksaan MTT yang dikonversi menjadi persentase dapat mencerminkan viabilitas relatif sel, di mana hasil yang lebih tinggi dari 100% mencerminkan pertumbuhan sel, sedangkan hasil yang lebih rendah dari 100% mencerminkan toksisitas sel.

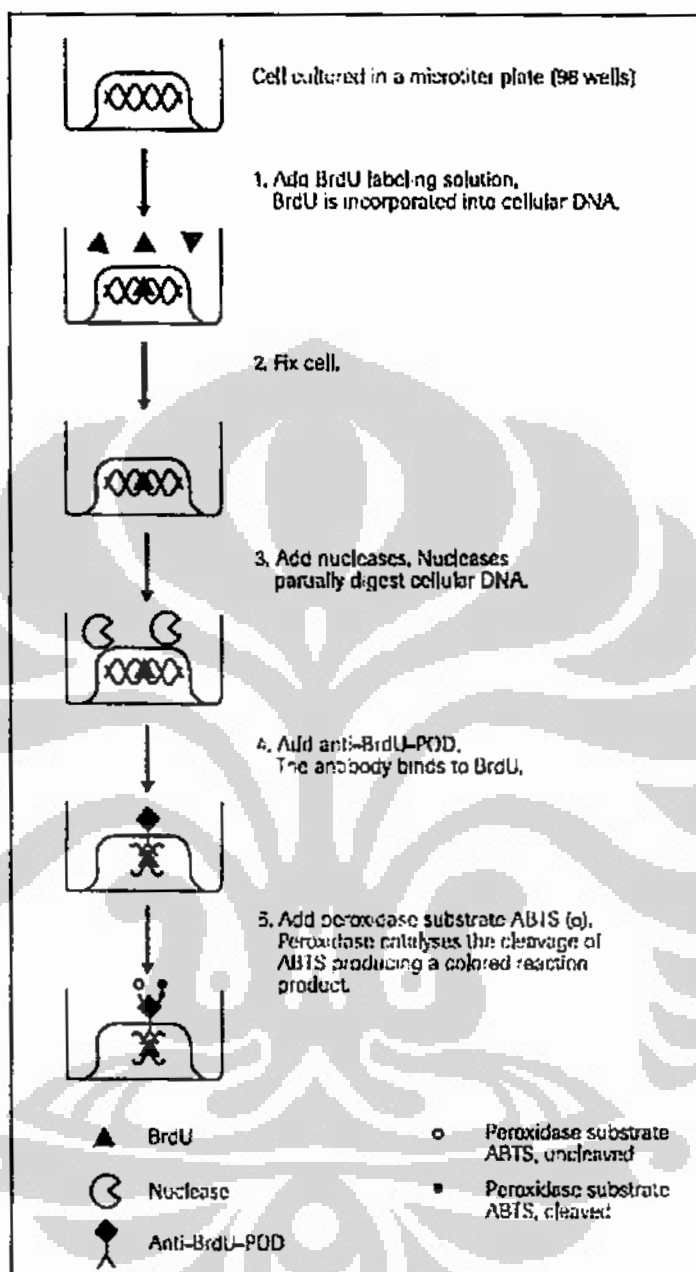
#### **G. PENGAMATAN PROLIFERASI SEL MENGGUNAKAN 5-BROMO-2'-DEOXY-URIDINE (BrdU) ASSAY**

*5-bromo-2'-deoxy-uridine* (BrdU) merupakan nukleosida sintetik yang merupakan analog timidin, sehingga dapat diinkorporasikan ke dalam DNA yang baru disintesis oleh sel yang bereplikasi. Antibodi monoklonal yang spesifik terhadap BrdU dapat digunakan untuk mendeteksi sel-sel yang aktif bereplikasi. Dengan penambahan peroksidase, akan terbentuk warna, dan warna ini dapat diperiksa dengan ELISA (lihat Gambar 18).

Berdasarkan prinsip tersebut, semakin tinggi absorbansi dari warna larutan yang terbentuk mencerminkan semakin tingginya jumlah antibodi monoklonal yang mendeteksi BrdU dan menunjukkan semakin tingginya tingkat proliferasi sel. Maka absorbansi sebagai hasil pemeriksaan BrdU dapat mencerminkan tingkat proliferasi sel.

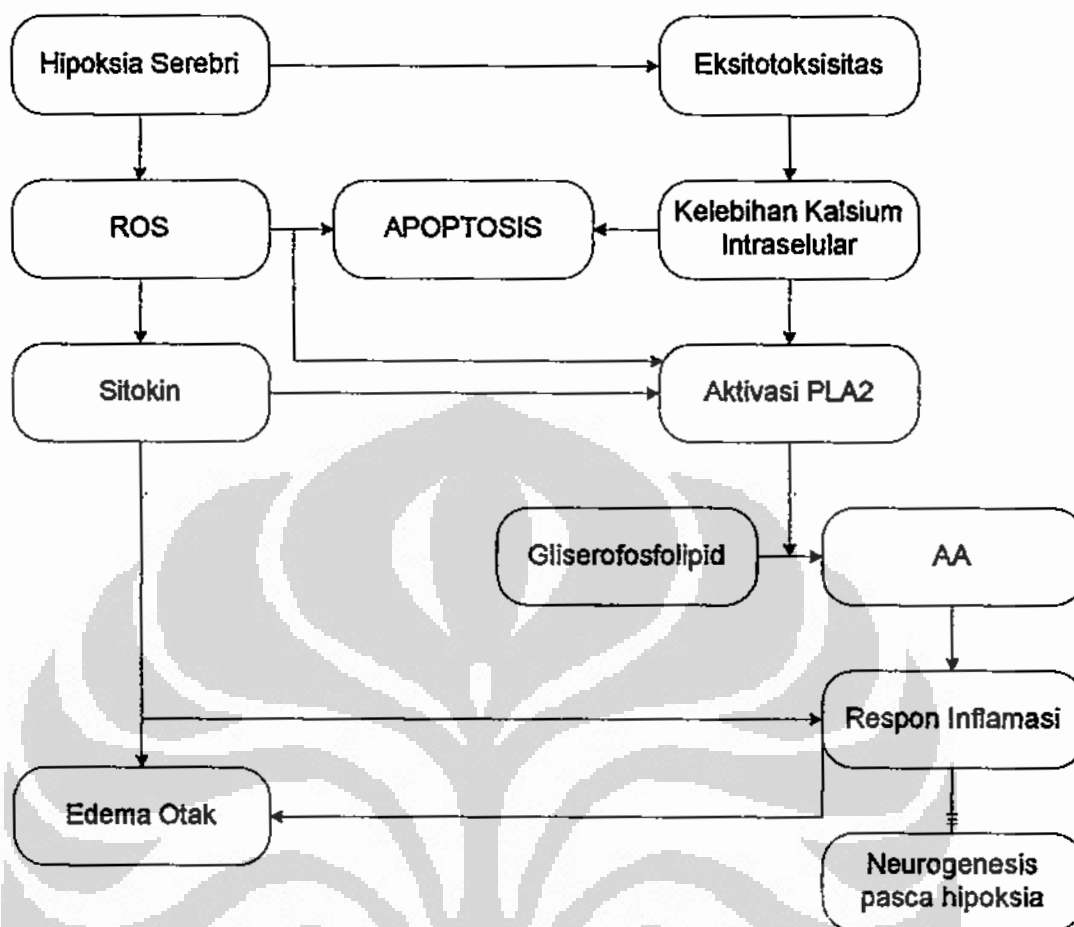
Teknik pemeriksaan dengan BrdU merupakan salah satu alternatif untuk menentukan tingkat proliferasi sel selain menggunakan zat yang dilabel secara radioaktif/radioisotop ( $[^3\text{H}]$ -timidin). Beberapa keunggulan BrdU dari teknik radioisotop antara lain adalah dari segi keamanan, karena pemeriksaan BrdU tidak menggunakan radioisotop sehingga tidak terdapat bahaya radiasi. Selain itu, hasil pemeriksaan dengan BrdU juga akurat dan sensitif, di mana hasil yang diperoleh melalui metode BrdU berkorelasi secara kuat dengan hasil yang diperoleh melalui metode ( $[^3\text{H}]$ -timidin). Dari segi waktu, kelebihan pemeriksaan BrdU adalah kecepatannya, karena penggunaan *multiwell plate* pada *ELISA reader* dapat

memproses sampel dalam jumlah besar, dan pemeriksaan ini merupakan pemeriksaan yang mudah karena mengikuti protokol pemeriksaan sel standard ELISA.

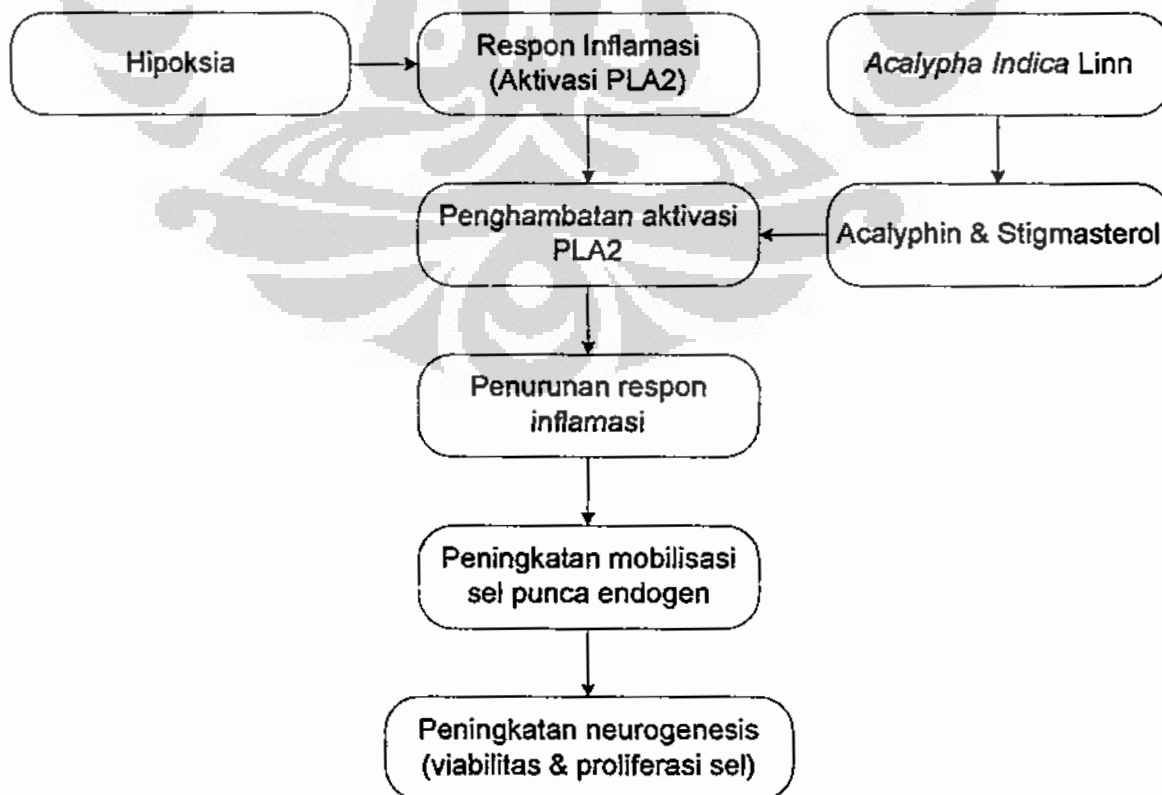


**Gambar 18. Prinsip Pemeriksaan BrdU**

## H. KERANGKA TEORI



## I. KERANGKA KONSEP





## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### A. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vitro* pada kultur jaringan sel saraf. Kultur sel saraf diperoleh dari sel saraf yang diisolasi dari jaringan hipokampus 1 ekor tikus *Sprague Dowley* dewasa berusia 9-10 minggu dengan berat 200-250 gram. Tikus dikorbankan dengan cara dislokasi leher. Menurut Purwaningsih *et al*, efek neuroprotektor dan neuroterapi ekstrak *Acalypha indica* Linn pada *neuromuscular junction* optimal pada dosis 15-20 mg/mL,<sup>20</sup> maka pada penelitian ini akan diuji pengaruh ekstrak air *Acalypha indica* Linn pada sel saraf pasca hipoksia dengan dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL. Sel saraf dipajankan terhadap hipoksia dengan cara pemberian gas 5% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> balans selama 24 jam.<sup>61</sup> Setelah pemajanan terhadap hipoksia, tiap kelompok kultur sel saraf diberikan ekstrak air *Acalypha indica* Linn dengan dosis 10 mg/mL (kelompok perlakuan A), 15 mg/mL (kelompok perlakuan B), dan 20 mg/mL (kelompok perlakuan C), dengan 1 kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan. Selanjutnya tingkat neurogenesis tiap kelompok perlakuan diukur dengan menggunakan 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) untuk viabilitas relatif sel dan dengan menggunakan 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) untuk proliferasi sel.<sup>50</sup>

#### B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dan di Laboratorium Fisiologi Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada bulan Januari 2010 hingga Maret 2010.

#### C. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

##### C.1. Alat penelitian

1. *Laminar air flow*, ESCO class II type A2 *biohazard safety cabinet* model EC2-4A
2. Mikroskop fase kontras, Nikon eclipse 80i
3. Mikroskop *inverted*, Olympus CK series
4. Inkubator, Inco 2 Memmert

5. *ELISA* microplate reader, Bio-Rad benchmark
6. Vorteks, Bio-Rad BR-2000 vortexer
7. *Waterbath*, Thermostatic water bath model YCW-01
8. Timbangan gram, OHAUS adventurer
9. Timbangan miligram, OHAUS explorer
10. Sentrifus, Sorvall legend RT
11. *Shaker*, Certomat® U
12. Cawan petri steril diameter 10 cm, Corning
13. *Multiwell plate* 24 well, IWAKI
14. *Multiwell plate* 96 well, Costar
15. Kamar hitung/hemocytometer improved Neubauer
16. *Cover slip*
17. Wadah kedap udara, Glasslock
18. Tabung eppendorf ukuran 50 mL, Biologix
19. Tabung eppendorf ukuran 15 mL, Biologix
20. Tabung eppendorf ukuran 1,5 mL
21. Mortar
22. *Minor set + scalpel blade* no. 23, Braun
23. Filter, Sartorius stedim minisart dengan pori 0,2  $\mu\text{m}$
24. *Disposable syringe* ukuran 50 mL, Terumo
25. Pipettor + pipette tips
26. *Cell strainer*, BD Falcon dengan pori 40  $\mu\text{m}$
27. *Cell scraper*, BD Falcon
28. *Cell lifter*, Biologix

## C.2. Bahan Penelitian

1. Jaringan hipokampus diambil dari otak tikus *Sprague Dowley* dewasa berusia 9-10 minggu dengan berat 200-250 gram
2. Ekstrak air *Acalypha indica* Linn (250 mg/mL), diperoleh dari Departemen Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
3. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) stok, GIBCO (1x) high glucose (+) 4,5 g/L D-glucose (+) L-glutamine (-) sodium pyruvate
4. *Fetal Bovine Serum* (FBS), GIBCO
5. Penisilin-Streptomisin (Penn-Strep), GIBCO (100x)

6. Fungizone, GIBCO (100x)
7. *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
8. Trypsin-EDTA, GIBCO 0,25% (1x)
9. *Deiodinized water*, Milli-Q
10. Poly-L-Lysine, Nacalai tesque code 28356-84
11. Gas 5% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> balans, Pelangi Gasindo
12. *Trypan blue* dengan *dilution factor* 1:10
13. MTT bubuk, SIGMA
14. NaCl 0,9% steril
15. Isopropanol
16. HCl 2N
17. *BrdU Labeling and Detection Kit III*, Roche cat. no 11 444 611 001
18. *Bovine Albumin Serum* (BSA), Bio-Rad (284 mg/mL)
19. Gliserol 50%
20. HCl 25%
21. Ethanol 100%

## D. POPULASI PENELITIAN

### D.1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah tikus *Sprague Dowley* dewasa berusia 9-10 minggu dengan berat 200-250 gram.

### D.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah jaringan hipokampus yang berasal dari tikus *Sprague Dowley* dewasa berusia 9-10 minggu dengan berat 200-250 gram.

### D.3. Besar Sampel

Penentuan besar sampel menggunakan rumus Federer:

$$(t-1)(n-1) \geq 15; \quad t=4 \text{ (jumlah perlakuan)}$$

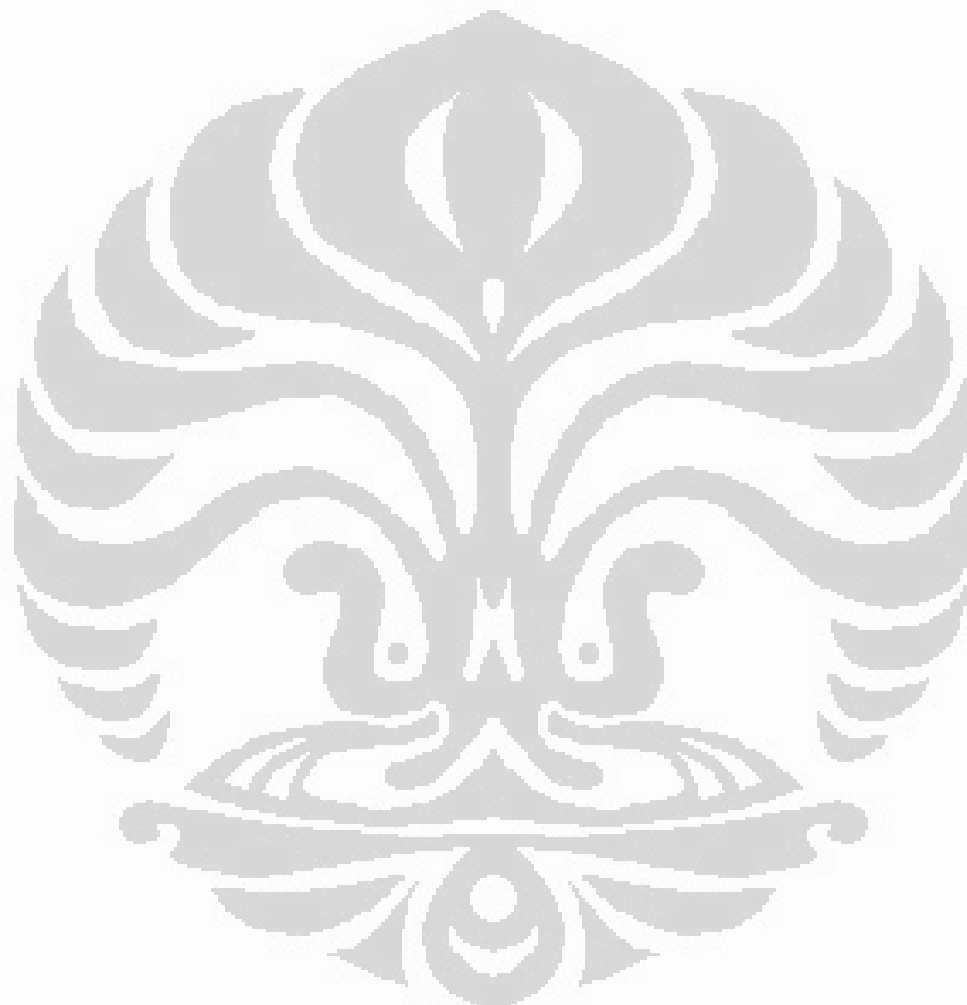
$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

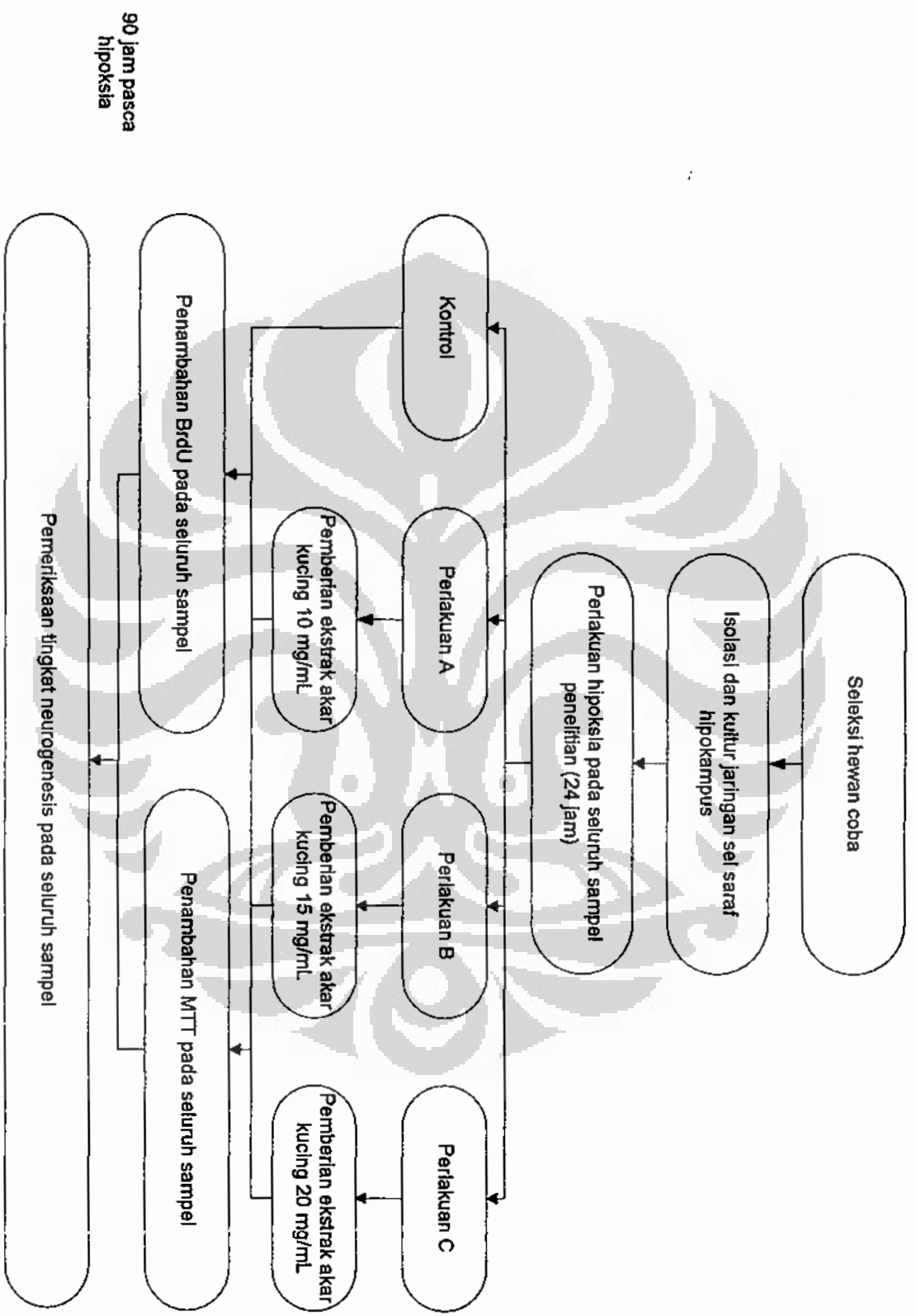
$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan dengan rumus di atas, jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 6 sampel untuk tiap kelompok (1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan), maka jumlah total sampel adalah 24 sampel. Seluruh sampel dapat diperoleh dari 1 tikus, sehingga jumlah tikus yang dibutuhkan hanyalah sebanyak 1 ekor.



### E. ALUR PENELITIAN



## F. DEFINISI OPERASIONAL

- *Acalypha indica* Linn (akar kucing) yang digunakan merupakan ekstrak air yang diperoleh dari Departemen Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Ekstrak air ini dibuat dari kadar simplisia (akar *Acalypha indica* Linn kering) sebesar 10% yang didekok 2 kali masing-masing selama 30 menit, kemudian dikeringkan dengan rotavapor dan ditimbang untuk penentuan rendemen. Dari ekstrak kering dibuat larutan koloidal dengan konsentrasi ekstrak 250 mg/mL.
- Neurogenesis adalah proses pembentukan neuron baru dari sel-sel prekursor yang meliputi beberapa tahapan yaitu proliferasi, migrasi, diferensiasi, maturasi, dan pembentukan sinaps. Parameter pengukurannya pada penelitian ini dilakukan dengan:
  - Pengukuran viabilitas relatif sel dengan MTT. MTT adalah bahan kimia larut air yang bila terpajan dengan enzim suksinil dehidrogenase mitokondria sel hidup akan diubah menjadi kristal formazan ungu yang tidak larut air. Perubahan ini tidak terjadi pada sel yang mati. Kristal formazan ungu tersebut dapat dilarutkan dengan isopropanol, dan warna pada larutan tersebut dapat diukur dengan spektrofotometri.
  - Pengukuran proliferasi sel dengan BrdU. BrdU adalah nukleosida sintetik yang merupakan analog timidin, sehingga dapat diinkorporasikan ke dalam DNA yang baru disintesis oleh sel yang bereplikasi. Antibodi yang spesifik terhadap BrdU dapat digunakan untuk mendeteksi sel-sel yang aktif bereplikasi dengan metode ELISA.

## G. VARIABEL PENELITIAN

- Variabel bebas/independen (variabel yang mempengaruhi nilai variabel terikat): kadar/dosis ekstrak *Acalypha indica* Linn
- Variabel terikat/dependen (variabel yang nilainya dipengaruhi variabel yang lain dan merupakan variabel yang akan dianalisa): viabilitas relatif sel dan tingkat proliferasi sel

Tabel 5. Variabel Penelitian

Variabel	Parameter	Cara Pengukuran	Skala	Satuan
Variabel bebas	Kadar/dosis ekstrak <i>Acalypha indica</i> Linn	-	-	mg/mL
Variabel terikat/dependen	Viabilitas relatif sel Tingkat proliferasi sel	Pemeriksaan MTT Pemeriksaan BrdU	numerik numerik	% (persen) -

## H. CARA KERJA

### 1. Hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Sprague Dowley* dewasa berusia 9-10 minggu dengan berat 200-250 gram.

### 2. Pembuatan medium DMEM komplit

Medium DMEM komplit diperoleh dengan cara mencampur 440 mL DMEM stok + 50 mL FBS 10% + 5 mL Penn-Strep + 5 mL Fungizone. Selanjutnya larutan tersebut disaring dengan filter berpori 0,2 µm.

### 3. Pembuatan larutan ekstrak air *Acalypha indica* Linn (dilakukan oleh staf Departemen Farmasi FKUI)

Tumbuhan akar kucing diambil dari Depok, Jawa Barat, kemudian dideterminasi sebagai *Acalypha indica* Linn oleh Lembaga Herbivora LIPI, Bogor. Akar dipisahkan, dicuci, kemudian dikeringkan dalam lemari pemanas bersuhu 45°C selama 3-4 hari. Sebanyak 200 gram akar kering ditimbang dan dibuat dekokta dengan penambahan akuades hingga 2000 mL dalam panci dekok (10%). Panci dekok kemudian dipanaskan di atas *waterbath* hingga suhu dalam panci mencapai 90-95°C. Pemanasan dilakukan selama 30 menit dengan sesekali diaduk. Hasil dekok didinginkan, kemudian disaring. Proses pemanasan hingga penyaringan diulangi. Hasil dekok diuapkan dalam *rotary-evaporator* di atas *waterbath* bersuhu 60°C pada tekanan 50 mBar hingga kering (tahap ini dilakukan dalam wadah yang telah ditimbang sebelumnya). Ekstrak kering ditimbang hingga diperoleh berat bersih 9 gram. Rendemen ekstrak ditentukan dengan perhitungan berikut:  $9 \text{ gram} / 200 \text{ gram} \times 100\% = 4,5\%$ . Ekstrak kering kemudian diencerkan dengan penambahan akuades hingga 36 mL sehingga diperoleh larutan koloidal dengan konsentrasi ekstrak 250 mg/mL.

#### 4. Pembuatan larutan ekstrak air *Acalypha indica* Linn + DMEM komplit

Larutan ekstrak air *Acalypha indica* Linn + DMEM komplit dengan kadar:

- 10 mg/mL: diperoleh dengan cara mencampur 24 mL DMEM komplit + 1 mL larutan ekstrak air *Acalypha indica* Linn stok (250 mg/mL)
- 15 mg/mL: diperoleh dengan cara mencampur 23,5 mL DMEM komplit + 1,5 mL larutan ekstrak air *Acalypha indica* Linn stok (250 mg/mL)
- 20 mg/mL: diperoleh dengan cara mencampur 23 mL DMEM komplit + 2 mL larutan ekstrak air *Acalypha indica* Linn stok (250 mg/mL)

Selanjutnya setiap larutan tersebut disaring dengan filter berpori 0,2  $\mu$ m.

#### 5. Isolasi sel saraf hipokampus

Hipokampus diambil dari otak tikus *Sprague Dowley* dewasa berusia 9-10 minggu dengan berat 200-250 gram dan disimpan dalam DMEM komplit yang tidak difilter. Selanjutnya, jaringan hipokampus diletakkan pada cawan petri dengan diameter 10 cm dan dibilas dengan PBS. Jaringan hipokampus kemudian dihancurkan dengan mortar hingga halus, lalu dimasukkan dalam tabung sentrifus. Tripsin-EDTA sebanyak 2 mL ditambahkan, kemudian jaringan hipokampus dihancurkan secara mekanik dengan pipet plastik steril. Selanjutnya, jaringan hipokampus diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit dan kemudian ditambahkan 0,5 mL FBS untuk menghentikan kerja tripsin. Jaringan hipokampus kemudian disentrifugasi pada 200 g selama 13 menit, setelah itu supernatan dibuang dan endapan sel saraf (pellet) yang diperoleh disuspensikan dengan 2 mL DMEM komplit.

#### 6. Penghitungan sel

Suspensi sel hasil isolasi pada cara kerja nomor 4 diencerkan 10 kali dengan cara mencampur 80  $\mu$ L *trypan blue* + 10  $\mu$ L Milli Q + 10  $\mu$ L suspensi sel. Suspensi sel yang telah diencerkan ditempelkan asal menyentuh pada ujung kamar hitung yang telah dibersihkan yang ditempelkan *cover slip*, kemudian efek kapiler akan menyebabkan suspensi sel tersebar merata pada kamar hitung. Kamar hitung diletakkan di bawah mikroskop dengan pembesaran objektif 20 kali. Jumlah sel dihitung pada 2 kali 16 kotak besar di luar area sentral. Jumlah sel dihitung dengan rumus: jumlah sel (rata-rata jumlah 2 kali 16 kotak besar)  $\times 10^4 \times$  faktor dilusi  $\times$  total volume dalam mililiter.



### 7. Kultur sel saraf

Sel saraf hasil isolasi pada cara kerja nomor 4 dikultur dalam cawan petri dengan diameter 10 cm yang masing-masing telah dilapisi poly-L-lysine sebanyak 3 mL selama 1 jam. Kultur sel saraf kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri dengan jumlah sel  $10^6$  sel pada tiap cawan. Kultur diinkubasi pada inkubator 5% CO<sub>2</sub>/95% udara dengan suhu 37°C. Medium kultur diganti setiap 72 jam. Kultur sel saraf tumbuh dengan baik pada hari ke-10.

### 8. Panen sel dan *plating*

Kultur sel saraf dipanen pada hari ke-10. Medium dari tiap cawan kultur sel dibuang, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 2-3 kali. Selanjutnya tiap cawan ditambahkan tripsin-EDTA sebanyak 3 mL, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Sisa sel dilepaskan dengan *cell scraper* atau *cell lifter*, dimasukkan pada tabung sentrifus, kemudian ditambahkan PBS hingga volume tabung sentrifus menjadi 40 mL. Tabung disentrifugasi pada 200 g selama 15 menit. Supernatan dibuang, dan pellet diresuspensi dengan 5 mL PBS. Suspensi disentrifugasi kembali pada 200 g selama 15 menit. Supernatan dibuang, dan pellet diresuspensi dengan DMEM komplet 1 mL. Jumlah sel dihitung dengan *trypan blue* menggunakan *hemocytometer* dan didistribusikan pada *multiwell plate 24 well* dan *multiwell plate 96 well* yang sebelumnya telah dilapisi dengan poly-L-lysine sebanyak 200 µL/*well* pada *multiwell plate 24 well* dan poly-L-lysine sebanyak 20 µL/*well* pada *multiwell plate 96 well* selama 1 jam. Jumlah sel pada *multiwell plate 24 well* adalah sebanyak  $5 \times 10^5$  sel/*well*, sedangkan jumlah sel pada *multiwell plate 96 well* adalah sebanyak  $10^5$  sel/*well*.

### 9. Pemajanan sel saraf pada hipoksia

*Multiwell plate 24 well* dan *multiwell plate 96 well* dimasukkan dalam wadah kedap udara dan dialirkan gas 5% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> balans selama 10 menit, kemudian wadah ditutup rapat dan dimasukkan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

### 10. Pemberian ekstrak *Acalypha indica* Linn

Setelah dipajankan pada hipoksia selama 24 jam, supernatan pada tiap *well* dibuang, dicuci dengan PBS 2-3 kali, kemudian pada kelompok:

- Kontrol: ditambahkan DMEM komplet

- Perlakuan A: ditambahkan DMEM komplit + ekstrak *Acalypha indica* Linn 10 mg/mL
- Perlakuan B: ditambahkan DMEM komplit + ekstrak *Acalypha indica* Linn 15 mg/mL
- Perlakuan C: ditambahkan DMEM komplit + ekstrak *Acalypha indica* Linn 20 mg/mL

*Plate* diinkubasi kembali pada inkubator 5% CO<sub>2</sub>/95% udara dengan suhu 37°C selama 90 jam.

#### 11. Pemeriksaan viabilitas relatif sel dengan MTT (lihat Lampiran 2)

Setelah pemberian ekstrak *Acalypha indica* Linn selama 90 jam, 800 µL medium dari tiap *well multiwell plate 24 well* dibuang sehingga pada tiap *well* akan tersisa 200 µL medium. Pada tiap *well* ditambahkan 75 µL MTT 5 mg/mL (didapatkan dari pencampuran 25 mg MTT bubuk + 5 mL NaCl 0,9% steril yang dikerjakan dalam keadaan gelap), diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam. Selanjutnya pada tiap *well* ditambahkan 750 µL *acidified isopropanol* (didapatkan dari pencampuran 49 mL isopropanol + 1 mL HCl 2N), dan diinkubasi pada suhu ruangan di atas *shaker* selama 1 jam. Dari tiap *well* diambil 200 µL larutan dan dipindahkan ke *multiwell plate 96 well*, dibuat triplo, kemudian dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 490 nm.

Viabilitas relatif sel dihitung dengan rumus:

$$\text{viabilitas relatif (\%)} = \frac{\text{absorbansi (perlakuan)}}{\text{absorbansi (kontrol)}} \times 100$$

#### 12. Pemeriksaan proliferasi sel dengan BrdU (lihat Lampiran 3)

Pemeriksaan BrdU dilakukan dengan menggunakan *BrdU Labeling and Detection Kit III* dari Roche. Setelah pemberian ekstrak *Acalypha indica* Linn selama 90 jam, tiap *well multiwell plate 96 well* ditambahkan 10 µL *BrdU labeling solution/solution I*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. *Solution I* dibuang, kemudian sel pada tiap *well* dicuci dengan 250 µL DMEM komplit sebanyak 2 kali. Sel difiksasi dengan 200 µL cairan fiksatif pada suhu -20°C selama 30 menit. Cairan fiksatif dibuang, sel dicuci dengan 250 µL DMEM komplit sebanyak 3 kali. Sel disimpan pada suhu 2-8°C *overnight*, kemudian dicuci dengan 250 µL DMEM komplit sebanyak 1 kali. Sel tiap *well* ditambahkan dengan 100 µL *nucleases working solution/solution IVa*, kemudian diinkubasi

pada waterbath dengan suhu 37°C selama 30 menit. *Solution IVa* dibuang, kemudian sel pada tiap *well* dicuci dengan 250 µL DMEM komplit sebanyak 3 kali. Sel dalam tiap *well* ditambahkan 100 µL *anti BrdU-POD, Fab fragments, working solution/solution Va*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. *Solution Va* dibuang, kemudian sel pada tiap *well* dicuci dengan 250 µL *washing buffer/solution II* sebanyak 3 kali. Sel tiap *well* ditambahkan 100 µL *peroxidase substrate/solution VIa*, kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 2-30 menit hingga sampel berubah warna menjadi hijau. Warna larutan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 405 nm dengan *reference wavelength* 490 nm.

Larutan pada pemeriksaan ini perlu disiapkan terlebih dahulu sebelum tahapan pemeriksaan ini dimulai.

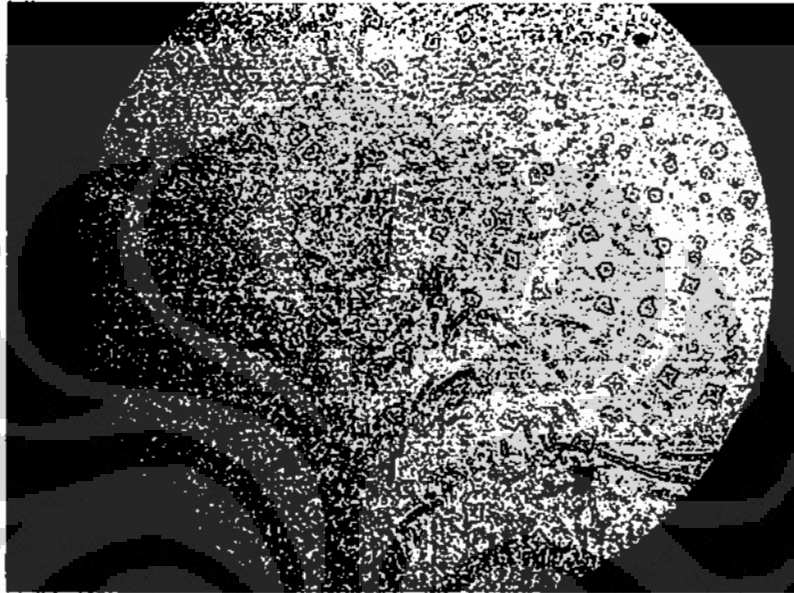
## I. ANALISIS DATA

Analisis data secara statistik dilakukan dengan menggunakan uji statistik parametrik. Sebelumnya, dilakukan uji normalitas, bila data mempunyai distribusi normal dan varians homogen, uji statistik parametrik yang akan digunakan adalah *one way ANOVA* yang dilanjutkan dengan analisis *post-hoc*, namun bila data tidak normal dan setelah ditransformasi tetap tidak normal, uji statistik non-parametrik akan digunakan. Pengolahan data akan dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS 16 (*Statistical Social Sciences 16*).

## BAB 4

### HASIL PENELITIAN

Setelah seleksi hewan coba, isolasi dan kultur sel saraf selama 10 hari, didapatkan pertumbuhan sel saraf yang baik dan diidentifikasi secara morfologis dengan mikroskop fase kontras (lihat Gambar 19).

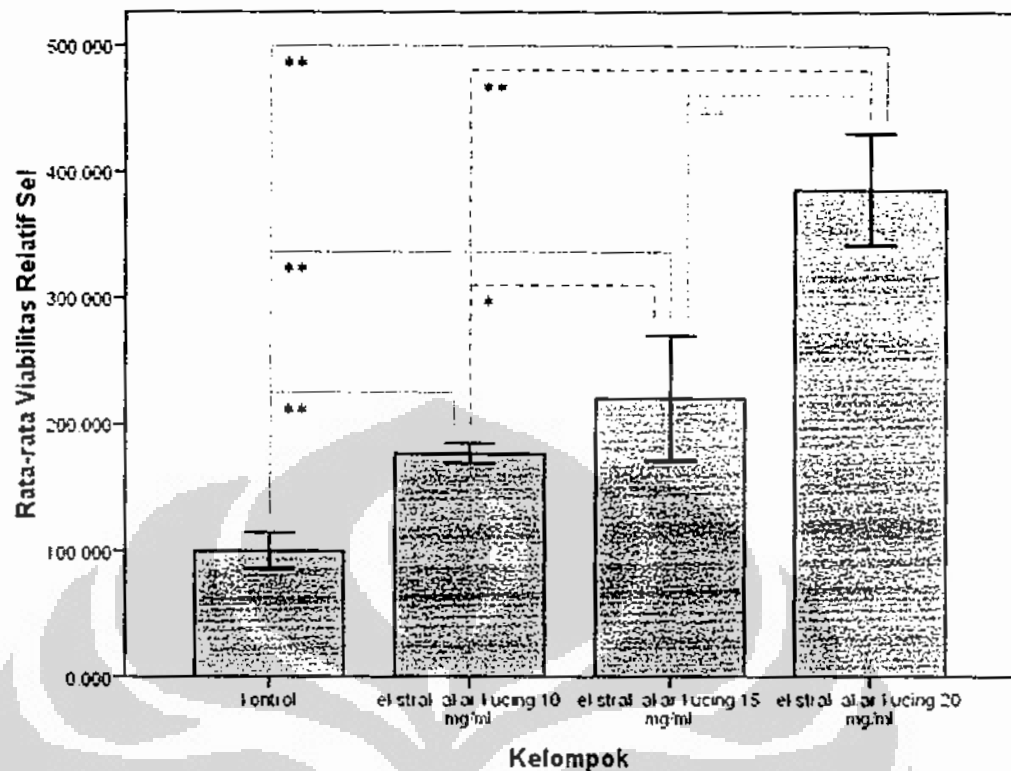


**Gambar 19. Hasil Kultur Sel Saraf Jaringan Hipokampus hari ke-10**

#### **A. VIABILITAS RELATIF SEL**

Dari hasil pemeriksaan MTT untuk mengukur viabilitas relatif sel yang dilakukan secara triplo, didapatkan rata-rata viabilitas relatif sel pada kelompok kontrol sebesar 100%; kelompok perlakuan A sebesar 176,95%; kelompok perlakuan B sebesar 220,62%; dan kelompok perlakuan C sebesar 386,02% (lihat Gambar 20 dan Tabel 6).

Berdasarkan tes normalitas Shapiro-Wilk, didapatkan nilai signifikansi tiap kelompok perlakuan  $> 0,05$ , sehingga ditarik kesimpulan bahwa distribusi data pada seluruh kelompok perlakuan normal (lihat Tabel 6).



**Gambar 20. Rata-rata Viabilitas Relatif Sel**

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

**Tabel 6. Rata-rata Viabilitas Relatif Sel**

Kelompok Perlakuan	Jumlah sampel (N)	Rata-rata viabilitas relatif sel (%)	SD	Sig. Tes Shapiro-Wilk
Kontrol	6	100	14,33	0,981
A	6	176,95	7,95	0,650
B	6	220,62	49,47	0,071
C	6	386,02	44,16	0,418

Selanjutnya dilakukan tes untuk menganalisis homogenitas varians antar kelompok, dengan hasil nilai signifikansi 0,018 ( $p < 0,05$ ), sehingga ditarik kesimpulan bahwa varians antar kelompok perlakuan tidak homogen. Oleh karena itu, dilakukan transformasi data dengan cara  $\log_{10}$  dari data asli rata-rata viabilitas relatif sel. Dari hasil transformasi ini, didapatkan distribusi data tiap kelompok normal (lihat Tabel 7), dan dari hasil tes varians homogenitas varians, didapatkan nilai signifikansi 0,069 ( $p > 0,05$ ), sehingga varians antar kelompok perlakuan homogen.

**Tabel 7. Transformasi Log<sub>10</sub> Data Rata-rata Viabilitas Relatif Sel**

Kelompok Perlakuan	Jumlah sampel (N)	Rata-rata viabilitas relatif sel	SD	Sig. Tes Shapiro-Wilk
Kontrol	6	2	0,06	0,909
A	6	2,25	0,02	0,685
B	6	2,34	0,09	0,168
C	6	2,58	0,05	0,418

Untuk mengetahui perbedaan antara keempat kelompok perlakuan dilakukan uji *one way ANOVA*. Dari hasil perhitungan didapatkan nilai F 95,181 dengan signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ), dengan demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa rata-rata jumlah sel pada keempat kelompok perlakuan berbeda secara bermakna.

Untuk mengetahui perbedaan antara kelompok yang mana yang berbeda secara bermakna, dilakukan uji *post-hoc* dengan hasil bahwa viabilitas relatif sel setiap kelompok yang diberikan perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol, viabilitas relatif sel kelompok perlakuan B lebih tinggi secara bermakna daripada viabilitas relatif sel kelompok perlakuan A, dan viabilitas relatif sel kelompok perlakuan C lebih tinggi secara bermakna daripada viabilitas relatif sel kelompok perlakuan B (lihat Tabel 8).

**Tabel 8. Hasil Uji Kemaknaan Rata-rata Viabilitas Relatif Sel Antar Kelompok Perlakuan**

	Kontrol	A	B	C
Kontrol	-	0,000**	0,000**	0,000**
A	0,000**	-	0,021*	0,000**
B	0,000**	0,021*	-	0,000**
C	0,000**	0,000**	0,000**	-

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

## B. TINGKAT PROLIFERASI SEL

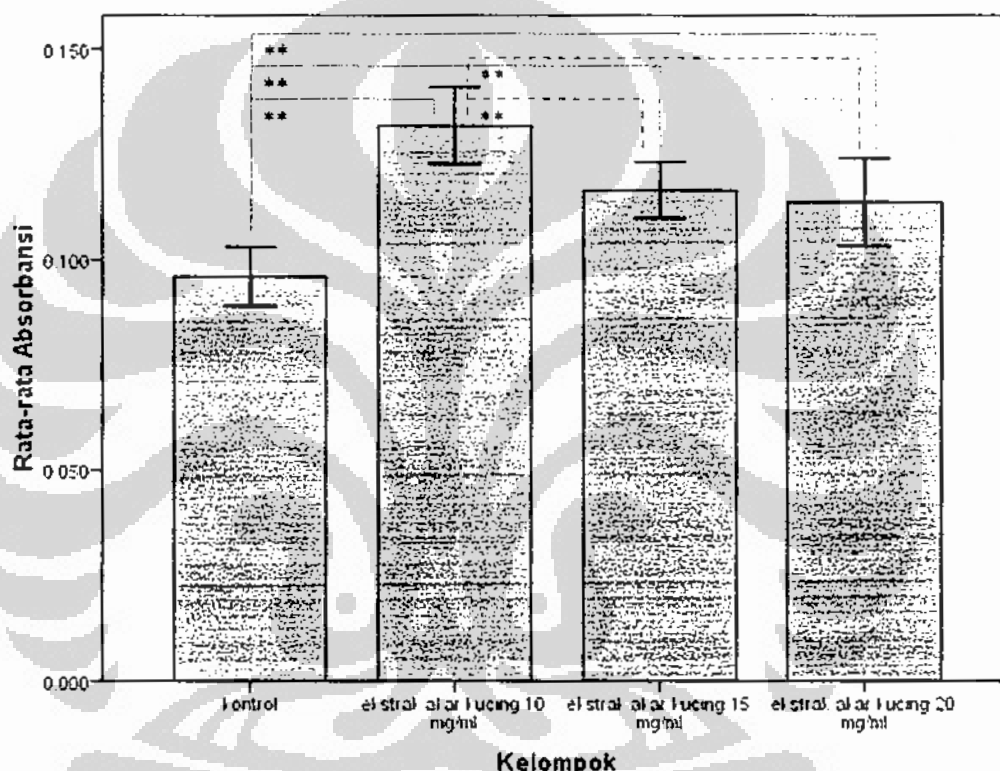
Pemeriksaan BrdU tidak akan menghasilkan nilai mutlak tingkat proliferasi sel, namun hasil dari pemeriksaan ini adalah absorbansi dari larutan tiap kelompok perlakuan, dan nilai absorbansi yang lebih tinggi menunjukkan tingkat proliferasi sel yang lebih tinggi pula.

Dari hasil pemeriksaan BrdU untuk mengukur tingkat proliferasi sel yang dilakukan secara duplo, didapatkan absorbansi pada kelompok kontrol sebesar 0,096; kelompok perlakuan A sebesar 0,132; kelompok perlakuan B sebesar 0,117; dan kelompok perlakuan C sebesar 0,114 (lihat Tabel 9 dan Gambar 21).

Berdasarkan tes normalitas Shapiro-Wilk, didapatkan nilai signifikansi tiap kelompok perlakuan  $> 0,05$ , sehingga ditarik kesimpulan bahwa distribusi data pada seluruh kelompok perlakuan normal (lihat Tabel 9).

**Tabel 9. Rata-rata Absorbansi Pemeriksaan BrdU**

Kelompok Perlakuan	Jumlah sampel (N)	Rata-rata Absorbansi	SD	Sig. Tes Shapiro-Wilk
Kontrol	6	0,096	0,007	0,919
A	6	0,132	0,009	0,417
B	6	0,117	0,007	0,055
C	6	0,114	0,010	0,310



**Gambar 21. Rata-rata Absorbansi Pemeriksaan BrdU**

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

Selanjutnya dilakukan tes untuk menganalisis homogenitas varians antar kelompok, dengan hasil nilai signifikansi 0,419 ( $p > 0,05$ ), sehingga ditarik kesimpulan bahwa varians antar kelompok perlakuan homogen.

Untuk mengetahui perbedaan antara keempat kelompok perlakuan dilakukan uji *one way ANOVA*. Dari hasil perhitungan didapatkan nilai F 18,164 dengan signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ), dengan demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa rata-rata jumlah sel pada keempat kelompok perlakuan berbeda secara bermakna.

Untuk mengetahui perbedaan antara kelompok yang mana yang berbeda secara bermakna, dilakukan uji *post-hoc* dengan hasil bahwa tingkat proliferasi sel setiap kelompok yang diberikan perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol, dengan tingkat proliferasi sel paling tinggi terlihat pada kelompok perlakuan A, kemudian menurun secara bermakna pada kelompok perlakuan B dan C, namun tidak didapatkan perbedaan tingkat proliferasi sel yang bermakna antara kelompok perlakuan B dan C (lihat Tabel 10).

**Tabel 10. Hasil Uji Kemaknaan Rata-rata Absorbansi Pemeriksaan BrdU Antar Kelompok Perlakuan**

	Kontrol	A	B	C
Kontrol	-	0,000**	0,000**	0,002**
A	0,000**	-	0,005**	0,001**
B	0,000**	0,005**	-	0,568
C	0,002**	0,001**	0,568	-

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$



## BAB 5

### PEMBAHASAN

*Acalypha Indica* Linn (akar kucing) merupakan tanaman yang telah banyak diteliti sebagai pencahar, antihelmintik, ekspektoran, emetik, antimikroba, kontrasepsi (antifertilitas),<sup>56</sup> antimalaria<sup>57</sup> dan diuretik.<sup>58</sup> Efeknya sebagai neuroprotektor dan neuroterapi juga telah diteliti oleh Purwaningsih *et al* pada otot katak yang diberikan pelumpuh otot, dengan aktivitas listrik otot tersebut sebagai parameter yang diukur.<sup>20</sup> Efeknya neuroterapinya pada SSP telah dibuktikan oleh Suswati pada otak tikus pasca hipoksia serebri, dengan jumlah sel rusak pada hipokampus sebagai parameter yang diukur.<sup>23</sup> Walaupun telah terdapat penelitian yang menganalisis efek neuroterapi ekstrak akar kucing pada SSP pasca hipoksia, namun pada penelitian tersebut parameter yang digunakan hanyalah jumlah sel rusak pada hipokampus, sehingga tingkat neurogenesisnya tidak dapat diketahui. Maka masih diperlukan penelitian untuk menilai pengaruh akar kucing terhadap neurogenesis pasca hipoksia.

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis pengaruh akar kucing terhadap neurogenesis pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia. Kultur sel yang digunakan merupakan kultur sel primer dengan harapan akan diperoleh sel saraf dengan karakteristik dan fungsi yang sama dengan karakteristik dan fungsi sel saraf *in vivo*. Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dengan tujuan menghilangkan bias dari berbagai faktor yang sulit dikontrol bila penelitian ini dilakukan secara *in vivo*. Selain itu, dengan desain penelitian *in vitro*, jumlah tikus yang dikorbankan juga jauh lebih sedikit, cukup dengan mengorbankan 1 ekor tikus dapat diperoleh 24 sampel, dan homogenitas seluruh sampel lebih terjamin.

Tikus yang dikorbankan dalam penelitian ini berusia 9-10 minggu dengan alasan pada usia ini tikus tersebut sudah dianggap dewasa, sehingga dapat merepresentasikan kelompok usia sebagian besar penderita *stroke* yang sebenarnya. Jaringan hipokampus dipilih karena pada area ini terdapat sel-sel punca neuronal/NSC terutama pada zona subgranular (SGZ) girus dentata (DG),<sup>4,7-10</sup> sehingga diharapkan neurogenesis dapat terjadi pasca hipoksia. Tikus dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan bukan dengan cara pemberian eter karena dengan dislokasi leher diharapkan jaringan hipokampus yang diperoleh akan lebih segar dan tidak terjadi hipoksia yang tidak diinginkan karena pengaruh eter.

Dosis ekstrak akar kucing yang digunakan pada penelitian ini adalah 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL. Dosis ini dipilih karena menurut Purwaningsih *et al*, efek neuroprotektor dan neuroterapi ekstrak akar kucing secara *eks vivo* mulai terlihat pada dosis 10 mg/mL, optimal pada dosis 15-20 mg/mL, dan menurun kembali pada dosis 25 mg/mL.<sup>20</sup>

Kultur sel saraf tumbuh dengan baik pada hari ke-10. Waktu yang diperlukan oleh kultur sel saraf ini lebih lama daripada penelitian oleh Kamelia yaitu selama 6 hari.<sup>62</sup> Hal ini mungkin disebabkan karena pada penelitian Kamelia, digunakan tikus muda dengan usia 2 minggu, sehingga pertumbuhan sel sarafnya masih lebih cepat dibandingkan dengan pertumbuhan sel saraf tikus dewasa. Pada penelitian ini identifikasi sel saraf dilakukan secara morfologis. Cara ini cukup dapat dipercaya, namun akan lebih baik lagi bila dilakukan identifikasi sel saraf dengan penanda neuronal/*neuronal marker* seperti *neuron-specific enolase antibodies*.<sup>63</sup> Identifikasi sel saraf secara morfologis merupakan keterbatasan pada penelitian ini, dikarenakan penentuan sel saraf dilakukan secara subyektif dan mikroskop yang tersedia pada penelitian ini kurang menunjang untuk identifikasi sel saraf secara morfologis. Maka pada penelitian lanjutan diperlukan isolasi sel saraf dengan menggunakan penanda neuronal yang spesifik untuk menambah tingkat kepercayaan hasil penelitian. Sel glia yang tidak diinginkan tumbuh pada kultur jaringan penelitian ini dihambat pertumbuhannya dengan menggunakan medium berupa DMEM dan serum FBS yang merupakan medium dan serum yang spesifik untuk pertumbuhan neuron, sedangkan medium yang digunakan untuk pertumbuhan sel glia adalah MEM.<sup>63</sup>

Parameter yang digunakan untuk menilai tingkat neurogenesis adalah viabilitas relatif sel dan tingkat proliferasi sel. Viabilitas relatif sel diperiksa dengan menggunakan MTT. Walaupun dengan metode pemeriksaan ini viabilitas sel yang diperoleh merupakan viabilitas relatif, namun cara ini dianggap lebih praktis dan hasilnya lebih dapat dipercaya bila dibandingkan dengan metode penghitungan sel dengan *trypan blue* karena cara ini tidak tergantung pada ketrampilan pemeriksa, tidak diperlukan lebih dari 1 pemeriksa untuk meningkatkan tingkat reliabilitas, dan pemeriksaan pun tidak perlu dilakukan secara *blind*. Reliabilitas pemeriksaan juga tidak perlu dipertanyakan karena pemeriksaan dilakukan secara triplo.

Hasil pemeriksaan MTT menunjukkan bahwa viabilitas relatif sel seluruh kelompok yang diberi perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibanding kontrol, dan viabilitas relatif sel juga terus meningkat secara bermakna sesuai dengan peningkatan dosis pemberian ekstrak akar kucing, bahkan hingga hampir 4 kali lipat pada dosis 20 mg/mL

(viabilitas relatif sel kontrol < dosis 10 mg/mL < dosis 15 mg/mL < dosis 20 mg/mL). Hasil pemeriksaan ini menunjukkan bahwa ekstrak akar kucing berpengaruh pada peningkatan jumlah sel saraf yang hidup pasca hipoksia. Hasil pemeriksaan ini sesuai dengan penelitian Purwaningsih *et al*<sup>20</sup> di mana dosis neuroterapi optimal terlihat pada dosis 20 mg/mL. Walaupun penelitian Purwaningsih *et al*<sup>20</sup> menunjukkan bahwa pada dosis 25 mg/mL efek neuroterapi ekstrak akar kucing mulai menurun pada *neuromuscular junction*, namun hal ini belum tentu sesuai pada susunan saraf pusat. Makin tingginya viabilitas relatif sel sesuai peningkatan dosis menimbulkan kemungkinan bahwa pada dosis yang lebih tinggi lagi akan lebih meningkatkan viabilitas sel, sehingga penelitian untuk menilai pengaruh ekstrak akar kucing terhadap tingkat neurogenesis pada jaringan hipokampus pasca hipoksia dengan dosis ekstrak akar kucing yang lebih tinggi perlu dilakukan untuk mendapatkan dosis yang benar-benar optimal untuk peningkatan neurogenesis pasca hipoksia.

Hasil pemeriksaan MTT menunjukkan bahwa ekstrak akar kucing berpengaruh pada peningkatan jumlah sel saraf yang hidup pasca hipoksia, namun seluruh sel yang hidup ini dapat berasal dari sel-sel saraf baru hasil neurogenesis maupun dari sel-sel saraf lama yang bertahan hidup pasca hipoksia dan tidak mengalami apoptosis. Untuk itu diperlukan pemeriksaan lain yang dapat menilai tingkat proliferasi sel, sehingga digunakan pemeriksaan BrdU.

Pemeriksaan BrdU dipilih karena pemeriksaan ini merupakan pemeriksaan baku emas/*gold standard* untuk menilai proliferasi sel.<sup>64</sup> Hasil pemeriksaan BrdU menunjukkan bahwa tingkat proliferasi sel seluruh kelompok yang diberi perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibanding kontrol. Hasil pemeriksaan ini menunjukkan bahwa ekstrak akar kucing memiliki pengaruh pada tingkat proliferasi sel saraf pasca hipoksia. Dari hasil pemeriksaan, didapatkan bahwa tingkat proliferasi sel paling optimal pada dosis ekstrak akar kucing 10 mg/mL, dan kemudian menurun pada dosis 15 mg/mL dan 20 mg/mL, walaupun penurunannya masih lebih tinggi dibandingkan kontrol. Fenomena ini kemungkinan disebabkan oleh 2 hal, yang pertama adalah bahwa memang tingkat proliferasi sel paling optimal pada dosis 10 mg/mL, sehingga tingkat viabilitas sel yang lebih tinggi pada dosis 15 mg/mL dan 20 mg/mL merupakan hasil dari sel-sel saraf lama yang bertahan hidup pasca hipoksia dan tidak mengalami apoptosis. Hal ini dapat terjadi karena dengan penurunan respon inflamasi yang disebabkan oleh penurunan aktivasi enzim PLA<sub>2</sub> oleh acalyphin dan stigmasterol, kejadian *respiratory burst* juga menurun dan produksi ROS juga menurun sehingga sel-sel lebih dapat bertahan hidup pasca

hipoksia.<sup>6,13,26,29</sup> Selain itu, stigmasterol merupakan golongan fitosterol dengan aktivitas antioksidan yang juga dapat melawan produksi ROS dan pada akhirnya meningkatkan ketahanan hidup sel-sel saraf pasca hipoksia.<sup>65</sup> Aktivitas antioksidan dan kemampuan sebagai *scavenger* radikal bebas juga dimiliki oleh flavonoid yang terkandung dalam akar kucing.<sup>66</sup> Kemungkinan kedua adalah bahwa pada saat pemeriksaan, tidak semua sel-sel saraf baru hasil neurogenesis dapat diperiksa dengan pemeriksaan BrdU. Hal ini disebabkan karena meskipun BrdU merupakan nukleosida sintetik yang merupakan analog timidin, sehingga dapat diinkorporasikan ke dalam DNA yang baru disintesis oleh sel yang bereplikasi, namun inkorporasi ini hanya dapat terjadi bila sel berada dalam fase S.<sup>64</sup> Hal ini akan menyebabkan sel-sel baru yang telah mengalami proliferasi sebelumnya atau yang sedang akan mengalami proliferasi namun tidak sedang berada dalam fase S tidak dapat diperiksa dengan pemeriksaan BrdU ini. Untuk itu, penelitian dengan pemeriksaan BrdU secara serial dalam hal waktu (misalnya tiap 24 jam pasca hipoksia) perlu dilakukan untuk mendapatkan tingkat proliferasi sel yang sesungguhnya dan juga untuk mendapatkan gambaran tingkat proliferasi sel sesuai waktu. Selain itu, pemeriksaan dengan penanda proliferasi sel lain juga dapat dilakukan sebagai perbandingan dengan hasil BrdU, misalnya dengan pemeriksaan Ki-67 yang merupakan antigen protein nuklear umum yang diekspresikan pada sel yang berada pada fase G<sub>1</sub>, S, dan G<sub>2</sub>, sehingga mungkin pemeriksaan dengan Ki-67 dapat menunjukkan tingkat proliferasi sel yang lebih mendekati nilai yang sesungguhnya, namun memang penggunaannya sampai saat ini masih terbatas dan sebagian besar aplikasinya masih dilakukan pada sel manusia.<sup>64</sup>

Hipoksia akan menyebabkan terjadinya respon inflamasi melalui ekspresi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B yang akan meningkatkan ekspresi gen-gen sitokin (seperti TNF $\alpha$  dan IL-1), molekul adhesi (seperti ICAM-1), mediator inflamasi prostanoid, dan NO.<sup>6,26</sup> Enzim PLA<sub>2</sub> juga akan diaktifkan pada proses inflamasi ini dan menghasilkan AA, yang akan dimetabolisme melalui jalur COX dan mengubah AA menjadi PGH<sub>2</sub>, yang merupakan prekursor prostaglandin dan kemudian akan dimetabolisme menjadi berbagai eikosanoid. Seluruh eikosanoid ini akan meningkatkan permeabilitas sawar darah otak dan pada akhirnya menyebabkan edema otak.<sup>15</sup> Inflamasi telah terbukti mengganggu neurogenesis basal maupun pasca hipoksia.<sup>16,17</sup>

Peningkatan neurogenesis yang terjadi pada kelompok yang diberi perlakuan ekstrak akar kucing kemungkinan disebabkan oleh penghambatan aktivasi enzim PLA<sub>2</sub> yang akan menurunkan respon inflamasi, sehingga mobilisasi sel punca dewasa yang sudah ada secara fisiologis di sistem saraf pusat akan ditingkatkan dan pada akhirnya akan

meningkatkan neurogenesis.<sup>18,19</sup> Mekanisme ini tidak diperiksa pada penelitian ini, sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk menilai apakah pengaruh ekstrak kucing terhadap peningkatan neurogenesis pasca hipoksia memang disebabkan oleh penghambatan aktivasi PLA<sub>2</sub> dengan membandingkan level PLA<sub>2</sub> antar kelompok perlakuan menggunakan penanda PLA<sub>2</sub>.

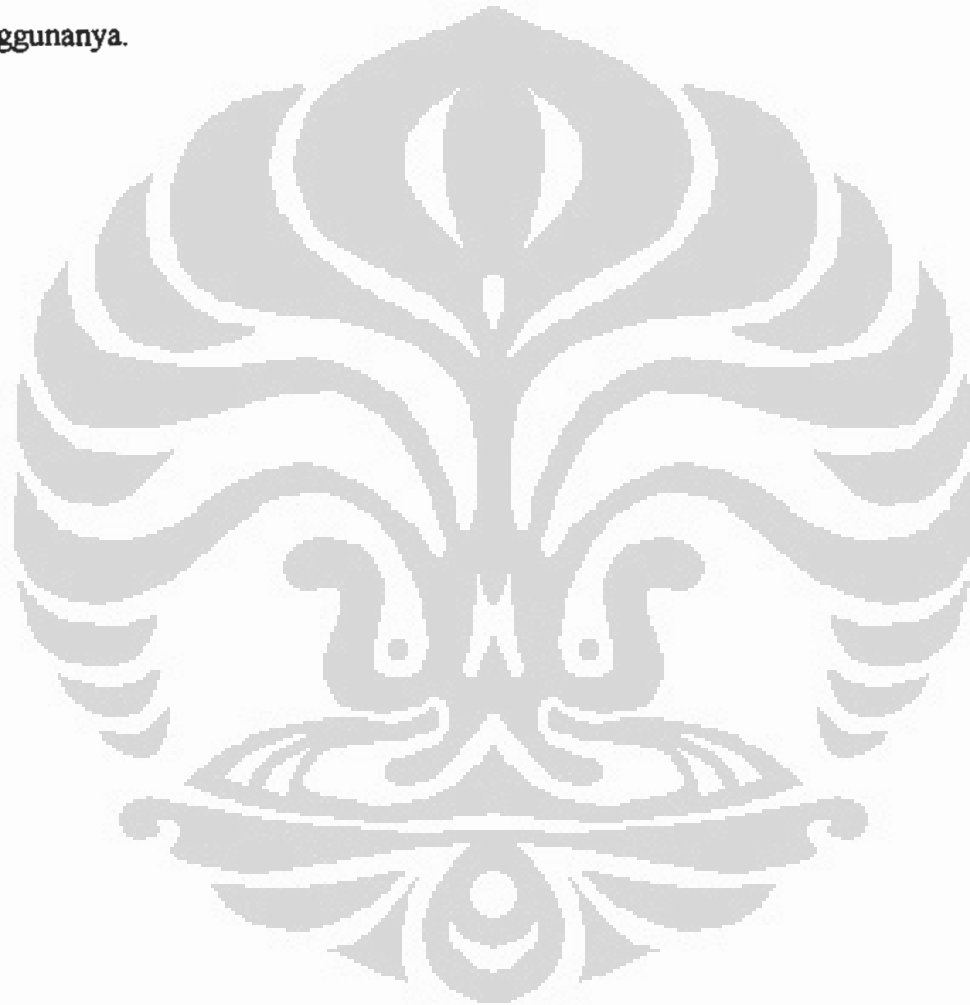
Selain melalui penurunan respon inflamasi, ekstrak akar kucing juga mungkin bekerja melalui peningkatan faktor neurotropik seperti BDNF, VEGF, dan bFGF. Seperti telah ditulis di atas, faktor neurotropik dibutuhkan untuk keberlangsungan hidup neuroblast.<sup>4,37</sup> Mekanisme peningkatan neurogenesis yang disebabkan oleh ekstrak akar kucing melalui jalur ini belum pernah diteliti, sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk menilai apakah ekstrak kucing dapat meningkatkan neurogenesis pasca hipoksia melalui peningkatan faktor neurotropik dengan memeriksa kadar faktor pertumbuhan (misalnya BDNF) antar kelompok perlakuan.

Saat ini zat-zat sintetik yang telah banyak diteliti untuk terapi *stroke* dengan mekanisme penurunan inflamasi seperti akar kucing antara lain adalah Enlimomab, LeukArrest, FK-506, dan steroid.<sup>67</sup> Enlimomab adalah antibodi ICAM-1 tikus yang menghambat adhesi leukosit,<sup>68</sup> dan LeukArrest bekerja dengan cara yang sama seperti Enlimomab, namun merupakan antibodi manusia.<sup>67</sup> FK-506 menekan jalur transduksi sinyal yang tergantung kalsium yang meningkatkan proliferasi sel T *helper* dengan inhibisi calcineurin, dan kortikosteroid mengaktivasi aktivasi eNOS sintase. Dari berbagai uji klinis terhadap zat-zat tersebut, tidak ada satupun yang memberikan hasil positif terhadap perbaikan klinis pasien, bahkan enlimomab diasosiasikan dengan peningkatan mortalitas dan morbiditas dibandingkan dengan plasebo, dan steroid dapat meningkatkan kejadian komplikasi infeksi dan hiperglikemia.<sup>67</sup> Oleh sebab itu, kemungkinan perkembangan obat-obat herbal seperti akar kucing untuk digunakan pada terapi *stroke* masih terbuka lebar.

Zat lain yang telah diteliti untuk terapi *stroke* adalah minyak kurkuma/*turmeric* dan estradiol. Minyak kurkuma menurunkan volume infark dan edema otak 24 jam pasca hipoksia dengan menurunkan ekspresi iNOS, cytc, dan Bax/Bcl-2. Selain itu, minyak kurkuma juga mengkoreksi penurunan potensial membran mitokondria dan menghambat aktivasi caspase-3 yang pada akhirnya menghambat apoptosis.<sup>69</sup> Belum ada penelitian yang membandingkan potensi berbagai zat herbal termasuk akar kucing untuk terapi *stroke*, namun potensi akar kucing kemungkinan besar sama atau bahkan lebih baik daripada minyak kurkuma karena meskipun minyak kurkuma dapat menghambat

kematian sel, kandungan bahan aktif pada akar kucing tidak hanya dapat menghambat kematian sel namun juga meningkatkan neurogenesis.

Estradiol telah diteliti sebagai agen poten sebagai neuroprotektor, neurorestorator, dan faktor tropik pada trauma otak dengan menurunkan kematian sel, meningkatkan neurogenesis, meningkatkan dukungan neurotropik, dan penekanan jalur neuroinflamasi. Sayangnya, penggunaan estradiol saat ini terutama ditujukan untuk wanita yang telah mengalami menopause dan belum ditargetkan untuk populasi laki-laki.<sup>70</sup> Keterbatasan penggunaan estradiol ini merupakan keunggulan akar kucing dalam aspek target populasi penggunaannya.



## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. KESIMPULAN

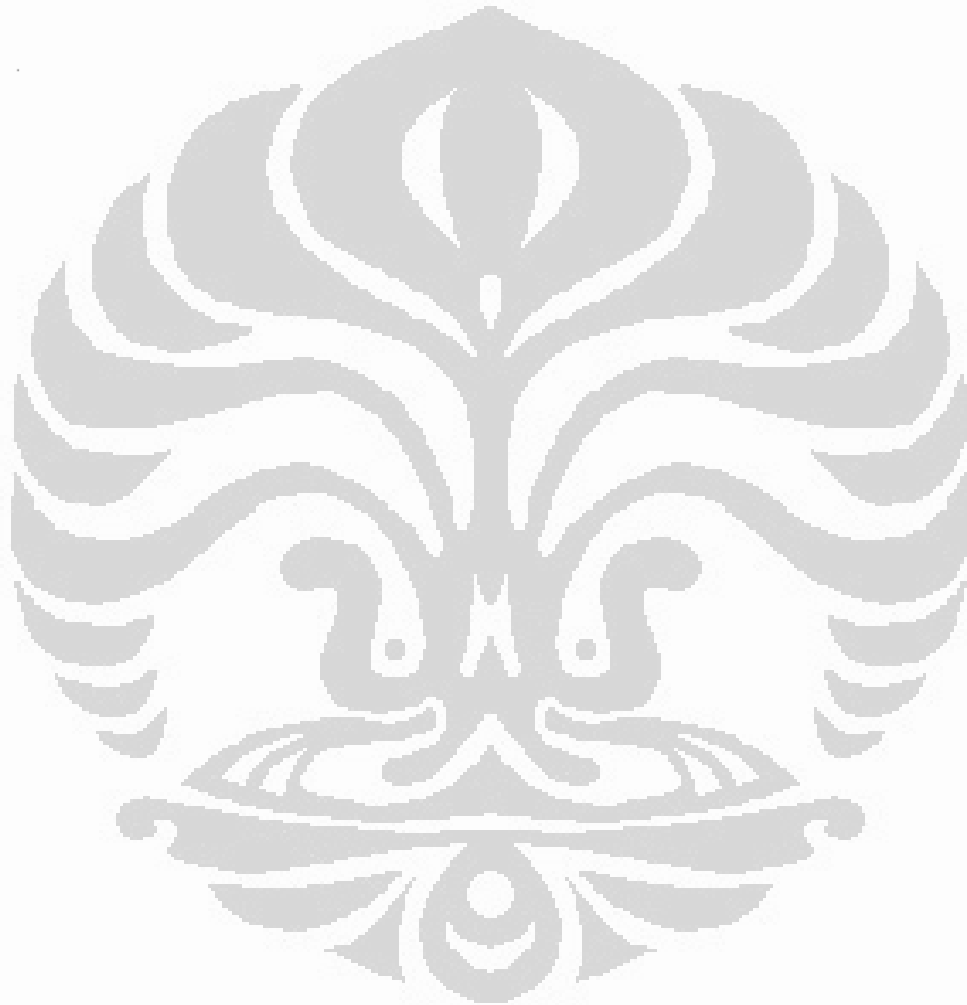
1. Viabilitas relatif sel pada kultur jaringan hipokampus tikus pada 90 jam pasca hipoksia dengan pemberian ekstrak air akar kucing pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL lebih tinggi secara bermakna bila dibandingkan dengan viabilitas relatif sel kultur jaringan hipokampus tikus pada 90 jam pasca hipoksia tanpa pemberian ekstrak air akar kucing.
2. Tingkat proliferasi sel pada kultur jaringan hipokampus tikus pada 90 jam pasca hipoksia dengan pemberian ekstrak air akar kucing pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL lebih tinggi secara bermakna bila dibandingkan dengan tingkat proliferasi sel kultur jaringan hipokampus tikus pada 90 jam pasca hipoksia tanpa pemberian ekstrak air akar kucing.

Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn dapat meningkatkan neurogenesis kultur jaringan hipokampus tikus pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL.

#### B. SARAN

1. Perlu dilakukan isolasi sel saraf dengan penanda neuronal (misalnya *neuron-specific enolase antibodies*) untuk menambah tingkat kepercayaan hasil penelitian.
2. Perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan dosis optimal pengaruh ekstrak akar kucing terhadap tingkat neurogenesis pada jaringan hipokampus pasca hipoksia (dosis ekstrak akar kucing lebih tinggi dari 20 mg/mL).
3. Perlu dilakukan penelitian dengan pemeriksaan BrdU secara serial dalam hal waktu (misalnya tiap 24 jam pasca hipoksia).
4. Perlu dilakukan penelitian dengan pemeriksaan penanda proliferasi sel lain selain BrdU, misalnya dengan pemeriksaan Ki-67.
5. Perlu dilakukan penelitian untuk menilai apakah mekanisme pengaruh ekstrak kucing terhadap peningkatan neurogenesis pasca hipoksia memang disebabkan oleh penghambatan aktivasi PLA<sub>2</sub> dengan membandingkan level PLA<sub>2</sub> antar kelompok perlakuan menggunakan penanda PLA<sub>2</sub>.

6. Perlu dilakukan penelitian untuk menilai apakah mekanisme pengaruh ekstrak kucing terhadap peningkatan neurogenesis pasca hipoksia dapat disebabkan oleh peningkatan faktor neurotropik dengan memeriksa kadar faktor pertumbuhan (misalnya BDNF) antar kelompok perlakuan.





## DAFTAR REFERENSI

- <sup>1</sup> Becker JU. Stroke, ischemic [homepage on the internet]. 2008 [cited 2008 Sept 30]. Available from: URL: <http://www.emedicine.com/EMERG/topic558.htm>.
- <sup>2</sup> Tahun 2020, penderita stroke meningkat 2 kali. [homepage on the internet]. [cited 2008 Sept 30]. Available from: URL: <http://www.vastroki.or.id/read.php?id=319>.
- <sup>3</sup> Nassisi D. Stroke, hemorrhagic [homepage on the internet]. 2010 [cited 2010 Apr 22]. Available from: URL: <http://emedicine.medscape.com/article/793821-overview>.
- <sup>4</sup> Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Neurogenesis in the adult ischemic brain: generation, migration, survival, and restorative therapy. *Neuroscientist* [serial online]. 2005 [cited 2008 Oct 8]; 11: 408. Available from: URL: <http://nro.sagepub.com/cgi/content/abstract/11/5/408>.
- <sup>5</sup> Ding G, Jiang Q, Li L, Zhang L, Zhang ZG, Ledbetter KA, et al. Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodeling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* [serial online]. 2008 [cited 2008 Aug 24]; 28: 1440-8. Available from: [www.jcbfm.com](http://www.jcbfm.com).
- <sup>6</sup> Culmsee C, Kriegelstein J. Ischaemic brain damage after stroke: new insights into efficient therapeutic strategies. *EMBO reports* [serial online]. 2007 [cited 2008 Aug 24]; 8: 129-33. Available from: Pubmed Central.
- <sup>7</sup> Jiang W, Gu WG, Brännström T, Rosqvist R, Wester P. Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* [serial online]. 2001 [cited 2008 Sept 30]; 32: 1201-7. Available from: URL: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/content/full/32/5/1201>.
- <sup>8</sup> Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *PNAS* [serial online]. 2001 [cited 2008 Aug 24]; 98(8): 4710-5. Available from: URL: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.081011098>.
- <sup>9</sup> Tanaka R, Yamashiro K, Mochizuki H, Cho N, Onodera M, Mizuno Y, et al. *Stroke* [serial online]. 2004 [cited 2008 Sept 30]; 35: 1454-9. Available from: <http://www.strokeaha.org>.
- <sup>10</sup> Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa K, Miyata T, Okano H, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* [serial online]. 2001 [cited 2008 Sept 30]; 32: 1890-6. Available from: <http://www.strokeaha.org>.
- <sup>11</sup> Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *PNAS* [serial online]. 2006 [cited 2008 Aug 24]; 103(35): 13198-202. Available from: URL: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0603512103>.
- <sup>12</sup> Borlongan CV, Hess DC. New hope for stroke patients: mobilization of endogenous stem cells. *CMAJ* [serial online]. 2006 [cited 2008 Aug 24]; 174(7): 954-5. Available from: [www.cmaj.ca](http://www.cmaj.ca).
- <sup>13</sup> Fawcett JW, Rosser AE, Dunnett, SB, editors. Metabolic damage. In: Fawcett JW, Rosser AE, Dunnett, SB, editors. *Brain damage, brain repair*. Oxford: Oxford University Press, 2001; p. 26-44.
- <sup>14</sup> Titsworth WL, Liu NK, Xu XM. Role of secretory phospholipase A<sub>2</sub> in CNS inflammation: implications in traumatic spinal cord injury. *CNS Neurol Disord Drug Targets* [serial online]. 2008 [cited 2010 Apr 11]; 7(3): 254-69. Available from: NIH Public Access.
- <sup>15</sup> Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* [serial online]. 2007 [cited 2008 Sept 30]; 184(1-2): 53-68. Available from: NIH Public Access.
- <sup>16</sup> Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *PNAS* [serial online]. 2003 [cited 2008 Aug 24]; 100(23): 13632-7. Available from: URL: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2234031100>.
- <sup>17</sup> Taupin. Adult neurogenesis, neuroinflammation and therapeutic potential of adult neural stem cells. *Int J Med Sci* [serial online]. 2008 [cited 2008 Aug 24]; 5(3): 127-32. Available from: [www.medsci.org](http://www.medsci.org).

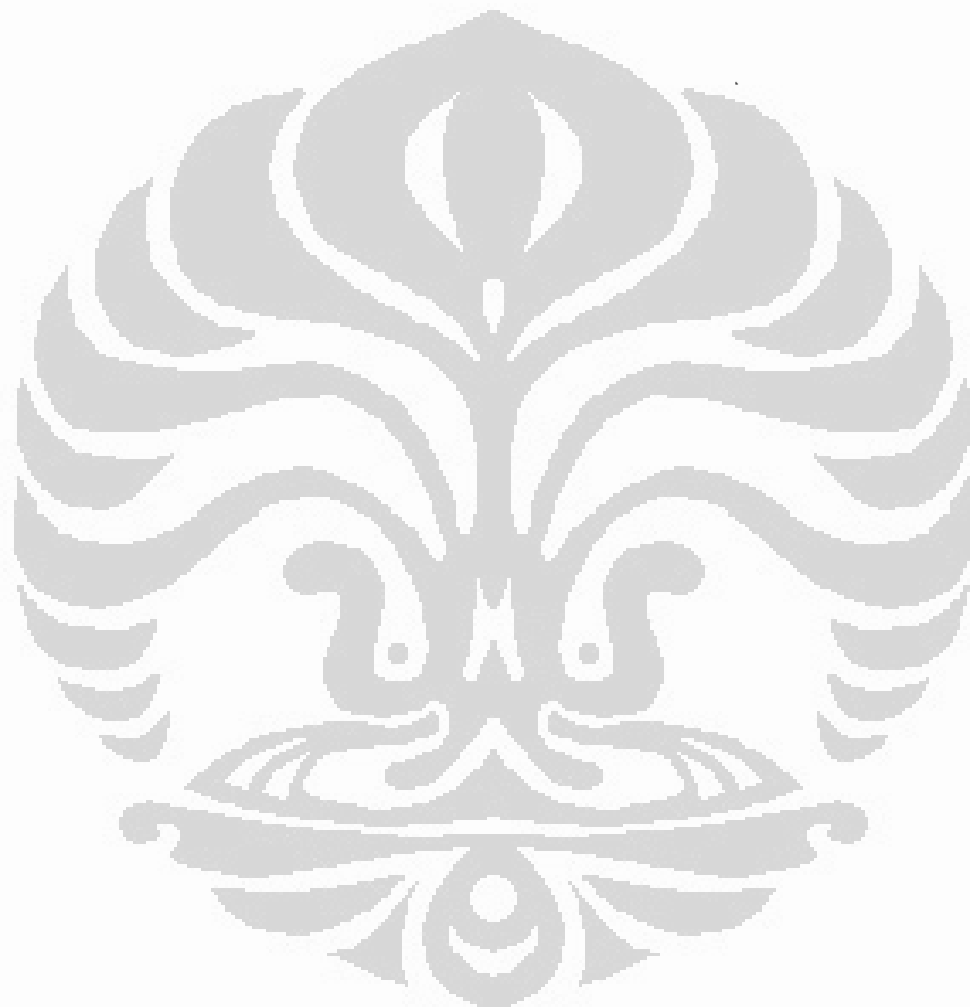
- <sup>18</sup> Haas S, Weidner N, Winkler J. Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol* [serial online]. 2005 [cited 2009 Feb 2]; 18: 59-64. Available from: Lippincott Williams & Wilkins.
- <sup>19</sup> Szentirmai O, Carter BS. Genetic and cellular therapies for cerebral infarction. *Neurosurgery* [serial online]. 2004 [cited 2009 Feb 2]; 55(2): 283-97. Available from: [www.neurosurgery-online.com](http://www.neurosurgery-online.com).
- <sup>20</sup> Purwaningsih EH, Ibrahim N, Zain H. Efek neuroprotektor dan neuroterapi ekstrak akar *Acalypha indica* Linn (akar kucing) secara *eks vivo* dan *in vivo*. Laporan akhir riset unggulan Universitas Indonesia; 2007.
- <sup>21</sup> Indian Medicinal Plants Growers' Consortium. *Acalypha indica* L [homepage on the internet]. 2007 [cited 2009 Jan 12]. Available from: [impgc.com](http://impgc.com).
- <sup>22</sup> Nirmal N, Praba GO, Velmurugan D. Modeling studies on phospholipase A<sub>2</sub>-inhibitor complexes. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* [serial online]. 2008 [cited 2009 August 31]; 45: 256-62. Available from: [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/1941/1/IJBB%2045\(4\)%20256-262.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/1941/1/IJBB%2045(4)%20256-262.pdf).
- <sup>23</sup> Suswati L. Perbaikan neuron hipokampus pasca hipoksia serebri dengan penggunaan ekstrak air tanaman akar kucing (*Acalypha indica* Linn). Tesis Magister Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2009.
- <sup>24</sup> Benarroch EE. Neuron-Astrocyte Interactions: Partnership for Normal Function and Disease in the Central Nervous System. *Mayo Clin Proc* [serial online]. 2005 [cited 2008 Nov 5]; 80(10): 1326-38. Available from: [www.mayoclinicproceedings.com](http://www.mayoclinicproceedings.com).
- <sup>25</sup> Chong ZZ, Li F, Maiese K. Oxidative Stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol* [serial online]. 2005 [cited 2008 Sept 30]; 75(3): 207-46. Available from: NIH Public Access.
- <sup>26</sup> Yi JH, Park SW, Kapadia R, Vemugati R. Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. *Neurochem Int* [serial online]. 2007 [cited 2008 Sept 30]; 50(7-8): 1014-27. Available from: NIH Public Access.
- <sup>27</sup> Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A<sub>2</sub> biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther* [serial online]. 2009 [cited 2010 Apr 11]; 23(1): 49. Available from: NIH Public Access.
- <sup>28</sup> Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. Phospholipase A<sub>2</sub> in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* [serial online]. 2004 [cited 2010 Apr 11]; 45: 205-13. Available from: [www.jlr.org](http://www.jlr.org).
- <sup>29</sup> Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Costa G, et al. Neuroprotection by Flavinoids. *Braz J Med Biol Res* [serial online]. 2003 [cited 2008 Oct 9]; 36(12): 1613-20. Available from: PubMed Central.
- <sup>30</sup> Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* [serial online]. 2008 [cited 2008 Oct 6]; 132: 645-50. Available from: Elsevier.
- <sup>31</sup> Fawcett JW, Rosser AE, Dunnett, SB, editors. Stem cells. In: Fawcett JW, Rosser AE, Dunnett, SB, editors. *Brain damage, brain repair*. Oxford: Oxford University Press, 2001; p. 344-56.
- <sup>32</sup> Kempermann G, Wiskott L, Gage FH. Functional significance of adult neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* [serial online]. 2004 [cited 2008 Oct 6]; 14: 181-91. Available from: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- <sup>33</sup> Sanes JR, Jessell TM. The formation and regeneration of synapses. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of neuroscience*. 4<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2000; p.1087-114.
- <sup>34</sup> Kalluri HSG, Dempsey RJ. Growth factors, stem cells, and stroke. *Neurosurg Focus* [serial online]. 2008 [cited 2008 Oct 9]; 24(3&4): E13. Available from: PubMed Central.
- <sup>35</sup> Liu XS, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Meng H, Chopp M. Comparison of *in vivo* and *in vitro* gene expression profiles in subventricular zone neural progenitor cells from the adult mouse after middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience* [serial online]. 2007 [cited 2008 Sept 30]; 146(3): 1053-61. Available from: NIH Public Access.

- <sup>36</sup> Riquelme PA, Drapeau E, Doetsch F. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Phil Trans R Soc [serial online]*. 2008 [cited 2009 Apr 15]; 363: 123-37. Available from: Pub Med Central.
- <sup>37</sup> Carmichael ST. Gene expression changes after focal stroke, traumatic brain and spinal cord injuries. *Curr Opin Neurol [serial online]*. 2003 [cited 2008 Sept 30]; 16: 669-704. Available from: Lippincott Williams & Wilkins.
- <sup>38</sup> Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell [serial online]*. 2002 [cited 2008 Sept 30]; 110: 429-41. Available from: PubMed Central.
- <sup>39</sup> Hou SW, Wang YQ, Xu M, Shen DH, Wang JJ, Huang F, et al. Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain. *Stroke [serial online]*. 2008 [cited 2008 Aug 24]; 39: 2837-44. Available from: <http://www.strokeaha.org>.
- <sup>40</sup> Taupin P. Adult neural stem cells: the promise of the future. *Neuropsychiatric Disease and Treatment [serial online]*. 2007 [cited 2009 Apr 15]; 3(6): 753-60. Available from: Pub Med Central.
- <sup>41</sup> Toyoda K, Chu Y, Heistad D. Gene therapy for cerebral vascular disease: update 2003. *British Journal of Pharmacology [serial online]*. 2003 [cited 2009 Feb 2]; 139: 1-9. Available from: [www.nature.com/bjp](http://www.nature.com/bjp).
- <sup>42</sup> Matsuoka N, Nozaki K, Takagi Y, Nishimura M, Hayashi J, Miyatake SI, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of fibroblast growth factor-2 increases BrdU-positive cells after forebrain ischemia in gerbils. *Stroke [serial online]*. 2003 [cited 2009 Feb 2]; 34: 1519-25. Available from: <http://www.strokeaha.org>.
- <sup>43</sup> Sugiura S, Kitagawa K, Tanaka S, Todo K, Omura-Matsuoka E, Sasaki T, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor enhances neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke [serial online]*. 2005 [cited 2009 Feb 2]; 36: 859-64. Available from: <http://www.strokeaha.org>.
- <sup>44</sup> Savitz SI, Dinsmore JH, Wechsler LR, Rosenbaum DM, Caplan LR. Cell therapy for stroke. *NeuroRx [serial online]*. 2004 [cited 2009 Feb 2]; 1: 406-14. Available from: PubMed Central.
- <sup>45</sup> Schneider A, Wysocki R, Pitzer C, Krüger C, Laage R, Schwab S, et al. An extended window of opportunity for G-CSF treatment in cerebral ischemia. *BMC Biology [serial online]*. 2006 [cited 2009 Feb 2]; 4: 36. Available from: BioMed Central.
- <sup>46</sup> Kobayashi T, Ahlenius H, Thored P, Kobayashi R, Kokaia Z, Lindvall O. Intracerebral infusion of glial cell-line derived neurotrophic factor promotes striatal neurogenesis after stroke in adult rats. *Stroke [serial online]*. 2006 [cited 2009 Feb 2]; 37: 2361-7. Available from: <http://www.strokeaha.org>.
- <sup>47</sup> Schäbitz W-R, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke [serial online]*. 2007 [cited 2009 Feb 2]; 38: 2165-72. Available from: <http://www.strokeaha.org>.
- <sup>48</sup> Teramoto T, Qiu J, Plumier J-C, Moskowitz MA. EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia. *J Clin Invest [serial online]*. 2003 [cited 2009 Feb 2]; 111: 1125-32. Available from: PubMed Central.
- <sup>49</sup> Türeyen K, Vemuganti R, Bowen KK, Sailor KA, Dempsey RJ. EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain. *Neurosurgery [serial online]*. 2005 [cited 2009 Feb 2]; 57: 1254-63. Available from: [www.neurosurgery-online.com](http://www.neurosurgery-online.com).
- <sup>50</sup> Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *PNAS [serial online]*. 2002 [cited 2008 Aug 24]; 99(18): 11946-50. Available from: URL: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.182296499>.
- <sup>51</sup> Liu Z, Fan Y, Won SJ, Neumann M, Hu D, Zhou L, et al. Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. *Stroke [serial online]*. 2007 [cited 2009 Feb 2]; 38: 146-52. Available from: <http://www.strokeaha.org>.

- <sup>52</sup> Hoehn BD, Palmer TD, Steinberg GK. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke* [serial online]. 2005 [cited 2009 Feb 2]; 36: 2718-24. Available from: <http://www.strokeaha.org>.
- <sup>53</sup> Kauppinen TM, Suh AW, Berman AE, Hamby AM, Swanson RA. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase suppresses inflammation and promotes recovery after ischemic injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* [serial online]. 2009 [cited 2009 Apr 10]; 9: 1-10. Available from: [www.jcbfm.com](http://www.jcbfm.com).
- <sup>54</sup> Komitova M, Mattson B, Johansson BB, Eriksson PS. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke* [serial online]. 2005 [cited 2009 Feb 2]; 36: 1278-82. Available from: <http://www.strokeaha.org>.
- <sup>55</sup> *Acalypha indica* Linn. [homepage on the internet]. [cited 2009 Jan 12]. Available from: URL: [www.stuartxchange.org/Maraotong.html](http://www.stuartxchange.org/Maraotong.html).
- <sup>56</sup> Walter TM. Review of *Acalypha indica* Linn in traditional Siddha medicine. *Bio Info Bank Library* [serial online]. [cited 2009 Jan 12]; 321: 2007-03-03. Available from: <http://lib.bioinfo.pl>.
- <sup>57</sup> Govindarajan M, Jebanesan A, Pushpanathan T, Samidurai K. Studies on effect of *Acalypha indica* L. (Euphorbiaceae) leaf extracts on the malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* [serial online]. 2008 [cited 2009 Jan 12]; 103(3): 691-5. Available from: [IngentaConnect](http://www.ingentaconnect.com).
- <sup>58</sup> Das AK, Ahmed F, Biswas NN, Dev S, Masud MM. Diuretic Activity of *Acalypha indica*. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences* [serial online]. 2005 [cited 2009 Jan 12]; 4:1. Available from: [www.pharmacdu.net](http://www.pharmacdu.net).
- <sup>59</sup> Sharma S, Singh T, Vijayvergia R. Molluscicidal activity of some medicinal plants. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* [serial online]. 2009 [cited 2010 May 11]; 3(2):155-7. Available from: [hmtjournals.com/vol3\\_2/028.pdf](http://hmtjournals.com/vol3_2/028.pdf).
- <sup>60</sup> Nahrstedt A, Hungeling M, Petereit F. Flavonoids from *Acalypha indica*. *Fitoterapia* [serial online]. 2006 [cited 2010 Apr 22]; 77(6):484-6. Available from: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- <sup>61</sup> Gozal E, Sachleben Jr LR, Rane MJ, Vega C, Gozal D. Mild sustained and intermittent hypoxia induce apoptosis in PC-12 cells via different mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* [serial online]. 2005 [cited 2010 Jan 20]; 288:535-42. Available from: [www.ajpcell.org](http://www.ajpcell.org).
- <sup>62</sup> Kamelia E. Pengaruh ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) pada neurogenesis dan kadar BDNF dalam kultur sel jaringan hipokampus tikus muda. Tesis Magister Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia: 2005.
- <sup>63</sup> Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Wiley-Liss Inc, 2000.
- <sup>64</sup> Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissue with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem* [serial online]. 2003 [cited 2010 Apr 14]; 51:1681-8. Available from: [www.jhc.org](http://www.jhc.org).
- <sup>65</sup> Yasukazu Y, Etsuo N. Antioxidant effects of phytosterol and its components. *Journal of nutritional science and vitaminology* [serial online]. 2003 [cited 2010 Apr 16]; 49(4):277-80. Available from: [http://www.biomedexperts.com/Abstract.bme/14598915/Antioxidant\\_effects\\_of\\_phytosterol\\_and\\_its\\_components](http://www.biomedexperts.com/Abstract.bme/14598915/Antioxidant_effects_of_phytosterol_and_its_components)
- <sup>66</sup> Georgetti SR, Casagrande R, Di Mambro VM, Azzolini AECS, Fonseca MJV. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS PharmSci* [serial online]. 2003 [cited 2010 Apr 22]; 5(2):20. Available from: <http://www.pharmsci.org>.
- <sup>67</sup> Labiche LA, Grotta JC. Clinical trials for cytoprotection in stroke. *NeuroRx* [serial online]. 2004 [cited 2010 Apr 22]; 1:1. Available from: [PubMed Central](http://pubmedcentral.nih.gov).
- <sup>68</sup> Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* [serial online]. 2008 [cited 2010 May 7]; 55(3):363-89. Available from: [NIH Public Access](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov).

<sup>69</sup> Dohare P, Garg P, Sharma U, Jagannathan NR, Ray M. Neuroprotective efficacy and therapeutic window of curcuma oil: in rat embolic stroke model. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [serial online]. 2008 [cited 2010 Apr 22]; 8:55. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/8/55>.

<sup>70</sup> Brown CM, Suzuki S, Jelks KAB, Wise PM. Estradiol is a potent protective, restorative, and trophic factor after brain injury. *Semin Reprod Med* [serial online]. 2009 [cited 2010 Apr 22]; 27(3):240-9. Available from: NIH Public Access.



## LAMPIRAN 1

## A. HASIL ANALISIS STATISTIK DATA VIABILITAS RELATIF SEL

				Descriptives		
kelompok				Statistic	Std. Error	
mtipersen	kontrol	Mean		100.04387	5.848864	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	85.00888		
			Upper Bound	115.07885		
		5% Trimmed Mean		100.21883		
		Median		99.82500		
		Variance		205.255		
		Std. Deviation		14.326732		
		Minimum		78.040		
		Maximum		118.896		
		Range		40.856		
		Interquartile Range		23.338		
		Skewness		-.320		.845
		Kurtosis		-.005		1.741
		ekstrak kencing 10 mg/ml	akar	Mean		
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			168.60115		
	Upper Bound			185.29218		
5% Trimmed Mean				178.84457		
Median				178.85900		
Variance				63.240		
Std. Deviation				7.952385		
Minimum				165.617		
Maximum				190.114		
Range				24.497		
Interquartile Range				9.930		
Skewness				.474	.845	
Kurtosis				1.919	1.741	
ekstrak kencing 15 mg/ml	akar			Mean		220.61833
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	168.70018		
			Upper Bound	272.53649		
		5% Trimmed Mean		217.75226		
		Median		200.04350		
		Variance		2447.524		
		Std. Deviation		49.472453		
		Minimum		179.878		
		Maximum		312.948		
		Range		133.070		
		Interquartile Range		68.832		
		Skewness		1.891	.845	
		Kurtosis		2.710	1.741	
		ekstrak kencing 20 mg/ml	akar	Mean		386.01633
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			339.64803		
	Upper Bound			432.38663		
5% Trimmed Mean				386.25126		
Median				388.74550		
Variance				1952.397		
Std. Deviation				44.185941		
Minimum				331.059		
Maximum				438.745		
Range				105.686		
Interquartile Range				94.683		
Skewness				-.083	.845	
Kurtosis				-1.777	1.741	

## Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
mttpersen kontrol	.147	6	.200*	.987	6	.981
ekstrak akar kucing 10 mg/ml	.248	6	.200*	.939	6	.650
ekstrak akar kucing 15 mg/ml	.300	6	.098	.809	6	.071
ekstrak akar kucing 20 mg/ml	.189	6	.200*	.907	6	.418

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

## Test of Homogeneity of Variances

mttpersen

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.204	3	20	.018

## ANOVA

mttpersen	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	262809.789	3	87603.263	75.060	.000
Within Groups	23342.083	20	1167.104		
Total	286151.873	23			

## B. HASIL ANALISIS STATISTIK TRANSFORMASI DATA VIABILITAS RELATIF SEL SECARA LOG<sub>10</sub>

				Descriptives	
mtpensen_log	kelompok			Statistic	Std. Error
kontrol		Mean		1.99633	.026177
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.92904	
			Upper Bound	2.06362	
		5% Trimmed Mean		1.99773	
		Median		1.99694	
		Variance		.004	
		Std. Deviation		.064120	
		Minimum		1.892	
		Maximum		2.075	
		Range		.183	
		Interquartile Range		.102	
		Skewness		-.821	.845
		Kurtosis		.435	1.741
ekstrak kucing 10 mg/ml	akar	Mean		2.24748	.007927
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.22710	
			Upper Bound	2.26786	
		5% Trimmed Mean		2.24730	
		Median		2.24763	
		Variance		.000	
		Std. Deviation		.019417	
		Minimum		2.219	
		Maximum		2.279	
		Range		.060	
		Interquartile Range		.024	
		Skewness		.332	.845
		Kurtosis		1.835	1.741
ekstrak kucing 15 mg/ml	akar	Mean		2.33562	.036164
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.24266	
			Upper Bound	2.42859	
		5% Trimmed Mean		2.33122	
		Median		2.30105	
		Variance		.008	
		Std. Deviation		.088583	
		Minimum		2.255	
		Maximum		2.495	
		Range		.240	
		Interquartile Range		.132	
		Skewness		1.485	.845
		Kurtosis		1.825	1.741
ekstrak kucing 20 mg/ml	akar	Mean		2.58421	.020474
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.53158	
			Upper Bound	2.63684	
		5% Trimmed Mean		2.58467	
		Median		2.58741	
		Variance		.003	
		Std. Deviation		.050152	
		Minimum		2.520	
		Maximum		2.640	
		Range		.120	
		Interquartile Range		.107	
		Skewness		-.178	.845
		Kurtosis		-1.740	1.741



## Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
mttpersen_log kontrol	.168	6	.200	.973	6	.909
ekstrak akar kucing 10 mg/ml	.241	6	.200	.943	6	.685
ekstrak akar kucing 15 mg/ml	.284	6	.141	.854	6	.168
ekstrak akar kucing 20 mg/ml	.184	6	.200	.907	6	.418

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

## Test of Homogeneity of Variances

mttpersen\_log

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.753	3	20	.069

## ANOVA

mttpersen_log	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.060	3	.353	95.181	.000
Within Groups	.074	20	.004		
Total	1.134	23			

## Multiple Comparisons

mttpersen\_log  
LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	ekstrak kucing 10 mg/ml akar	-.251150*	.035179	.000	-.32453	-.17777
	ekstrak kucing 15 mg/ml akar	-.339294*	.035179	.000	-.41268	-.26591
	ekstrak kucing 20 mg/ml akar	-.587878*	.035179	.000	-.66126	-.51450
ekstrak kucing mg/ml 10	kontrol akar	.251150*	.035179	.000	.17777	.32453
	ekstrak kucing 15 mg/ml akar	-.088144*	.035179	.021	-.16153	-.01476
	ekstrak kucing 20 mg/ml akar	-.336727*	.035179	.000	-.41011	-.26335
ekstrak kucing mg/ml 15	kontrol akar	.339294*	.035179	.000	.26591	.41268
	ekstrak kucing 10 mg/ml akar	.088144*	.035179	.021	.01476	.16153
	ekstrak kucing 20 mg/ml akar	-.248583*	.035179	.000	-.32197	-.17520
ekstrak kucing mg/ml 20	kontrol akar	.587878*	.035179	.000	.51450	.66126
	ekstrak kucing 10 mg/ml akar	.336727*	.035179	.000	.26335	.41011
	ekstrak kucing 15 mg/ml akar	.248583*	.035179	.000	.17520	.32197

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

### C. HASIL ANALISIS STATISTIK TRANSFORMASI DATA VIABILITAS RELATIF SEL

Descriptives				Statistic	Std. Error
kelompok					
brduabe	kontrol	Mean		.09000	.002864
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.08864	
			Upper Bound	.10336	
		5% Trimmed Mean		.09606	
		Median		.09700	
		Variance		.000	
		Std. Deviation		.007014	
		Minimum		.088	
		Maximum		.105	
		Range		.019	
		Interquartile Range		.013	
		Skewness		-.306	.845
		Kurtosis		-.901	1.741
ekstrak kucing 10 mg/ml	akar	Mean		.13183	.003719
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.12227	
			Upper Bound	.14139	
		5% Trimmed Mean		.13170	
		Median		.13000	
		Variance		.000	
		Std. Deviation		.009109	
		Minimum		.122	
		Maximum		.144	
		Range		.022	
		Interquartile Range		.018	
		Skewness		.408	.845
		Kurtosis		-1.914	1.741
ekstrak kucing 15 mg/ml	akar	Mean		.11650	.002729
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.10848	
			Upper Bound	.12352	
		5% Trimmed Mean		.11811	
		Median		.11350	
		Variance		.000	
		Std. Deviation		.006688	
		Minimum		.111	
		Maximum		.129	
		Range		.013	
		Interquartile Range		.009	
		Skewness		1.708	.845
		Kurtosis		2.758	1.741
ekstrak kucing 20 mg/ml	akar	Mean		.11387	.004248
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.10275	
			Upper Bound	.12459	
		5% Trimmed Mean		.11398	
		Median		.11750	
		Variance		.000	
		Std. Deviation		.010405	
		Minimum		.098	
		Maximum		.124	
		Range		.028	
		Interquartile Range		.019	
		Skewness		-.797	.845
		Kurtosis		-1.181	1.741

## Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
brduabs kontrol	.187	6	.200*	.974	6	.919
ekstrak akar kucing 10 mg/ml	.202	6	.200*	.912	6	.447
ekstrak akar kucing 15 mg/ml	.312	6	.068	.797	6	.055
ekstrak akar kucing 20 mg/ml	.229	6	.200*	.888	6	.310

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

## Test of Homogeneity of Variances

brduabs

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.986	3	20	.419

## ANOVA

brduabs	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.004	3	.001	18.164	.000
Within Groups	.001	20	.000		
Total	.005	23			

## Multiple Comparisons

brduabs  
LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	ekstrak kucing mg/ml akar 10	-.035833*	.004875	.000	-.04600	-.02567
	ekstrak kucing mg/ml akar 15	-.020500*	.004875	.000	-.03067	-.01033
	ekstrak kucing mg/ml akar 20	-.017667*	.004875	.002	-.02783	-.00750
ekstrak kucing mg/ml	akar kontrol 10	.035833*	.004875	.000	.02567	.04600
	akar ekstrak kucing mg/ml 15	.015333*	.004875	.005	.00517	.02550
	akar ekstrak kucing mg/ml 20	.018167*	.004875	.001	.00800	.02833
ekstrak kucing mg/ml	akar kontrol 15	.020500*	.004875	.000	.01033	.03067
	akar ekstrak kucing mg/ml 10	-.015333*	.004875	.005	-.02550	-.00517
	akar ekstrak kucing mg/ml 20	.002833	.004875	.568	-.00733	.01300
ekstrak kucing mg/ml	akar kontrol 20	.017667*	.004875	.002	.00750	.02783
	akar ekstrak kucing mg/ml 10	-.018167*	.004875	.001	-.02833	-.00800
	akar ekstrak kucing mg/ml 15	-.002833	.004875	.568	-.01300	.00733

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



## LAMPIRAN 2

3050 Spruce Street  
 Saint Louis, Missouri 63103 USA  
 Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765  
 Fax (314) 286-7828  
 email: techserv@sigma.com  
 sigma-aldrich.com

## Product Information

**CELL GROWTH DETERMINATION KIT  
 MTT BASED**

Stock No. CGD-1

Store at -0 °C

This kit is designed for the spectrophotometric measurement of cell growth as a function of mitochondrial activity in living cells.

**IT IS RECOMMENDED THAT THE ENTIRE PROTOCOL BE REVIEWED BEFORE STARTING THE ASSAY.**

**Product Description**

Traditionally, the determination of cell growth is done by counting viable cells after staining with a vital dye. Alternative methods include measurement of radioisotope incorporation as a measure of DNA synthesis, automated cell counters and other techniques which rely on dyes and cellular activity.

The MTT system is a simple, accurate, reproducible means of measuring the activity of living cells via mitochondrial dehydrogenase activity. The key component is 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide or MTT. Solutions of MTT solubilized in tissue culture media or balanced salt solutions, without phenol red, are yellowish in color. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells cleave the tetrazolium ring, yielding purple MTT formazan crystals which are insoluble in aqueous solutions. The crystals can be dissolved in acidified isopropanol. The resulting purple solution is spectrophotometrically measured. An increase in cell number results in an increase in the amount of MTT formazan formed and an increase in absorbance.

The use of the MTT method does have limitations influenced by: (1) the physiological state of cells and (2) variance in mitochondrial dehydrogenase activity in different cell types. Nevertheless, the MTT method of cell determination is useful in the measurement of cell growth in response to mitogens, antigenic stimuli, growth factors and other cell growth promoting reagents, cytotoxicity studies, and in the derivation of cell growth curves.

---

**REAGENT**

For Research Use Only.

Not for Use In Diagnostic Procedures.

---

**Kit Components**

<u>Prod. No.</u>	<u>Item</u>	<u>Quantity</u>
M-0283	MTT SOLUTION, 5mg/ml MTT in RPMI-1640 without phenol red, 1ml vials	5
M-0408	MTT SOLVENT, 50ml, 0.1 N HCl in anhydrous isopropanol	1

**WARNING:** Components of this kit should be carefully handled when using. MTT SOLUTION may be harmful if swallowed, inhaled or absorbed through skin. MTT may alter genetic material. MTT SOLVENT is flammable and corrosive.

### Procedure

The MTT method of cell determination is most useful when cultures are prepared in multiwell plates. For best results, cell numbers should be determined during log growth stage. Each test should include a blank containing complete culture medium without cells.

**NOTE:** Bacteria, mycoplasma and other microbial contaminants may also cleave the MTT tetrazolium ring; thus contaminated cultures should not be tested by this method.

1. Remove cultures from incubator into laminar flow hood or other sterile working area.
2. Aseptically add MTT SOLUTION in an amount equal to 10% of the culture volume.
3. Return cultures to incubator and incubate for 3 to 4 hours. Incubation times should be consistent when making comparisons.
4. After the incubation period, remove cultures from incubator and dissolve the resulting MTT formazan crystals as follows:
  - a. If cells are attached to culture vessel growth surface, remove and dispose of the culture fluid. Add MTT SOLVENT in an amount equal to the original culture volume. Solvent volumes may vary but the final volumes should be consistent to facilitate comparison.
  - b. If cells are not attached or loss of MTT formazan occurs if culture fluid is removed, add MTT SOLVENT directly to the culture in an amount equal to the original culture volume.
  - c. Plates should be read within 1 hour after adding MTT SOLVENT.
5. Gentle stirring in a gyratory shaker will enhance dissolution. Occasionally, pelting up and down (trituration) may be required to completely dissolve the MTT formazan crystals especially in dense cultures.
6. Spectrophotometrically measure absorbance at a wavelength of 570 nm. Subtract background absorbance measured at 690 nm.
7. Tests performed in 96 well plates may be measured in an ELISA-type plate reader equipped with appropriate filters.
8. Tests performed in other multiwell plates will require transfer to appropriate size cuvetts or plate reader for spectrophotometric measurement.

**NOTE:** MTT conversion to MTT formazan is cell-type specific. Because of variability that may occur between different strains of the same cell line and because of the influence of the physiological state of the cells, it is recommended that researchers prepare their own absorbance/cell number curves.

### POSSIBLE SOURCES OF ERROR

1. MTT SOLUTION is stable when stored frozen. Storage at 2-8 °C may result in decomposition and yield erroneous results. Development of dark color or formation of crystals indicate product deterioration.
2. Microbial contamination will contribute to the cleavage of MTT and formation of MTT formazan yielding erroneous results.
3. Uneven evaporation of culture fluid in wells of multiwell plates may cause erroneous results.
4. High protein levels (serum, albumin, etc.) in the culture medium may form a precipitate when MTT SOLVENT is added. Samples with protein concentrations equivalent to 10% fetal bovine serum seem acceptable. Sera with higher protein concentrations than fetal bovine serum may have to be used at lower percentages.

### References

1. Slater, T. et al. (1963) *Biochem. Biophys. Acta* 77:383.
2. Vossman, T. (1983) *J. Immunol. Methods* 65:55.
3. Denizot, F. and Lang, R. (1986) *J. Immunol. Methods* 89:271.
4. Carmichael, J. et al. (1987) *Cancer Research* 47:935.

CELL GROWTH DETERMINATION KIT  
MTT BASED  
Stock No. CGD-1  
7H294

Sigma brand products are sold through Sigma Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) to their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

## LAMPIRAN 3

For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.  
FOR IN VITRO USE ONLY.

## 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III

96-well Microplate cell ELISA for the detection of  
5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) incorporated into cellular DNA.

Non-radioactive alternative for [<sup>3</sup>H]-thymidine based DNA synthesis and cell proliferation assays

Cat. No. 11 444 611 001

For 1000 tests

Version August 2007

Store at -2 to +8°C

### I. Introduction

The determination of cellular proliferation, viability and attachment are key areas in a wide variety of cell biological approaches. The need for sensitive, quantitative, reliable and automated methods led to the development of standard assays. For example the incorporation of a radioactively labeled substance ([<sup>3</sup>H]-thymidine), or the release of a radioisotope such as [<sup>14</sup>C] after cell lysis is commonly used. Alternatively, the incorporation of 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) in place of thymidine is mentioned as a parameter for DNA synthesis and cellular proliferation in immunohisto- and cytochemistry and FACS analysis. Cells which have incorporated BrdU into DNA can be easily detected using a monoclonal antibody against BrdU (1-5) and measured by an enzyme- or fluorochrome-conjugated second antibody. Monoclonal antibodies to BrdU are used to detect both BrdU incorporated into tissues (6-11) and single cells (12-21).

Cell proliferation assays based on a microplate format are of particular importance for routine applications. Tetrazolium salts MTT (22) and XTT (23, 24) are especially useful for the quantification of living metabolically active cells that are rapidly proliferating. Both MTT and XTT work by being metabolized by mitochondrial dehydrogenases to form formazan dyes. A Cell Proliferation Kit I (MTT) and a Cell Proliferation Kit II (XTT) are available from RMB.

Alternatively the BrdU labeling technique is used to build a cell ELISA (25-28). This approach is particularly useful, when either a low number of population doublings or the stimulation of DNA synthesis is anticipated. Compared to radioactive isotope techniques, the BrdU Labeling and Detection Kit III is

- safer - no radioactive isotopes are used.
- accurate - the results, obtained strongly correlate to those, obtained with the [<sup>3</sup>H]-thymidine method (see figs. 2, 3).
- sensitive - as sensitive as [<sup>3</sup>H]-thymidine (see figs. 2, 3).
- fast - the use of multimer ELISA readers allows for processing a large number of samples.
- easy - the test follows a standard cell ELISA protocol.
- economical - no additional reagents like stimulation fluid is required.

BrdU Labeling and Detection Kit III is based on the cell ELISA principle. Cells are cultured in a microplate (96 wells) (see fig. 1). BrdU is added to the culture medium and incorporated into freshly synthesized DNA (fig. 1, step 1). Following fixation of cells (fig. 1, step 2), cellular DNA is partially digested by nuclease treatment (fig. 1, step 3). Next a peroxidase labeled antibody to BrdU (anti-BrdU-POD, Fab fragments) is added and binds to BrdU (fig. 1, step 4). In the final step, the peroxidase substrate is added. The peroxidase enzyme catalyses the cleavage of the substrate yielding a colored reaction product (see fig. 1, step 5). The absorbance of the sample can be determined using a microplate reader and is directly correlated to the level of BrdU incorporated into cellular DNA.

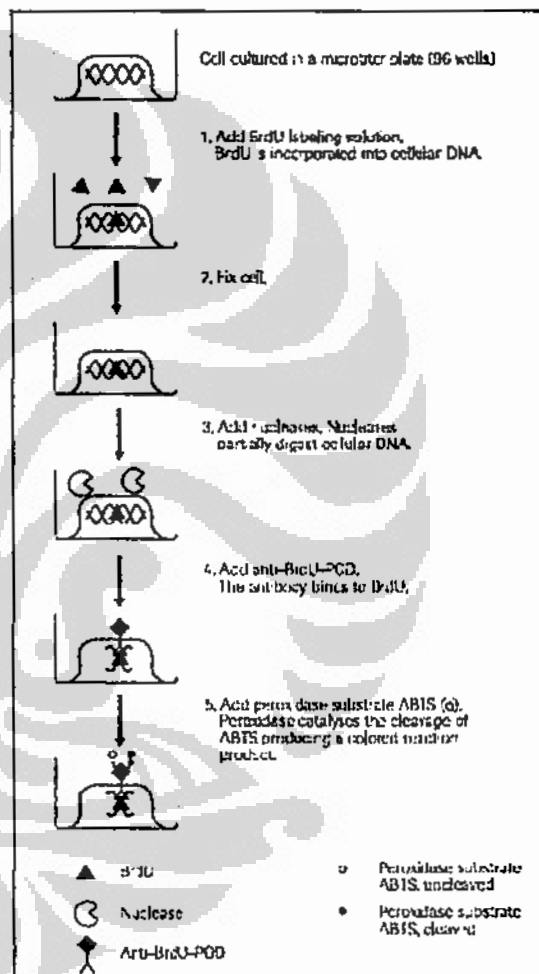


Fig. 1: BrdU Labeling and Detection Kit III: Assay principle.

8007114687740018

Roche



## II. Product description

- The kits contains:**
- BrdU labeling reagent (1000x)** (red flip-up-cap)  
One glass vial containing 1 ml 10 mM BrdU stock solution (1000x) in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4; sterile.
  - Washing buffer concentrate (10x)** (colorless screw-cap)  
One plastic bottle containing 125 ml PBS, 10x concentrated.
  - Incubation buffer** (red screw-cap)  
One plastic bottle containing 125 ml 66 mM Tris buffer, 0.66 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-mercaptoethanol.
  - Nucleases** (blue screw-cap)  
One glass vial containing nucleases, stabilized, lyophilized.
  - Anti-BrdU-POD, Fab fragments** (yellow screw-cap)  
One glass vial containing anti-BrdU (monoclonal antibody, Fab fragments from mouse) conjugated with peroxidase (25 U), stabilized, lyophilized.
  - Substrate buffer** (green screw-cap)  
One plastic bottle containing 125 ml ABTS-substrate buffer (sodium perborate and citric acid/phosphate buffer).
  - ABTS-substrate** (green screw cap)  
One glass vial containing ABTS-substrate powder for 125 ml substrate buffer.
  - Substrate enhancer** (green screw-cap)  
One glass vial containing 125 mg substrate enhancer.

**Specificity** Anti-BrdU-POD, Fab fragments, specifically bind to 5-bromo-2'-deoxy-uridine and show cross-reactivity with 5-iodo-2'-deoxy-uridine (10%). The conjugate shows no cross-reactivity either with 5-fluoro-2'-deoxy-uridine nor any endogenous cellular components, such as thymidine or uridine. The antibody conjugate also binds to BrdU incorporated into cellular DNA.

**Stability** • Stable at +2 to +8°C.

## III. Application

The kit is designed for the quantitative determination of BrdU incorporated into cellular DNA using a 96-well microplate cell ELISA format.

**Assay principle** Cells grown in a microplate are incubated with 10 µM BrdU for about 2-18 h. The cells are fixed with 0.5 M ethanol/HCl, and are then incubated with nucleases to partially digest the DNA (29-32). This improves the accessibility of the BrdU for the detection by antibodies. Incorporated BrdU is detected with the monoclonal anti-BrdU-POD, Fab fragments, and the bound conjugate is visualized with the soluble chromogenic substrate ABTS and measured using an ELISA reader.

## IV. Working procedure

### Preparation of solutions

**Solution I. BrdU labeling solution**  
Dilute BrdU labeling reagent (vial 1) 1 : 99 with sterile PBS or culture medium (resulting concentration: 111 µM BrdU) [e.g., for one 96-well microplate containing 100 µl medium per well, dilute 12 µl BrdU labeling reagent (vial 1) with 1.068 ml sterile PBS].  
Note: The BrdU labeling solution should be prepared freshly before use. The undiluted BrdU labeling reagent (1000 x) is stable at +2 to +8°C for 6 months. It is stable stored in aliquots at -15 to -25°C.

### Solution II. Washing buffer

Dilute washing buffer concentrate (10x) (vial 2) 1 : 10 with redist. water [e.g., for one 96-well microplate dilute 9 ml washing buffer concentrate (10x) (vial 2) with 81 ml redist. water].

Note: If precipitates in Washing buffer, 10x conc. (Bottle 2) are visible, please incubate the bottle for 10 min at 37°C in a water bath before you prepare Solution II.

Washing buffer is used to

- prepare the anti-BrdU-POD, working solution (see solution Va).
- wash cells after incubation with anti-BrdU-POD.

Note: For all other washing steps use PBS or culture medium containing 10% serum [e.g., FCS (fetal calf serum)] to obtain reliable results.

### Solution III. Incubation buffer

Incubation buffer (bottle 3) is ready-to-use. Incubation buffer is used to dilute the nucleases.

### Solution IV. Nucleases, stock solution

Reconstitute the nucleases (vial 4) in 1.3 ml redist. water containing 50% glycerol (w/v).

### Solution IVa. Nucleases, working solution

Dilute nucleases, stock solution, 1 : 100 with incubation buffer (bottle 3) [e.g., for one 96-well microplate dilute 100 µl nucleases, stock solution (vial 4) with 9.9 ml incubation buffer (bottle 3)].

### Solution V. Anti-BrdU-POD, Fab fragments, stock solution

Dissolve anti-BrdU-POD, Fab fragments (vial 5) in 1.25 ml redist. water (final concentration: 20 U/ml).

### Solution Va. Anti-BrdU-POD, Fab fragments, working solution

Prepare anti-BrdU-POD, Fab fragments, working solution shortly before use. Dilute anti-BrdU-POD, Fab fragments, stock solution (solution V) 1 : 100 with washing buffer (solution II) supplemented with 10 mg/ml BSA (bovine serum albumin)\*. [e.g., for one 96-well microplate dilute 100 µl anti-BrdU-POD, Fab fragments, stock solution, with 9.9 ml PBS and BSA (final concentration: 200 µg/ml)].

### Solution VI. Peroxidase substrate

Dissolve the ABTS powder (vial 7) in substrate buffer (bottle 6) and stir at +15 to +25°C to obtain a clear solution.

### Solution VIa. Peroxidase substrate containing substrate enhancer.

If a low signal is expected, take an appropriate aliquot of substrate solution and add substrate enhancer (vial 8), 1 mg/ml and dissolve by stirring for 15 min at +15 to +25°C [e.g., for one 96-well microplate dissolve 10 mg substrate enhancer in 10 ml peroxidase-substrate (solution VI)].

Note: The substrate solution containing substrate enhancer is stable for only 4 h and should, therefore, be freshly prepared before use.

### Stability of solutions

Solution I must be prepared shortly before use.  
Solution II is stable at +2 to +8°C for 3 months.  
Solution III is stable at +2 to +8°C (see expiry date on the kit label).

Solution IV is stable for 6 months when stored at -15 to -25°C.

Solution IVa must be prepared shortly before use.

Solution V is stable at +2 to +8°C for 6 months. For long term storage it is recommended to store the solution in aliquots at -15 to -25°C.

Solution Va must be prepared freshly before use.

Solution VI is stable at +2 to +8°C for 2 months when stored protected from light. Solution VIa must be prepared freshly before use.

### Additional required reagents

Fixative: Ethanol p.a. (70%) in HCl (final concentration 0.5 M) [e.g., for one 96-well microplate dilute 14 ml ethanol p.a., 100% with 4.66 ml redist. water and add 1.34 ml HCl p.a., 25%]. Before use precool and store fixative at -15 to -25°C.

Washing medium, PBS or culture medium containing 10% serum [e.g., FCS (fetal calf serum)].

## V. Assay procedure

### A. Adherent cells

- Culture cells in microplates (tissue culture grade, 96 wells, flat bottom) in a final volume of 100  $\mu$ l culture medium per well according to the media needs of the cells. In a humidified atmosphere (e.g. 37°C, 6.5% CO<sub>2</sub>). The incubation period of the cell cultures depends on the particular experimental approach and on the cell line used for the assay. For most experimental setups, an incubation of cell culture for 24 to 96 h is appropriate.
- Add 10  $\mu$ l BrdU labeling solution (solution I) per well (final concentration: 10  $\mu$ M BrdU) and incubate for 2 – 18 h at 37°C.

Note

- Add 10  $\mu$ l BrdU labeling solution (solution I) per well to suspension cells grown in 100  $\mu$ l culture medium (final concentration: 10  $\mu$ M BrdU) and incubate for 2-18 h at 37°C.

Note

For most application 2 – 6 h are appropriate. The optimal incubation time has to be determined experimentally.

For most application 2-6 h are appropriate. The optimal incubation time has to be determined experimentally.

- Carefully remove the culture medium containing the labeling solution by suction and carefully wash cells twice with 250  $\mu$ l wash medium containing 10% serum per well.
- Carefully remove wash medium after the last wash and fix cells with 200  $\mu$ l precooled fixative per well for 30 min at –15 to –25°C.
- Carefully remove fixative and wash cells 3 times with 250  $\mu$ l wash medium containing 10% serum per well.
- Remove wash medium carefully after the last wash and incubate cells with 100  $\mu$ l nucleases working solution per well for 30 min at 37°C.

Note

- Remove labeling medium carefully using a cannula. To avoid loss of cells it is essential to spin down the cells for 10 min at 300x g in a centrifuge, which has a rotor device for microplates, before removing labeling medium! Suspension cells should not be washed prior to drying and fixation. Excess of BrdU will be readily removed by washing after fixation.
- Let cells dry to the bottom of the microplate for approx. 2 h at 50°C.
- Fix cells with 200  $\mu$ l precooled fixative per well for 30 min at –20°C (after fixation cells should be tightly attached to the bottom of the microplate) and remove fixative.
- Wash cells 3 times with 250  $\mu$ l wash medium containing 10% serum per well and remove wash medium.
- Incubate cells with 100  $\mu$ l nucleases working solution (solution IVa) per well for 30 min at 37°C.

Note

We recommend to perform the nucleases incubation step in the absence of CO<sub>2</sub>, e.g. using a water bath.

We recommend to perform the nucleases incubation step in the absence of CO<sub>2</sub>, e.g. using a water bath.

- Remove nucleases working solution (solution IVa) and wash cells 3 times with 250  $\mu$ l wash medium containing 10% serum per well.
- Remove wash medium after the last wash, add 100  $\mu$ l of anti-BrdU-POD, Fab fragments, working solution (solution Va) per well and incubate for 30 min at 37°C.
- Remove antibody conjugate and wash 3 times with 250  $\mu$ l washing buffer (solution II) per well.
- Carefully remove washing buffer after the last wash. Add 100  $\mu$ l peroxidase substrate without (solution VI) or with substrate enhancer (solution VIa) per well. Incubate at room temperature until positive samples show a green color, and is clearly distinguishable from the color of pure peroxidase substrate (2-30 min).
- Measure extinction of the samples in a microplate reader at 405 nm with a reference wavelength at approx. 490 nm (e.g. EAR 340 ATTC, SLT LabInstruments).

Notes

- Remove nucleases working solution and wash cells 3 times with 250  $\mu$ l wash medium containing 10% serum per well.
- Carefully remove wash medium after the last wash. Add 100  $\mu$ l of anti-BrdU-POD, Fab fragments, working solution (solution Va) per well and incubate for 30 min at 37°C.
- Remove antibody conjugate and wash 3 times with 250  $\mu$ l washing buffer (solution II).
- Carefully remove washing buffer after the last wash. Add 100  $\mu$ l peroxidase substrate without (solution VI) per well or with substrate enhancer (solution VIa) per well. Incubate at room temperature until positive samples show a green color, and is clearly distinguishable from the color of pure peroxidase substrate (2 – 30 min).
- Measure extinction of the samples in a microplate reader at 405 nm with a reference wavelength at approx. 490 nm (e.g. EAR 340 ATTC, SLT LabInstruments).

Notes

- To obtain reliable results it is essential to perform all washing steps with PBS or cell culture medium containing 10% serum [e.g. fetal calf serum (FCS)]. Washing of cells with serum-free media or washing buffer (solution II) before fixation should be avoided.
- If for the initial incubation of the cells a larger volume of culture medium is required, increase the amount of BrdU labeling solution correspondingly (e.g. 20  $\mu$ l BrdU labeling solution, when cells are cultured in 200  $\mu$ l medium).
- In case the assay cannot be performed within one day, wash wells after fixation as described. Remove wash medium and store the microplates overnight without buffer at 2-8°C. To continue the assay, wash once with 250  $\mu$ l washing medium and proceed by adding the nucleases working solution (solution IVa) as described.

- To obtain reproducible results it is essential to perform all washing steps with PBS or cell culture medium containing 10% serum [e.g. fetal calf serum (FCS)]. Washing of cells with serum-free media or washing buffer (solution II) before fixation causes cell clumping during fixation and should therefore be avoided.

- If for the initial incubation of the cells a larger volume of culture medium is required, increase the amount of BrdU labeling solution correspondingly (e.g. 20  $\mu$ l BrdU labeling solution, when cells are cultured in 200  $\mu$ l culture medium).

- In case the assay cannot be performed within one day, wash wells after fixation as described. Remove wash medium and store the microplates overnight without buffer at +2 to +8°C. To continue the assay, wash once with 250  $\mu$ l washing medium and proceed by adding the nucleases working solution (solution IVa) as described.

### B. Suspension cells

- Culture cells in microplates (tissue culture grade, 96 wells, flat bottom) in a final volume of 100  $\mu$ l culture medium per well according to the media needs of the cells. In a humidified atmosphere (e.g. 37°C, 6.5% CO<sub>2</sub>). The incubation period depends on the particular experimental approach and on the cell line, used for the assay. For most experimental setups, an incubation of the cell for 24 to 96 h is appropriate.

## VI. Examples

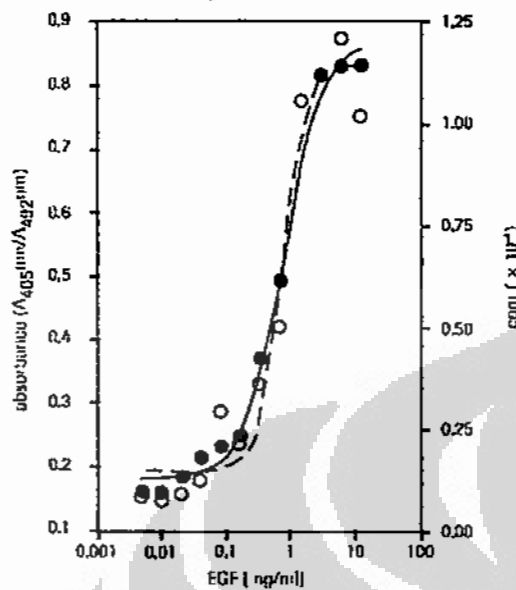
**A. Adherent cells** AKR-2B cells (mouse fibroblast cell line) to determine epidermal growth factor (EGF) activity (see fig. 2).


Fig. 2: Proliferation of AKR-2B cells (mouse fibroblast cell line) in response to recombinant human epidermal growth factor (hEGF) using the procedure described (see section VI.A) (O), or the  $[^3\text{H}]$ -thymidine method (●, dashed line), respectively.

## Reagents

- Culture medium, e.g. McCoy 5 A containing 25% FCS (fetal calf serum) (v/v) and 2 mM L-glutamine. If an antibiotic is to be used, further supplement media with penicillin/streptomycin\* or gentamicin\*.
- Synchronisation medium, e.g. MCDB-402.
- EGF, human, recombinant\*.
- Insulin, human, recombinant\*.
- BSA (for cell culture)\*.
- BrdU Labeling and Detection Kit III.

## Procedure

- Seed  $5.0 \times 10^3$  AKR-2B cells in 100  $\mu\text{l}$  culture medium per well of a microplate (96 wells, tissue culture grade, flat bottom). Incubate cells for approx. 4 days at 37°C and 6.5%  $\text{CO}_2$ .
- When cells are grown to confluency carefully remove culture medium.
- Add 200  $\mu\text{l}$  synchronisation medium per well. Incubate cells for 2 days at 37°C and 6.5%  $\text{CO}_2$ .
- Carefully remove synchronisation medium. Add 50  $\mu\text{l}$  fresh synchronisation medium containing 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  insulin per well. Incubate for 2 h at 37°C and 6.5%  $\text{CO}_2$ .
- Add various amounts of recombinant human EGF in a volume of 50  $\mu\text{l}$  synchronisation medium containing 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  insulin and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA. (Final concentration of EGF e.g. 0.01–100  $\text{ng}/\text{ml}$ ). Incubate for 18 h at 37°C and 6.5%  $\text{CO}_2$ .
- Add 10  $\mu\text{l}$  BrdU labeling solution and incubate for 2 h at 37°C and 6.5%  $\text{CO}_2$ .
- Proceed as described in section V (assay procedure).

## B. Suspension cells

7TD1 cells (mouse-mouse hybridoma) to determine the activity of human interleukin-6 (hIL-6) (see fig. 3)

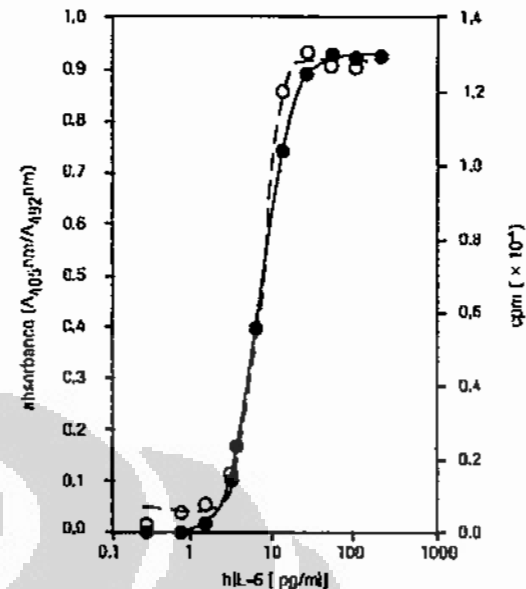


Fig. 3: Proliferation of 7TD1 cells (mouse-mouse hybridoma) in response to recombinant human interleukin-6 (hIL-6) using the procedure described (see section VI.B) (O), or the  $[^3\text{H}]$ -thymidine method (●, dashed line), respectively.

## Reagents

- Culture medium, e.g. DMEM containing 10% heat inactivated FCS (fetal calf serum), 2 mM L-glutamine, 0.55 mM L-arginine, 0.24 mM L-asparagine-monohydrate, 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol, HT-media supplement (1x) containing 0.1 mM hypoxanthine, and 16  $\mu\text{M}$  thymidine. If an antibiotic is to be used, further supplement media with penicillin/streptomycin\* or gentamicin\*.
- Interleukin-6, human, recombinant (200 000 U/ml; 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )\*.
- BrdU Labeling and Detection Kit III.

## Procedure

- Seed 7TD1 cells at a concentration of  $4 \times 10^3$  cells/well in 100  $\mu\text{l}$  culture medium containing various amounts of IL-6 [final concentration e.g. 0.1–100 U/ml (0.001–1  $\text{ng}/\text{ml}$ )] into microplates (tissue culture grade, 96 wells, flat bottom). Incubate cell cultures of 4 days at 37°C and 6.5%  $\text{CO}_2$ .
- Add 10  $\mu\text{l}$  BrdU labeling solution and incubate for 2 h at 37°C and 6.5%  $\text{CO}_2$ .
- Proceed as described in section V (assay procedure).

## Notes

- Steps 1a and 3a are only to be performed with suspension cells.
- If for the initial incubation of the cells a larger volume of culture medium is required, increase the amount of BrdU labeling solution correspondingly (e.g. 20  $\mu\text{l}$  BrdU labeling solution, when cells are cultured in 200  $\mu\text{l}$  culture medium).
- In case the assay cannot be performed within one day, wash wells after fixation as described. Remove wash medium and store the microplates overnight without buffer at +2 to +8°C. To continue the assay, wash once with 250  $\mu\text{l}$  washing medium and proceed by adding the nucleases working solution (solution IVa) as described.
- Suspension cells should not be washed prior to drying and fixation. Excess of BrdU will be readily removed by washing after fixation.

### BrdU Labeling and Detection Kit III Flow chart

Step	Procedure	Vol./well	Time	Temp. (°C)
	Culture cells in 96-well microplates (tissue culture-grade, flat-bottom)	100 µl	24-96 h	37°C
		see: Notes		
1	Add BrdU labeling solution (solution I) to the culture medium	10 µl	2 - 18 h	37°C
1a	Centrifuge suspension cells at 300 g using a rotor device for centrifugation of microplates	—	10 min	15 - 25°C
2	Discard labeling medium. In case of suspension cells, carefully remove labeling medium using a canula.	—	—	—
3	Wash adherent cells 2 times with culture medium with 10% serum	250 µl per wash	—	—
3a	Air dry suspension cells in an incubator. Do not wash suspension cells prior to drying to avoid loss of cells	—	2 h	60°C
4	Add precooled fixative	200 µl	30 min	-15 to -25°C
5	Discard fixative, wash wells 3 times with wash medium with 10% serum	250 µl per wash	—	—
6	Add nucleases (solution IVa)	100 µl	30 min	37°C
7	Discard nucleases, wash wells 3 times with wash medium with 10% serum	250 µl per wash	—	—
8	Add anti-BrdU-POD (solution Va)	100 µl	30 min	37°C
9	Discard conjugate solution wash 3 times with washing buffer (solution II)	250 µl per wash	—	—
10	Add POD substrate without (solution Vb) or with substrate enhancer (solution Vc)	100 µl	2 - 30 min	15 - 25°C
11	Measure absorbance using an ELISA reader at 405 nm with a reference wavelength at approx. 490 nm	—	—	—

### References

- Gutzmer, H. G. (1982) *Science* 218, 474-475.
- Vanderbon, M. & Thomas, C. B. (1985) *Cytometry* 6, 501-505.
- Ganschow, N. J. et al. (1985) *Cytometry* 6, 505-512.
- Millic, M. R. et al. (1987) *J. Immunol.* 138, 1791-1795.
- Miltenberger, H. G., Socher, G. & Schiffermann, M. (1987) *Deutscher Biol. Standard* 65, 91-99.
- Moroy, G. et al. (1982) *J. Clin. Invest.* 72, 1644-1650.
- Hoshino, T. et al. (1986) *Cytometry* 6, 627-632.
- Moroy, G. et al. (1986) *J. Histochem. Cytochem.* 35, 667-701.
- Schulte, B. et al. (1987) *J. Histochem. Cytochem.* 35, 371-374.
- Schulte, B. et al. (1987) *J. Histochem. Cytochem.* 35, 1943-1945.
- Dolbener, F. et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5573-5577.
- Raza, A. & Pridmore, H. D. (1984) *BioTechniques* 2, 262-268.
- Dean, P. M. et al. (1984) *Cell Tissue Res.* 17, 427-435.
- Quindt, M. (1985) *Cytometry* 6, 507-601.
- Raza, A. et al. (1985) *Canc. Res.* 45, 2283-2287.
- Raza, A. et al. (1985) *Cytometry* 6, 633-640.
- Wilson, G. D. et al. (1985) *Cytometry* 6, 541-547.
- Moroy, G. et al. (1985) *Exp. Hematol.* 13, 289-294.
- Pool, C. (1985) *J. Immunol.* 137, 2115-2121.
- Schulte, B. et al. (1987) *Cytometry* 8, 372-376.
- Pool, C. & Vassour, F. (1987) *J. Immunol.* 142, 8260-8277.
- Mosemann, T. (1983) *J. Immunol. Methods* 65, 65-83.
- Scudiero, P. A. et al. (1988) *Cancer Res.* 48, 4827-4833.
- Faull, K. D. et al. (1988) *J. Histochem. Cytochem.* 25, 911-914.
- Moguel, J. P., Sargent, I. & Wilson, D. Y. (1988) *J. Immunol. Methods* 106, 85-100.
- Muir, D., Varon, S. & Montbarge, M. (1987) *Anal. Biochem.* 165, 377-382.
- Huang, P. L. T. et al. (1991) *J. Immunol. Methods* 140, 243-248.
- Ehrhart, J. & Dorow, P. (1985) *Cytometry* 6, 513-520.
- Moran, R. et al. (1985) *J. Histochem. Cytochem.* 33, 821-827.
- Dolbener, F. et al. (1985) *Cytometry* 6, 521-530.
- Ganschow, N. J. et al. (1985) *J. Immunol. Methods* 82, 87-101.
- Eyer, J. A. et al. (1990) *J. Immunol. Methods* 132, 13-24.

### 7. Related Products

Parameter	Detection by	Products	Cat. No.
BrdU labeling of proliferating cells	In situ assay	BrdU Labeling and Detection Kit I	11 258 736 001
		BrdU Labeling and Detection Kit II	11 259 954 001
	BrdU Labeling and Detection Kit III	11 444 911 001	
		In Situ Cell Proliferation Kit, FLUOS	11 918 740 001
	ELISA	Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	11 847 229 001
		Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)	11 689 915 001
	Single reagents for in situ assays and ELISA applications	Anti-BrdU formalin grade	11 170 578 001
		Anti-BrdU -Fluorescein, formalin grade	11 202 693 001
		Anti-BrdU -Peroxidase, Fab fragments, formalin grade	11 585 890 001
		RbDenat	11 758 764 001
Measurement of metabolite activity	Quantification in microplate	Cell Proliferation Kit I (MTT)	11 465 007 001
		Cell Proliferation Kit II (XTT)	11 465 015 001
		Cell Proliferation Reagent WST-1	11 644 807 001

\* available from Roche Applied Science  
ABTS is a trademark of Roche.

### Changes to previous version:

Working procedure:  
Addition of preparing Solution II, Washing buffer

### Contact and Support

To ask questions, solve problems, suggest enhancements or report new applications, please visit our Online Technical Support Site at

[www.roche-applied-science.com/support](http://www.roche-applied-science.com/support)

To call, write, fax, or email us, visit the Roche Applied Science home page, [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com), and select your home country. Country-specific contact information will be displayed. Utilize the Product Search function to get access to Pack Inserts and Material Safety Data Sheets.



## Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH  
Roche Applied Science  
68298 Mannheim  
Germany



# UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat

Pos Box 1358 Jakarta 10430

Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, 3153236, Fax. : 31930372, 3157288, e-mail : office@fk.ui.ac.id

NOMOR : 02 IPT02.FK/ETIK/2010

## KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

### ETHICAL — CLEARANCE

Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:  
*The Committee of The Medical research Ethics of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled:*

**"Pengaruh Pemberian Ekstrak Akar Acalypha Indica Linn (Akar Kucing) Terhadap Neurogenesis Pada Kultur Jaringan Hipokampus Mencit Pasca Hipoksia".**

**Peneliti Utama** : dr. Sophia Yolanda  
*Name of the principal investigator*

**Nama Institusi** : Program Megister Ilmu Biomedik FKUI  
Kekhususan Fisiologi

dan telah menyetujui protocol tersebut di atas. *valuasi and approved the above mentioned proposal.*

Jakarta, 7 Januari 2010



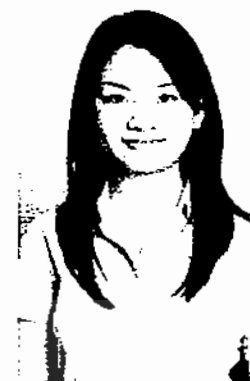
Chairman  
Ketua

Prof. Dr. dr. Agus Firmansyah, SpA(K)

**-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.**

## RIWAYAT HIDUP

Nama : Sophie Yolanda  
 NPM : 0706304454  
 Tempat, Tanggal Lahir : Jakarta, 21 Januari 1982  
 Jenis Kelamin/Status : Perempuan/Menikah  
 Agama : Katolik  
 Alamat Tinggal : Taman Aries B2/21, Jakarta Barat  
 E-mail : sophiehijau@yahoo.com  
 Pekerjaan : Staf Pengajar Departemen Fisiologi Kedokteran FKUI  
 Sumber Dana : RUUI 2009



### RIWAYAT PENDIDIKAN FORMAL

Nama Sekolah	Tahun
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia	2000-2006
SMUK Sang Timur Jakarta	1997-2000
SLTPK Sang Timur Jakarta	1994-1997
SDK Sang Timur Jakarta	1988-1994
TK Petra Jakarta	1986-1988


### RIWAYAT PENELITIAN

Judul	Tahun
Pengetahuan, Sikap dan Perilaku tentang Sarapan Pagi pada Siswa SLTPN 1	2004

### RIWAYAT PEKERJAAN

Institusi	Posisi	Tahun
Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Rumah Sakit Umum Tangerang, Rumah Sakit Persahabatan, Klinik Dokter Keluarga Kiara, Puskesmas Rawamangun	Magang	2004-2006
Departemen Ilmu Fisiologi FKUI	Staf Pengajar	2006-sekarang
Klinik SamMarie	Dokter Umum	2007-sekarang

Jakarta, 14 Mei 2010

  
 (Sophie Yolanda)

## Draft Artikel Majalah Kedokteran Indonesia

### Pengaruh ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn (akar kucing) terhadap neurogenesis pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia

Nurhadi Ibrahim\*, Endang Winiati Bachtiar<sup>^</sup>, Sophie Yolanda\*

\* Departemen Fisiologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

<sup>^</sup> Departemen Oral Biology Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia

Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita *stroke* terbesar di Asia. Terapi neurorestoratif akan meningkatkan neurogenesis pada jaringan otak iskemik pasca *stroke*. Neurogenesis dengan mobilisasi populasi sel punca dewasa endogen yang sudah ada secara fisiologis di sistem saraf pusat dapat ditingkatkan dengan cara menurunkan respon inflamasi. Tanaman akar kucing (*Acalypha indica* Linn) dapat dijumpai di setiap daerah di Indonesia. Rebusan akar kucing dapat memulihkan kelumpuhan saraf akibat *stroke*. Acalyphin dan stigmasterol yang terkandung dalam akar kucing bersifat anti inflamasi dengan membentuk kompleks inhibitor PLA<sub>2</sub>. Tujuan penelitian adalah mengamati pengaruh pemberian ekstrak air akar kucing terhadap neurogenesis pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia. Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vitro* pada kultur primer jaringan sel saraf tikus *Sprague Dowley* dewasa yang dipajankan terhadap hipoksia dengan gas 5% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> balans selama 24 jam. Selain kelompok kontrol, ekstrak air *Acalypha indica* Linn ditambahkan pada sel saraf pasca hipoksia pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL. Setelah inkubasi selama 90 jam, tingkat neurogenesis diukur dengan MTT untuk viabilitas relatif sel dan BrdU untuk proliferasi sel. Didapatkan hasil viabilitas relatif sel dan tingkat proliferasi sel pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia dengan pemberian ekstrak air akar kucing pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kontrol. Disimpulkan bahwa ekstrak air *Acalypha indica* Linn dapat meningkatkan neurogenesis pasca hipoksia *in vitro* pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL.

**Kata kunci:** neurogenesis, hipoksia, *Acalypha indica* Linn (akar kucing)

### The influence of *Acalypha indica* Linn root water extract towards neurogenesis in hippocampal tissue culture post hypoxia

Nurhadi Ibrahim\*, Endang Winiati Bachtiar<sup>^</sup>, Sophie Yolanda\*

\* Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Indonesia

<sup>^</sup> Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, University of Indonesia

Indonesia has the biggest stroke patients in Asia. Neurorestorative therapy will increase neurogenesis in ischemic brain tissue post stroke. Neurogenesis by mobilization of endogen adult stem cells that physiologically already exist in the central nervous system can be achieved by lowering the inflammatory response. *Acalypha indica* Linn (*akar kucing*) can be found all over Indonesia. The decoction of the root can cure the paralysis caused by stroke. Acalyphin and stigmasterol contained within the root is anti-inflammatory by forming a PLA<sub>2</sub> inhibitory complex. The objective of this study is to observe the influence of *Acalypha indica* Linn root water extract towards neurogenesis in hippocampal tissue culture post hypoxia. The method was an experimental *in vitro* study using primary neuronal cell culture of adult *Sprague Dowley* rat exposed to hypoxia with 5% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> balance gas for 24 hours. Except the control group, *Acalypha indica* Linn root water extract is added with dosage of 10 mg/mL, 15 mg/mL, and 20 mg/mL. After 90 hours of incubation, neurogenesis is measured MTT assay for relative cell viability and BrdU for cell proliferation. The result obtained was that relative cell viability and cell proliferation of rat hippocampal tissue culture with *Acalypha indica* Linn root water extract with dosage of 10 mg/mL, 15 mg/mL, and 20 mg/mL is significantly higher than control. It can be concluded that *Acalypha indica* Linn root water extract with dosage of 10 mg/mL, 15 mg/mL, and 20 mg/mL can increase neurogenesis post hypoxia *in vitro*.

**Keywords:** neurogenesis, hypoxia, *Acalypha indica* Linn

## Pendahuluan

*Stroke* merupakan salah satu penyebab utama kematian dan kecacatan di Amerika Serikat.<sup>1</sup> Di Indonesia belum ada angka pasti insidens *stroke*, namun dari salah satu artikel disebutkan bahwa saat ini Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita *stroke* terbesar di Asia.<sup>2</sup> Apabila tidak ada upaya penanggulangan *stroke* yang lebih baik maka jumlah penderita *stroke* pada tahun 2020 diprediksikan akan meningkat 2 kali lipat.<sup>2</sup> Secara umum *stroke* diklasifikasikan menjadi *stroke* hemoragik dan *stroke* iskemik. *Stroke* hemoragik terjadi bila terdapat perdarahan intrakranial yang paling sering disebabkan oleh kebocoran pembuluh darah pada hipertensi,<sup>3</sup> sedangkan *stroke* iskemik akut disebabkan oleh thrombosis atau emboli.<sup>1</sup>

Saat ini terapi utama untuk *stroke* iskemik adalah pemberian trombolitik,<sup>1</sup> sebab inilah satu-satunya pendekatan terapi yang menunjukkan peningkatan fungsi neurologis.<sup>4</sup> Sayangnya, jendela terapeutik untuk terapi ini sangat singkat, yaitu 3 jam,<sup>1</sup> sehingga sebagian besar pasien *stroke* iskemik tidak dapat diterapi dengan pemberian trombolitik karena sempitnya jendela terapeutik.<sup>5</sup> Selain itu, terapi ini juga memiliki risiko transformasi hemoragik, sehingga hanya 2% penderita *stroke* di Amerika yang mendapatkan terapi ini.<sup>4,5,6</sup> Karena itulah diperlukan terapi yang memiliki jendela terapi yang lebih lama dan secara aktif meningkatkan fungsi neurologis untuk mengembalikan dan mengoptimalkan fungsi otak, yaitu terapi neurorestoratif.<sup>4,5,6</sup>

Terapi neurorestoratif akan meningkatkan perkembangan sel-sel saraf baru (neurogenesis) pada jaringan otak iskemik pasca *stroke*.<sup>5</sup> Pada sebagian besar otak mamalia dewasa, terdapat sel-sel punca (*stem cells*) yang dapat memperbaharui diri pada regio-regio otak tertentu, yaitu pada zona subgranular (SGZ) girus dentata (DG) hipokampus dan zona subventrikular (SVZ) ventrikel lateral.<sup>4,7,8,9,10</sup> Sel-sel punca ini dapat memperbaharui diri sepanjang kehidupan, sehingga kemampuan neurogenesis tetap ada pada otak dewasa, dan dapat distimulasi baik dengan berbagai faktor fisiologis maupun patologis seperti hipoksia.<sup>9,10,11</sup> Neurogenesis dapat diukur dengan berbagai cara, namun cara yang umum adalah dengan menghitung viabilitas sel, misalnya dengan hitung sel menggunakan metode *trypan blue* atau MTT, dan dengan menganalisis proliferasi sel, misalnya dengan menggunakan pemeriksaan BrdU.

Berbagai percobaan telah membuktikan kemampuan neurogenesis otak dewasa pasca hipoksia serebri, antara lain oleh Jiang *et al*<sup>7</sup>, Jin *et al*<sup>8</sup>, Tanaka *et al*<sup>9</sup>, dan Yagita *et al*<sup>10</sup>. Semua penelitian tersebut menunjukkan peningkatan neurogenesis pada otak dewasa yang mengalami hipoksia dibandingkan kontrol. Pada manusia, neurogenesis yang diinduksi oleh *stroke* telah dilaporkan oleh Jin *et al*<sup>11</sup>. Walaupun terdapat peningkatan neurogenesis secara alamiah pasca hipoksia serebral, namun peningkatan ini tidak sebanding dengan kerusakan yang telah terjadi.<sup>12</sup>

Salah satu penyebab kematian sel pada *stroke* adalah proses inflamasi.<sup>6,13</sup> Pada proses ini, terjadi aktivasi enzim fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) yang akan menghasilkan asam arakidonat (AA).<sup>14,15</sup> AA akan dimetabolisme melalui jalur *cyclooxygenase* (COX) yang akan mengubah AA menjadi prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), yang merupakan prekursor prostaglandin dan kemudian akan dimetabolisme menjadi berbagai eikosanioid. Seluruh eikosanioid ini akan meningkatkan permeabilitas sawar darah otak dan pada akhirnya menyebabkan edema otak.<sup>15</sup> Inflamasi telah terbukti mengganggu neurogenesis basal maupun pasca hipoksia.<sup>16,17</sup>

Salah satu pendekatan terapi neurorestoratif yang aman adalah dengan memobilisasi populasi sel punca dewasa endogen yang sudah ada secara fisiologis di sistem saraf pusat sehingga dapat berintegrasi dan berpartisipasi dalam sirkuit neural yang fungsional.<sup>18</sup> Mobilisasi sel punca ini dapat ditingkatkan dengan cara meningkatkan faktor pertumbuhan, menurunkan respon inflamasi, dan memperbaiki kondisi lingkungan



pasien.<sup>19</sup> Saat ini terapi neurorestoratif masih tergolong mahal dan sulit didapatkan di Indonesia.

Tanaman akar kucing atau *Acalypha indica* Linn merupakan tanaman perdu yang banyak tumbuh di pinggir jalan atau ladang yang tak terawat dan dapat dijumpai di setiap daerah di Indonesia dengan nama yang berbeda-beda, antara lain kucing-kucingan, bunga anting-anting, atau rumput bolong-bolong.<sup>20</sup> Tanaman ini dinamai akar kucing karena akarnya disenangi kucing yang sedang sakit. Beberapa saat setelah dimakan dimuntahkan kembali bersama isi perutnya, dan kucing tersebut akan tampak membaik. Atas dasar itulah pada awalnya masyarakat dengan coba-coba memanfaatkan rebusan akar kucing untuk mengobati dirinya saat menderita sakit perut. Secara tidak sengaja, ternyata rebusan akar kucing tersebut dapat memulihkan kelumpuhan saraf akibat *stroke*.<sup>20</sup>

Kandungan bahan aktif yang bermanfaat dari tanaman ini masih belum dapat diidentifikasi dengan baik. Beberapa bahan kimia yang telah berhasil diidentifikasi antara lain adalah *kaempferol* (flavonoid), *beta-sitosterol*, HCN, *gamma-sitosterol*, dan *Acalyphin*.<sup>21</sup> Nirmal *et al* telah membuktikan bahwa *Acalyphin* dan *stigmaterol* bersifat anti inflamasi dengan membentuk kompleks inhibitor PLA<sub>2</sub> yang merupakan prekursor inflamasi penting.<sup>22</sup> Seperti telah disebutkan di atas, penurunan respon inflamasi dapat meningkatkan mobilisasi sel punca dewasa yang sudah ada secara fisiologis di sistem saraf pusat.<sup>18,19</sup>

Efek neuroprotektor dan neuroterapinya telah dibuktikan oleh Purwaningsih *et al* secara *eks vivo* maupun *in vivo* pada dosis 15-20 mg/mL. Purwaningsih *et al* meneliti efek neuroprotektor dan neuroterapi akar kucing pada otot katak yang diberikan pelumpuh otot, dengan aktivitas listrik otot tersebut sebagai parameter yang diukur.<sup>20</sup> Pada susunan saraf pusat (SSP), efek neuroterapinya telah dibuktikan oleh Suswati secara *in vivo* pada dosis 400-500 mg/kgBB. Suswati meneliti efek neuroterapi akar kucing pada otak tikus pasca hipoksia serebri, dengan jumlah sel rusak pada hipokampus sebagai parameter yang diukur.<sup>23</sup>

Walaupun secara empiris tanaman ini telah dimanfaatkan untuk menyembuhkan kelumpuhan pada penderita pasca *stroke*, belum ada bukti ilmiah mengenai pengaruh ekstrak akar kucing terhadap neurogenesis sel-sel saraf pasca *stroke*. Oleh sebab diperlukan penelitian untuk mengetahui bagaimana pengaruh pemberian ekstrak akar kucing terhadap neurogenesis pasca hipoksia serebri secara *in vitro*.

## Metode

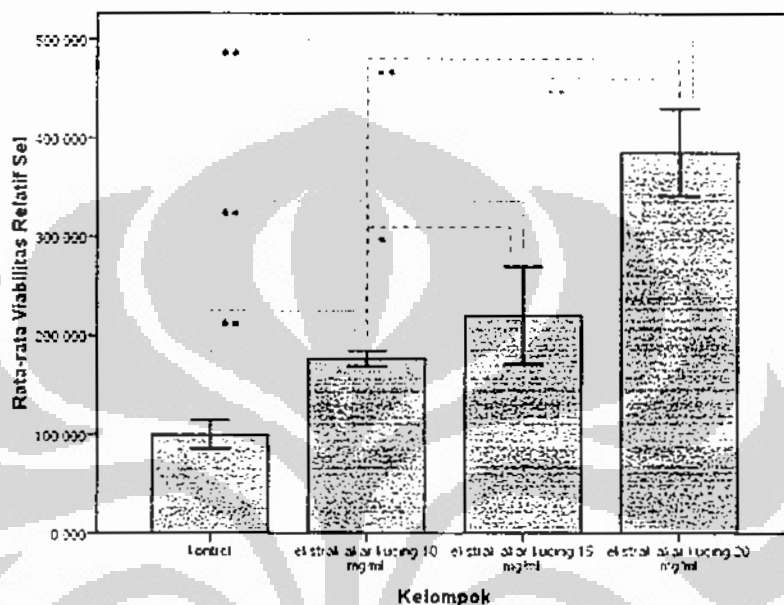
Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vitro* pada kultur jaringan sel saraf hipokampus tikus *Sprague Dowley* dewasa berusia 9-10 minggu dengan berat 200-250 gram. Tikus dikorbankan dengan cara dislokasi leher. Pengaruh ekstrak air *Acalypha indica* Linn pada sel saraf pasca hipoksia diujikan pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL. Sel saraf dipajankan terhadap hipoksia dengan cara pemberian gas 5% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> balans selama 24 jam.<sup>24</sup> Setelah pemajanan terhadap hipoksia, tiap kelompok kultur sel saraf diberikan ekstrak air *Acalypha indica* Linn dengan dosis 10 mg/mL (kelompok perlakuan A), 15 mg/mL (kelompok perlakuan B), dan 20 mg/mL (kelompok perlakuan C), dengan 1 kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan. Selanjutnya tingkat neurogenesis tiap kelompok perlakuan diukur dengan menggunakan 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) untuk viabilitas relatif sel dan dengan menggunakan 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) untuk proliferasi sel.<sup>25</sup>

## Hasil

Pemeriksaan MTT untuk mengukur viabilitas relatif sel dilakukan secara triplo. Didapatkan rata-rata viabilitas relatif sel pada kelompok kontrol sebesar 100±14,33%;

kelompok perlakuan A sebesar  $176,95 \pm 7,95\%$ ; kelompok perlakuan B sebesar  $220,62 \pm 49,47\%$ ; dan kelompok perlakuan C sebesar  $386,02 \pm 44,16\%$  (lihat Gambar 1).

Berdasarkan analisis data, didapatkan hasil viabilitas relatif sel setiap kelompok yang diberikan perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol, viabilitas relatif sel kelompok perlakuan B lebih tinggi secara bermakna daripada viabilitas relatif sel kelompok perlakuan A, dan viabilitas relatif sel kelompok perlakuan C lebih tinggi secara bermakna daripada viabilitas relatif sel kelompok perlakuan B (lihat Gambar 1).

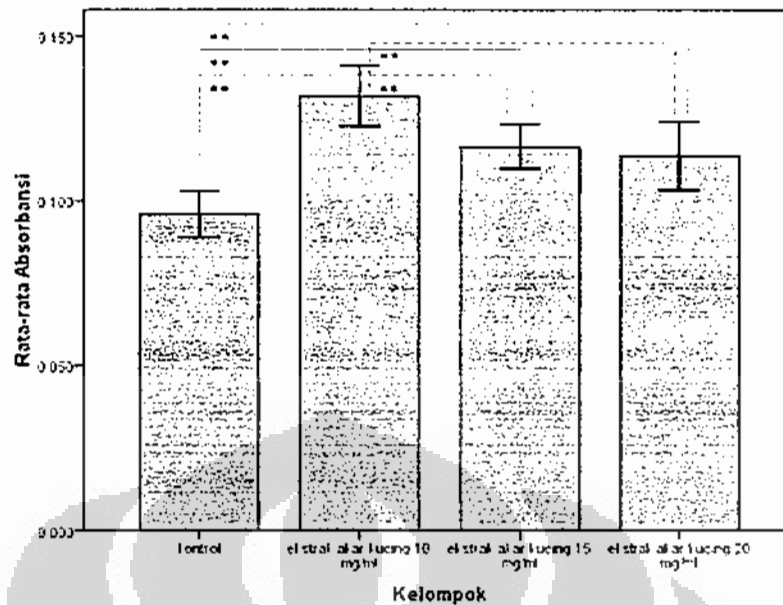


**Gambar 1. Rata-rata Viabilitas Relatif Sel**

\*  $p < 0,05$       \*\*  $p < 0,01$

Pemeriksaan BrdU untuk mengukur tingkat proliferasi sel dilakukan secara duplo. Didapatkan absorbansi pada kelompok kontrol sebesar  $0,096 \pm 0,007$ ; kelompok perlakuan A sebesar  $0,132 \pm 0,009$ ; kelompok perlakuan B sebesar  $0,117 \pm 0,007$ ; dan kelompok perlakuan C sebesar  $0,114 \pm 0,010$  (lihat Gambar 2).

Berdasarkan analisis data, didapatkan hasil tingkat proliferasi sel setiap kelompok yang diberikan perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol, dengan tingkat proliferasi sel paling tinggi terlihat pada kelompok perlakuan A, kemudian menurun secara bermakna pada kelompok perlakuan B dan C, namun tidak didapatkan perbedaan tingkat proliferasi sel yang bermakna antara kelompok perlakuan B dan C (lihat Gambar 2).



**Gambar 2. Rata-rata Absorbansi Pemeriksaan BrdU**

\*  $p < 0,05$       \*\*  $p < 0,01$

### Pembahasan

Hasil pemeriksaan MTT menunjukkan bahwa viabilitas relatif sel seluruh kelompok yang diberi perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibanding kontrol, dan viabilitas relatif sel juga terus meningkat secara bermakna sesuai dengan peningkatan dosis pemberian ekstrak akar kucing, bahkan hingga hampir 4 kali lipat pada dosis 20 mg/mL (viabilitas relatif sel kontrol < dosis 10 mg/mL < dosis 15 mg/mL < dosis 20 mg/mL). Hasil pemeriksaan ini menunjukkan bahwa ekstrak akar kucing berpengaruh pada peningkatan jumlah sel saraf yang hidup pasca hipoksia. Hasil pemeriksaan ini sesuai dengan penelitian Purwaningsih et al<sup>20</sup> di mana dosis neuroterapi optimal terlihat pada dosis 20 mg/mL. Walaupun penelitian Purwaningsih et al<sup>20</sup> menunjukkan bahwa pada dosis 25 mg/mL efek neuroterapi ekstrak akar kucing mulai menurun pada *neuromuscular junction*, namun hal ini belum tentu sesuai pada susunan saraf pusat. Makin tingginya viabilitas relatif sel sesuai peningkatan dosis menimbulkan kemungkinan bahwa pada dosis yang lebih tinggi lagi akan lebih meningkatkan viabilitas sel, sehingga penelitian untuk menilai pengaruh ekstrak akar kucing terhadap tingkat neurogenesis pada jaringan hipokampus pasca hipoksia dengan dosis ekstrak akar kucing yang lebih tinggi perlu dilakukan untuk mendapatkan dosis yang benar-benar optimal untuk peningkatan neurogenesis pasca hipoksia.

Hasil pemeriksaan MTT menunjukkan bahwa ekstrak akar kucing berpengaruh pada peningkatan jumlah sel saraf yang hidup pasca hipoksia, namun seluruh sel yang hidup ini dapat berasal dari sel-sel saraf baru hasil neurogenesis maupun dari sel-sel saraf lama yang bertahan hidup pasca hipoksia dan tidak mengalami apoptosis. Untuk itu diperlukan pemeriksaan lain yang dapat menilai tingkat proliferasi sel, sehingga digunakan pemeriksaan BrdU.

Hasil pemeriksaan BrdU menunjukkan bahwa tingkat proliferasi sel seluruh kelompok yang diberi perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibanding kontrol. Hasil pemeriksaan ini menunjukkan bahwa ekstrak akar kucing memiliki pengaruh pada tingkat proliferasi sel saraf pasca hipoksia. Dari hasil pemeriksaan, didapatkan bahwa tingkat proliferasi sel paling optimal pada dosis ekstrak akar kucing 10 mg/mL, dan kemudian menurun pada dosis 15 mg/mL dan 20 mg/mL, walaupun penurunannya masih lebih tinggi

dibandingkan kontrol. Fenomena ini kemungkinan disebabkan oleh 2 hal, yang pertama adalah bahwa memang tingkat proliferasi sel paling optimal pada dosis 10 mg/mL, sehingga tingkat viabilitas sel yang lebih tinggi pada dosis 15 mg/mL dan 20 mg/mL merupakan hasil dari sel-sel saraf lama yang bertahan hidup pasca hipoksia dan tidak mengalami apoptosis. Hal ini dapat terjadi karena dengan penurunan respon inflamasi yang disebabkan oleh penurunan aktivasi enzim PLA<sub>2</sub> oleh acalyphin dan stigmasterol, kejadian *respiratory burst* juga menurun dan produksi ROS juga menurun sehingga sel-sel lebih dapat bertahan hidup pasca hipoksia.<sup>6,26,27,28</sup> Selain itu, stigmasterol merupakan golongan fitosterol dengan aktivitas antioksidan yang juga dapat melawan produksi ROS dan pada akhirnya meningkatkan ketahanan hidup sel-sel saraf pasca hipoksia.<sup>29</sup> Aktivitas antioksidan dan kemampuan sebagai *scavenger* radikal bebas juga dimiliki oleh flavonoid yang terkandung dalam akar kucing.<sup>30</sup> Kemungkinan kedua adalah bahwa pada saat pemeriksaan, tidak semua sel-sel saraf baru hasil neurogenesis dapat diperiksa dengan pemeriksaan BrdU. Hal ini disebabkan karena meskipun BrdU merupakan nukleosida sintetik yang merupakan analog timidin, sehingga dapat diinkorporasikan ke dalam DNA yang baru disintesis oleh sel yang bereplikasi, namun inkorporasi ini hanya dapat terjadi bila sel berada dalam fase S.<sup>31</sup> Hal ini akan menyebabkan sel-sel baru yang telah mengalami proliferasi sebelumnya atau yang sedang akan mengalami proliferasi namun tidak sedang berada dalam fase S tidak dapat diperiksa dengan pemeriksaan BrdU ini. Untuk itu, penelitian dengan pemeriksaan BrdU secara serial dalam hal waktu (misalnya tiap 24 jam pasca hipoksia) perlu dilakukan untuk mendapatkan tingkat proliferasi sel yang sesungguhnya dan juga untuk mendapatkan gambaran tingkat proliferasi sel sesuai waktu. Selain itu, pemeriksaan dengan penanda proliferasi sel lain juga dapat dilakukan sebagai perbandingan dengan hasil BrdU, misalnya dengan pemeriksaan Ki-67 yang merupakan antigen protein nuklear umum yang diekspresikan pada sel yang berada pada fase G<sub>1</sub>, S, dan G<sub>2</sub>, sehingga mungkin pemeriksaan dengan Ki-67 dapat menunjukkan tingkat proliferasi sel yang lebih mendekati nilai yang sesungguhnya, namun memang penggunaannya sampai saat ini masih terbatas dan sebagian besar aplikasinya masih dilakukan pada sel manusia.<sup>31</sup>

Hipoksia akan menyebabkan terjadinya respon inflamasi melalui ekspresi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B yang akan meningkatkan ekspresi gen-gen sitokin (seperti TNF $\alpha$  dan IL-1), molekul adhesi (seperti ICAM-1), mediator inflamasi prostanoide, dan NO.<sup>6,27</sup> Enzim PLA<sub>2</sub> juga akan diaktifkan pada proses inflamasi ini dan menghasilkan AA, yang akan dimetabolisme melalui jalur COX dan mengubah AA menjadi PGH<sub>2</sub>, yang merupakan prekursor prostaglandin dan kemudian akan dimetabolisme menjadi berbagai eikosanoid. Seluruh eikosanoid ini akan meningkatkan permeabilitas sawar darah otak dan pada akhirnya menyebabkan edema otak.<sup>15</sup> Inflamasi telah terbukti mengganggu neurogenesis basal maupun pasca hipoksia.<sup>16,17</sup>

Peningkatan neurogenesis yang terjadi pada kelompok yang diberi perlakuan ekstrak akar kucing kemungkinan disebabkan oleh penghambatan aktivasi enzim PLA<sub>2</sub> yang akan menurunkan respon inflamasi, sehingga mobilisasi sel punca dewasa yang sudah ada secara fisiologis di sistem saraf pusat akan ditingkatkan dan pada akhirnya akan meningkatkan neurogenesis.<sup>18,19</sup> Mekanisme ini tidak diperiksa pada penelitian ini, sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk menilai apakah pengaruh ekstrak kucing terhadap peningkatan neurogenesis pasca hipoksia memang disebabkan oleh penghambatan aktivasi PLA<sub>2</sub> dengan membandingkan level PLA<sub>2</sub> antar kelompok perlakuan menggunakan penanda PLA<sub>2</sub>.

Selain melalui penurunan respon inflamasi, ekstrak akar kucing juga mungkin bekerja melalui peningkatan faktor neurotropik seperti BDNF, VEGF, dan bFGF. Seperti telah ditulis di atas, faktor neurotropik dibutuhkan untuk keberlangsungan hidup

neuroblast.<sup>4,32</sup> Mekanisme peningkatan neurogenesis yang disebabkan oleh ekstrak akar kucing melalui jalur ini belum pernah diteliti, sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk menilai apakah ekstrak kucing dapat meningkatkan neurogenesis pasca hipoksia melalui peningkatan faktor neurotropik dengan memeriksa kadar faktor pertumbuhan (misalnya BDNF) antar kelompok perlakuan.

### Kesimpulan

Ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn dapat meningkatkan neurogenesis kultur jaringan hipokampus tikus pada dosis 10 mg/mL, 15 mg/mL, dan 20 mg/mL.

### Daftar Pustaka

- <sup>1</sup> Becker JU. Stroke, ischemic [homepage on the internet]. 2008 [cited 2008 Sept 30]. Available from: URL: <http://www.emedicine.com/EMERG/topic558.htm>.
- <sup>2</sup> Tahun 2020, penderita stroke meningkat 2 kali. [homepage on the internet]. [cited 2008 Sept 30]. Available from: URL: <http://www.vastroki.or.id/read.php?id=319>.
- <sup>3</sup> Nassisi D. Stroke, hemorrhagic [homepage on the internet]. 2010 [cited 2010 Apr 22]. Available from: URL: <http://emedicine.medscape.com/article/793821-overview>.
- <sup>4</sup> Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Neurogenesis in the adult ischemic brain: generation, migration, survival, and restorative therapy. *Neuroscientist* [serial online]. 2005 [cited 2008 Oct 8]; 11: 408. Available from: URL: <http://nro.sagepub.com/cgi/content/abstract/11/5/408>.
- <sup>5</sup> Ding G, Jiang Q, Li L, Zhang L, Zhang ZG, Ledbetter KA, et al. Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodeling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* [serial online]. 2008 [cited 2008 Aug 24]; 28: 1440-8. Available from: [www.jcbfm.com](http://www.jcbfm.com).
- <sup>6</sup> Culmsee C, Kriegstein J. Ischaemic brain damage after stroke: new insights into efficient therapeutic strategies. *EMBO reports* [serial online]. 2007 [cited 2008 Aug 24]; 8: 129-33. Available from: Pubmed Central.
- <sup>7</sup> Jiang W, Gu WG, Brännström T, Rosqvist R, Wester P. Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* [serial online]. 2001 [cited 2008 Sept 30]; 32: 1201-7. Available from: URL: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/content/full/32/5/1201>.
- <sup>8</sup> Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *PNAS* [serial online]. 2001 [cited 2008 Aug 24]; 98(8): 4710-5. Available from: URL: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.081011098>.
- <sup>9</sup> Tanaka R, Yamashiro K, Mochizuki H, Cho N, Onodera M, Mizuno Y, et al. Stroke [serial online]. 2004 [cited 2008 Sept 30]; 35: 1454-9. Available from: <http://www.strokeaha.org>.
- <sup>10</sup> Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa K, Miyata T, Okano H, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* [serial online]. 2001 [cited 2008 Sept 30]; 32: 1890-6. Available from: <http://www.strokeaha.org>.
- <sup>11</sup> Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *PNAS* [serial online]. 2006 [cited 2008 Aug 24]; 103(35): 13198-202. Available from: URL: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0603512103>.
- <sup>12</sup> Borlongan CV, Hess DC. New hope for stroke patients: mobilization of endogenous stem cells. *CMAJ* [serial online]. 2006 [cited 2008 Aug 24]; 174(7): 954-5. Available from: [www.cmaj.ca](http://www.cmaj.ca).
- <sup>13</sup> Fawcett JW, Rosser AE, Dunnett, SB, editors. Metabolic damage. In: Fawcett JW, Rosser AE, Dunnett, SB, editors. *Brain damage, brain repair*. Oxford: Oxford University Press, 2001; p. 26-44.
- <sup>14</sup> Titsworth WL, Liu NK, Xu XM. Role of secretory phospholipase A<sub>2</sub> in CNS inflammation: implications in traumatic spinal cord injury. *CNS Neurol Disord Drug Targets* [serial online]. 2008 [cited 2010 Apr 11]; 7(3): 254-69. Available from: NIH Public Access.
- <sup>15</sup> Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* [serial online]. 2007 [cited 2008 Sept 30]; 184(1-2): 53-68. Available from: NIH Public Access.

- <sup>16</sup> Ek Dahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *PNAS* [serial online]. 2003 [cited 2008 Aug 24]; 100(23): 13632-7. Available from: URL: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2234031100>.
- <sup>17</sup> Taupin. Adult neurogenesis, neuroinflammation and therapeutic potential of adult neural stem cells. *Int J Med Sci* [serial online]. 2008 [cited 2008 Aug 24]; 5(3): 127-32. Available from: [www.medsci.org](http://www.medsci.org).
- <sup>18</sup> Haas S, Weidner N, Winkler J. Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol* [serial online]. 2005 [cited 2009 Feb 2]; 18: 59-64. Available from: Lippincott Williams & Wilkins.
- <sup>19</sup> Szentirmai O, Carter BS. Genetic and cellular therapies for cerebral infarction. *Neurosurgery* [serial online]. 2004 [cited 2009 Feb 2]; 55(2): 283-97. Available from: [www.neurosurgery-online.com](http://www.neurosurgery-online.com).
- <sup>20</sup> Purwaningsih EH, Ibrahim N, Zain H. Efek neuroprotektor dan neuroterapi ekstrak akar *Acalypha indica* Linn (akar kucing) secara *eks vivo* dan *in vivo*. Laporan akhir riset unggulan Universitas Indonesia; 2007.
- <sup>21</sup> Indian Medicinal Plants Growers' Consortium. *Acalypha indica* L [homepage on the internet]. 2007 [cited 2009 Jan 12]. Available from: [impgc.com](http://impgc.com).
- <sup>22</sup> Nirmal N, Praba GO, Velmurugan D. Modeling studies on phospholipase A<sub>2</sub>-inhibitor complexes. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* [serial online]. 2008 [cited 2009 August 31]; 45: 256-62. Available from: [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/1941/1/IJBB%2045\(4\)%20256-262.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/1941/1/IJBB%2045(4)%20256-262.pdf).
- <sup>23</sup> Suswati L. Perbaikan neuron hipokampus pasca hipoksia serebri dengan penggunaan ekstrak air tanaman akar kucing (*Acalypha indica* Linn). Tesis Magister Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2009.
- <sup>24</sup> Gozal E, Sachleben Jr LR, Rane MJ, Vega C, Gozal D. Mild sustained and intermittent hypoxia induce apoptosis in PC-12 cells via different mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* [serial online]. 2005 [cited 2010 Jan 20]; 288:535-42. Available from: [www.ajpcell.org](http://www.ajpcell.org).
- <sup>25</sup> Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *PNAS* [serial online]. 2002 [cited 2008 Aug 24]; 99(18): 11946-50. Available from: URL: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.182296499>.
- <sup>26</sup> Fawcett JW, Rosser AE, Dunnett, SB, editors. Metabolic damage. In: Fawcett JW, Rosser AE, Dunnett, SB, editors. Brain damage, brain repair. Oxford: Oxford University Press, 2001; p. 26-44.
- <sup>27</sup> Yi JH, Park SW, Kapadia R, Vemugati R. Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. *Neurochem Int* [serial online]. 2007 [cited 2008 Sept 30]; 50(7-8): 1014-27. Available from: NIH Public Access.
- <sup>28</sup> Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Costa G, et al. Neuroprotection by Flavinoids. *Braz J Med Biol Res* [serial online]. 2003 [cited 2008 Oct 9]; 36(12): 1613-20. Available from: PubMed Central.
- <sup>29</sup> Yasukazu Y, Etsuo N. Antioxidant effects of phytosterol and its components. *Journal of nutritional science and vitaminology* [serial online]. 2003 [cited 2010 Apr 16]; 49(4):277-80. Available from: [http://www.biomedexperts.com/Abstract.bme/14598915/Antioxidant\\_effects\\_of\\_phytosterol\\_and\\_its\\_components](http://www.biomedexperts.com/Abstract.bme/14598915/Antioxidant_effects_of_phytosterol_and_its_components)
- <sup>30</sup> Georgetti SR, Casagrande R, Di Mambro VM, Azzolini AECS, Fonseca MJV. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS PharmSci* [serial online]. 2003 [cited 2010 Apr 22]; 5(2):20. Available from: <http://www.pharmsci.org>.
- <sup>31</sup> Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissue with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem* [serial online]. 2003 [cited 2010 Apr 14]; 51:1681-8. Available from: [www.jhc.org](http://www.jhc.org).
- <sup>32</sup> Carmichael ST. Gene expression changes after focal stroke, traumatic brain and spinal cord injuries. *Curr Opin Neurol* [serial online]. 2003 [cited 2008 Sept 30]; 16: 669-704. Available from: Lippincott Williams & Wilkins.