

**PENGARUH EKSTRAK AKAR *ACALYPHA INDICA* LINN
TERHADAP VIABILITAS NEURON DAN KADAR BDNF
ENDOGEN PADA KEADAAN HIPOKSIA SECARA *IN VITRO***

TESIS

**JULIA RAHADIAN
NPM 0806419560**



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

**PENGARUH EKSTRAK AKAR *ACALYPHA INDICA* LINN
TERHADAP VIABILITAS NEURON DAN KADAR BDNF
ENDOGEN PADA KEADAAN HIPOKSIA SECARA *IN VITRO***

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
MAGISTER ILMU BIOMEDIK (M. Biomedik)**

**JULIA RAHADIAN
NPM: 0806419560**



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

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Julia Rahadian
NPM : 0806419560
Tanda Tangan :



Tanggal : 29 Mei 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Julia Rahadian
NPM : 0806419560
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Fisiologi
Judul Tesis : Pengaruh ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap viabilitas neuron dan kadar BDNF endogen pada keadaan hipoksia secara *in vitro*

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

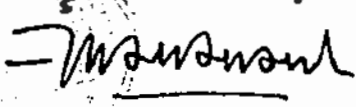
DEWAN PENGUJI

Pembimbing : dr. Nurhadi Ibrahim, PhD (Julia)
Pembimbing : drg. Dewi Fatma Suniarti, MS, PhD (Juf.)
Penguji I : Dr. drg. Sri Redjeki, MS (Sri)
Penguji II : Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc (Mamad)
Penguji III : Dra. Melva Louisa, Apt, M.Biomed (Melva)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : Juni 2010

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedis


Dr.ref.physiol.dr.Septelia Inawati Wanandi

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas anugerah dan berkat-Nya, saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini. Tesis ini dibuat dalam rangka memenuhi persyaratan untuk menyelesaikan Program Magister Ilmu Biomedik dengan kekhususan Fisiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Dalam kesempatan ini, saya 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. Dewi Fatma Suniarti, MS, 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) drg. Endang Winiati Bachtiar, MBiomed, PhD sebagai kepala laboratorium Biologi Oral FKG-UI. Terima kasih atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk dapat melakukan penelitian di laboratorium tersebut dan untuk bimbingannya selama penulis melakukan penelitian.
- (4) DR. drg. Sri Redjeki, MS yang telah banyak memberikan saran dan masukan sejak awal penulisan proposal.
- (5) DR. dr. Ratna Sitompul, SpM(K) sebagai dekan FKUI 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) Seluruh staf pengajar dan karyawan di Departemen Fisiologi FKUI. Terima kasih atas semua bantuan dan dukungannya selama penulis menjalani pendidikan S2.
- (8) dr. Sophie Yolanda sebagai rekan peserta Program Magister Ilmu Biomedik dan rekan penelitian yang telah membantu penulis selama penelitian.
- (9) Mbak Dessy dan Mbak Maisaroh atas bantuan dan bimbingannya selama penelitian di Laboratorium Biologi Oral FKG-UI.
- (10) dr. Satya Joewana, SpKJ(K) sebagai Dekan FKUAJ periode 2004-2008 dan dr. Felicia Kurniawan, MPH sebagai Dekan FKUAJ periode 2008-2012. dr. Ignatio Rika, SpKO sebagai kepala bagian Fisiologi FK Atmajaya, dr. Nawanto Agung, SpKO, dr. Jusuf Susanto, MS, dr. Monica A, dr. Mariani, dan dr. Glory C, staf Fsiologi FK Atmajaya. Terima kasih atas bantuan dan dukungan moril selama penulis menjalankan pendidikan S2 di FKUI.
- (11) Fakultas Kedokteran Unika Atma Jaya yang telah memberikan dukungan dan bantuan informasi dan inaterial selama masa studi dan penelitian.
- (12) Seluruh keluarga penulis, Papa, Mama, dan adik-adik yang tidak lelah memberikan dukungan dan doa untuk penyelesaian studi penulis.
- (13) Teman-teman yang tidak bisa disebutkan namanya satu persatu. Dan semua guru yang telah mendidik semenjak kecil hingga sekarang. Serta semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Sebagai akhir kata, 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 serta berharap agar tesis ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Jakarta, 29 Mei 2010

Julia Rahadian

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Julia Rahadian
NPM : 0806419560
Program Studi : Pasca Sarjana 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 akar *Acalypha indica* Linn terhadap viabilitas neuron dan kadar BDNF endogen pada keadaan bipoksia secara *in vitro*

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, 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 : 29 Mei 2010

Yang Menyatakan



(Julia Rahadian)

ABSTRAK

Nama : Julia Rahadian
Program studi : Magister Ilmu Biomedik
Judul : Pengaruh ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap viabilitas neuron dan kadar BDNF endogen pada keadaan hipoksia secara *in vitro*

Latar Belakang: Otak sangat sensitif terhadap kondisi kekurangan oksigen. Terhentinya suplai darah ke otak secara tiba-tiba, seperti yang terjadi pada hipoksia serebri yang diasosiasikan sebagai *stroke*, dapat berakibat fatal dan menyebabkan kematian sel-sel neuron otak dalam waktu beberapa menit. Hipoksia memicu serangkaian kaskade patologis yang disebabkan oleh eksitotoksisitas glutamat dan produksi berlebih radikal bebas yang selanjutnya memicu kaskade kematian sel. BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*), salah satu faktor yang berperan dalam mempertahankan kelangsungan hidup neuron, dilaporkan kadarnya menurun pada keadaan hipoksia. Seiring dengan meningkatnya kasus *stroke* serta prognosinya yang buruk, merupakan suatu kebutuhan untuk mencari bahan obat yang diharapkan dapat memblokir kaskade hipoksia sehingga kematian neuron dapat dicegah. Tanaman akar kucing atau *Acalypha indica* Linn adalah tanaman perdu liar yang banyak dijumpai di seluruh daerah di Indonesia dan secara tidak sengaja rebusan akarnya dapat memulihkan kelumpuhan akibat *stroke*. Senyawa flavonoid yang terkandung dalam tanaman akar kucing memiliki kemampuan antioksidan yang terbukti dapat mencegah kaskade kematian neuron.

Tujuan: Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak akar *Acalypha indica* Linn dalam memproteksi neuron tikus pada keadaan hipoksia.

Metode: Studi eksperimental *in vitro* pada kultur sel neuron jaringan hipokampus tikus *Sprague Dowley* dewasa yang dipajan dengan ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn pada dosis 10 mg/ml, 15 mg/ml, dan 20 mg/ml selama 72 jam. Kemudian seluruh sel diberi perlakuan hipoksia dengan gas 5% O₂/5% CO₂/N₂ balans selama 24 jam. Viabilitas sel diukur dengan MTT *assay*, tingkat proliferasinya diukur dengan BrdU dan kadar BDNF medium kultur diperiksa dengan metoda ELISA.

Hasil: Viabilitas relatif, tingkat proliferasi neuron dan kadar BDNF endogen pada kultur jaringan hipokampus tikus dengan pemberian ekstrak akar kucing pada dosis 10 mg/ml, 15 mg/ml, dan 20 mg/ml meningkat dibandingkan dengan kontrol.

Kesimpulan: Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn mampu meningkatkan viabilitas neuron serta kadar BDNF endogen pada keadaan hipoksia.

Kata kunci: *Acalypha indica* Linn, hipoksia, viabilitas neuron, BDNF

ABSTRACT

Name : Julia Rahadian
Study Program : Master Program of Biomedics Science
Title : The influence of *Acalypha indica* Linn root extract on the viability of neuron and endogenous BDNF level in hypoxic condition in vitro

Background: The brain is very sensitive to oxygen deprivation condition. Interruption of the blood supply to the brain suddenly, as happens on cerebral hypoxia is associated as a stroke, can be fatal and cause death of brain cells neurons within a few minutes. Hypoxia triggers a series of pathological cascade caused by the glutamate excitotoxicity and free radicals which in turn triggered a cascade of cell death. BDNF (Brain derived neurotrophic factor), is one of the factors maintaining the survival of neurons, is decreased during hypoxic conditions. The increase and a poor prognosis of stroke, represents a need to look for ingredients that are expected to block the cascade of hypoxia that neuron death can be prevented. *Acalypha indica* Linn (akar kucing) is a common wild plants that can be found in all regions in Indonesia and accidentally the decoction of the root can cure paralysis caused by stroke. Flavonoid compounds contained in the roots have the proven ability of antioxidants can prevent neuron death cascade.

Objective: To determine the effect of root extracts of *Acalypha indica* Linn as a protection of rat neuronal on the state of hypoxia.

Methods: Experimental in vitro study of cell culture of rat hippocampal neuronal of adult *Sprague Dowley* rat treated with *Acalypha indica* Linn root water extract at a dose of 10 mg/ml, 15 mg/ml, and 20 mg/ml for 72 hrs. Then the cells were exposed to hypoxia with 5% O₂/5% CO₂/N₂ balance gas for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay and BrdU for cell proliferation. Levels BDNF medium culture was measured by ELISA methods.

Results: Relative viability, proliferation rate of neuron and endogenous BDNF level of rat hippocampal tissue culture with *Acalypha indica* Linn roots extract with dosage of 10 mg/ml, 15 mg/ml, and 20 mg/ml is increased compared with control.

Conclusion: *Acalypha indica* Linn root extract can increase neuron viability and the level of endogenous BDNF in hypoxic conditions.

Key words: *Acalypha indica* Linn, hypoxia, neuron viability, BDNF

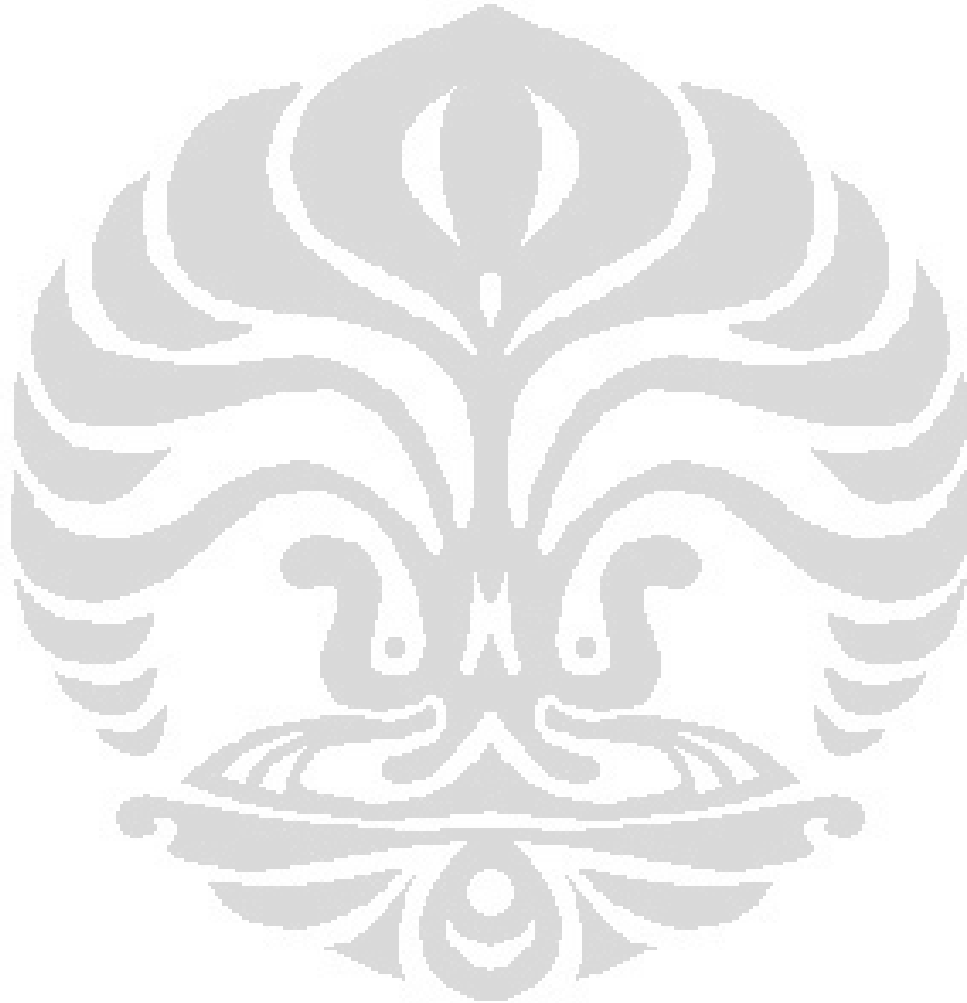
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar belakang.....	1
1.2. Rumusan masalah.....	4
1.3. Tujuan penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan umum.....	4
1.3.2 Tujuan khusus.....	4
1.4. Hipotesis	4
1.5. Manfaat penelitian.....	5
2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. HIPOKSIA SEREBRI.....	6
2.1.1. Aktivasi berlebihan reseptor glutamat.....	7
2.1.1.1. <i>Caspase</i> jalur intrinsik.....	8
2.1.1.2. <i>Caspase</i> jalur ekstrinsik.....	9
2.1.1.3. Kerjasama jalur intrinsik dan ekstrinsik.....	10
2.1.2. Produksi senyawa radikal bebas.....	10
2.1.2.1. Produksi radikal bebas oleh mitokondria.....	11
2.1.2.2. Produksi <i>Nitric oxide</i> (NO).....	13
2.2. <i>BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR</i> (BDNF).....	14
2.2.1. Hipoksia dan BDNF.....	16
2.2.2. Jalur " <i>survival signaling</i> " BDNF.....	17
2.3. <i>ACALYPHA INDICA</i> LINN (AKAR KUCING).....	19
2.3.1. Taksonomi tanaman akar kucing.....	20
2.3.2. Kegunaan tanaman akar kucing bagi kesehatan.....	20
2.3.3. Kandungan zat-zat aktif tanaman akar kucing.....	21
2.4. MTT ASSAY.....	23
2.5. PEMERIKSAAN BrdU.....	23
2.6. PEMERIKSAAN KADAR BDNF METODE ELISA.....	24
2.7. KERANGKA TEORI.....	24
2.8. KERANGKA KONSEP.....	25

3 METODE PENELITIAN.....	27
3.1. RANCANGAN PENELITIAN.....	27
3.2. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN.....	27
3.3. SUBYEK PENELITIAN.....	27
3.4. PARAMETER, VARIABEL, DAN SAMPEL PENELITIAN.....	27
3.5. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN.....	29
3.5.1. Bahan Penelitian.....	29
3.5.2. Alat-alat Penelitian.....	29
3.6. CARA KERJA.....	30
3.6.1. Seleksi hewan coba.....	30
3.6.2. Pembuatan medium DMEM komplit.....	31
3.6.3. Pembuatan campuran ekstrak akar kucing dalam DMEM komplit.....	31
3.6.4. Isolasi sel saraf.....	31
3.6.5. Kultur sel saraf.....	32
3.6.6. Panen dan subkultur sel saraf.....	32
3.6.6.1. Panen sel saraf.....	33
3.6.6.2. Subkultur sel saraf.....	33
3.6.7. Pemajanan ekstrak air akar kucing.....	33
3.6.8. Perlakuan hpoksia.....	33
3.6.9. Sampel untuk kadar BDNF.....	34
3.6.10. MTT <i>assay</i>	34
3.6.11. Pemeriksaan tingkat proliferasi sel saraf.....	34
3.6.12. Pemeriksaan kadar BDNF metode ELISA.....	35
3.7. ANALISIS DATA.....	36
3.8. ALUR PENELITIAN.....	37
4 HASIL PENELITIAN.....	38
4.1. PENGARUH EKSTRAK AKAR <i>ACALYPHA INDICA</i> LINN TERHADAP VIABILITAS NEURON.....	38
4.2. PENGARUH EKSTRAK AKAR <i>ACALYPHA INDICA</i> LINN TERHADAP TINGKAT PROLIFERASI NEURON.....	40
4.3. PENGARUH EKSTRAK AKAR <i>ACALYPHA INDICA</i> LINN TERHADAP KADAR BDNF.....	41
5 PEMBAHASAN.....	44
6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	52
6.1. KESIMPULAN.....	52
6.2. SARAN.....	52
DAFTAR PUSTAKA... ..	53
LAMPIRAN.....	57
RIWAYAT HIDUP.....	81
DRAFT ARTIKEL.....	82

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Variabel Penelitian.....	28
Tabel 2	Rerata viabilitas relatif neuron.....	38
Tabel 3	Rerata nilai absorbansi BrdU.....	40
Tabel 4	Kadar BDNF neuron pada kelompok kontrol dan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing.....	42

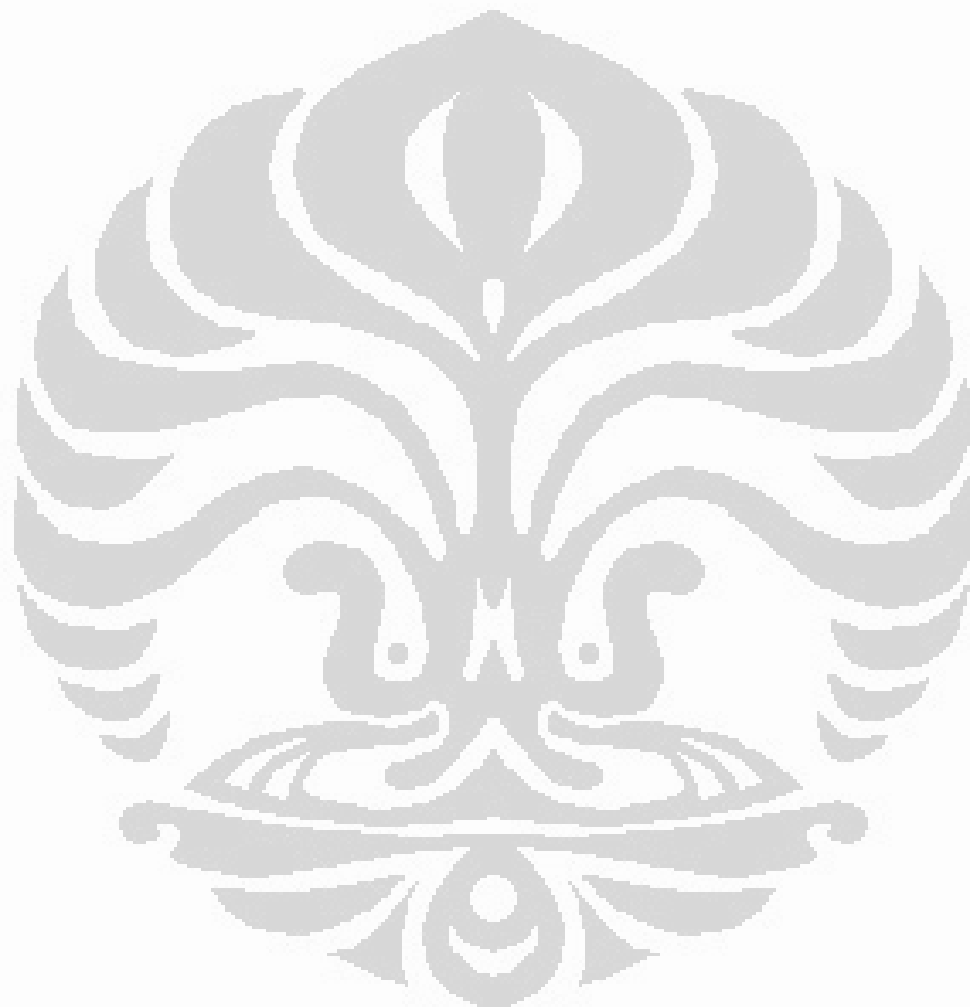


DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Sel yang mengalami apoptosis.....	7
Gambar 2	Mekanisme apoptosis jalur intrinsik, ekstrinsik, dan <i>crossstalk</i>	9
Gambar 3	Pembentukan radikal bebas pada hipoksia serebri.....	13
Gambar 4	Reaksi peroksinitrit yang menyebabkan kematian neuron....	14
Gambar 5	Proses pembentukan BDNF.....	15
Gambar 6	Aktivasi factor transkripsi CREB memicu ekspresi gen BDNF.....	17
Gambar 7	3 jalur "survival signaling" BDNF.....	18
Gambar 8	Tanaman <i>Acalypha indica</i> Linn.....	20
Gambar 9	Rumus bangun Kaempferol.....	22
Gambar 10	Kerangka teori.....	24
Gambar 11	Kerangka konsep penelitian.....	25
Gambar 12	Rerata prosentase viabilitas relatif neuron.....	39
Gambar 13	Nilai absorbansi BrdU	41
Gambar 14	Kadar BDNF neuron	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Analisis data statistik.....	57
Lampiran 2	Informasi produk MTT <i>assay</i>	71
Lampiran 3	BrdU <i>labeling and detection kit III</i>	73
Lampiran 4	BDNF Sandwich ELISA kit.....	76
Lampiran 5	Surat keterangan lolos kaji etik.....	80



DAFTAR SINGKATAN

AMPA	: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
Apaf-1	: Apoptotic protease activating factor-1
ATP	: Adenosine triphosphate
Bax	: Bcl-2-antagonist x protein
Bad	: Bcl2/Bcl-xL associated death promoter
Bcl-2	: B cell lymphoma leukemia 2 protein
BDNF	: Brain-derived neurotrophic factor
BNIP3	: Bcl/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3
BrdU	: 5-Bromo-2'-deoxy-uridine
Caspase	: Cysteine- dependent aspartate-directed protease
CAD	: Caspase Activated DNase
CREB	: c-AMP response binding element
Cyt c	: Cytochrome c
dATP	: deoxyadenosine tri-phosphate
DG	: Dentate gyrus
DNA	: Deoxyribonucleic acid
DMEM	: Dubelco's Modified Eagle's Medium
EAATs	: Excitatory amino acid transporters
ERK	: Extracellular Regulated Kinase
FADD	: Fas Associated Death Domain
FasL	: Fas Ligand
FBS	: Fetal Bovine Serum
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MEM	: Minimal Essential Medium
MPTP	: Mitochondrial Permeability Transition Pore
MTT	: (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NMDA	: N-methyl-D-aspartate acid
nNOS	: neuronal nitric oxide synthase
NO	: Nitric oxide
NOs	: Nitric oxide synthase
PARP	: poly(ADP ribose) polymerase
CPE	: Carboxipeptidase E
PI-3K	: Phosphatidylinositol 3-kinase
ROS	: Reactive oxygen species
SGZ	: Subgranular zone
SOD	: superoxide dismutase
SSP	: Susunan saraf pusat
SVZ	: Subventricular zone
tBid	: Truncated Bid
Trk	: Tyrosine kinase
TNF	: Tumor Necrotic Factor
TRAIL	: TNF receptor Apoptosis Inducing Ligand
TRADD	: TNF-receptor Associated Death Domain

BAB I PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Otak sangat sensitif terhadap kondisi kekurangan oksigen. Suatu penelitian melaporkan bahwa area otak yang paling rentan terhadap kondisi ini adalah hipokampus, korteks dan striatum.^{1,2} Terhentinya suplai darah ke otak secara tiba-tiba, yang disebut dengan kondisi hipoksia, dapat berakibat fatal dan menyebabkan kematian sel-sel neuron otak dalam waktu beberapa menit. Hipoksia serebri adalah hipoksia yang paling sering ditemukan dan diasosiasikan sebagai *stroke*.^{3,4}

Sampai saat ini, *stroke* merupakan penyebab ketiga kematian di dunia selain akibat penyakit kardiovaskular dan kanker. Prognosis pasien *stroke* bahkan lebih buruk dari kebanyakan pasien kanker, setengah dari seluruh pasien *stroke* meninggal dan 15-30% penderita *stroke* yang hidup menjadi cacat akibat defisit neurologis hingga membutuhkan bantuan perawat setelah 3 bulan menderita *stroke*.⁵ Seiring dengan meningkatnya kejadian *stroke* di Indonesia, merupakan suatu kebutuhan untuk mencari obat yang dapat diberikan sebagai terapi suplemen pada pasien-pasien yang mempunyai kecenderungan terserang *stroke*, seperti penderita hipertensi, sehingga diharapkan komplikasi yang timbul jika terjadi *stroke* dapat minimal.

Hipoksia serebri memicu serangkaian reaksi beruntun atau kaskade patologis yang menyebabkan kerusakan neuron yang ireversibel dalam beberapa menit setelah timbulnya onset hipoksia. Kaskade tersebut disebabkan oleh peningkatan glutamat ekstraselular disertai aktivasi berlebihan reseptor glutamat (eksitotoksisitas) sehingga menyebabkan peningkatan ion kalsium intraselular dan produksi radikal bebas yang berlebih mengakibatkan kerusakan pada membran lipid, protein, dan asam nukleat (DNA). Pada akhirnya semua hal tersebut memicu jalur kaskade *caspase* dengan hasil akhir kematian sel (apoptosis).³⁻⁷ Adanya kaskade

patologis yang dipicu hipoksia memungkinkan pengembangan strategi pengobatan baru yang dapat digunakan sebagai neuroproteksi, dengan cara memblokir kaskade tersebut sehingga kematian neuron dapat dicegah.^{8,9}

Selain itu, kemampuan neuron untuk bertahan hidup tidak terlepas dari peran faktor-faktor pertumbuhan, diantaranya *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF). BDNF adalah salah satu protein *neurotrophic factor* penting yang berperan dalam kelangsungan hidup, pertumbuhan, dan perkembangan neuron.^{10,11} BDNF berperan membatasi kematian neuron melalui kemampuannya memodulasi jalur-jalur "*survival signaling*" kaskade yang muncul sebagai manifestasi mekanisme pertahanan tubuh endogen.

Dilaporkan pada saat terjadinya hipoksia serebri, tidak terdapat peningkatan kadar BDNF endogen di area hipokampus dan korteks yang disebabkan inhibisi sintesis protein.⁴ Kadar BDNF endogen baru mulai meningkat setelah 24 jam hingga beberapa hari pasca hipoksia serebri.⁵ Oleh sebab itu, BDNF eksogen sering kali diberikan 24-48 jam pasca hipoksia serebri yang memungkinkan protein yang menginduksi BDNF terekspresi dengan lengkap dan dipertahankan hingga fase pemulihan.⁴

Indonesia memiliki banyak tanaman herbal yang memiliki potensi terapi salah satunya adalah tanaman akar kucing atau *Acalypha indica* Linn. Tanaman ini dinamai akar kucing karena akarnya disenangi kucing yang sedang sakit. Beberapa saat setelah dimakan dan dimuntahkan kembali bersama isi perutnya, kucing tersebut terlihat membaik. Atas dasar tersebut, meskipun belum ada bukti ilmiah tentang khasiatnya, masyarakat telah mencoba menggunakan rebusan akar kucing untuk mengobati dirinya saat sedang sakit perut. Dan secara tidak sengaja, ternyata rebusan akar kucing tersebut dapat memulihkan kelumpuhan saraf akibat *stroke*.¹²

Kandungan bahan aktif dari tanaman ini masih belum dapat diidentifikasi dengan baik. Beberapa bahan-bahan kinuia aktif yang bermanfaat dari tanaman ini yang telah berhasil diidentifikasi diantaranya adalah *kaempferol* (flavonoid), *beta-sitosterol*, HCN, *gamma-sitosterol*, dan *Acalyphin*.¹³ Baru-baru ini penelitian di India membuktikan bahan aktif yang

terkandung dalam akar tanaman akar kucing memiliki aktivitas antioksidan, yang mampu melindungi otak dari efek senyawa radikal bebas yang memicu terjadinya apoptosis pada keadaan hipoksia.¹⁴ Flavonoid yang terkandung dalam tanaman akar kucing, dilaporkan merupakan antioksidan kuat yang mampu melindungi sel neuron dari kerusakan yang disebabkan toksisitas glutamat.¹⁵

Secara ilmiah, Purwaningsih dan kawan-kawan telah membuktikan efek tanaman akar kucing terhadap gangguan komunikasi hubungan saraf otot (*neuromuscular junction*) secara *eks vivo* pada otot paha katak. Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terbukti mempunyai efek neuroprotektor dan neuroterapi secara *eks vivo* pada dosis 15-20 mg/ml.¹² Pada susunan saraf pusat, Suswati L, membuktikan bahwa ekstrak akar *Acalypha indica* Linn pada dosis 400 dan 500 mg/kg BB mampu memperbaiki kerusakan sel neuron hipokampus tikus pascahipoksia serebri secara *in vivo*.¹⁶

Adanya bukti bahwa tanaman akar kucing mengandung senyawa yang dapat mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh keadaan hipoksia sehingga kematian neuron tidak terjadi, besar kemungkinan tanaman akar kucing dapat meningkatkan kelangsungan hidup neuron serta menginduksi peningkatan kadar BDNF pada keadaan hipoksia. Sel yang hidup ditandai dengan adanya aktivitas enzim dan keaktifannya berproliferasi, sehingga viabilitas sel dihitung berdasarkan aktivitas enzim (*MTT assay*) dan berdasarkan tingkat proliferasinya (pemeriksaan BrdU).

Selain itu hingga saat ini belum ada penelitian yang meneliti mekanisme kerja ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap viabilitas neuron dan keterkaitannya dengan kadar BDNF endogen, sebagai salah satu faktor yang mempertahankan kelangsungan hidup neuron. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap viabilitas neuron dan kadar BDNF endogen pada keadaan hipoksia secara *in vitro*.

1.2. RUMUSAN MASALAH

1. Bagaimana pengaruh ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap viabilitas neuron tikus pada keadaan hipoksia?
2. Bagaimana pengaruh ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap tingkat proliferasi neuron tikus pada keadaan hipoksia?
3. Bagaimana pengaruh ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap kadar BDNF endogen tikus pada keadaan hipoksia?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak akar *Acalypha indica* Linn dalam memproteksi neuron tikus pada keadaan hipoksia.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap viabilitas relatif neuron pada kultur jaringan hipokampus tikus pada keadaan hipoksia.
2. Menganalisis pengaruh ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap tingkat proliferasi neuron pada kultur jaringan hipokampus tikus pada keadaan hipoksia.
3. Menganalisis hubungan ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap kadar BDNF endogen pada keadaan hipoksia.

1.4. HIPOTESIS

1. Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn dapat meningkatkan viabilitas relatif neuron pada keadaan hipoksia
2. Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn dapat meningkatkan tingkat proliferasi neuron pada keadaan hipoksia.
3. Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn dapat meningkatkan kadar BDNF endogen neuron tikus pada keadaan hipoksia.

1.5. MANFAAT PENELITIAN

1. Memberikan informasi tentang pengaruh ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap viabilitas neuron.
2. Memberikan data awal untuk penelitian biomedik selanjutnya pada tingkat molekuler yang berhubungan dengan mekanisme kerja ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap sel neuron.
3. Dapat dijadikan landasan ilmiah untuk dilakukan uji klinik khasiat tanaman obat, dalam rangka pengembangan dan pemanfaatan tanaman obat asli Indonesia menjadi fitofarmaka.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. HIPOKSIA SEREBRI

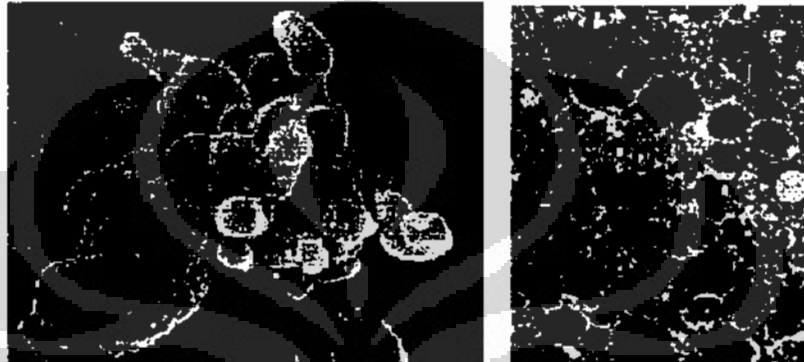
Hipoksia serebri adalah suatu kondisi terhentinya atau berkurangnya aliran darah ke otak secara tiba-tiba.¹ Terdapat 2 jenis hipoksia serebri yaitu:^{4,5}

- Hipoksia global, yang terjadi pada kegagalan sirkulasi umum seperti pada gagal jantung.
- Hipoksia fokal, yang terjadi akibat kehilangan aliran darah pada suatu area terbatas di otak, ditemukan paling sering pada *stroke*.

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. Sedangkan area di sekitar nekrosis pusat lesi disebut penumbra, area ini mengandung sel-sel yang kematiannya tidak secepat area pusat nekrosis, yaitu setelah beberapa jam hingga 48 jam. Mekanisme kematian sel pada area ini bukanlah nekrosis, melainkan apoptosis. Karena apoptosis membutuhkan sedikit energi, dan kondisi ini didapati pada area penumbra dimana sel-selnya masih bisa bertahan hidup dan menyisakan sedikit energi.^{4,17}

Apoptosis dan Nekrosis diperantari mekanisme yang berbeda, tetapi keduanya dapat dicetuskan oleh stimuli yang sama yaitu masuknya Ca^{2+} ke dalam sel. Nekrosis didahului oleh gangguan homeostasis ion, antara lain Ca^{2+} , air yang ikut masuk beserta ion Na membuat sel bengkak, defisit energi dan mengalami *autolysis* dengan pecahnya membran sel, menumpahkan isi sel berisi enzim serta organelnya ke ruang ekstraseluler dan menimbulkan reaksi inflamasi. Ini terjadi hanya dalam beberapa menit. Sedangkan apoptosis dapat dilihat setelah beberapa jam atau hari walaupun prosesnya sama-sama dipicu oleh Ca^{2+} . Dimana selnya mengisut, kromatin berkondensasi, membran sel

mengalami “blebbing” (membentuk tonjolan-tonjolan) dan proses matinya sel mengikuti program terkendali yang menghasilkan “*apoptotic bodies*” yang sebenarnya adalah fragmen sel, terbungkus oleh membran sel dan berisi organela yang masih utuh; debris ini kemudian difagositosis oleh makrofag. Jadi tidak menimbulkan inflamasi. Karena “teraturnya” tahapan-tahapan proses ini berlangsung maka disebut juga “*programmed cell death*”.¹⁸ (Gambar 1)



Gambar 1. Sel yang mengalami apoptosis.¹⁸

Pada saat terjadi hipoksia serebri, terjadi berbagai mekanisme yang kompleks. Dari sekian banyak jalur yang telah diidentifikasi, nyata bahwa peran kritis dipegang oleh peningkatan glutamat ekstraselular disertai aktivasi berlebihan reseptor glutamat/eksitotoksisitas, akumulasi ion Ca^{++} di sitoplasma, dan produksi senyawa radikal bebas dalam jumlah besar sebagai proses di hulu dan terpicunya kematian sel yang terprogram/apoptosis secara patologis sebagai proses hilir, terutama di daerah penumbra.^{5,19}

2.1.1. Aktivasi berlebihan reseptor glutamat/eksitotoksisitas

Hipoksia serebri memicu serangkaian reaksi beruntun atau kaskade patologis yang menyebabkan kerusakan neuron yang ireversibel dalam beberapa menit setelah timbulnya onset. Kaskade dimulai dari penurunan konsentrasi dari *Adenosine Triphosphate* (ATP) yang disebabkan oleh hilangnya pasokan oksigen dan glukosa.³⁻⁵ Akibatnya gradient konsentrasi

transmembran berkurang, potensial membran menghilang dan sel mengalami depolarisasi, ditandai keluarnya K^+ dan masuknya Na^+ , Cl^- , dan Ca^{2+} ke dalam sel. Selain itu terjadi penglepasan neurotransmitter glutamat yang berasal dari neuron dan sel glia. Pada keadaan normal, astrosit akan membuang kelebihan glutamat ekstraselular melalui transporter asam amino eksitatorik (EAATs, *excitatory amino acid transporter*) yang menukar 2 ion natrium dan 1 glutamat dengan 1 ion kalium dan hidroksil. Akibat penurunan level ATP dan perubahan-perubahan yang terjadi diatas, menyebabkan tidak bekerjanya EAATs ini sehingga konsentrasi glutamat ekstraselular menjadi sangat tinggi.^{4,6}

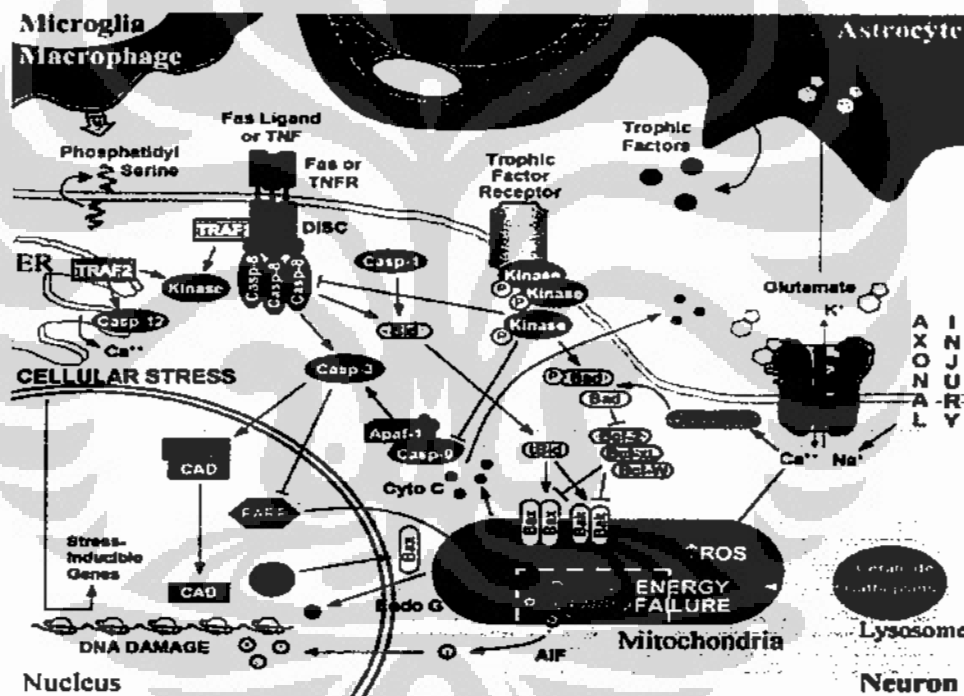
Konsentrasi glutamat ekstraselular yang tinggi akan menyebabkan depolarisasi neuron dan mencetuskan potensial aksi yang akan melepaskan lebih banyak lagi glutamat ke lingkungan ekstraselular. Peningkatan glutamat ekstraselular menyebabkan aktivasi berlebihan reseptor glutamat, *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDA) dan *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid* (AMPA), yang akan membuka kanal Ca^{2+} , menyebabkan masuknya Ca^{2+} sehingga terjadi peningkatan konsentrasi ion Ca^{2+} intraselular.¹⁹ Selanjutnya peningkatan Ca^{2+} intraselular memicu terjadinya proses kematian sel/ apoptosis melalui mekanisme jalur *caspase* yang terdiri dari jalur intrinsik, jalur ekstrinsik dan *cross-talk* yaitu kerjasama antara jalur intrinsik dan ekstrinsik.^{6,7,17} (Gambar 2)

2.1.1.1. *Caspase* jalur intrinsik

Peningkatan konsentrasi ion Ca^{2+} intraselular menyebabkan terbukanya *Mitochondrial Permeability Transition Pore* (MPTP) dan pelepasan Sitokrom c (*Cytochrome c*, *cyt c*), suatu enzim yang berlokalisasi di ruang antar membran mitokondria, keluar ke sitoplasma melalui pori tersebut.^{4,6,7} *Cyt c* yang dilepaskan akan bergabung dengan *Apoptotic Protease Activating Factor* (Apaf-1) di sitoplasma, bersama *procaspase 9* membentuk suatu molekul kompleks yang disebut *apoptosome*. Selanjutnya *Apoptosome* akan mengaktifkan *caspase 9* yang kemudian mengaktifkan *caspase* eksekutor,

caspase 3, yang akan menyebabkan kematian sel/apoptosis, dengan cara menyerang sarannya yaitu:^{3,20,21}

- Mengaktivasi *Caspase Activated DNase* (CAD) sehingga menyebabkan kerusakan DNA, dimana DNA pecah secara *internukleosomal* dalam pecahan-pecahan yang besarnya 180-200 bp. Fragmentasi DNA berakibat apoptosis.
- Memecah *poly(ADP ribose) polymerase* (PARP), suatu “DNA-repair enzyme” yang fungsinya untuk melaksanakan reparasi kerusakan DNA. Pemecahan PARP menyebabkan kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki dan selanjutnya memicu apoptosis.



Gambar 2. Mekanisme apoptosis jalur intrinsik, ekstrinsik, dan cross talk.²⁰

2.1.1.2. Caspase jalur ekstrinsik

Jalur ekstrinsik dipicu oleh kelompok reseptor kematian yaitu reseptor Fas dan *tumor necrosis factor* (TNF) dengan ligan-nya, *FasLigan* (FasL) dan

TNF receptor Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL). Reseptor ini bekerja dengan merekrut molekul protein dari cytosol yang bekerja sebagai “adaptor” (*adaptor proteins/molecules*) yaitu protein *Fas Associated Death Domain (FADD)* dan *TNF-receptor Associated Death Domain (TRADD)*. Selanjutnya FADD dan TRADD mengaktivasi *procaspase 8* (prekursor *caspace 8*) dan mengaktifkannya menjadi *caspace 8*, kemudian mengaktifkan *caspace 3* untuk mengeksekusi proses selanjutnya seperti pada jalur intrinsik.^{3,20,21}

Caspase 8 dan *9* disebut “*initiator caspases*” atau “*upstream caspases*” sedangkan *caspace 3* disebut “*executioner Caspases*” atau “*downstream Caspases*”.

2.1.1.3. Kerjasama jalur intrinsik dan ekstrinsik (*cross talk*)

Kelebihan Ca^{2+} bersama dengan akumulasi ROS dan reseptor kematian Fas, akan mengaktivasi *caspace 8* yang kemudian membelah anggota *Bcl2 protein family* yang pro-apoptotik, yaitu Bid. Bid yang terpenggal (*tBid*, *truncated Bid*) bertranslokasi ke mitokondria dan berinteraksi dengan *Bcl-2-anionogonist x protein (Bax)*, yang pada keadaan normal dihambat oleh *B cell lymphoma leukemia 2 protein (Bcl-2)*. Dimer *tBid* dan *Bax* menyebabkan terbukanya MPTP dan melepaskan sitokrom c dari mitokondria ke sitosol untuk membentuk kompleks dengan *Apaf-1* dan *procaspase 9* sehingga terbentuk *apoptosome* dan selanjutnya mengaktifkan *caspace 3*.²¹

2.1.2. Produksi senyawa radikal bebas

Radikal bebas adalah suatu molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan, sehingga menjadi tidak stabil dan sangat reaktif. Reaktifitas senyawa ini disebabkan karena elektron bebas yang tidak berpasangan yang akan berusaha menarik elektron dan molekul disekitarnya. Untuk mencapai kestabilan senyawa ini harus mencari elektron lain sebagai pasangan. Radikal bebas di otak yang dominan adalah anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil (OH^-).²²

Radikal bebas merupakan produk normal dari metabolisme aerob selular dan diproduksi dalam jumlah yang rendah selama kondisi fisiologis yang normal dan dapat dilawan oleh sistem antioksidan endogen seperti *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroxidase*, *catalase*, dan antioksidan endogen nonenzim seperti vitamin C and E. Anion superoksida sebagai salah satu radikal bebas otak akan diubah oleh SOD menjadi H₂O₂, yang kemudian akan diubah oleh *catalase* atau *glutathione peroxidase* menjadi H₂O, sehingga tidak terjadi peningkatan radikal bebas.²³

Adanya ketidakseimbangan mekanisme pertahanan tubuh yang diperankan oleh antioksidan dengan radikal bebas memicu kerusakan sel. Sistem susunan saraf pusat (SSP) sangat rentan terhadap adanya kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas.

2.1.2.1. Produksi radikal bebas oleh mitokondria

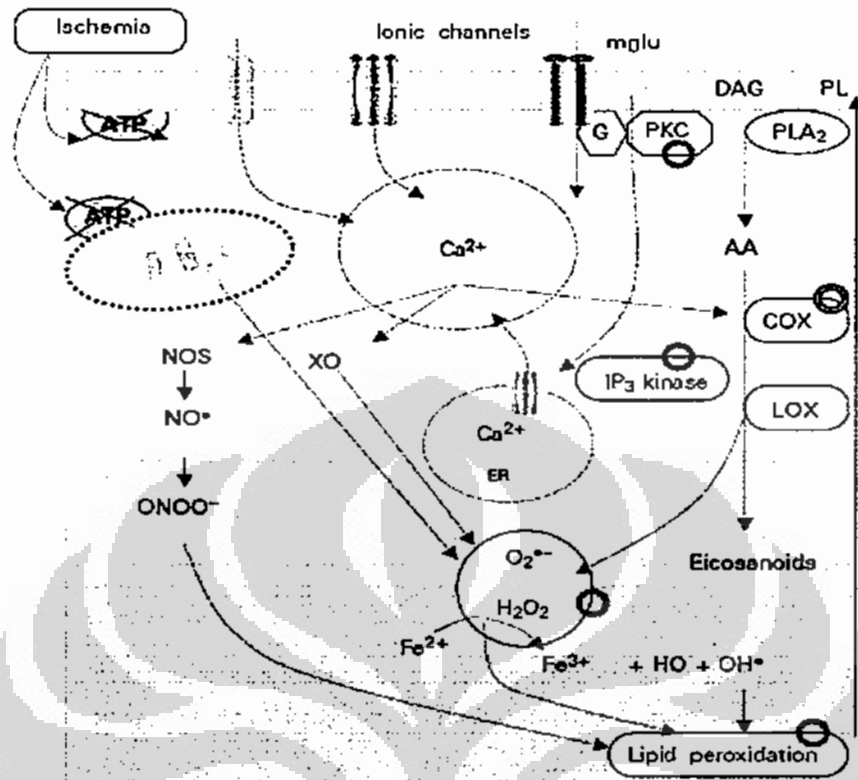
Hipoksia memicu terjadinya stres oksidatif, suatu kondisi yang terjadi ketika keseimbangan fisiologis antara antioksidan dan radikal bebas terganggu, mengakibatkan produksi berlebih radikal bebas yang melampaui pertahanan antioksidan tubuh.²² Dilaporkan, pada saat terjadinya hipoksia, enzim antioksidan endogen seperti SOD, *glutathione peroxidase*, *catalase*, vitamin C and E mengalami penurunan, sedangkan produksi radikal bebas, yang berasal dari mitokondria meningkat.²³

Mitokondria adalah organel vital yang berperan dalam berbagai metabolisme sel dan salah satu fungsi terpenting adalah mitokondria berfungsi mempertahankan cadangan energi selular dengan memproduksi ATP melalui transport elektron rantai respirasi. Mitokondria juga diketahui merupakan tempat pembentukan radikal superoksida serta produk ROS lainnya. Selain itu mitokondria juga berperan dalam menjaga keseimbangan kalsium (homeostasis kalsium) akan tetapi pada saat akumulasi kalsium mitokondria berlebih akibat peningkatan Ca²⁺ intraselular pada saat terjadinya hipoksia, berakibat hilangnya potensial transmembran mitokondria, kegagalan rantai transport elektron respirasi sehingga terjadi penurunan produksi ATP, dan

peningkatan pembentukan radikal bebas yang selanjutnya menyebabkan kegagalan pengaturan konsentrasi kalsium mitokondria.²³

Radikal bebas dan akumulasi kalsium mitokondria menyebabkan terbukanya MPTP mengakibatkan masuknya zat-zat terlarut dan molekul besar dalam ruang matriks mitokondria. Sebagai akibatnya mitokondria membengkak dan ruptur membran luar mitokondria yang memicu disfungsi mitokondria, pembentukan radikal-radikal bebas oksigen dan nitrogen yang menyebabkan peroksidasi membran lipid, protein dan asam nukleat (DNA). Proses-proses tersebut diatas juga mengakibatkan pelepasan cyt c, yang selanjutnya akan memicu aktivasi caspase yang berperan dalam kematian neuron seperti yang sudah dijelaskan pada sub bab 2.1.1.1.^{23,24}

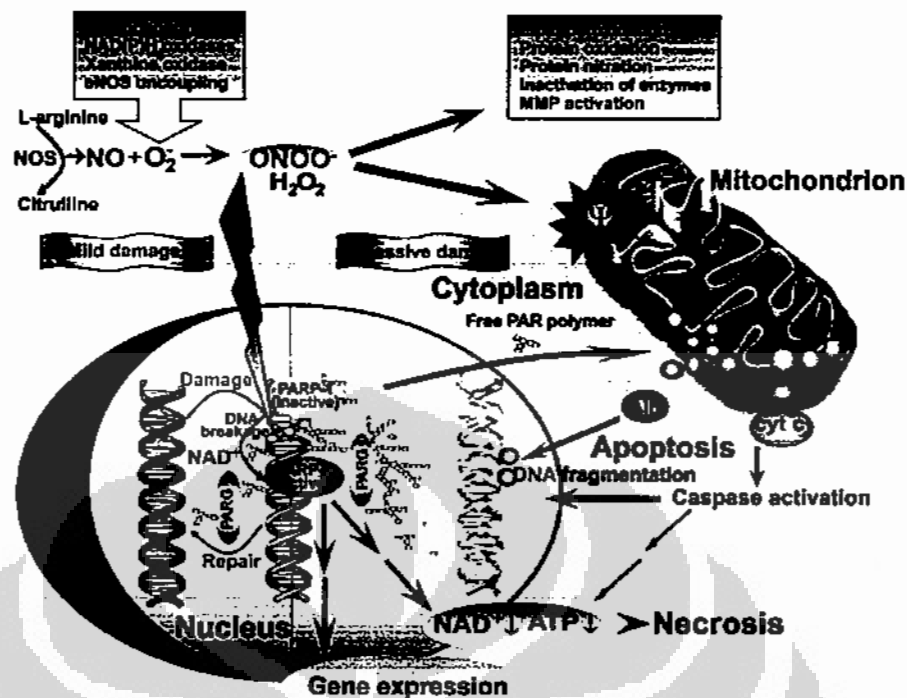
Radikal superoksida (O_2^-) adalah radikal bebas yang paling sering dijumpai yang akan memproduksi hidrogen peroksida (H_2O_2) melalui reaksi dismutase yang dikatalisis oleh SOD. (OH^-) adalah radikal bebas oksigen yang paling reaktif, menyebabkan peroksidasi lipid, oksidasi protein dan merusak DNA. Radikal (OH^-) diproduksi dari hidrogen peroksida (H_2O_2) melalui reaksi *Haber-Weiss* dan reaksi ini dipercepat oleh adanya Fe^{2+} (besi feri), dikenal dengan reaksi Fenton. $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + OH^- + O_2$ ^{22,23} Selain itu radikal bebas juga dapat dibentuk melalui reaksi superoksida (O_2^-) dengan radikal bebas lain yaitu NO (*nitric oxide*). (Gambar 3)



Gambar 3. Pembentukan radikal bebas pada hipoksia serebri.¹⁵

2.1.2.2. Produksi Nitric oxide (NO)

Pada hipoksia serebri, kelebihan Ca^{2+} juga meningkatkan aktivitas *nitric oxide sintase* (nNOS) neuronal, sehingga terjadi penglepasan NO (*nitric oxide*). Konsentrasi NO yang tinggi melalui reaksi dengan superoksida akan membentuk radikal peroksinitrit yang sangat toksik bagi sel ($\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$).^{4,22,25} Peroksinitrit menyebabkan berbagai kerusakan diantaranya peroksidasi membran lipid, pada protein mengakibatkan berkurang atau hilangnya aktivitas enzim serta inhibisi sintesis protein, kerusakan DNA, dan disfungsi mitokondria lebih lanjut yang akhirnya menyebabkan kematian sel akibat terlepasnya cyt c yang akan mengaktifkan kaskade *caspase* seperti yang sudah dijelaskan pada sub bab 2.1.1.1.²⁶ (Gambar 4)



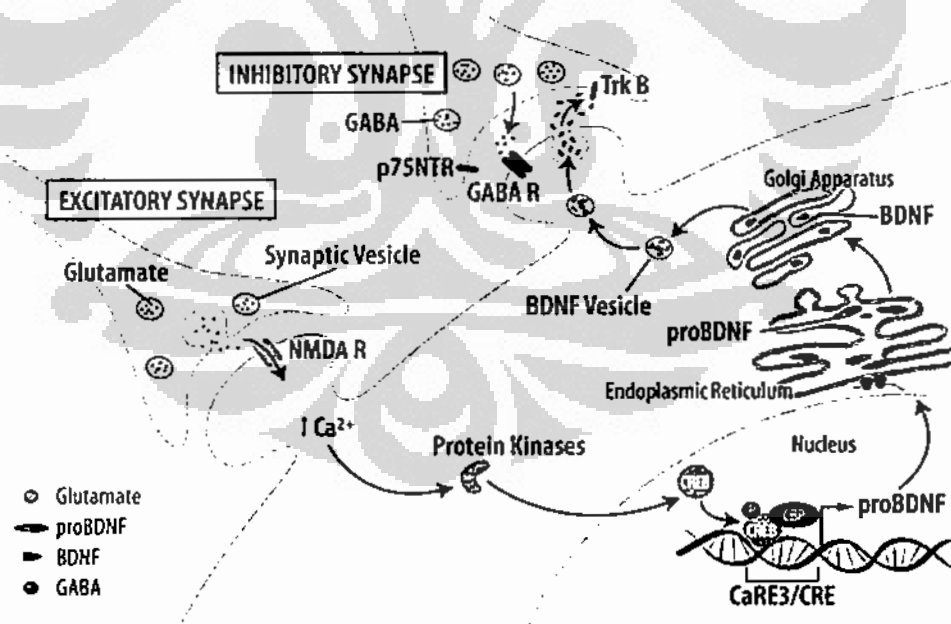
Gambar 4. Reaksi peroksinitrit yang menyebabkan kematian neuron.²⁵

2.2. BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF)

Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) adalah salah satu protein *neurotrophic factor* penting dengan berat molekul 14 kDa, berperan dalam mempertahankan kelangsungan hidup, pertumbuhan, dan perkembangan neuron. Di otak, BDNF ditemukan aktif di area hipokampus, kortek, dan area basal. Area-area tersebut penting dalam pembentukan memori dan pembelajaran, dimana BDNF sendiri juga berperan penting dalam plastisitas sinaps guna proses pembentukan memori jangka panjang dan pembelajaran. Meskipun sebagian besar neuron pada otak mamalia telah terbentuk selama periode prenatal, beberapa bagian otak dewasa tetap memiliki kemampuan membentuk neuron-neuron baru yang berasal dari sel-sel punca dalam proses yang dikenal sebagai neurogenesis. BDNF berperan menstimulasi dan mengontrol neurogenesis tersebut dan diproduksi dalam jumlah terbatas oleh sel target.¹⁰

Sel-sel neuron baru membutuhkan faktor tropik guna berdiferensiasi dan pertumbuhan selanjutnya serta bertahan hidup dalam proses seleksi alamiah yang timbul pada setiap stadium perkembangan neuron. Neuron-neuron dengan reseptor spesifik yang cukup diinervasi oleh BDNF akan mampu bertahan hidup. Karena jumlahnya terbatas, neuron-neuron saling berkompetisi terhadap BDNF yang tersedia, dan sel-sel neuron yang gagal berkompetisi akan mengalami apoptosis.¹⁰

Untuk berfungsi aktif, BDNF berikatan dengan reseptor spesifik pada permukaan sel, yaitu reseptor tirosin kinase B (Trk B).^{10,27} BDNF diproduksi di retikulum endoplasmik dalam bentuk pro-BDNF yang selanjutnya mengalami proses modifikasi post translasi menjadi BDNF yang matur di aparatus golgi. Disini pro-BDNF akan berikatan dengan sortilin, protein yang memfasilitasi pembentukan konformasi BDNF yang tepat. Kemudian BDNF akan berikatan dengan *carboxipeptidase* E (CPE) yang akan menyeleksi BDNF dan selanjutnya disekresi dalam bentuk vesikel untuk ditransport ke dendrit post sinaps dan akan berikatan dengan reseptornya.²⁷ (Gambar 5)

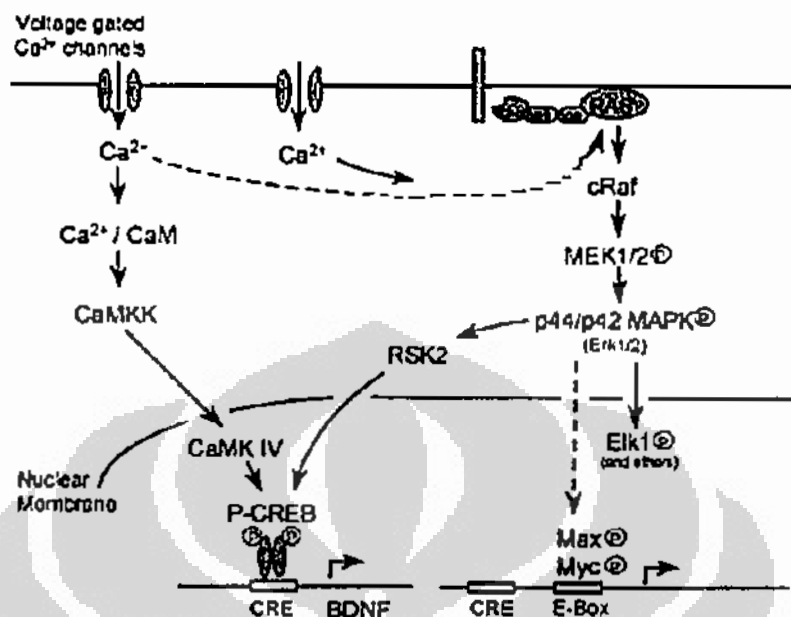


Gambar 5. Proses pembentukan BDNF.²⁷

2.2.1. Hipoksia dan BDNF

Pada saat terjadinya hipoksia serebri, BDNF berperan membatasi kematian neuron yang disebabkan oleh toksisitas glutamat, melalui kemampuannya memodulasi jalur-jalur “*survival signaling*” kaskade yang muncul sebagai manifestasi mekanisme pertahanan tubuh endogen. Akan tetapi, penelitian melaporkan tidak didapati adanya peningkatan kadar BDNF endogen di area hipokampus dan korteks pada saat terjadinya hipoksia yang disebabkan inhibisi sintesis protein oleh radikal bebas.^{4,25,26} Kadar BDNF endogen baru mulai meningkat setelah 24 jam hingga beberapa hari pasca hipoksia serebri, akibat adanya peningkatan induksi aktivasi faktor-faktor transkripsi yang dapat memodulasi ekspresi gen, diantaranya aktivasi faktor transkripsi *cAMP response element-binding protein* (CREB) dan selanjutnya memodulasi ekspresi gen yang berperan dalam mencegah kerusakan neuronal lebih lanjut maupun untuk meningkatkan kemampuan neuron untuk bertahan hidup.^{5,11}

Eksitotoksitas glutamat yang menyebabkan peningkatan kalsium intraselular akan mengaktifasi Ca^{2+} /CaM kinase (*Calcium calmodulin Kinase*) dan kaskade Ras/MAPK, yang selanjutnya memfosforilasi faktor transkripsi CREB. Aktivasi CREB memicu ekspresi gen-gen termasuk gen BDNF dan gen Bcl-2.¹¹ (Gambar 6)

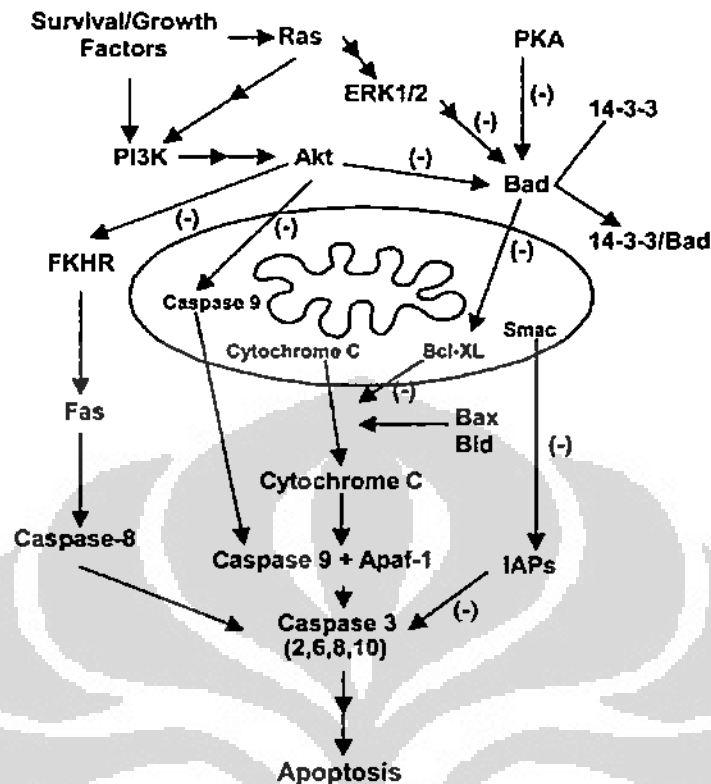


Gambar 6. Aktivasi faktor transkripsi CREB memicu ekspresi gen BDNF.¹¹

Oleh sebab itu, untuk mencegah kerusakan neuronal lebih lanjut, BDNF eksogen sering kali diberikan 24-48 jam pasca hipoksia serebri sehingga memungkinkan protein yang menginduksi BDNF terekspresi dengan lengkap dan dipertahankan hingga fase pemulihan.⁴ Pemberian BDNF secara *in vitro* dan *in vivo* pada tikus, dapat mengurangi akibat negatif pasca hipoksia, karena BDNF dapat menurunkan kematian neuron, mengurangi ukuran infark dan meningkatkan pemulihan baik sensorik maupun motorik.²⁸⁻³⁰

2.2.2. Jalur “*survival signaling*” BDNF

Efek neuroproteksi BDNF melibatkan *Tyrosine kinase* (Trk) reseptor dan diperantarai oleh induksi jalur MAPK/ERK1,2 (*Mitogen Activated Protein Kinase/ Extracellular Regulated Kinase*) dan jalur *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3-kinase). Pengaktifan jalur-jalur tersebut menghambat ekspresi protein proapoptosis Bad (*Bcl2/Bcl-xL associated death promoter*), di sisi lain terjadi peningkatan ekspresi protein antiapoptosis Bcl-2 pada neuron yang berlokasi di zona iskemik, sehingga apoptosis tidak terjadi.³¹⁻³⁴ (Gambar 7).



Gambar 7. 3 jalur "survival signaling" BDNF.¹

Bad adalah protein pro-apoptotik penting anggota keluarga Bcl-2 yang mempunyai kemampuan menginaktivasi protein anti apoptotik keluarga Bcl-2 yang lain. Bad diaktifkan oleh Calcineurin yang terpicu oleh peningkatan konsentrasi Ca^{2+} intraselular. Efek pro apoptosisnya dilakukan dengan cara mengikat protein anti apoptosis Bcl-xL (*Bcl-x-tra long*). Akibatnya ikatan Bcl-xL dengan protein pro apoptosis lain yaitu Bax terlepas mengakibatkan terbukanya MPTP dan pelepasan sitokrom c yang memicu kaskade apoptosis.¹

Penelitian secara invitro dan in vivo memperlihatkan BDNF mempertahankan kelangsungan hidup neuron hipokampus melalui 3 macam jalur yang menghambat protein pro apoptosis Bad.^{1,32,33,35}

- Jalur pertama dengan cara meningkatkan aktivitas PI3-kinase yang selanjutnya mengaktifasi Akt (PKB, Protein kinase B). Akt adalah inisiator jalur selanjutnya yang akan menghambat jalur apoptosis, dengan memfosforilasi protein pro apoptosis, Bad. Kemudian Bad yang telah

difosforilasi dinon-aktifkan oleh molekul protein *chaperone* 14-3-3, dengan demikian ikatan dengan Bcl-xL tidak terjadi dan pelepasan sitokrom c dihambat. Akibatnya tidak terjadi ikatan antara sitokrom c dengan Apaf-1 dan *caspase* 9 sehingga *caspase* 3 tidak aktif dan apoptosis tidak terjadi. Akt juga menghambat aktivitas pro *caspase* 9 sehingga tidak dapat berikatan dengan Apaf-1 dan menyebabkan apoptosis dihambat.^{1,33-35}

- Jalur kedua melalui aktivasi Ras. Ikatan BDNF dengan reseptornya, TrkB, akan mengaktifkan reseptor tersebut yang selanjutnya akan mengaktifkan Ras. Ras selanjutnya merekrut efekturnya yaitu Raf, kemudian mengaktifkan ERK1/2, anggota dari MAPK. Aktivasi ERK1/2 selanjutnya memfosforilasi Bad sehingga pelepasan sitokrom dihambat dan apoptosis tidak terjadi. Ras juga mengaktifkan PI3 kinase dan peristiwa selanjutnya terjadi seperti pada jalur pertama. Selain itu ERK yang teraktivasi bersama dengan Akt juga berpindah ke nukleus dan memfosforilasi faktor transkripsi *cAMP response element-binding protein* (CREB) yang akan meregulasi ekspresi dari gen-gen spesifik yang berkontribusi terhadap kelangsungan hidup neuron, diantaranya protein anti apoptosis Bcl-2.^{1,32-35}

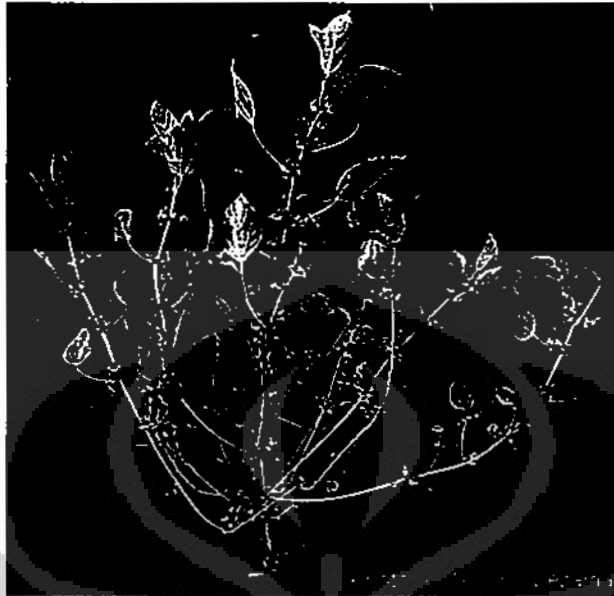
- Jalur ketiga melalui fosforilasi Bad oleh protein kinase A (PKA) dan peristiwa selanjutnya terjadi seperti jalur pertama.^{1,32,33}

2.3. *ACALYPHA INDICA* LINN (AKAR KUCING)

Acalypha Indica Linn sering juga disebut kucing-kucingan atau akar kucing karena akarnya disenangi kucing yang sedang sakit. Akar Kucing merupakan gulma yang sangat umum ditemukan dan tumbuh liar di pinggir jalan, di tempat pembuangan sampah, lapangan rumput maupun di lereng gunung. Merupakan tanaman semusim, tegak dengan tinggi antara 30-50 cm, bercabang dengan garis memanjang kasar dan berambut halus.

Tanaman ini memiliki daun tunggal, bertangkai panjang, dan letak tersebar. Helaian daun berbentuk bulat telur sampai lanset, tipis, ujung dan pangkal runcing dan berwarna hijau. Berbunga majemuk, berkelamin satu yang keluar dari ketiak daun, kecil-kecil dalam rangkaian berbentuk bulir.

Buahnya buah kotak, bulat dan hitam. Biji bulat panjang berwarna coklat pucat. Akarnya akar tunggang, berwarna putih kotor.³⁶⁻³⁹



Gambar 8. Tanaman *Acalypha Indica* Linn.³⁹

2.3.1. Taksonomi tanaman akar kucing.³⁹

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Euphorbiales
Suku	: Euphorbiaceae
Marga	: <i>Acalypha</i>
Jenis	: <i>Acalypha indica</i> Linn.

2.3.2. Kegunaan tanaman akar kucing bagi kesehatan

Di Indonesia, tanaman akar kucing telah lama digunakan sebagai pengobatan tradisional untuk mengatasi berbagai masalah kesehatan, bahkan di India penggunaan akar kucing ini merupakan salah satu tanaman obat

terkenal yang dipakai dalam sistim pengobatan Siddha.⁴⁰ Selain di Indonesia dan India penggunaan akar kucing sebagai obat tradisional juga terdapat di Banglades, Thailand, Filipina, Malaysia, dan negara-negara di Afrika.

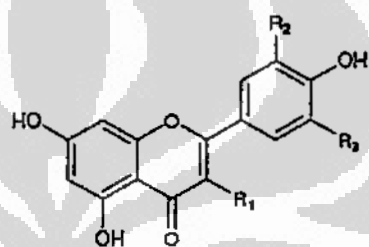
Beberapa manfaat dari tanaman ini telah dibuktikan secara ilmiah, antara lain sebagai pencahar, antihelmintik, ekspektoran, antiemetik, antimikroba, kontrasepsi (antifertilitas), antimalaria dan diuretik.⁴⁰⁻⁴²

Efek neuroproteksi dan neuroterapi tanaman akar kucing telah dibuktikan oleh Purwaningsih dan kawan-kawan (2008) secara *ex vivo* pada dosis 12-15 mg/ml, dimana ekstrak akar tanaman akar kucing mampu memperbaiki kelumpuhan otot katak yang diberikan pelumpuh otot, dengan aktivitas listrik otot tersebut sebagai parameter yang diukur.¹² Selain itu Suswati (2010) juga melaporkan ekstrak akar tanaman akar kucing mampu memperbaiki kerusakan sel neuron hipokampus tikus pascahipoksia serebri secara *in vivo* pada dosis 400 dan 500 mg/kg BB, dengan jumlah sel neuron hipokampus yang rusak sebagai parameternya.¹⁶

2.3.3. Kandungan zat-zat aktif akar kucing

Kandungan bahan aktif yang bermanfaat dari tanaman ini masih belum dapat diidentifikasi dengan baik. Terdapat beberapa bahan-bahan kimia aktif yang bermanfaat dari tanaman ini yang telah berhasil diidentifikasi diantaranya adalah *kaempferol* (flavonoid), *beta-sitosterol*, HCN, *gamma-sitosterol*, dan *Acalyphin*.^{13,39} Hasil uji fitokimia ekstrak air akar dari tanaman akar kucing yang dilakukan di FKUI, ditemukan alkaloid, saponin, tannin, dan stigmasterol sebagai bahan aktifnya.¹² Penelitian lainnya di FKUI yang dilakukan secara kualitatif juga menemukan adanya flavonoid (*kaempferol*) dan komponen fenolik (tannin) dalam ekstrak akar tanaman akar kucing.⁴³ Penelitian di India membuktikan bahan aktif yang terkandung dalam akar tanaman akar kucing (flavonoid dan tannin) memiliki aktivitas antioksidan, yang mampu melindungi otak dari efek senyawa radikal bebas yang memicu terjadinya apoptosis pada saat hipoksia.¹⁴

Flavonoid adalah komponen utama yang ditemukan pada buah-buahan, sayuran, dan tumbuh-tumbuhan. Selain merupakan antioksidan kuat, flavonoid juga memiliki efek neuroproteksi terhadap kerusakan neuron yang disebabkan oleh stroke iskemia dengan cara menginterupsi kaskade kematian sel, diantaranya dengan mencegah pembentukan ROS dan menghambat peningkatan kalsium intraselular.^{15,44,45,46} Senyawa ini larut dalam air dan banyak ditemukan pada ekstrak tanaman. Flavonoid terbagi dalam 7 subklas: Flavonol, flavon, flavonone, flavanonol, flavanol, antocyanidin, dan isoflavon.¹⁵



<i>Flavonols</i>			
	<i>R₁</i>	<i>R₂</i>	<i>R₃</i>
Kaempferol	OH	H	H

Gambar 9. Rumus bangun Kaempferol.¹⁵

Salah satu jenis flavonoid yang terkandung dalam tanaman akar kucing adalah kaempferol (golongan flavonol). Penelitian membuktikan, kaempferol memiliki kemampuan mencegah eksitotoksisitas glutamat dan disfungsi mitokondria dan secara signifikan mengurangi kematian neuron yang disebabkan oleh aktivasi berlebihan reseptor glutamat (salah satu bagian dari kaskade iskemia), yaitu reseptor N-methyl-D-aspartate acid (NMDA) dan kainat.⁴⁵ Efek neuroproteksi ini berhubungan dengan kemampuan kaempferol sebagai antioksidan dalam mempertahankan potensial elektrik membran mitokondria melalui pengaturan ion kalsium dan menangkal radikal bebas.⁴⁵ Dilaporkan adanya kemungkinan kaempferol berinteraksi langsung pada kanal Ca^{2+} , mencegah kanal tersebut terbuka sehingga tidak terjadi peningkatan Ca^{2+} intraselular yang berakibat kematian neuron serta secara langsung

menghambat pembentukan senyawa radikal bebas yang dihasilkan oleh mitokondria.⁴⁶

2.4. MTT ASSAY

MTT *assay* adalah salah satu cara yang digunakan untuk menghitung viabilitas neuron, dengan cara mengukur aktivitas enzim dehidrogenase mitokondria sel yang hidup. Enzim dehidrogenase yang terdapat dalam mitokondria yang aktif pada sel yang hidup akan mengubah larutan MTT yang berwarna kuning (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*), dengan cara memecah cincin tetrazolium menjadi kristal formazan ungu yang tidak larut dalam air. Perubahan warna ini tidak terjadi pada sel yang mati. Dengan penambahan *Acidified* isopropanol, kristal formazan ungu menjadi larut, sehingga densitas warna dapat diukur. Pengukuran absorbansi warna menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 490 nm.

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

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

2.5. PEMERIKSAAN BrdU

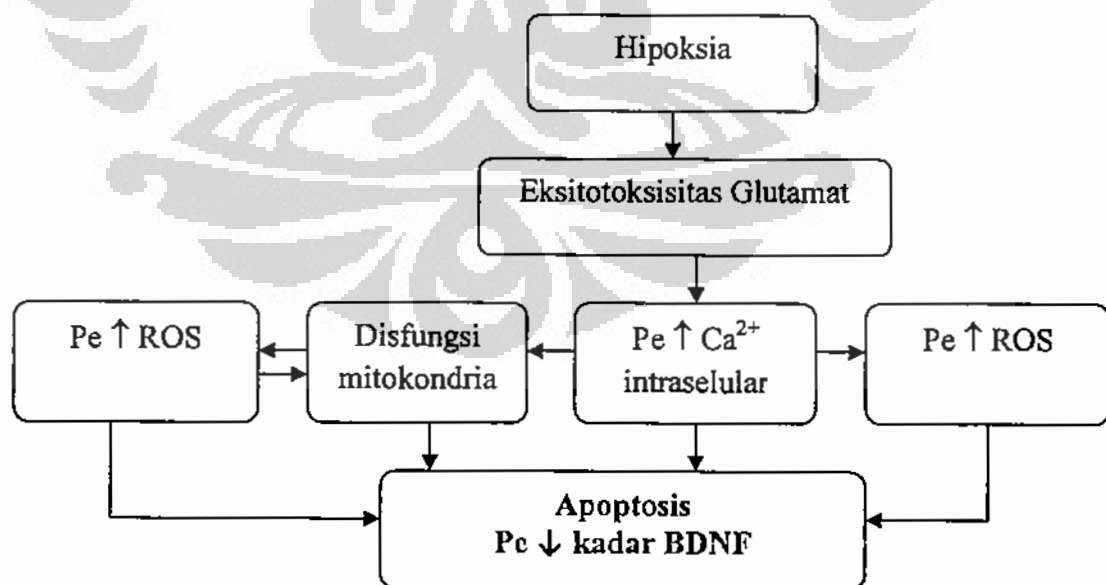
Prinsip kerjanya BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine) adalah nukleosida sintetik yang merupakan analog timidin, sehingga dapat diinkorporasikan ke dalam DNA yang baru disintesis oleh sel yang berproliferasi dengan metode ELISA. Antibodi monoklonal yang spesifik terhadap BrdU digunakan untuk mendeteksi sel-sel yang aktif berproliferasi. Lalu ditambahkan peroksida hingga dihasilkan perubahan warna. Pengukuran absorbansi menggunakan ELISA *reader* pada 405 nm dengan panjang gelombang reference 490 nm dan hasilnya berkorelasi langsung dengan kadar BrdU yang masuk ke dalam DNA sel.

Berdasarkan prinsip tersebut, semakin tinggi absorbansi dari warna larutan yang terbentuk mencerminkan semakin tingginya jumlah antibodi monoclonal yang mendeteksi BrdU dan menunjukkan semakin tingginya tingkat proliferasi sel.

2.6. PEMERIKSAAN KADAR BDNF METODE ELISA

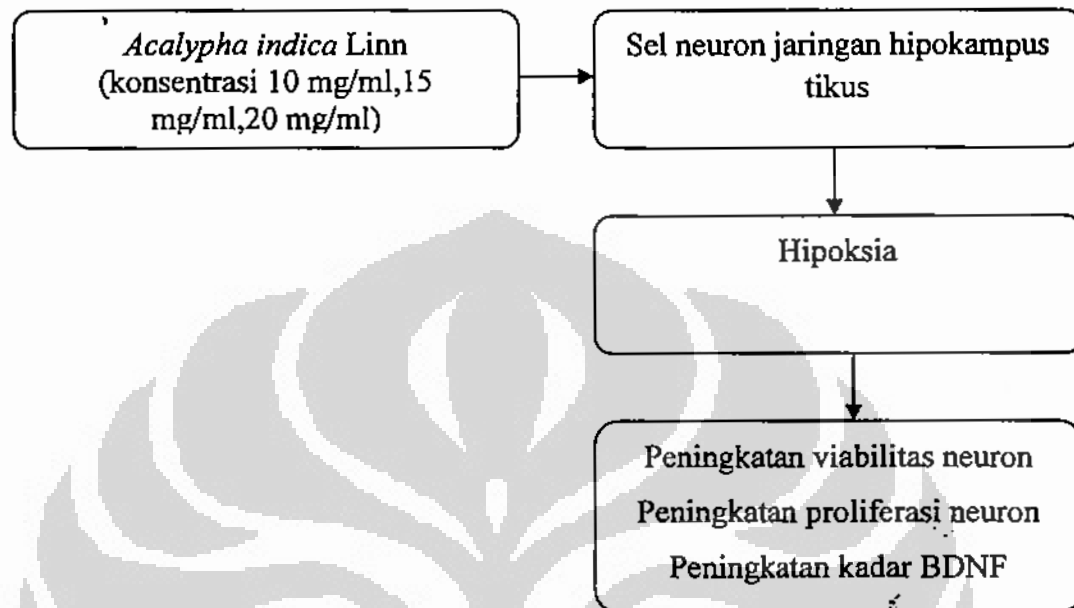
Prinsip kerja: pada tiap *microplate well* yang disediakan telah dilapisi oleh *Rabbit anti-Human BDNF Polyclonal Antibody* untuk mengikat BDNF dari sampel dan serial standar. *Biotin conjugated* dan antibodi monoklonal tikus akan mendeteksi BDNF yang terikat. Setelah penambahan enzim streptavidin serta *stop solution*, dapat dilakukan pengukuran kadar BDNF larutan standar dan sampel, menggunakan *Elisa reader* pada panjang gelombang 450 nm. Kurva standar menggambarkan hubungan langsung antara *Optical Density (OD)* dengan konsentrasi BDNF.

2.7. KERANGKA TEORI



Gambar 10. Kerangka teori

2.8. KERANGKA KONSEP



Gambar 11. Kerangka konsep penelitian

Definisi Operasional

- Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn, yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn, dari akar tanaman *Acalypha indica* Linn, yang ada di Indonesia. Determinasi sampel tanaman *Acalypha indica* Linn. dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Pusat Penelitian Biologi-Bogor. Ekstraksi dilakukan di Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran FKUI. Konsentrasi yang dipajankan adalah 10 mg/ml, 15 mg/ml, dan 20 mg/ml.
- Sel neuron adalah sel yang terdapat pada jaringan hipokampus tikus dan dikultur dalam medium DMEM selama 7-10 hari, kemudian diidentifikasi dengan pewarnaan trypan blue sebelum dipajan ekstrak akar *Acalypha indica* Linn.
- Hipoksia adalah suatu kondisi kekurangan oksigen yang dibuat dengan cara mengalirkan campuran 5% gas Oksigen, 5 % gas karbondioksida, dan

nitrogen balans ke dalam modifikasi *chamber* yang berisi kultur sel neuron.

- Viabilitas sel neuron (%) diukur berdasarkan nilai OD dari metode MTT *assay* pada panjang gelombang 490 nm. 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.
- Proliferasi neuron diukur berdasarkan nilai absorbansi BrdU dengan metode ELISA, pada panjang gelombang 490 nm. 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.
- Kadar BDNF (pg/ml) dalam medium kultur diukur dengan metode ELISA pada spektrofotometri dengan panjang gelombang 450 nm.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vitro* pada sel saraf yang dipajan dengan ekstrak akar kucing selama 72 jam dilanjutkan dengan perlakuan hipoksia selama 24 jam. Sel saraf diisolasi dari jaringan hipokampus tikus jantan dewasa sehat jenis *Sprague Dowley* berumur 9-10 minggu dengan berat 200-250 gram dan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol, yang tidak dipajan ekstrak akar kucing. Kelompok kedua, dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml. Kelompok ketiga, dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml dan kelompok keempat, dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml. Kemudian semua kelompok diberi perlakuan hipoksia. Viabilitas sel saraf diukur dengan metode MTT *assay*, tingkat proliferasi sel saraf dianalisa dengan *5-bromo2'-deoxy-uridine* (BrdU) yang dipakai sebagai penanda proliferasi sel dan diukur dengan metode ELISA. Kadar BDNF pada medium kultur dianalisa dengan menggunakan BDNF *kit* dan diukur dengan metode ELISA.

3.2. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan Laboratorium Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia (FKG-UI). Penelitian berlangsung dari bulan Januari – Maret 2010.

3.3. SUBYEK PENELITIAN

Subyek adalah tikus jantan dewasa sehat jenis *Sprague Dowley* berumur 9-10 minggu dengan berat 200-250 gram.

3.4. PARAMETER, VARIABEL, DAN SAMPEL PENELITIAN

- Parameter penelitian adalah viabilitas dan tingkat proliferasi sel saraf,

serta kadar BDNF.

- 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 serta kadar BDNF.

Tabel 1. Variabel Penelitian

Variabel	Parameter	Cara Pengukuran	Satuan
Variabel bebas	Kadar/dosis ekstrak <i>Acalypha indica</i> Linn	-	mg/ml
Variabel terikat	Viabilitas relatif sel	Pemeriksaan MTT	%
	Tingkat proliferasi sel	Pemeriksaan BrdU	Nilai absorbansi
	Kadar BDNF	Metoda ELISA	pg/ml

- Sample diambil dari jaringan hipokampus tikus jantan dewasa sehat jenis *Sprague Dowley* berumur 9-10 minggu yang diperoleh dari Departemen Biokimia FKUI.
- Perhitungan jumlah sampel pada tiap kelompok ditetapkan dengan menggunakan rumus Federer:

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

t = jumlah kelompok perlakuan; n = jumlah sampel

Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok perlakuan, maka jumlah sampel ialah:

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

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

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan dengan rumus diatas, jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 6 sampel untuk tiap kelompok (1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan). Maka jumlah total sampel adalah 24 sampel. Semua sampel diperoleh dari 1 ekor tikus.

3.5. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

3.5.1. Bahan Penelitian

- Jaringan hipokampus diambil dari otak tikus jantan dewasa sehat jenis *Sprague Dowley*, usia 9-10 minggu dengan berat 200-250 gram.
- Ekstrak air akar tanaman akar kucing 250 mg/ml (diperoleh dari Departemen Farmasi FKUI)
- Medium kultur DMEM, GIBCO
- *Fetal Bovine Serum* (FBS), SIGMA
- *Penn-Strep*, GIBCO (100x)
- *Fungizone* (Amphotericyn B), GIBCO (100x)
- *Poly-L-Lysin* 0,1%, Nacalai tesque.
- Milli Q
- *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
- *Trypsin* 0,025% -*EDTA* 0,01%, GIBCO, (1 x)
- ChemiKine BDNF ELISA kit, Chemicon Cat No. CYT 306
- BrdU Labeling and detection kit III, Roche Cat No. 11 444 611 001
- Gas CO₂ 5%/O₂ 5%/ N₂ 90%, PT Pelangi Gasindo, Jakarta.
- Ethanol 70% dalam HCl (konsentrasi akhir 0,5 M)
- Trypan blue
- BSA, Bio-Rad
- Glycerol 50%
- 0,9% NaCl
- MTT stock, In Vitro.
- Larutan Isopropanol
- HCl 0,04 N

3.5.2. Alat-alat

- Laminar air flow, ESCO type A2, Biohazard Safety Cabinet
- ELISA microplate reader, Bio-Rad
- Inkubator CO₂ 5%, 37°C. Inco 2 memmert
- Mikroskop phase kontras, Nikon cclipse 80i

- Mikroskop *inverted*, Olympus CK series
- Kamera Olympus Camedia C-4040 zoom
- Thermostatic water bath model YCW-01
- Timbangan gram Adventurer No. ARC 120
- Timbangan milligram, Explorer E 12140
- Sentrifuge Sorvall Legend RT
- Microcentrifuge Sorvall Legend Micro 17
- Shaker Certomat U, B Braun Biotech Int
- Vortex, Bio-Rad BR-2000
- Gunting, pinset, scalpel steril
- Cawan petri steril diameter 35 mm dan 100 mm, Corning
- Mortar
- Plate 24 well, IWAKI
- Plate 96 well, Costar
- Filter disposable millipore 0,2 μm , Sartorius
- Disposable syringe 50 ml, Terumo
- Tabung Eppendorf 15 ml, dan 50 ml, Biologix
- Sentrifuge tube 1,5 ml
- Cell Strainer, BD Falcon
- Cell scraper, BD Falcon
- Cell lifter, Biologix
- Pipettors
- Pipet tips

3.6. CARA KERJA

3.6.1. Seleksi hewan coba

Hewan coba adalah tikus jantan dewasa sehat jenis *Sprague Dowley* berumur 9-10 minggu dengan berat 200-250 gram berjumlah 1 ekor yang diperoleh dari Departemen Biokimia FKUI. Sumber sampel adalah jaringan hipokampus tikus.

3.6.2. Pembuatan medium DMEM komplit

Medium DMEM komplit dibuat dalam laminar air flow dengan cara menambahkan 10% FBS, 1% Penn-Strep dan 1% Fungizone ke dalam larutan DMEM. Selanjutnya campuran larutan tersebut disaring dengan filter milipore 0,2 μm steril dan disimpan dalam lemari es.

3.6.3. Pembuatan campuran ekstrak akar kucing dalam DMEM komplit

Semua proses pembuatan campuran ini dilakukan dalam laminar air flow. Ekstrak akar kucing dibuat dalam berbagai konsentrasi (10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml) dengan cara mencampur ekstrak akar kucing stok (250 mg/ml) dengan larutan medium DMEM komplit.

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

Selanjutnya campuran larutan tersebut disaring dengan filter milipore 0,2 μm steril kemudian disimpan di lemari es sampai waktu penggunaan.

3.6.4. Isolasi sel saraf

Jaringan hipokampus diambil dari otak tikus dewasa sehat jenis *Sprague Dowley* (hewan dikorbankan dengan cara dislokasi leher). Lalu jaringan dimasukkan dalam tabung eppendorf berisi larutan DMEM komplit. Selanjutnya, jaringan dipotong-potong dengan pisau atau secara mekanik dengan pisau hingga halus. Masukkan jaringan tersebut ke dalam tabung sentrifus 15 ml, tambahkan PBS 3 ml, kemudian disentrifugasi (200g, 6

menit). Supernatan dibuang, dan pada pellet ditambahkan 3 ml PBS dan 2 ml tripsin 0,025%-EDTA 0,01%. Inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, setelah itu tambahkan 0,5 ml FBS untuk menghentikan kerja tripsin lalu sentrifugasi (200g, 13 menit). Kemudian supernatan dibuang dan pada pellet ditambahkan 2 ml larutan medium DMEM komplet, lalu dipipeting sampai homogen.

3.6.5. Kultur sel saraf

Jumlah sel saraf dalam 2 ml larutan medium DMEM hasil 3.6.4. dihitung dengan menggunakan kamar hitung sel (*improved Neubauer hemocytometer*) dengan pewarnaan trypan blue, dengan cara mencampur 10 µl cairan suspensi sel saraf dengan 10 µl PBS dan 80 µl trypan blue. Teteskan campuran tadi pada ujung kamar hitung hingga cairan mengalir memenuhi kamar hitung. Letakkan kamar hitung di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa obyektif 10 x. Hitung jumlah sel yang hidup, tampak jernih karena tidak menyerap zat warna trypan blue, per 1 ml di 5 area lapang jumlahkan dan dirata-rata.

Sel saraf kemudian dikultur dalam *plate* steril diameter 100 mm yang sebelumnya telah dilapisi dengan Poli-L-Lysin selama 1-2 jam. Jumlah sel saraf yang dikultur adalah sebanyak 20×10^6 sel dalam medium DMEM komplet. Selanjutnya sel diinkubasi pada inkubator CO₂ pada kondisi 5% CO₂/95% udara pada suhu 37°C selama 10 hari. Medium kultur diganti setiap 3 hari sekali dan sel diobservasi dengan mikroskop phase kontras, Nikon eclipse 80i, pembesaran 10 x.

3.6.6. Panen dan subkultur sel saraf

Setelah 10 hari dikultur atau setelah sel *confluent*, morfologi sel saraf diidentifikasi dengan pewarnaan trypan blue. Setelah teridentifikasi sebagai sel saraf, sel dipanen untuk kemudian di subkultur pada *plate 24 well* untuk pemeriksaan MTT assay dan kadar BDNF serta *plate 96 well* guna pemeriksaan tingkat proliferasi dengan BrdU.

3.6.6.1. Panen sel saraf

3 ml tripsin 0,025%-EDTA 0,01% ditambahkan pada *plate* sel yang mau dipanen, lalu diinkubasi di inkubator 37°C selama 10 menit, observasi dengan mikroskop apakah sel saraf sudah terlepas. Kemudian koleksi sel-sel yang sudah terlepas ke dalam tabung sentrifus 15 ml. Panen sel ini dapat dikombinasi dengan cara mekanik menggunakan *cell scraper*. Selanjutnya sel disentrifugasi (200g, 15 menit), kemudian supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan DMEM komplet, lalu jumlah sel dihitung pada kamar hitung dengan pewarnaan trypan blue.

3.6.6.2. Subkultur sel saraf

Sel di kultur pada *microplate* 24 *well* (jumlah sel 5×10^5 /well) dan *microplate* 96 *well* (jumlah sel 1×10^5 /well) yang sebelumnya telah dilapisi dengan Poli-L-Lysin selama 1-2 jam.

3.6.7. Pemajanan ekstrak air akar kucing

Ekstrak akar kucing (10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml) dipajan pada kelompok perlakuan, dengan cara mencampur dalam medium kultur. Sedangkan kelompok kontrol dikultur dalam medium DMEM komplet. Selanjutnya sel dikultur pada inkubator 5% CO₂/95% udara dengan suhu 37°C selama 72 jam.

3.6.8. Perlakuan hipoksia

Setelah 72 jam sel dipajan dengan ekstrak akar kucing, kultur *plate* dimasukkan dalam *Tupperware* kedap udara, kemudian *tupperware* tersebut dialiri gas dari tangki khusus yang berisi CO₂ 5%/O₂ 5%/ N₂ 90% melalui selang kecil selama 10 menit dengan kondisi *tupperware* tertutup rapat.⁴⁷ Kemudian setelah 10 menit, selang dicabut dan *tupperware* dilapisi dengan *tape* kertas hingga benar-benar kedap udara. Selanjutnya sel dalam *tupperware* dikultur pada inkubator CO₂ 5% /95% udara dengan suhu 37°C selama 24 jam.

3.6.9. Sampel untuk kadar BDNF

Sampel untuk pengukuran kadar BDNF diperoleh dari medium kultur *plate 24 well* langsung setelah perlakuan hipoksia selama 24 jam. 800 μ L medium dari tiap *well* diambil selanjutnya medium kultur tersebut disentrifugasi 200g, 1 menit, supernatan diambil dan disimpan -20° C untuk analisa kadar BDNF.

3.6.10. MTT assay (lihat lampiran 2)

Setelah perlakuan hipoksia selama 24 jam dan pengambilan medium kultur untuk pemeriksaan kadar BDNF, langsung dilakukan pemeriksaan MTT. Tambahkan 75 μ l larutan MTT (5 mg/ml) per *well* pada kurang lebih 200 μ l sisa medium dalam *microplate 24 well*. Inkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam. Kemudian tambahkan 750 μ l larutan *Acidified isopropanol* pada tiap *well*, lalu goyangkan *microplate* di *shaker* 50 rpm selama 1 jam pada suhu ruangan. Selanjutnya ambil 250 μ l cairan per *well* pindahkan ke *microplate 96 well* (triplo), lalu *optical density* dari *assay* tersebut diukur pada *Elisa reader* dengan panjang gelombang 490 nm. Perhitungan viabilitas relatif menggunakan rumus:

$$\text{Viabilitas relatif (\%)} = \frac{\text{Absorbance (kelompok perlakuan)} \times 100}{\text{Absorbance kontrol}}$$

3.6.11. Pemeriksaan tingkat proliferasi sel saraf (lampiran 3)

Tambahkan 10 μ l *BrdU labeling solution* pada tiap *well* (*microplate 96 well*) (konsentrasi akhir 10 μ m *BrdU*), inkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Kemudian buang medium kultur yang mengandung *BrdU labeling solution* dengan hati-hati lalu cuci sel dengan 250 μ l *DMEM* komplet sebanyak 2 kali.. Fiksasi sel dengan 200 μ l *fixative* selama 30 menit pada suhu -15°C - -25°C. Kemudian buang cairan *fixative* dan cuci sel sebanyak 3 kali dengan 250 μ l *DMEM* komplet, lalu inkubasi sel dengan 100 μ l *nucleases working solution* selama 30 menit di *water bath* pada suhu 37°C. Setelah itu buang *nucleases working solution* dan sel dicuci sebanyak 3 kali dengan 250 μ l *DMEM* komplet. Tambahkan 100 μ l anti *BrdU* *POD*, *Fab fragments working solution*

dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Buang anti BrdU POD, Fab *fragments working solution* dan cuci sel sebanyak 3 kali dengan 250 µl *washing buffer* lalu tambahkan 100 µl *peroxidase substrate* dan inkubasi pada suhu ruang selama 2-30 menit hingga sample berwarna hijau. Pengukuran *absorbance* dengan ELISA *reader* pada 405 nm dengan panjang gelombang *reference* 490 nm.

3.6.12. Pemeriksaan kadar BDNF metoda ELISA (Lampiran 4)

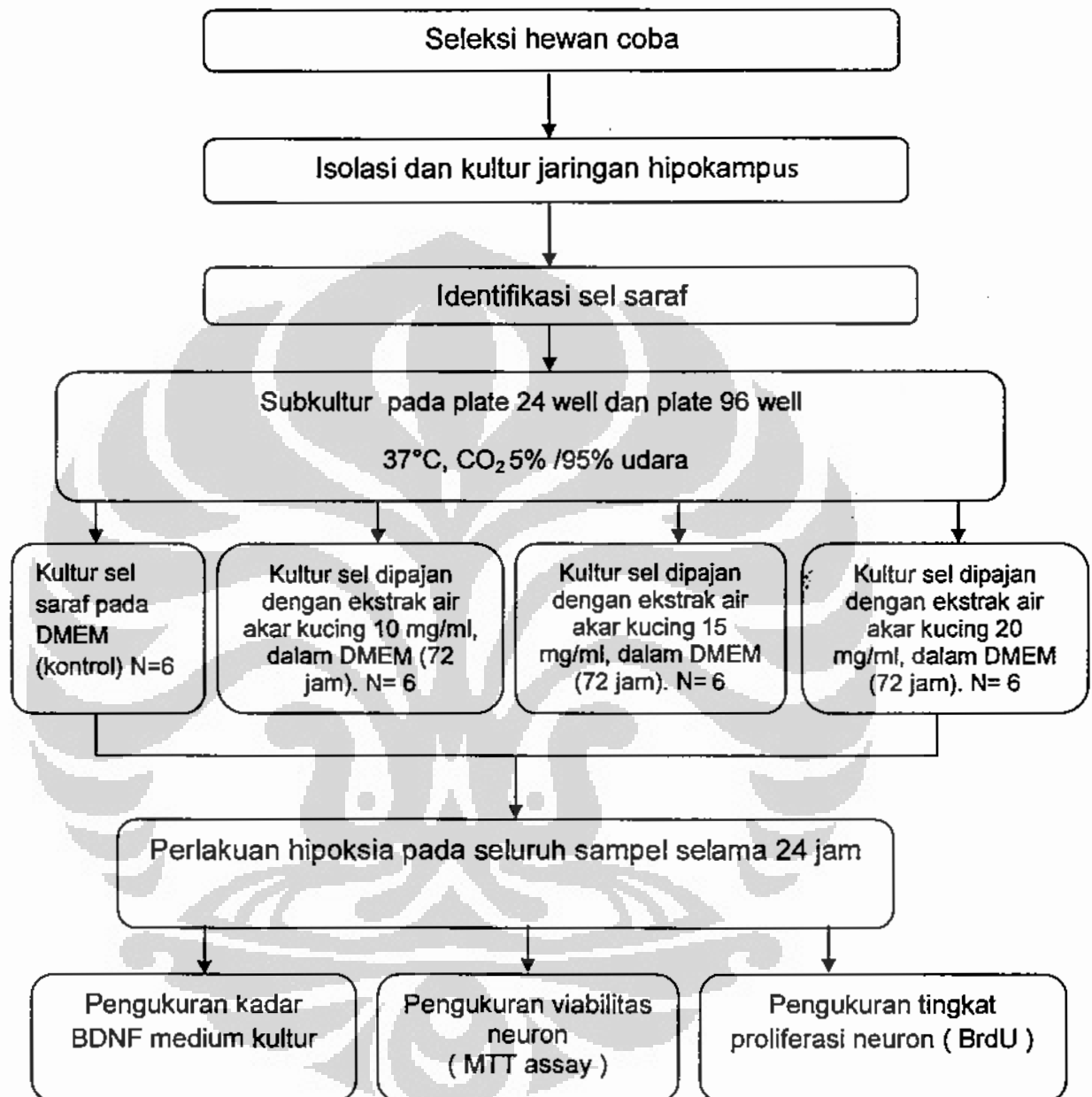
Langkah-langkah pemeriksaan: pertama-tama buat dahulu larutan standar sesuai konsentrasi yang ditentukan pada petunjuk. Masukkan 100 µl larutan standar dan sampel (dari 3.6.9) ke dalam *well* (duplo). Kemudian tutup *microplate* dengan parafin film dan inkubasi "overnight" pada suhu 2-8°C. Selanjutnya cuci dengan seksama *microplate* dengan 250 µl *wash buffer* dengan cara membalik *plate* dan ketuk-ketuk hingga cairan keluar lalu keringkan dengan cara ditepuk-tepuk pada tissue. Ulangi pencucian tersebut sebanyak 4 kali. Tambahkan 100 µl mouse anti BDNF antibodi yang telah diencerkan, tutup plate dengan parafin film dan diinkubasi sambil digoyang pada *shaker* 50 rpm suhu ruang selama 3 jam. Cuci kembali dengan 250 µl *wash buffer* seperti prosedur pencucian diatas sebanyak 4 kali. Lalu tambahkan 100 µl Streptavidin-enzyme conjugate yang telah diencerkan, tutup plate dan inkubasi pada suhu ruang selama 1 jam sambil digoyang di atas *shaker*. Cuci kembali dengan 250 µl *wash buffer* sebanyak 4 kali dan tambahkan 100 µl larutan TMB/E. Inkubasi pada suhu ruang selama 15 menit hingga timbul warna biru gelap. Setelah itu tambahkan 100 µl *stop solution* hingga terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning. Segera lakukan pembacaan pada ELISA *reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

3.7. ANALISIS DATA

Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan program statistik komputer SPSS versi 16. Perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dan antar kelompok perlakuan, setiap variable diuji dengan uji statistik Parametrik (*Anova one way*) setelah dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Bila terdapat data dengan distribusi dan variansnya tidak normal akan dilakukan transformasi data dan apabila setelah transformasi data, distribusi tetap tidak normal, maka dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal Wallis* dengan $p < 0,05$ dianggap bermakna secara statistik.



3.8. ALUR PENELITIAN



BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. PENGARUH EKSTRAK AKAR *ACALYPHA INDICA* LINN TERHADAP VIABILITAS NEURON

Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn mampu meningkatkan viabilitas neuron pada keadaan hipoksia, terlihat pada tabel 2 dan gambar 12.

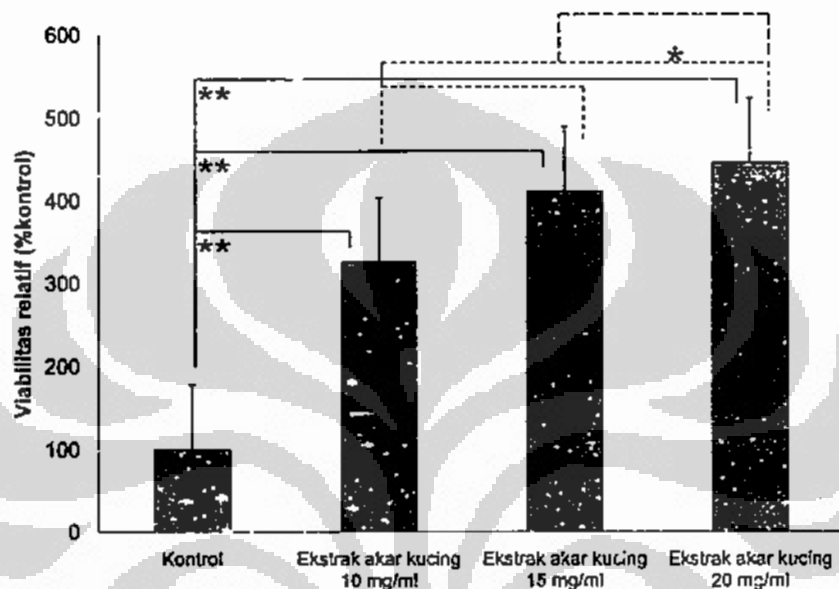
Tabel 2. Rerata viabilitas relatif neuron, diukur dengan menggunakan metoda MTT assay secara triplo pada kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml dan kelompok kontrol.

Kelompok Perlakuan	Jumlah sampel (N)	Rata-rata viabilitas relatif sel (%)	SD	Sig.
Kontrol	6	99.7	6.98	
akar kucing 10 mg/ml	6	326.30	43.73	0,004
akar kucing 15 mg/ml	6	411.65	114.25	0,004
akar kucing 20 mg/ml	6	445.91	67.37	0,004

Terlihat rerata prosentase viabilitas neuron pada kelompok kontrol sebesar 99,7%, sedangkan pada kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml sebesar 326.30%, kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml sebesar 411.65%, dan pada kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml sebesar 445.91%.

Dibandingkan dengan kelompok kontrol, terdapat peningkatan rerata prosentase viabilitas neuron kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml sebanyak 3 kali, dan perbedaan ini bermakna secara statistik (uji Kruskal Wallis $p=0,004$; $p<0,01$).

Demikian juga rerata prosentase viabilitas neuron kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml dan 20 mg/ml meningkat sebanyak 4 kali bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, perbedaan ini bermakna secara statistik (uji Kruskal Wallis $p=0,004$, $p=0,004$; $p<0,01$).



Gambar 12. Rerata prosentase viabilitas relatif neuron
(** $p<0,01$; * $p<0,05$)

Prosentase rerata viabilitas neuron kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml tidak menunjukkan perbedaan bermakna dengan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml ($p=0,200$; $p>0,05$). Demikian juga Prosentase rerata viabilitas neuron kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml tidak menunjukkan perbedaan bermakna dengan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml ($p=0,522$; $p>0,05$). Sedangkan prosentase rerata viabilitas neuron kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml menunjukkan perbedaan bermakna dengan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml ($p=0,01$; $p<0,05$).

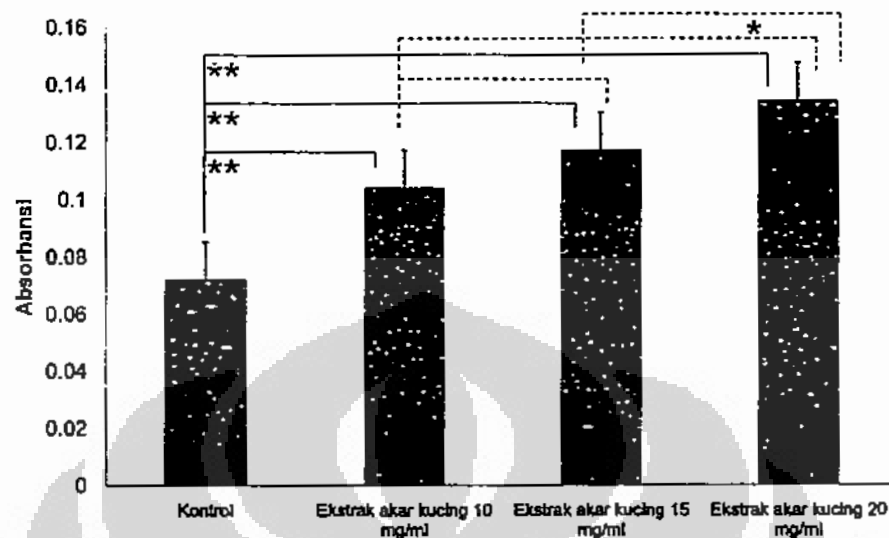
4.2. PENGARUH EKSTRAK AKAR *ACALYPHA INDICA* LINN TERHADAP TINGKAT PROLIFERASI NEURON

Viabilitas neuron berdasarkan tingkat proliferasinya diukur dengan menambahkan BrdU, sebagai penanda proliferasi neuron yang dilakukan secara duplo. Hasil berupa nilai absorbansi (berkorelasi langsung dengan tingkat proliferasi) antara kelompok kontrol dengan kelompok yang dipajan dengan ekstrak akar kucing terlihat pada tabel 3 dan gambar 13 sebagai berikut:

Tabel 3. Rerata nilai absorbansi BrdU pada kelompok kontrol dan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml, 15 mg/ml, dan 20 mg/ml.

Kelompok Perlakuan	Jumlah sampel (N)	Rata-rata Absorbansi	SD	Sig.
Kontrol	6	0,072	0,0095	
Akar kucing 10 mg/ml	6	0,104	0,0146	0,006
Akar kucing 15 mg/ml	6	0,117	0,0187	0,004
Akar kucing 20 mg/ml	6	0,134	0,0135	0,004

Terlihat kelompok kontrol dengan rerata absorbansi 0,072, sedang kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml memiliki rerata absorbansi 0,104, dengan peningkatan sebanyak 1,5 kali dibandingkan dengan kelompok kontrol yang bermakna secara statistik (Uji Kruskal wallis, $p=0,006$; $p<0,01$). Kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml memiliki rerata absorbansi 0,117, dengan peningkatan hampir 2 kali dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji Kruskal wallis, $p=0,004$; $p<0,01$). Kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml memiliki rerata absorbansi 0,134, dengan peningkatan 2 kali dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji Kruskal wallis, $p=0,004$; $p<0,01$).



Gambar 13. Nilai absorbansi BrdU
(** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Nilai absorbansi BrdU neuron kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml tidak menunjukkan perbedaan bermakna dengan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml ($p = 0,297$; $p > 0,05$). Demikian juga dengan nilai absorbansi BrdU neuron kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml tidak menunjukkan perbedaan bermakna dengan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml ($p = 0,149$; $p > 0,05$). Sedangkan nilai absorbansi BrdU neuron kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml menunjukkan perbedaan bermakna dengan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml ($p = 0,01$; $p < 0,05$).

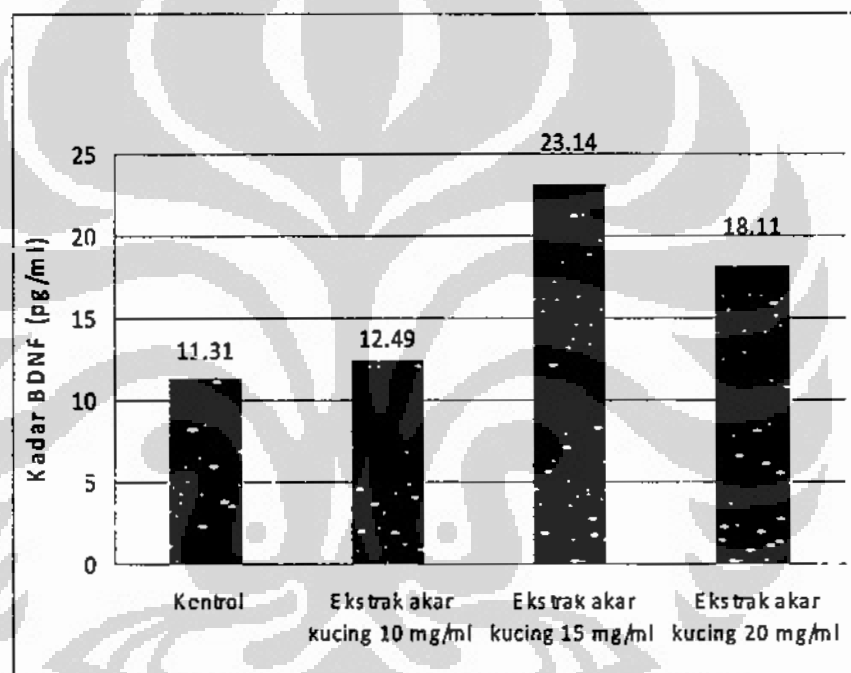
4.3. PENGARUH EKSTRAK AKAR *ACALYPHA INDICA* LINN TERHADAP KADAR BDNF

Kadar BDNF diukur dengan BDNF *kit* metode ELISA yang dilakukan secara duplo. Hasil dapat dilihat pada tabel 4 dan Gambar 14

Tabel 4. Kadar BDNF neuron pada kelompok kontrol dan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing.

No.	Kadar BDNF (pg/ml)			
	Kontrol	ekstrak akar kucing 10 mg/ml	ekstrak akar kucing 15 mg/ml	ekstrak akar kucing 20 mg/ml
1	11.31	12.49	23.14	18.11

* sampel yang diukur berasal dari kumpulan 6 sampel/ kelompok perlakuan (*pooled*)

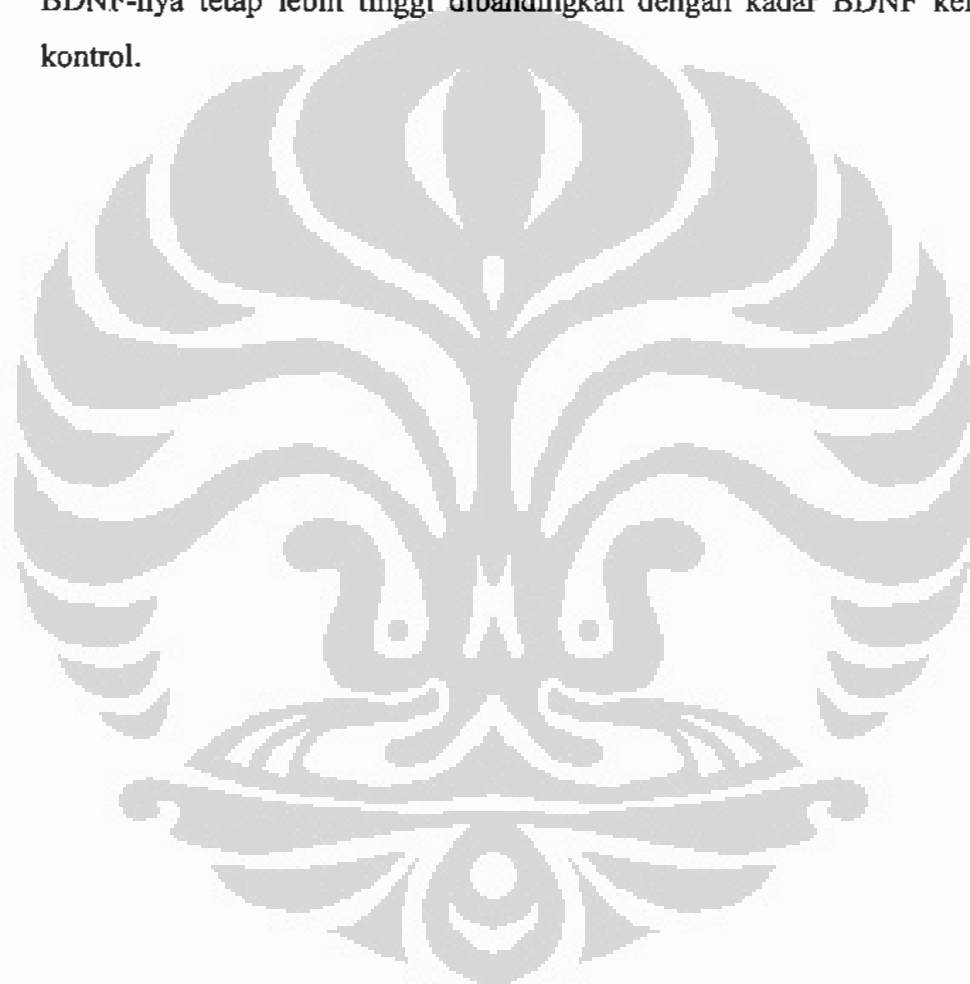


* sampel yang diukur berasal dari kumpulan 6 sampel/ kelompok perlakuan (*pooled*)

Gambar 14. Kadar BDNF neuron kelompok kontrol dan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing.

Kadar BDNF pada kelompok kontrol, 11,3055pg/ml, sedang pada kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml, 12,4865 pg/ml. Pada kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml memiliki kadar BDNF sebesar 23,137 pg/ml dan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml memiliki kadar BDNF sebesar 18,1145 pg/ml.

Terdapat sedikit peningkatan kadar BDNF pada kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml dibandingkan dengan kadar BDNF kelompok kontrol. Peningkatan sebesar 2 kali terdapat pada kadar BDNF kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml dibandingkan dengan kadar BDNF kelompok kontrol. Kadar BDNF mengalami sedikit penurunan pada kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml bila dibandingkan dengan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml, tetapi kadar BDNF-nya tetap lebih tinggi dibandingkan dengan kadar BDNF kelompok kontrol.



BAB V

PEMBAHASAN

Tanaman akar kucing atau *Acalypha indica* Linn telah lama digunakan sebagai pengobatan tradisional di beberapa negara termasuk di Indonesia. Khasiatnya dalam mengobati berbagai penyakit telah banyak diteliti, diantaranya sebagai pencahar, antihelmintik, ekspektoran, antiemetik, antimikroba, antimalaria, dan antidiuretik.⁴⁰⁻⁴² Sedangkan efeknya terhadap sel saraf belum banyak diteliti.

Purwaningsih *et al* telah meneliti efeknya sebagai neuroprotektor dan neuroterapi pada otot katak yang diberikan pelumpuh otot, dengan aktivitas listrik otot tersebut sebagai parameter yang diukur.¹² Pada SSP, efek neuroterapinya telah dibuktikan oleh Suswati pada otak tikus pasca hipoksia serebri, dengan jumlah sel rusak pada hipokampus sebagai parameter yang diukur¹⁶ dan oleh Yolanda pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia, dengan tingkat neurogenesis sebagai parameternya.⁴⁸ Sedangkan pengaruhnya terhadap viabilitas neuron pada saat terjadinya hipoksia belum diketahui. Maka masih diperiukan penelitian untuk mengetahui pengaruh akar kucing terhadap viabilitas neuron dan kadar BDNF pada keadaan hipoksia.

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis pengaruh akar kucing terhadap viabilitas neuron dan kadar BDNF endogen pada kultur jaringan hipokampus tikus pada keadaan hipoksia. Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dengan tujuan menghilangkan bias dari berbagai faktor yang sulit dikontrol bila penelitian ini dilakukan secara *in vivo*. Kultur sel yang digunakan adalah kultur sel primer dengan harapan akan diperoleh sel saraf dengan karakteristik dan fungsi yang sama dengan karakteristik dan fungsi sel saraf *in vivo*. Jaringan hipokampus digunakan pada penelitian ini karena hipokampus adalah area di otak yang rentan terhadap kondisi hipoksia serta di daerah ini pula terdapat sel-sel punca neuronal yang aktif berproliferasi.¹

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, dan optimal pada dosis 15-20 mg/ml.¹²

Identifikasi sel saraf pada penelitian ini dilakukan secara morfologis. Cara ini cukup dapat dipercaya, namun akan lebih baik lagi bila dilakukan identifikasi sel saraf dengan penanda neuronal/*neuronal marker* seperti *neuronal nuclei* (NeuN) atau *neuron-specific enolase antibodies*.⁴⁹ Identifikasi sel saraf secara morfologis merupakan keterbatasan penelitian ini, karena 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 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 (Dubelco's Modified Eagle's Medium) dan serum FBS yang merupakan medium dan serum yang spesifik untuk pertumbuhan neuron, sedangkan medium yang digunakan untuk pertumbuhan sel glia adalah MEM (Minimal Essential Medium).⁴⁹

Viabilitas sel dihitung berdasarkan aktivitas enzim dengan menggunakan *MTT assay* dan berdasarkan tingkat proliferasinya dengan pemeriksaan BrdU. Dengan menggunakan MTT, viabilitas sel yang diperoleh merupakan viabilitas relatif, namun cara ini dianggap lebih praktis dan hasilnya lebih dapat dipercaya dibandingkan dengan metode penghitungan sel dengan *trypan blue*. Cara ini tidak tergantung pada ketampilan pemeriksa, tidak diperlukan lebih dari 1 pemeriksa untuk meningkatkan tingkat reliabilitas, dan pemeriksaan pun tidak perlu dilakukan secara *blind*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn mampu meningkatkan viabilitas neuron pada keadaan hipoksia. Hasil ini tampak dari viabilitas neuron yang meningkat sebanyak tiga kali lipat pada neuron yang dipajan dengan ekstrak akar *Acalypha indica* Linn 10 mg/ml, dan peningkatan viabilitas neuron sampai empat kali lipat pada neuron

yang dipajan dengan ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn 15 mg/ml dan 20 mg/ml, dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan viabilitas neuron ini sesuai dengan peningkatan dosis dan bermakna secara statistik ($p < 0,01$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Purwaningsih *et al* (2008), dimana ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn memberikan efek baik neuroprotektif maupun neuroterapi yang optimal pada dosis 15 mg dan 20 mg/ml terhadap kelumpuhan saraf otot katak secara *ex vivo*.¹² Hasil ini juga sesuai dengan penelitian Yolanda (2010) dimana ekstrak akar kucing pada dosis 10 mg, 15 mg, dan 20 mg/ml berpengaruh terhadap peningkatan neurogenesis sel saraf pasca hipoksia.⁴⁸

Kemampuan ekstrak akar *Acalypha indica* Linn dalam meningkatkan viabilitas neuron berkaitan dengan zat aktif yang terkandung dalam ekstrak akar diantaranya flavonoid (kaempferol) dan komponen phenolic (tannin). Flavonoid merupakan salah satu antioksidan kuat, dilaporkan memiliki efek neuroproteksi potensial dalam mencegah kerusakan neuron yang disebabkan oleh stroke iskemia dengan cara menginterupsi kaskade kematian sel, diantaranya dengan mencegah pembentukan ROS dan menghambat masuknya kalsium ke intraselular.^{15,44-46}

Penelitian yang dilakukan oleh Balakrishnan N *et al* (2009) membuktikan zat-zat aktif tersebut diatas yang terkandung dalam ekstrak akar *Acalypha indica* Linn mampu menangkal efek radikal bebas NO dengan cara mensupresi pembentukan radikal NO.¹⁴ Kemampuan ini berhubungan dengan aktivitas antioksidan zat-zat aktif dalam akar *Acalypha indica* Linn dan dilaporkan setara dengan aktivitas antioksidan asam askorbat (vitamin C).¹⁴

NO, radikal bebas, yang dilepaskan saat terjadinya hipoksia berikatan dengan ROS (superoksida, O_2^-) membentuk radikal peroksinitrit yang sangat toksik bagi sel, yang akhirnya menyebabkan kematian sel.^{22,26} Adanya kemampuan antioksidan dalam tanaman *Acalypha indica* Linn ini diduga berperan dalam melindungi neuron terhadap kerusakan yang disebabkan peroksinitrit, sehingga dengan demikian neuron mampu bertahan hidup.

Beberapa penelitian juga melaporkan kemampuan neuroprotektif Kaempferol (golongan flavonoid yang terkandung dalam akar *Acalypha indica* Linn), terhadap eksitotoksisitas neuronal dan disfungsi mitokondria yang secara signifikan mengurangi kematian dan meningkatkan kelangsungan hidup neuron.^{45,50} Kaempferol terbukti mampu menghambat pembentukan radikal peroksida di mitokondria, menurunkan peroksidasi lipid membran mitokondria, serta mencegah hilangnya potensial elektrik transmembran mitokondria.^{45,50}

Kemampuan ini terkait dengan aktivitas antioksidan yang terkandung dalam kaempferol dalam mempertahankan potensial elektrik membran mitokondria melalui pengaturan ion kalsium dan menangkal radikal bebas.⁴⁵ Dilaporkan adanya kemungkinan kaempferol berinteraksi langsung pada kanal Ca^{2+} , mencegah kanal tersebut terbuka sehingga tidak terjadi peningkatan Ca^{2+} intraselular yang berakibat kematian neuron serta secara langsung menghambat pembentukan senyawa radikal bebas yang dihasilkan oleh mitokondria.^{46,50} Untuk itu diperlukan penelitian lebih lanjut guna membuktikan adanya kemungkinan ini. Dengan demikian, adanya zat-zat aktif dalam akar tanaman *Acalypha indica* Linn berperan dalam mencegah kematian neuron pada saat hipoksia yang terlihat dari meningkatnya viabilitas neuron.

Peningkatan viabilitas neuron ini sesuai dengan peningkatan dosis, dan kemungkinan pemberian dosis ekstrak akar *Acalypha indica* Linn yang lebih tinggi lagi, dapat semakin meningkatkan viabilitas neuron sehingga penelitian lanjutan dengan dosis ekstrak akar kucing yang lebih tinggi perlu dilakukan untuk mendapatkan dosis yang benar-benar optimal untuk peningkatan viabilitas neuron pada keadaan hipoksia.

Sel yang hidup, aktif berproliferasi sehingga viabilitas neuron juga dapat dilihat berdasarkan keaktifannya berproliferasi untuk itu dilakukan pemeriksaan lain guna melihat pengaruh akar kucing terhadap viabilitas neuron berdasarkan tingkat proliferasi selnya. Proliferasi sel diperiksa dengan penambahan label BrdU, suatu analog timidin, yang dapat diinkorporasikan ke

dalam DNA yang baru disintesis oleh sel yang berproliferasi dan antibodi yang spesifik terhadap BrdU digunakan untuk mendeteksi sel-sel yang aktif berproliferasi. Hasil berupa nilai absorbansi yang berkorelasi langsung dengan tingkat proliferasi.

Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa ekstrak akar *Acalypha indica* Linn juga berpengaruh pada tingkat proliferasi, terlihat dari peningkatan absorbansi/ tingkat proliferasi dengan pola yang mirip dengan tingkat viabilitas neuron. Tingkat proliferasi kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml mengalami peningkatan sebesar 1,5 kali lipat dibandingkan dengan kelompok kontrol, sedangkan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml dan 20 mg/ml mengalami peningkatan proliferasi sampai 2 kali lipat dibandingkan dengan kelompok kontrol. Tingkat proliferasi juga paling optimal pada dosis ekstrak akar kucing 15 mg/ml dan 20 mg/ml. Semua peningkatan ini sesuai dengan peningkatan dosis dan bermakna secara statistik ($p < 0,01$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Adanya peningkatan proliferasi, dengan demikian viabilitas sel juga meningkat.

Kematian sel neuron disebabkan karena DNA rusak, terfragmentasi menjadi bagian-bagian kecil, radikal bebas menyebabkan kerusakan DNA melalui reaksi radikal hidroksil (OH^\cdot) yang memodifikasi gugus ribosa fosfat dan pirimidin serta reaksi dengan gula fosfat "backbone" sehingga untai ganda DNA terpecah.⁵¹ Selain itu NO juga menyebabkan inaktivasi beberapa enzim antioksidan, *catalase*, *glutathione peroxidase*, dan SOD sehingga radikal bebas terdapat dalam jumlah berlebih yang memicu kematian neuron.⁵¹

Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn dengan kemampuan antioksidannya seperti yang telah dibahas sebelumnya, mampu mengatasi kerusakan DNA yang disebabkan radikal bebas terlihat dari meningkatnya absorbansi BrdU (yang diinkorporasikan ke dalam DNA yang baru disintesis (fase S) oleh sel yang berproliferasi) yang berkorelasi dengan peningkatan proliferasi.

Neuron-neuron yang aktif berproliferasi disini, diduga berasal dari neuron-neuron yang telah ada atau baru saja terbentuk pada saat atau sebelum hipoksia terjadi. Diketahui adanya sel-sel punca (*stem cells*) pada otak

mamalia dewasa, pada regio-regio otak tertentu, yaitu pada zona subgranular (SGZ), girus dentata (DG), hipokampus, dan zona subventrikular (SVZ) ventrikel lateral yang dapat memperbaharui diri sepanjang kehidupannya, sehingga kemampuan neurogenesis tetap ada pada otak dewasa.^{52,53}

Kemampuan neurogenesis ini dapat distimulasi oleh berbagai faktor fisiologis seperti stres, olahraga, pembelajaran, dan perbaikan lingkungan, ataupun distimulasi oleh faktor-faktor patologis seperti hipoksia, epilepsi, dan penyakit-penyakit neurodegeneratif.^{52,53} *Stroke* menginduksi neurogenesis pasca hipoksia, dan dilaporkan neurogenesis baru mulai terjadi kurang lebih 1 jam pasca hipoksia.⁵² Hingga diperkirakan neuron-neuron yang berproliferasi pada penelitian ini berasal dari neuron-neuron baru yang telah ada sebelum atau pada saat terjadinya hipoksia.

Beberapa tanaman herbal lain juga telah diteliti dan memiliki khasiat melindungi neuron terhadap kerusakan yang ditimbulkan oleh hipoksia. Diantaranya *Brazilian green propolis*⁵⁴ dan *Allium cepa*⁵⁵ (bawang bombay) yang dilaporkan efeknya dapat mengurangi ukuran infark, memperbaiki kemampuan memori jangka pendek dan inkoordinasi motorik pasca hipoksia. Adanya senyawa flavonoid yang terkandung dalam tanaman-tanaman tersebut, seperti tanaman akar kucing, dengan kemampuan antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas penyebab kerusakan neuron sehingga kematian dan kerusakan neuron dapat dicegah. Dilaporkan *Brazilian green propolis* dan *Allium cepa* mampu menurunkan produksi radikal bebas di mitokondria serta melindungi neuron terhadap serangan radikal bebas yang menyebabkan peroksidasi membran lipid, protein dan DNA.^{54,55} Belum ada penelitian yang membandingkan potensi tanaman akar kucing dengan berbagai zat herbal, namun potensi akar kucing kemungkinan besar sama atau bahkan lebih baik karena kandungan bahan aktif pada akar kucing tidak hanya dapat menghambat kematian sel namun juga meningkatkan neurogenesis.

Disamping itu, kemampuan neuron untuk bertahan hidup juga disebabkan oleh pengaruh dari neurotropik faktor, diantaranya BDNF, yang berperan dalam mempertahankan hidup dan membatasi kematian neuron. Oleh

sebab itu dilakukan pemeriksaan terhadap kadar BDNF medium kultur. Hasil pemeriksaan menunjukkan adanya peningkatan kadar BDNF pada kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml, 15 mg/ml, dan 20 mg/ml dibandingkan dengan kadar BDNF kelompok kontrol. Dengan demikian, BDNF berpengaruh dalam mempertahankan kelangsungan hidup neuron saat hipoksia terjadi, sesuai dengan adanya peningkatan proliferasi neuron. Pada ekstrak akar dosis 15 mg/ml didapat kadar optimal BDNF, hal ini sejalan dengan peningkatan proliferasi yang didapati mulai optimal pada dosis 15 mg/ml.

BDNF disintesis dalam jumlah terbatas oleh sel target untuk menstimulasi dan mengontrol neuron-neuron yang baru dibentuk. Seperti diketahui sel-sel neuron baru membutuhkan faktor tropik guna berdiferensiasi dan pertumbuhan selanjutnya. Selain itu adanya faktor tropik memungkinkan neuron bertahan hidup dalam proses seleksi alamiah yang timbul pada setiap stadium perkembangan neuron. Neuron-neuron dengan reseptor spesifik yang cukup diinervasi oleh BDNF akan mampu bertahan hidup. Karena jumlahnya terbatas, neuron-neuron saling berkompetisi terhadap BDNF yang tersedia. Neuron yang gagal berkompetisi akan mengalami apoptosis.^{56,57}

Pada penelitian ini terlihat kemampuan neuron bertahan hidup berdasarkan peningkatan viabilitas dan tingkat proliferasinya, sehingga selain peran BDNF, ekstrak akar *Acalypha indica* Linn juga berpengaruh terhadap kelangsungan hidup neuron dengan kemampuannya menangkal radikal bebas sehingga kematian neuron dapat dicegah.

Diketahui pada saat terjadinya hipoksia, terjadi penurunan kadar BDNF endogen yang disebabkan kerusakan DNA dan inhibisi sintesis protein.^{4,5} Guo *et al* (2008) juga melaporkan kerusakan oksidatif mensupresi produksi BDNF yang dihasilkan oleh sel endotelium otak dan pemberian zat antioksidan mampu mengatasi radikal bebas sehingga terjadi peningkatan sintesis BDNF endogen..⁵⁸

Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn dengan kemampuan antioksidannya, berperan secara langsung terhadap produksi BDNF endogen

dengan mencegah kerusakan protein dan inhibisi sintesis protein. Grant, *et all* (2005) melaporkan antioksidan yang terdapat dalam asam askorbat mampu menginduksi ekspresi dari gen BDNF saat terjadi kerusakan oksidatif.⁵⁹ Akar *Acalypha indica* Linn mengandung zat-zat antioksidan yang dilaporkan setara dengan asam askorbat dalam mengatasi radikal bebas,¹⁴ dengan demikian mampu menginduksi ekspresi gen BDNF saat terjadinya hipoksia seperti asam askorbat. Adanya peningkatan BDNF turut berkontribusi pada peran tanaman *Acalypha indica* Linn dalam mempertahankan kelangsungan hidup neuron pada keadaan hipoksia.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. KESIMPULAN

Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn pada dosis 10 mg/ml, 15 mg/ml, dan 20 mg/ml mampu meningkat viabilitas neuron, tingkat proliferasi neuron, serta kadar BDNF endogen neuron pada keadaan hipoksia secara *in vitro*.

6.2. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan guna mengetahui dosis optimal ekstrak akar *Acalypha indica* Linn dalam meningkatkan viabilitas dan tingkat proliferasi neuron.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan pada tingkat molekuler untuk menjelaskan mekanisme kerja ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap viabilitas neuron dan kadar BDNF endogen.
3. Perlu dilakukan penelitian untuk uji toksisitas akut, subkronik, dan kronik serta pengembangan formulasi obat guna pengembangan tanaman *Acalypha indica* Linn sebagai fitofarmaka.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*®. 2004;1:17-25.
2. Marti HJH, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H. Hypoxia-induced Vascular Endothelial Growth Factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am. J of Pathol.* 2000;156(3):965-76.
3. Yakovlev AG, Faden AI. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *NeuroRx*®. 2004;1:5-16.
4. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999;79:1431-1568.
5. Hsu CY, Ahmed H, Lees KR. The therapeutic time window-theoretical and practical considerations. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.* 2000;9(6)suppl 2:24-31.
6. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences.* 2000;179:1-33.
7. Kajta M. Apoptosis in the central nervous system: mechanisms and protective strategies. *Pol. J. Pharmacol.* 2004;56:689-700.
8. Danton GH, Dietrich WD. The search for neuroprotective strategies in stroke. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2004;25:181-94.
9. Yu DC, Lama A, Zivin JA. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx*®. 2004;1:36-45.
10. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors.* 2004;22(3):123-31.
11. Kitagawa K. CREB and c-AMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain. *FEBS Journal.* 2007;274:3210-17.
12. Purwaningsih EH, Ibrahim N, Zain H, Tedjo A. Neuro-protection and neuro-therapy effects of *Acalypha indica* Linn water extract ex vivo on *misculus gastrocnemius* frog. *Makara Kesehatan.* 2008;12(2):71-76.
13. Indian Medicinal Plants Growers' Consortium. *Acalypha indica* Linn. Available from: impgc.com.
14. Balakrishnan N, Panda AB, Raj NR, Shrivastava A. The evaluation of nitric oxide scavenging activity of *Acalypha Indica* Linn root. *Asian J. Research Chem.* 2009;2(2):148-50.
15. Vauzour D, Vafeiadou K, Mateos AR. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr.* 2008;3:115-26.
16. Suswati L. Perbaikan neuron hipokampus pasca hipoksia serebri dengan penggunaan ekstrak air akar tanaman akar kucing (*Acalypha*

- Indica Linn). Tesis Magister Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia: 2009.
17. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med.* 2003;348:1365-75.
 18. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am. J of Pathol.* 2000;157(5):1415-30.
 19. Culmsee C, Kriegelstein J. Ischaemic brain damage after stroke: new insights into efficient therapeutic strategies. *EMBO reports.* 2007;8(2):129-33.
 20. Zang X, Chen Y, Jenkins LW, Kochanek PM, Clark RSB. Bench-to bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury. *Critical Care.* 2005;9(1):66-75.
 21. Xiao MY, Luo Y, Cao G, Bai L, Pei W, Kuharsky DK, et al. Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. *The Journal of Biological Chemistry.* 2002;277(44):42074-81.
 22. Uttara B, Singh AV, Zamboni V, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology.* 2009;7:65-74.
 23. Chong ZZ, Li F, Maiese K. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol.* 2005;75(30):207-46.
 24. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem.J.* 2009;417:1-13.
 25. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 2007;87(1):315-424.
 26. Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett.* 2003;140:113-24.
 27. Carvalho AL, Caldeira MV, Santos SD, Duarte CB. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *British Journal of Pharmacology.* 2008;153:5310-24.
 28. Schabitz WR, Sommer C, Zoder W. Intravenous Brain-derived Neurotrophic Factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2003;31:2212-17.
 29. Schabitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM. Intravenous Brain-derived Neurotrophic Factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke.* 2007;38:2165-72.
 30. Wu Dafang. Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *NeuroRx®.* 2005;2:120-28.
 31. Hetman M, Gozdź A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur. J. Biochem.* 2004;271:2050-55.
 32. Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z. Neuroprotection by Brain-derived Neurotrophic Factor is mediated by Extracellular Signal-

- regulated Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(32):22569-80.
33. Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death and Differentiation*. 2005;12:1329-43.
 34. Han BH, Holtzman DM. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *The Journal of Neuroscience*. 2000;20(15):5775-81.
 35. Hetman M, Xia Z. Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins. *Acta Neurobiol. Exp.* 2000;60:531-45.
 36. Anonim. Tim peneliti Universitas Indonesia. Pengembangan tanaman akar kucing *Acalypha Indica* Linn menjadi fitofarmaka penurun kadar asam urat darah. 2005.
 37. Anonim. Akar kucing. [homepage on the internet]. 2007. [cited 2010 Maret 23]. Available from: www.net.id/Ind/pdtanobat/viewphp/htm.
 38. Maraotong. *Acalypha indica* Linn. [homepage on the internet]. 2006. Available from: www.bpi.da.gov.ph/maraotong.pdf. 2006
 39. Anonim. *Acalypha indica* Linn. Available from: www.prota.org.
 40. Walter TM. Review of *Acalypha indica* Linn in traditional Siddha medicine. *Bio Info Bank Library* [serial online]. 2007;321. Available from: <http://lib.bioinfo.pl>.
 41. 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*. 2008;103(3):691-5. Available from: IngentaConnect.
 42. Das AK, Ahmed F, Biswas NN, Dev S, Masud MM. Diuretic Activity of *Acalypha indica*. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;4:1. Available from: www.pharmaedu.net.
 43. Fenny. Uji kualitatif kandungan fenol dan flavonoid dalam ekstrak akar tanaman *Acalypha indica* Linn. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia ; 2008.
 44. Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F. Neuroprotection by flavonoids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003;36:1613-20.
 45. Silva B, Oliveira PJ, Dias A, Malva JO. Quercetin, Kaempferol and Biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. *Neurotoxicity Research*. 2008;13(3,4):265-79.
 46. Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2001;30:433-46.
 47. Gozal E, Sachleben RJ, Ranc MJ, Vega C, Gozai D. Mild sustained and intermittent hypoxia induce apoptosis in PC-12 cells via different mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;288:535-42.

48. Yolanda S. Pengaruh pemberian ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn (akar kucing) terhadap neurogenesis pada kultur jaringan hipokampus tikus pasca hipoksia. Tesis Magister Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia: 2010.
49. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4th ed. New York: Willey-Liss Inc, 2000.
50. Samhan AK, Martin-Romero FJ, Gutierrez-Merino C. Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:48-61.
51. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*. 2010;2010:1-23.
52. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 2008;132:645-50.
53. Kempermann G, Wiskott L, Gage FH. Functional significance of adult neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*. 2004;14:181-91.
54. Shimazawa M, Chikamatsu S, Morimoto N, Mishima S, Nagai H, Hara H. Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *eCAM*. 2005;2(2):201-07.
55. Shri R, Bora KS. Neuroprotective effect of methanolic extracts of *Allium cepa* on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Fitoterapia*. 2008;79:86-96.
56. Lotto RB, Asavaritikrai P, Vali L, Price DJ. Target-derived neurotrophic factors regulate the death of developing forebrain neurons after a change in their trophic requirements. *J Neurosci*. 2001;21:3904-10.
57. Matson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann NY Acad Sci*. 2008;1144:97-112.
58. Guc S, Kin WJ, Lok J, Lee SR, Besancon E, Luo BH, et al. Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial cells and neurons. *PNAS*. 2008;105(21):7582-87.
59. Grant MM, Barber VS, Griffiths HR. The presence of ascorbate induces expression of brain derived neurotrophic factor in SH-SY5Y neuroblastoma cells after peroxide insult, which is associated with increased survival. *Proteomics*. 2005;5:534-40.

LAMPIRAN 1

A. HASIL ANALISIS STATISTIK DATA VIABILITAS RELATIF SEL

Tabel. Data awal viabilitas neuron

No.	Viabilitas neuron (%)			
	Kontrol	ekstrak akar kucing 10 mg/ml	ekstrak akar kucing 15 mg/ml	ekstrak akar kucing 20 mg/ml
1	100.32	329.17	364.90	434.45
2	104.33	364.26	281.25	550.32
3	101.12	281.89	316.83	447.60
4	99.68	350.80	425.64	354.00
5	106.57	367.47	583.17	484.61
6	86.54	264.26	498.07	404.49
Rerata	99.76	326.30	411.65	445.91

Descriptives							
	Kelompok			Statistic	Std. Error		
MTTpersen	Kontrol	Mean			99.75967	2.853330	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			92.42495	
			Upper Bound			107.09439	
		5% Trimmed Mean			100.11560		
		Median			100.72150		
		Variance			48.849		
		Std. Deviation			6.989203		
		Minimum			86.538		
		Maximum			108.571		
		Range			20.033		
		Interquartile Range			8.494		
		Skewness			-1.667	.845	
		Kurtosis			3.475	1.741	
		Ekstrak akar kucing 10 mg/ml	Mean			328.30883	17.856148
	95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound			280.40814	
			Upper Bound			372.20952	
	5% Trimmed Mean				327.46920		
	Median				339.98400		
	Variance				1913.052		
	Std. Deviation				43.738451		
	Minimum				264.263		
	Maximum				367.468		
	Range				103.205		
	Interquartile Range				87.580		
	Skewness				-.672	.845	
	Kurtosis				-1.656	1.741	
	Ekstrak akar kucing 15 mg/ml		Mean			411.64533	48.642707
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			291.74644	
			Upper Bound			531.54423	
		5% Trimmed Mean			409.36020		
		Median			395.27250		
		Variance			13053.253		
		Std. Deviation			114.250833		
		Minimum			281.250		
		Maximum			583.173		
		Range			301.923		
		Interquartile Range			211.418		
		Skewness			.508	.845	
		Kurtosis			-.925	1.741	
		Ekstrak akar kucing 20 mg/ml	Mean			445.91333	27.505153
	95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound			375.20909	
Upper Bound					516.61758		
5% Trimmed Mean			445.21887				
Median			441.02550				
Variance			4539.201				
Std. Deviation			67.373591				
Minimum			354.006				
Maximum			550.321				
Range			196.315				
Interquartile Range			109.175				
Skewness			.341	.845			
Kurtosis			.388	1.741			

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MTTpersen Kontrol	.329	6	.042	.832	6	.112
Ekstrak akar kucing 10 mg/ml	.212	6	.200*	.873	6	.239
Ekstrak akar kucing 15 mg/ml	.159	6	.200*	.960	6	.823
Ekstrak akar kucing 20 mg/ml	.157	6	.200*	.990	6	.989

a. Lilliefors Significance Correction

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

Berdasarkan tes normalitas Shapiro-Wilk, didapatkan nilai signifikansi tiap kelompok perlakuan $> 0,05$, sehingga ditarik kesimpulan bahwa distribusi data pada seluruh kelompok perlakuan normal. Dilanjutkan dengan tes untuk menganalisis homogenitas varians antar kelompok.

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

MTTpersen

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.714	3	20	.005

ANOVA

MTTpersen	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	435772.108	3	145590.703	29.782	.000
Within Groups	97771.773	20	4888.589		
Total	534543.881	23			

Analisis homogenitas varians antar kelompok, didapati hasil dengan nilai signifikansi $0,005$ ($p < 0,05$), sehingga ditarik kesimpulan bahwa varians antar kelompok perlakuan tidak homogen. Oleh karena itu, dilakukan transformasi data.

Hasil transformasi, varians antar kelompok perlakuan tetap tidak homogen, sehingga dilanjutkan dengan uji statistik non parametrik Kruskal-Wallis

NPar Tests Kruskal-Wallis Test

Ranks

Kelompok		N	Mean Rank
MTTpersen	Kontrol	6	3.50
	Ekstrak akar kucing 10 mg/ml	6	11.50
	Ekstrak akar kucing 15 mg/ml	6	16.17
	Ekstrak akar kucing 20 mg/ml	6	18.83
Total		24	

Test Statistics^{a,b}

	MTTpersen
Chi-Square	16.267
df	3
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Kelompok

Uji Kruskal-Wallis didapatkan nilai dengan signifikansi 0,001 ($p < 0,05$), dengan demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa rata-rata viabilitas sel pada keempat kelompok perlakuan berbeda secara bermakna.

Untuk mengetahui perbedaan antara kelompok yang mana yang berbeda secara bermakna, dilakukan uji Mann-Whitney.

Mann-Whitney Test

Ranks

Kelompok		N	Mean Rank	Sum of Ranks
MTTpersen	Kontrol	6	3.50	21.00
	Ekstrak akar kucing 10 mg/ml	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics^b

	MTT'persen
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MTT'persen	Kontrol	6	3.50	21.00
	Ekstrak akar kucing 15 mg/ml	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics^b

	MTT'persen
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MTT'persen	Kontrol	6	3.50	21.00
	Ekstrak akar kucing 20 mg/ml	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics^b

	MTTpersen
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MTTpersen	Ekstrak akar kucing 10 mg/ml	6	5.17	31.00
	Ekstrak akar kucing 15 mg/ml	6	7.83	47.00
	Total	12		

Test Statistics^b

	MTTpersen
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	31.000
Z	-1.281
Asymp. Sig. (2-tailed)	.200
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.240 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MTTpersen	Ekstrak akar kucing 10 mg/ml	6	3.83	23.00
	Ekstrak akar kucing 20 mg/ml	6	9.17	55.00
	Total	12		

Test Statistics^b

	MTTpersen
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	23.000
Z	-2.562
Asymp. Sig. (2-tailed)	.010
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.009 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

Kelompok		N	Mean Rank	Sum of Ranks
MTTpersen	Ekstrak akar kucing 15 mg/ml	6	5.83	35.00
	Ekstrak akar kucing 20 mg/ml	6	7.17	43.00
	Total	12		

Test Statistics^b

	MTTpersen
Mann-Whitney U	14.000
Wilcoxon W	35.000
Z	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.589 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Keiompok

B. HASIL ANALISIS STATISTIK DATA TINGKAT PROLIFERASI SEL

Tabel. Data awal nilai absorbansi BrdU

No.	Absorbansi (A405nm/A492nm)			
	Kontrol	ekstrak akar kucing 10 mg/ml	ekstrak akar kucing 15 mg/ml	ekstrak akar kucing 20 mg/ml
1	0.089	0.12	0.112	0.1225
2	0.071	0.1065	0.1515	0.1415
3	0.068	0.1165	0.123	0.1425
4	0.074	0.1015	0.1085	0.143
5	0.06	0.079	0.0995	0.1115
6	0.07	0.0995	0.1055	0.1425
Rerata	0.072	0.104	0.117	0.134

Descriptives							
	Kelompok		Statistic	Std. Error			
BrdU	Kontrol	Mean		.07200	.003907		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.06196			
			Upper Bound	.08204			
		5% Trimmed Mean		.07172			
		Median		.07050			
		Variance		.000			
		Std. Deviation		.008571			
		Minimum		.080			
		Maximum		.089			
		Range		.029			
		Interquartile Range		.012			
		Skewness		1.068	.845		
		Kurtosis		2.472	1.741		
		Ekstrak akar kucing 10 mg/ml		Mean		.10383	.005972
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.08848	
Upper Bound	.11918						
5% Trimmed Mean				.10431			
Median				.10400			
Variance				.000			
Std. Deviation				.014628			
Minimum				.079			
Maximum				.120			
Range				.041			
Interquartile Range				.023			
Skewness				-.875	.845		
Kurtosis				1.010	1.741		
Ekstrak akar kucing 15 mg/ml				Mean		.11667	.007662
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.09997	
		Upper Bound	.13636				
		5% Trimmed Mean		.11569			
		Median		.11025			
		Variance		.000			
		Std. Deviation		.018769			
		Minimum		.100			
		Maximum		.152			
		Range		.052			
		Interquartile Range		.026			
		Skewness		1.607	.845		
		Kurtosis		2.969	1.741		
		Ekstrak akar kucing 20 mg/ml		Mean		.13392	.005538
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.11968	
Upper Bound	.14815						
5% Trimmed Mean				.13466			
Median				.14200			
Variance				.000			
Std. Deviation				.013566			
Minimum				.112			
Maximum				.143			
Range				.031			
Interquartile Range				.023			
Skewness				-1.238	.845		
Kurtosis				-.247	1.741		

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
BrdU Kontrol	.251	6	.200*	.910	6	.438
Ekstrak akar kucing 10 mg/ml	.217	6	.200*	.932	6	.595
Ekstrak akar kucing 15 mg/ml	.265	6	.200*	.848	6	.153
Ekstrak akar kucing 20 mg/ml	.379	6	.007	.732	6	.013

a. Lilliefors Significance Correction

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

Berdasarkan tes normalitas Shapiro-Wilk, didapatkan nilai signifikansi 3 kelompok perlakuan $> 0,05$, dan 1 kelompok perlakuan dengan nilai signifikansi $< 0,05$ sehingga ditarik kesimpulan bahwa distribusi data tidak normal. Dilakukan transformasi untuk menormalkan data. Hasil transformasi, data tetap tidak berdistribusi normal, maka alternatifnya dipilih uji statistik non parametrik yaitu uji Kruskal-Wallis.

NPar Tests Kruskal-Wallis Test

Ranks

Kelompok	N	Mean Rank
BrdU Kontrol	6	3.67
Ekstrak akar kucing 10 mg/ml	6	11.58
Ekstrak akar kucing 15 mg/ml	6	15.08
Ekstrak akar kucing 20 mg/ml	6	19.67
Total	24	

Test Statistics^{a,b}

	BrdU
Chi-Square	16.443
df	3
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Kelompok

Uji Kruskal-Wallis didapatkan nilai dengan signifikansi 0,001 ($p < 0,05$), dengan demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa rata-rata proliferasi sel pada keempat kelompok perlakuan berbeda secara bermakna.

Untuk mengetahui perbedaan antara kelompok yang mana yang berbeda secara bermakna, dilakukan uji Mann-Whitney.

Mann-Whitney Test

Ranks

Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BrdU Kontrol	6	3.67	22.00
Ekstrak akar kucing 10 mg/ml	6	9.33	56.00
Total	12		

Test Statistics^b

	BrdU
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	22.000
Z	-2.722
Asymp. Sig. (2-tailed)	.006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BrdU Kontrol	6	3.50	21.00
Ekstrak akar kucing 15 mg/ml	6	9.50	57.00
Total	12		

Test Statistics^b

	BrdU
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BrdU Kontrol	6	3.50	21.00
Ekstrak akar kucing 20 mg/ml	6	9.50	57.00
Total	12		

Test Statistics^b

	BrdU
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a

a. Not corrected for ties.

Test Statistics^b

	BrdU
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BrdU	Ekstrak akar kucing 10 mg/ml	6	5.42	32.50
	Ekstrak akar kucing 15 mg/ml	6	7.58	45.50
	Total	12		

Test Statistics^b

	BrdU
Mann-Whitney U	11.500
Wilcoxon W	32.500
Z	-1.043
Asymp. Sig. (2-tailed)	.297
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BrdU	Ekstrak akar kucing 10 mg/ml	6	3.83	23.00
	Ekstrak akar kucing 20 mg/ml	6	9.17	55.00
	Total	12		

Test Statistics^b

	BrdU
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	23.000
Z	-2.567
Asymp. Sig. (2-tailed)	.010
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.009 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Ranks

Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BrdU Ekstrak akar kucing 15 mg/ml	6	5.00	30.00
Ekstrak akar kucing 20 mg/ml	6	8.00	48.00
Total	12		

Test Statistics^b

	BrdU
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	30.000
Z	-1.444
Asymp. Sig. (2-tailed)	.149
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

LAMPIRAN 2



3050 Spruce Street
 Saint Louis, Missouri 63103 USA
 Telephone 800-325-5832 • (314) 771-6765
 Fax (314) 286-7826
 email: techserv@sigma.com
 sigma-usdirect.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, pipetting 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. Mossman, 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 47:936.

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) for 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 [³H]-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

1. Introduction

The 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.

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

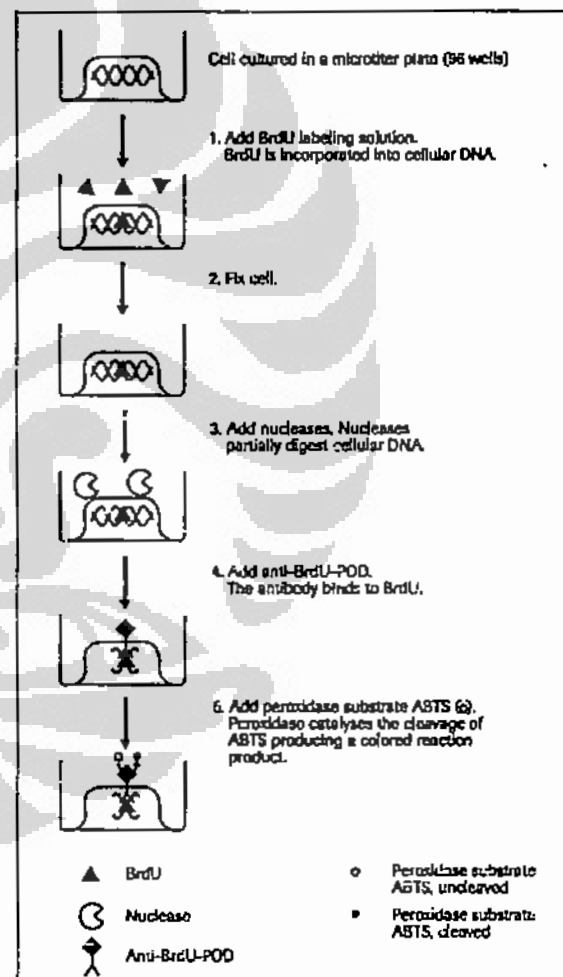


Fig. 1: BrdU Labeling and Detection Kit III: Assay principle.

II. Product description

- The kit 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 60 mM Tris buffer, 0.06 mM MgCl₂, 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 : 90 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 µU/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 μ l culture medium per well according to the media needs of the cells, in a humidified atmosphere (e.g. 37°C, 6.5% CO₂). 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 μ l BrdU labeling solution (solution I) per well (final concentration: 10 μ 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.

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

Note

We recommend to perform the nuclease incubation step in the absence of CO₂, e.g. using a waterbath.

- Remove nucleases working solution (solution IVa) and wash cells 3 times with 250 μ l wash medium containing 10% serum per well.
- Remove wash medium after the last wash, add 100 μ 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 μ l washing buffer (solution II) per well.
- Carefully remove washing buffer after the last wash. Add 100 μ 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 Labinstrument).

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 μ l BrdU labeling solution, when cells are cultured in 200 μ 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 μ 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 μ l culture medium per well according to the media needs of the cells, in a humidified atmosphere (e.g. 37°C, 6.5% CO₂). 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.

Note

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

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

- 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 60°C.
- Fix cells with 200 μ 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 μ l wash medium containing 10% serum per well and remove wash medium.
- Incubate cells with 100 μ l nucleases working solution (solution IVa) per well for 30 min at 37°C.

Note

We recommend to perform the nuclease incubation step in the absence of CO₂, e.g. using a water bath.

- Remove nucleases working solution and wash cells 3 times with 250 μ l wash medium containing 10% serum per well.
- Carefully remove wash medium after the last wash. Add 100 μ 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 μ l washing buffer (solution II).
- Carefully remove washing buffer after the last wash. Add 100 μ 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 Labinstrument).

Notes

- 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 μ l BrdU labeling solution, when cells are cultured in 200 μ 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 μ l washing medium and proceed by adding the nucleases working solution (solution IVa) as described.

LAMPIRAN 4

CHEMICON[®]
INTERNATIONAL
a Serologicals Company

ChemiKine[™]
Brain Derived Neurotrophic Factor
(BDNF)
Sandwich ELISA Kit

Cat. No. CYT306

FOR RESEARCH USE ONLY
Not for use in diagnostic procedures

USA & Canada
Phone: +1(800) 437-7500 • Fax: +1 (951) 070-9209 • Europe +44 (0) 23 8020 2233
Australia +61 3 9839 2000 • Germany +49 0192-207300 • ISO Registered Worldwide
www.chemicon.com • custserv@chemicon.com • techserv@chemicon.com

Introduction

ChemiKine[™] Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) kit is a sandwich enzyme immunoassay (EIA), which measures BDNF. The kit will measure BDNF from human and rat.

Test Principle

With the *ChemiKine* BDNF assay system, rabbit polyclonal antibodies generated against human BDNF are coated onto a microplate and are used to capture BDNF from a sample. BDNF specific, biotin conjugated, mouse monoclonal antibodies detect the captured BDNF. After addition of streptavidin-enzyme, substrate and stop solution the amount of BDNF is determined. The standard curve demonstrates a direct relationship between Optical Density (OD) and BDNF concentration: i.e., the higher the OD the higher the BDNF concentration in the sample.

Application

ChemiKine BDNF kit is designed to measure the amount of BDNF in cell culture supernatants, tissue homogenates and biological fluid (serum, plasma, and serum-free) samples from human and rat. There are enough reagents included in this kit for two 96-well immuno-assay plates. Running duplicate wells for samples and standards is recommended.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Analytical Sensitivity and Detection Limits

Sensitivity:	7.8 pg/mL
Range of Detection:	7.8 pg/mL to 500 pg/mL
Crossreactivity:	No significant cross reactivity with NGF, NT4/5 or NT3
Intra-assay Variation:	\pm 3.7% (125 pg/mL)
Inter-assay Variation:	\pm 8.5 % (125 pg/mL)

Kit Materials

1. **ChemiKine BDNF ELISA Plate:** (Part No. 60238) Two Pre-coated with Rabbit anti-Human BDNF Polyclonal Antibody 96-Well Immunoplates sealed in foil pouches.
 2. **Wash Buffer Concentrate:** (Part No. 60245) One 100 mL (10X) bottle of Concentrate.
 3. **Standard/Sample Diluent:** (Part No. 60249) One 60 mL bottle (Ready to Use).
 4. **BDNF Standard (Recombinant Human):** (Part No. 60237) Two vials (Lyophilized).
 5. **Biotinylated Mouse anti-Human BDNF Monoclonal Antibody:** (Part No. 60583) One 25 μ L vial.
 6. **Streptavidin-Enzyme conjugate:** (Part No. 60582) One 50 μ L vial of HRP conjugated Streptavidin.
 7. **TMB/E Solution:** (Part No. 60096) Two 10 mL bottles of a Ready to Use solution of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in a proprietary buffer with enhancer.
 8. **Stop Solution** (Part No. 60260): One 22 mL bottle of an HCl solution.
-

Materials Not Supplied

1. Multi-channel or repeating pipettes
 2. Plate shaker (optional)
 3. Pipettors & tips capable of accurately measuring 10-1000 μ L
 4. Graduated serological pipettes
 5. 96-well microplate Reader with 450 nm filter
 6. Graph paper for manual plotting of data
 7. Polystyrene test tubes for standard and sample dilutions
 8. Mechanical vortex
 9. One 1 or 2 liter container
-

Precautions

- Wash Buffer and Sample Buffer contain thimerosal. Thimerosal is highly toxic by inhalation, contact with skin or if swallowed. Thimerosal is a possible mutagen and should be handled accordingly.
 - The instructions provided have been designed to optimize the kit's performance. Deviation from the instructions may result in suboptimal performance of the kit and the failure to produce accurate data.
-

Technical Hints

- **Manual Plate Washing:** Vigorous washing and complete removal of all liquid by aspiration at the end of each washing step is very important to obtain low background values.
- **Recommended Method for Plate Washing:**
 1. Remove existing fluid from each well by flicking the plate over a sink. Subsequently blot the plate on clean paper towels.
 2. Forcefully pipet 250 μ L of diluted Wash Buffer into each well with a multi-channel pipet.
 3. Remove fluid from each well by flicking the plate over a sink. Subsequently blot the plate on clean paper towels.
 4. Repeat washing and flicking 4 times.

Preparation of Reagents

1. Biotinylated Mouse anti-Human BDNF Monoclonal Antibody

Immediately before use dilute the biotinylated antibody 1:1,000 with Sample Diluent. Do not store diluted solutions.

2. Streptavidin-Enzyme Conjugate

Immediately before use dilute the HRP conjugate 1:1,000 with Sample Diluent. Do not store diluted solutions.

3. BDNF Standard

Note: When opening lyophilized Standard, remove rubber stopper gently as the lyophilizate may have become dislodged during shipping.

Reconstitute the standard vial with the volume of Sample Diluent indicated on the label to give a relative BDNF concentration of 10,000 pg/mL. This stock material is then used to generate a standard curve. Use the Sample Diluent to make the dilutions. A suggested dilution scheme is as follows:

- Label 7 test tubes #1-7 and "0 dose". Add 950 μ L of the Sample Diluent to Standard tube #1. Add 500 μ L of the Sample Diluent to Standard tubes #2-7 and the "0 dose".
- Add 50 μ L of the stock Standard solution to tube #1 and vortex. This is Standard tube #1 with a concentration of 500 pg/mL.
- Standards #2-7 are then prepared by performing a 1:2 dilution of the preceding standard. Refer to Fig. 1. For example, to make Standard #2, remove 500 μ L of Standard #1 and add it to tube #2 and vortex and so on. Do not add any BDNF Standard to the "0 Dose" Standard tube.

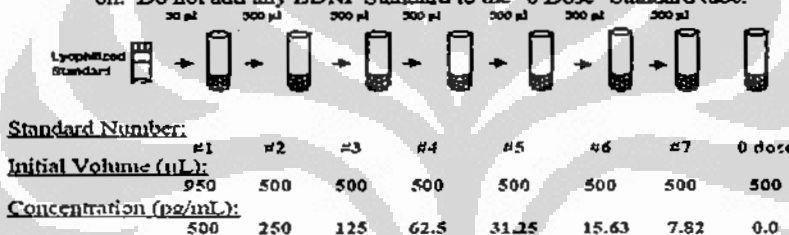


Figure 1: Serial Dilution of BDNF Standard

Assay Instructions

- Place the desired number of *Chemikine* Brain Derived Neurotrophic Factor strips in the strip well plate holder.
- Add 100 μ L of Standards 0 through 7 or samples to wells. It is recommended that standards and samples be run in duplicate.
Note: A standard curve must be run at each setting.
- Seal the plate with a plate sealer. Incubate the plate at 2-8°C overnight (on a shaker if possible).
- IMPORTANT WASH STEP:**

Gently remove the plate sealer and wash the plate at least 4 times. A thorough washing of the plate is extremely important to reduce background. We recommend using a multi-channel pipette to fill each well with 250 μ L of diluted Wash Buffer. Fluid removal from the wells is best accomplished by inverting the plate over a sink and flicking the fluid out of the wells and then blotting the plate on clean paper towels. Using the multichannel pipet add 250 μ L of Wash Buffer to each well; flick and blot the plate. Repeat this procedure for a total of 4 times.

For users of automatic plate washers: It is important to ensure that the wash apparatus is properly maintained and operating correctly. Tubing and tips can easily become clogged, leading to incomplete washing and inadequate aspiration of wells. The result may be poor precision and an unsuitable standard curve. For best results, we recommend at least 4 wash cycles.

- Add 100 μ L of the diluted biotinylated mouse anti-BDNF monoclonal antibody (see reagent preparation section) to each well. Cover the plate and incubate at room temperature for 2-3 hours (on shaker if possible). Wash as described in Step 4.
- Add 100 μ L of the diluted streptavidin-HRP conjugate solution (see reagent preparation section) to each well. Cover the plate and incubate at room temperature for 1 hour (on shaker if possible). Wash as described in Step 4.

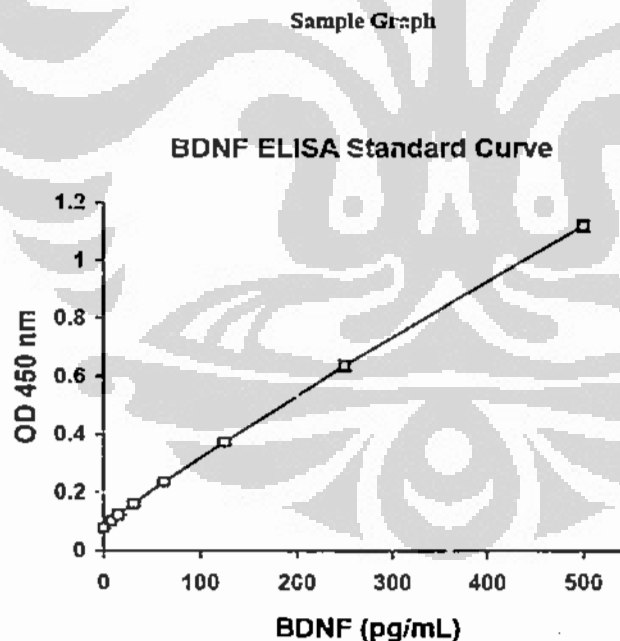
7. Warm TMB to room temperature. Add 100 μ L of TMB/E Substrate to each well. Incubate at room temperature for 15 minutes. (The 500 pg/mL standard should achieve a deep blue color). Stop the reaction by adding 100 μ L of Stop Solution to each well. The blue color will change to yellow. Immediately read the plate at 450 nm (color will fade over time).

CAUTION: *Bubbles in the wells will cause inaccurate readings. Ensure that all bubbles are removed prior to taking the absorbance reading.*

Calculation of Results

Manual Plotting: Plot the standard curve on graph paper. Known concentrations of BDNF are plotted on the X-axis and the corresponding OD on the Y-axis. The standard curve should result in a graph that shows a direct relationship between BDNF concentrations and the corresponding ODs (absorbances). In other words, the greater the concentration of BDNF in the sample, the higher the OD. The concentration of BDNF in unknown samples may be determined by plotting the sample OD on the Y-axis, then drawing a horizontal line to intersect with the standard curve. A vertical line dropped from this point intersects the X-axis at the concentration of BDNF in the unknown sample.

Plate Reader/PC Interface: An alternative approach is to enter the data into a computer program curve fitting software. A good fit can be obtained with a linear regression analysis. Some data points at the top or bottom of the range tested may need to be dropped to get a good fit. Currently existing spreadsheet software can perform such plotting.



Reference:

Laske, C., et al. (2007) Increased BDNF serum concentration in fibromyalgia with or without depression or antidepressants. *Journal of Psychiatric Research*. 41:600-605.

Tranontina, J., et al. (2007) Val66met polymorphism and serum brain-derived neurotrophic factor levels in bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*. 12:230-231.

Neumeister, A., et al. (2005) Effects of Tryptophan Depletion on Serum Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Unmedicated Patients with Remitted Depression and Healthy Subjects. *Am. J. Psychiatry*. 162:805-807.



UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat

Pos Box 1339 Jakarta 10430

Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927364, 3912477, 3153236, Fax. : 31930372, 3157285, e-mail : office@fku.ui.ac.id

NOMOR : 465 /PT02.FK/ETIKU2009

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:

"Peran BDNF" Dalam Memproteksi Kerusakan Jaringan Hipokampus Mencit Pasca Hipoksia oleh Ekstrak Akar Acalypha Indica Linn".

Peneliti Utama : dr. Julia Rahadian
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Program Magister Ilmu Biomedik FKUI
Kekhususan Fisiologi
dan telah menyetujui protocol tersebut di atas. *valuasi and approved the above mentioned proposal.*

Jakarta, 28 Desember 2009



Chairman
Ketua

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

Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

RIWAYAT HIDUP

Nama : Julia Rahadian
 NPM : 0806419560
 Tempat, Tanggal Lahir : Jakarta, 26 Februari 1972
 Jenis Kelamin : Perempuan
 Agama : Kristen
 Alamat Tinggal : Jln. Jiban No.20. Jakarta Selatan
 E-mail : julia_rt@yahoo.com
 Pekerjaan : Staf pengajar Departemen Fisiologi Kedokteran FK. Atma Jaya Jakarta.
 Sumber Dana : RUUI 2009 dan FK. Atma Jaya



RIWAYAT PENDIDIKAN FORMAL

Nama Sekolah	Tahun
Fakultas Kedokteran Atma Jaya Jakarta	1991-1999
SMUK Santa Theresia Jakarta	1988-1991
SLTPK Tarakanita I Jakarta	1985-1988
SDK Tarakanita I Jakarta	1982-1985

Draft Artikel Majalah Kedokteran Indonesia

Pengaruh ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap viabilitas neuron dan kadar BDNF endogen pada keadaan hipoksia secara *in vitro*

Nurhadi Ibrahim^{*}, Dewi Fatma Suniarti[♠], Julia Rahadian[#]

* Departemen Fisiologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

♠ Departemen *Oral Biology* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia

Departemen Fisiologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Atma Jaya

Otak sangat sensitif terhadap kondisi kekurangan oksigen seperti yang terjadi pada *stroke*, mengakibatkan kematian neuron otak. Hipoksia memicu serangkaian kaskade patologis yang disebabkan eksitotoksitas glutamat dan produksi radikal bebas yang akan mengaktifkan kaskade kematian sel. BDNF, faktor yang berperan mempertahankan kelangsungan hidup neuron, kadarnya menurun saat hipoksia. Seiring dengan meningkatnya *stroke* dan akibat yang ditimbulkannya, suatu kebutuhan untuk mencari bahan obat yang dapat memblokir kaskade hipoksia hingga kematian neuron dapat dicegah. Tanaman akar kucing (*Acalypha indica* Linn) dapat dijumpai di setiap daerah di Indonesia. Rebusan akar kucing dapat memulihkan kelumpuhan saraf akibat *stroke*. Flavonoid yang terkandung dalam akar kucing memiliki kemampuan antioksidan yang dapat mencegah kematian neuron. Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh pemberian ekstrak akar kucing dalam memproteksi neuron tikus pada keadaan hipoksia. Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vitro* pada kultur primer sel neuron jaringan hipokampus tikus *Sprague Dowley* dewasa yang dipajan dengan ekstrak akar *Acalypha indica* Linn pada dosis 10 mg, 15 mg, dan 20 mg/ml selama 72 jam. Kemudian seluruh sel diberi perlakuan hipoksia dengan gas 5% O₂/5% CO₂/N₂ balans selama 24 jam. Viabilitas sel diukur dengan MTT, BrdU untuk proliferasi sel dan BDNF kit metode ELISA untuk kadar BDNF. Didapatkan hasil viabilitas relatif sel, tingkat proliferasi serta kadar BDNF kultur jaringan hipokampus tikus dengan pemberian ekstrak akar kucing dosis 10 mg, 15 mg, dan 20 mg/ml meningkat dibandingkan dengan kontrol. Disimpulkan bahwa ekstrak *Acalypha indica* Linn mampu meningkatkan viabilitas neuron serta kadar BDNF endogen pada keadaan hipoksia.

Kata kunci: *Acalypha indica* Linn, hipoksia, viabilitas neuron, BDNF

The influence of *Acalypha indica* Linn root extract on the viability of neuron and endogenous BDNF level in hypoxic condition *in vitro*

Nurhadi Ibrahim^{*}, Dewi Fatma Suniarti[♠], Julia Rahadian[#]

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

♠ Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, University of Indonesia

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Atma Jaya University

The brain is very sensitive to oxygen deprivation condition as happens on stroke, cause death of brain cells neurons. Hypoxia triggers a series of pathological cascade caused by the glutamate excitotoxicity and free radicals which in turn triggered a cascade of cell death. BDNF, one of the factors maintaining the survival of neurons, was reported decreased during hypoxic conditions. The increase in cases of stroke, represents a need to look for ingredients that are expected to block the cascade of hypoxia that neuron death can be prevented. *Acalypha indica* Linn (*akar kucing*) can be found all over Indonesia. The decoction of the root can cure the paralysis caused by stroke. Flavonoid compounds contained within the roots have the proven ability of antioxidants can prevent neuron death. The objective of this study is to determine the effect of root extracts of *Acalypha indica* Linn as a protection of rat neuronal on the state of hypoxia. The method was an experimental *in vitro* study using primary neuronal cell culture of adult *Sprague Dowley* rat treated with *Acalypha indica* Linn root water extract at a dose of 10 mg, 15 mg, and 20 mg/ml for 72 hrs. Then the cells were exposed to hypoxia with 5% O₂/5% CO₂/N₂ balance gas for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay and BrdU for cell proliferation. Levels BDNF medium culture was measured by ELISA methods. The result obtained was that relative viability, cell proliferation and endogenous BDNF level of rat hippocampal tissue culture with *Acalypha indica* Linn root extract with dosage of 10 mg, 15 mg, and 20 mg/ml is increased compared with control. It can be concluded that *Acalypha indica* Linn root extract can increase neuron viability and the level of endogenous BDNF in hypoxic conditions.

Keywords: *Acalypha indica* Linn, hypoxia, neuron viability, BDNF

Pendahuluan

Otak sangat sensitif terhadap kondisi kekurangan oksigen. Suatu penelitian melaporkan bahwa area otak yang paling rentan terhadap kondisi ini adalah hipokampus, korteks dan striatum.¹ Terhentinya suplai darah ke otak secara tiba-tiba, yang disebut dengan kondisi hipoksia, dapat berakibat fatal dan menyebabkan kematian sel-sel neuron otak dalam waktu beberapa menit. Hipoksia serebri adalah hipoksia yang paling sering ditemukan dan diasosiasikan sebagai *stroke*.^{3,4}

Sampai saat ini, *stroke* merupakan penyebab ketiga kematian di dunia selain akibat penyakit kardiovaskular dan kanker. Prognosis pasien *stroke* bahkan lebih buruk dari kebanyakan pasien kanker, setengah dari seluruh pasien *stroke* meninggal dan 15-30% penderita *stroke* yang hidup menjadi cacat akibat defisit neurologis hingga membutuhkan bantuan perawat setelah 3 bulan menderita *stroke*.⁵ Oleh karena itu merupakan suatu kebutuhan untuk mencari obat yang dapat diberikan sebagai terapi suplemen pada pasien-pasien yang mempunyai kecenderungan terserang *stroke*, seperti penderita hipertensi, sehingga diharapkan komplikasi yang timbul jika terjadi *stroke* dapat minimal.

Hipoksia serebri memicu serangkaian reaksi beruntun atau kaskade patologis yang menyebabkan kerusakan neuron yang ireversibel dalam beberapa menit setelah timbulnya onset hipoksia. Kaskade tersebut disebabkan oleh peningkatan glutamat ekstraselular disertai aktivasi berlebihan reseptor glutamat (eksitotoksisitas) sehingga menyebabkan peningkatan ion kalsium intraselular dan produksi radikal bebas yang berlebih mengakibatkan kerusakan pada membran lipid, protein, dan asam nukleat (DNA). Pada akhirnya semua hal tersebut memicu jalur kaskade *caspase* dengan hasil akhir kematian sel (apoptosis).³⁻⁷ Adanya kaskade patologis yang dipicu hipoksia memungkinkan pengembangan strategi pengobatan baru yang dapat digunakan sebagai neuroproteksi, dengan cara memblokir kaskade tersebut sehingga kematian neuron dapat dicegah.^{8,9}

Selain itu, kemampuan neuron untuk bertahan hidup tidak terlepas dari peran faktor-faktor pertumbuhan, diantaranya *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF). BDNF adalah salah satu protein *neurotrophic factor* penting yang berperan dalam kelangsungan hidup, pertumbuhan, dan perkembangan neuron.^{10,11} BDNF berperan membatasi kematian neuron melalui kemampuannya memodulasi jalur-jalur "survival signaling" kaskade yang muncul sebagai manifestasi mekanisme pertahanan tubuh endogen.

Dilaporkan pada saat terjadinya hipoksia serebri, tidak terdapat peningkatan kadar BDNF endogen di area hipokampus dan korteks yang disebabkan inhibisi sintesis protein.⁴ Kadar BDNF endogen baru mulai meningkat setelah 24 jam hingga beberapa hari pasca hipoksia serebri.⁵ Oleh sebab itu, BDNF eksogen sering kali diberikan 24-48 jam pasca hipoksia serebri yang memungkinkan protein yang menginduksi BDNF terekspresi dengan lengkap dan dipertahankan hingga fase pemulihan.⁴

Indonesia memiliki banyak tanaman herbal yang memiliki potensi terapi salah satunya adalah tanaman akar kucing atau *Acalypha indica* Linn. Tanaman ini dinamai akar kucing karena akarnya disenangi kucing yang sedang sakit. Beberapa saat setelah dimakan dan dimuntahkan kembali bersama isi perutnya, kucing tersebut terlihat membaik. Atas dasar tersebut, meskipun belum ada bukti ilmiah tentang khasiatnya, masyarakat telah mencoba menggunakan rebusan akar kucing untuk mengobati dirinya saat sedang sakit perut. Dan secara tidak sengaja, ternyata rebusan akar kucing tersebut dapat memulihkan kelumpuhan saraf akibat *stroke*.¹²

Kandungan bahan aktif dari tanaman ini masih belum dapat diidentifikasi dengan baik. Beberapa bahan-bahan kimia aktif yang bermanfaat dari tanaman ini yang telah berhasil diidentifikasi diantaranya adalah *kaempferol* (flavonoid), *beta-sitosterol*, HCN, *gamma-sitosterol*, dan *Acalyphin*.¹³ Baru-baru ini penelitian di India membuktikan bahan aktif yang terkandung dalam akar tanaman akar kucing memiliki aktivitas antioksidan, yang mampu melindungi otak dari efek senyawa radikal bebas yang memicu terjadinya apoptosis pada keadaan hipoksia.¹⁴ Flavonoid yang terkandung dalam tanaman akar kucing, dilaporkan merupakan antioksidan kuat yang mampu melindungi sel neuron dari kerusakan yang disebabkan toksisitas glutamat.¹⁵

Secara ilmiah, Purwaningsih dan kawan-kawan telah membuktikan efek tanaman akar kucing terhadap gangguan komunikasi hubungan saraf otot (*neuromuscular junction*) secara *eks vivo* pada otot paha katak. Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terbukti mempunyai efek neuroprotektor dan neuroterapi secara *eks vivo* pada dosis 1.5-20 mg/ml.¹² Pada susunan saraf pusat, Suswati L, membuktikan bahwa ekstrak akar *Acalypha indica* Linn pada dosis 400 dan 500 mg/kg BB mampu memperbaiki kerusakan sel neuron hipokampus tikus pascahipoksia serebri secara *in vivo*.¹⁶

Adanya bukti bahwa tanaman akar kucing mengandung senyawa yang dapat mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh keadaan hipoksia sehingga kematian neuron tidak terjadi, besar kemungkinan tanaman akar kucing dapat meningkatkan kelangsungan hidup neuron serta menginduksi peningkatan kadar BDNF pada keadaan hipoksia. Sel yang hidup ditandai dengan adanya aktivitas enzim dan keaktifannya berproliferasi, sehingga viabilitas sel dihitung berdasarkan aktivitas enzim (*MTT assay*) dan berdasarkan tingkat proliferasinya (pemeriksaan BrdU).

Selain itu hingga saat ini belum ada penelitian yang meneliti tentang kemungkinan adanya pengaruh tanaman akar kucing terhadap viabilitas neuron dan keterkaitannya dengan kadar BDNF endogen, sebagai salah satu faktor yang mempertahankan kelangsungan hidup neuron. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak akar *Acalypha indica* Linn terhadap viabilitas neuron dan kadar BDNF endogen pada keadaan hipoksia secara *in vitro*.

Metode

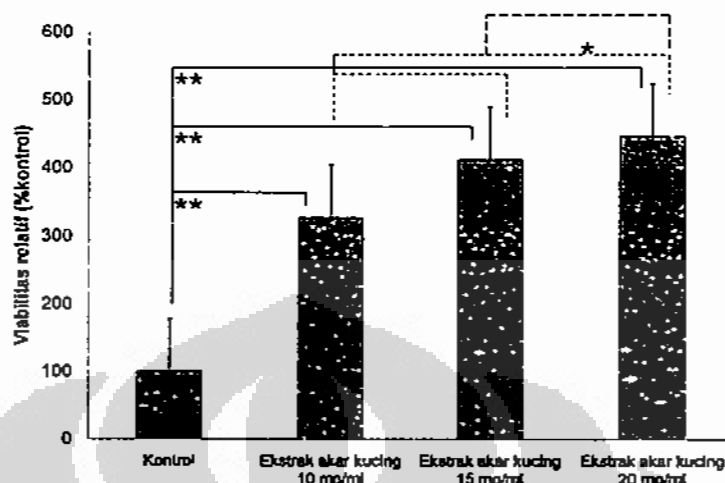
Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vitro* pada kultur jaringan sel saraf hipokampus tikus *Sprague Dowley* dewasa berusia 9-10 minggu dengan berat 200-250 gram. Tikus dikorbankan dengan cara dislokasi leher. Tiap kelompok kultur sel saraf diberikan ekstrak air *Acalypha indica* Linn selama 72 jam dengan dosis 10 mg/ml, 15 mg/ml, dan 20 mg/ml, dan 1 kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan. Kemudian sel saraf dipajankan terhadap hipoksia dengan cara pemberian gas 5% O₂/5% CO₂/N₂ balans selama 24 jam. Setelah pemajanan terhadap hipoksia, viabilitas sel saraf diukur dengan *MTT assay*, tingkat proliferasi sel saraf dianalisa dengan *5-bromo2'-deoxy-uridine* (BrdU) dan kadar BDNF pada medium kultur dianalisa dengan menggunakan BDNF kit metode ELISA.

Hasil

Pemeriksaan MTT untuk mengukur viabilitas relatif sel, dilakukan secara triplo. Didapatkan rata-rata viabilitas relatif sel pada kelompok kontrol sebesar 99,7±6,98%; kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml sebesar 326,30±43,73%; kelompok dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml sebesar 411,65±114,25%; dan kelompok dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml sebesar 445,91±67,37% (lihat Gambar 1)

Berdasarkan analisis data, didapatkan hasil viabilitas relatif sel setiap kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan

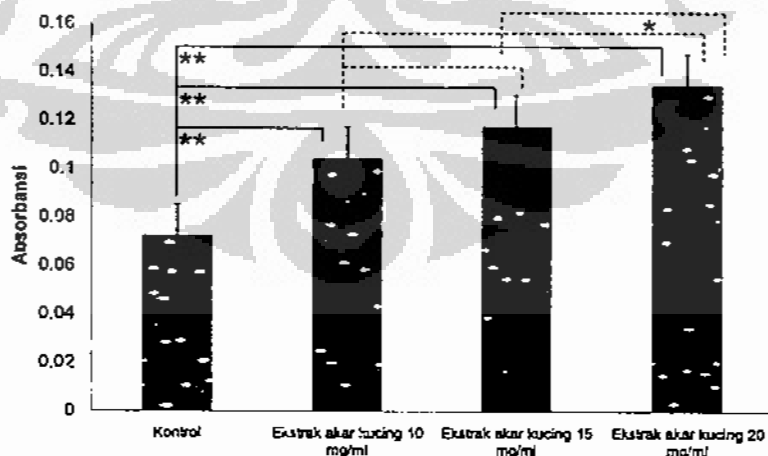
kelompok kontrol, viabilitas neuron kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml meningkat 3 kali dibandingkan kontrol, sedangkan viabilitas neuron kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml dan 20 mg/ml meningkat sebanyak 4 kali dibandingkan dengan kelompok kontrol.



Gambar 1. Rerata prosentase viabilitas relatif neuron
(** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Pada pemeriksaan BrdU untuk mengukur tingkat proliferasi sel, dilakukan secara duplo. Didapatkan absorbansi pada kelompok kontrol sebesar $0,072 \pm 0,0095$; kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml sebesar $0,104 \pm 0,0146$; kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml sebesar $0,117 \pm 0,0187$; dan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml sebesar $0,134 \pm 0,0135$ (lihat Gambar 2).

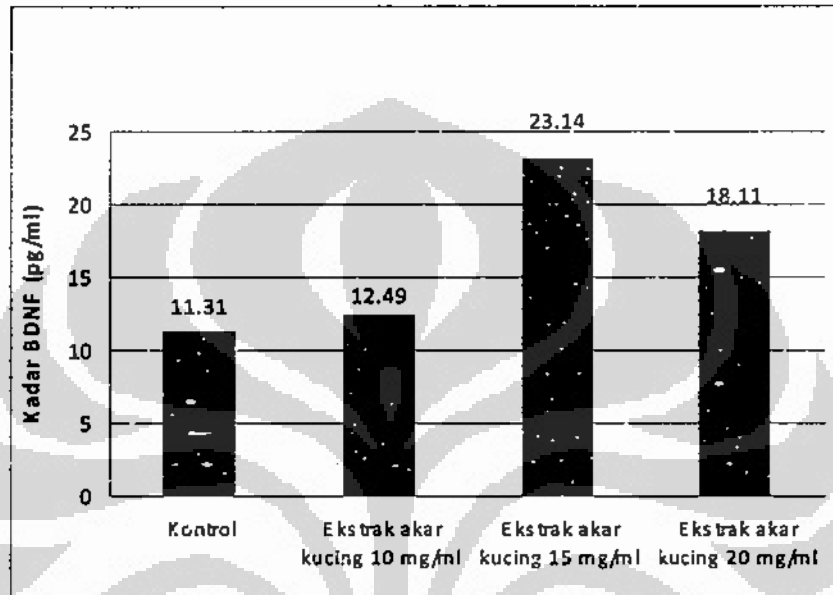
Berdasarkan analisis data, didapatkan hasil tingkat proliferasi sel setiap kelompok dipajan ekstrak akar kucing lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol, dengan tingkat proliferasi sel yang paling tinggi pada kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml.



Gambar 2. Nilai absorbansi BrdU
(** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Pengukuran kadar BDNF medium kultur, didapatkan kadar BDNF pada kelompok kontrol sebesar 11,31 pg/ml; kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml sebesar 12,49 pg/ml; kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml sebesar 23,14 pg/ml; kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml sebesar 18,11 pg/ml. (Gambar 3)

Kadar BDNF didapati paling tinggi pada kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 15 mg/ml dan menurun kadarnya pada kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 20 mg/ml tetapi tetap masih lebih tinggi dibanding kontrol dan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml.



* sampel yang diukur berasal dari kumpulan 6 sampel/ kelompok perlakuan (*pooled*)

Gambar 3. Kadar BDNF neuron kelompok kontrol dan kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing.

Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn mampu meningkatkan viabilitas neuron pada keadaan hipoksia. Hasil ini tampak dari viabilitas neuron yang meningkat dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan viabilitas neuron ini sesuai dengan peningkatan dosis dan bermakna secara statistik ($p < 0,01$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Purwaningsih et al (2008), dimana ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn memberikan efek baik neuroprotektif maupun neuroterapi yang optimal pada dosis 15 mg dan 20 mg/ml terhadap kelumpuhan saraf otot katak secara *ex vivo*.⁷

Kemampuan ekstrak akar *Acalypha indica* Linn dalam meningkatkan viabilitas neuron diduga berkaitan dengan zat aktif yang terkandung dalam ekstrak akar diantaranya flavonoid (kaempferol) dan komponen phenolic (tannin). Flavonoid merupakan salah satu antioksidan kuat, dilaporkan memiliki efek neuroproteksi potensial dalam mencegah kerusakan neuron yang disebabkan oleh stroke iskemia dengan cara menginterupsi kaskade kematian sel, diantaranya dengan mencegah pembentukan ROS dan menghambat masuknya kalsium ke intrasejular.^{10,12,13}

Penelitian yang dilakukan oleh Balakrishnan N et al (2009) membuktikan zat-zat aktif tersebut diatas yang terkandung dalam ekstrak akar *Acalypha indica* Linn mampu menangkal efek radikal bebas NO dengan cara mensupresi pembentukan radikal NO.⁹ Kemampuan ini berhubungan dengan aktivitas antioksidan zat-zat aktif dalam akar

Acalypha indica Linn dan dilaporkan setara dengan aktivitas antioksidan asam askorbat (vitamin C).⁹

Beberapa penelitian juga melaporkan kemampuan neuroprotektif Kaempferol (golongan flavonoid yang terkandung dalam akar *Acalypha indica* Linn), terhadap eksitotoksitas neuronal dan disfungsi mitokondria yang secara signifikan mengurangi kematian dan meningkatkan kelangsungan hidup neuron.¹⁴ Kaempferol terbukti mampu menghambat pembentukan radikal peroksida di mitokondria, menurunkan peroksidasi lipid membran mitokondria, serta mencegah hilangnya potensial elektrik transmembran mitokondria.¹⁴

Kemampuan ini terkait dengan aktivitas antioksidan yang terkandung dalam kaempferol dalam mempertahankan potensial elektrik membran mitokondria melalui pengaturan ion kalsium dan menangkal radikal bebas.¹⁴ Dilaporkan adanya kemungkinan kaempferol berinteraksi langsung pada kanal Ca^{2+} , mencegah kanal tersebut terbuka sehingga tidak terjadi peningkatan Ca^{2+} intraselular yang berakibat kematian neuron serta secara langsung menghambat pembentukan senyawa radikal bebas yang dihasilkan oleh mitokondria.¹⁴ Dengan demikian, adanya zat-zat aktif dalam akar tanaman *Acalypha indica* Linn diduga berperan dalam mencegah kematian neuron pada saat hipoksia yang terlihat dari meningkatnya viabilitas neuron.

Peningkatan viabilitas neuron ini sesuai dengan peningkatan dosis, dan kemungkinan pemberian dosis ekstrak akar *Acalypha indica* Linn yang lebih tinggi lagi, dapat semakin meningkatkan viabilitas neuron sehingga penelitian lanjutan dengan dosis ekstrak akar kucing yang lebih tinggi perlu dilakukan untuk mendapatkan dosis yang benar-benar optimal untuk peningkatan viabilitas neuron pada keadaan hipoksia.

Sel yang hidup, aktif berproliferasi sehingga viabilitas neuron juga dapat dilihat berdasarkan keaktifannya berproliferasi untuk itu dilakukan pemeriksaan lain guna melihat pengaruh akar kucing terhadap viabilitas neuron berdasarkan tingkat proliferasi selnya. Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa ekstrak akar *Acalypha indica* Linn juga berpengaruh pada tingkat proliferasi, terlihat dari peningkatan absorbansi/ tingkat proliferasi dengan pola yang mirip dengan tingkat viabilitas neuron. Tingkat proliferasi juga paling optimal pada dosis ekstrak akar kucing 15 mg/ml dan 20 mg/ml. Semua peningkatan ini sesuai dengan peningkatan dosis dan bermakna secara statistik ($p < 0,01$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Adanya peningkatan proliferasi, dengan demikian viabilitas sel juga meningkat.

Kematian sel neuron disebabkan karena DNA rusak, terfragmentasi menjadi bagian-bagian kecil, radikal bebas menyebabkan kerusakan DNA melalui reaksi radikal hidroksil (OH^{\cdot}) yang memodifikasi gugus ribosa fosfat dan pirimidin serta reaksi dengan gula fosfat "backbone" sehingga untai ganda DNA terpecah.¹⁵ Selain itu NO juga menyebabkan inaktivasi beberapa enzim antioksidan, *catalase*, *glutathione peroxidase*, dan SOD sehingga radikal bebas terdapat dalam jumlah berlebih yang memicu kematian neuron.¹⁵ Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn dengan kemampuan antioksidannya seperti yang telah dibahas sebelumnya, mampu mengatasi kerusakan DNA yang disebabkan radikal bebas terlihat dari meningkatnya absorbansi BrdU (yang diinkorporasikan ke dalam DNA yang baru disintesis (fase S) oleh sel yang berproliferasi) yang berkorelasi dengan peningkatan proliferasi.

Neuron-neuron yang aktif berproliferasi disini, diduga berasal dari neuron-neuron yang telah ada atau baru saja terbentuk pada saat atau sebelum hipoksia terjadi. Diketahui adanya sel-sel punca (*stem cells*) pada otak mamalia dewasa, pada regio-regio otak tertentu, yaitu pada zona subgranular (SGZ), girus dentata (DG), hipokampus, dan zona subventrikular (SVZ) ventrikel lateral yang dapat memperbaharui diri sepanjang kehidupannya, sehingga kemampuan neurogenesis tetap ada pada otak dewasa.¹⁶

Beberapa tanaman herbal lain juga telah diteliti dan memiliki khasiat melindungi neuron terhadap kerusakan yang ditimbulkan oleh hipoksia. Diantaranya *Brazilian green propolis*¹⁷ dan *Allium cepa*¹⁸ (bawang bombay) yang dilaporkan efeknya dapat mengurangi ukuran infark, memperbaiki kemampuan memori jangka pendek dan inkoordinasi motorik pasca hipoksia. Adanya senyawa flavonoid yang terkandung dalam tanaman-tanaman tersebut, seperti tanaman akar kucing. Meskipun belum ada penelitian yang membandingkan efeknya dengan tanaman akar kucing, potensi tanaman akar kucing kemungkinan sama atau bahkan lebih baik.

Disamping itu, kemampuan neuron untuk bertahan hidup juga disebabkan oleh pengaruh dari neurotropik faktor, diantaranya BDNF, yang berperan dalam mempertahankan hidup dan membatasi kematian neuron. Oleh sebab itu dilakukan pemeriksaan terhadap kadar BDNF medium kultur. Hasil pemeriksaan menunjukkan adanya peningkatan kadar BDNF pada kelompok yang dipajan ekstrak akar kucing 10 mg/ml, 15 mg/ml, dan 20 mg/ml dibandingkan dengan kadar BDNF kelompok kontrol. Dengan demikian, BDNF turut berpengaruh dalam mempertahankan kelangsungan hidup neuron saat hipoksia terjadi, sesuai dengan adanya peningkatan proliferasi neuron. Pada ekstrak akar dosis 15 mg/ml didapat kadar optimal BDNF, hal ini sejalan dengan peningkatan proliferasi yang mulai optimal pada dosis 15 mg/ml. Pada penelitian ini terlihat kemampuan neuron bertahan hidup berdasarkan peningkatan viabilitas dan tingkat proliferasinya, sehingga selain peran BDNF, ekstrak akar *Acalypha indica* Linn juga berpengaruh terhadap kelangsungan hidup neuron dengan kemampuannya menangkal radikal bebas sehingga kematian neuron dapat dicegah.

Ekstrak akar *Acalypha indica* Linn dengan kemampuan antioksidannya, berperan secara langsung terhadap produksi BDNF endogen dengan mencegah kerusakan protein dan inhibisi sintesis protein. Grant, *et al* (2005) melaporkan antioksidan yang terdapat dalam asam askorbat mampu menginduksi ekspresi dari gen BDNF saat terjadi kerusakan oksidatif.¹⁹ Guo *et al* (2008) juga melaporkan pemberian zat antioksidan mampu mengatasi radikal bebas sehingga terjadi peningkatan sintesis BDNF endogen.²⁰ Akar *Acalypha indica* Linn mengandung zat-zat antioksidan yang dilaporkan setara dengan asam askorbat dalam mengatasi radikal bebas,⁹ dengan demikian mampu menginduksi ekspresi gen BDNF saat terjadinya hipoksia seperti asam askorbat. Adanya peningkatan BDNF turut berkontribusi pada peran tanaman *Acalypha indica* Linn dalam mempertahankan kelangsungan hidup neuron pada keadaan hipoksia.

Kesimpulan

Ekstrak air akar *Acalypha indica* Linn mampu meningkatkan viabilitas neuron serta kadar BDNF endogen neuron pada keadaan hipoksia secara *in vitro*.

Daftar Pustaka

1. Sugawara T, Fujinura M, Noshita N, Kim GW, et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*®. 2004;1:17-25.
2. Yakovlev AG, Faden AI. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *NeuroRx*®. 2004;1:5-16.
3. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences*. 2000;179:1-33.
4. Kajta M. Apoptosis in the central nervous system: mechanisms and protective strategies. *Pol. J. Pharmacol.* 2004;56:689-700.
5. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*. 2004;22(3):123-131.

6. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999;79:1431-1568.
7. Purwaningsih EH, Ibrahim N, Zain H, Tedjo A. Neuro-protection and neuro-therapy effects of *Acalypha indica* Linn water extract ex vivo on musculus gastrocnemius frog. *Makara Kesehatan.* 2008;12(2):71-76.
8. Indian Medicinal Plants Growers' Consortium. *Acalypha indica* Linn. Available from: impgc.com.
9. Balakrishnan N, Panda AB, Raj NR, Shrivastava A. The evaluation of nitric oxide scavenging activity of *Acalypha Indica* Linn root. *Asian J. Research Chem.* 2009;2(2):148-50.
10. Vauzour D, Vafeiadou K, Mateos AR, et al. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr.* 2008;3:115-26.
11. Suswati L. Perbaikan neuron hipokampus pasca hipoksia serebri dengan penggunaan ekstrak air akar tanaman akar kucing (*Acalypha Indica* Linn). Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2009.
12. Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F, et al. Neuroprotection by flavonoids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2003;36:1613-20.
13. Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2001;30:433-46.
14. Samhan AK, Martin-Romero FJ, Gutierrez-Merino C. Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:48-61.
15. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology.* 2010;2010:1-23.
16. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 2008;132:645-50.
17. Shimazawa M, Chikamatsu S, Morimoto N, Mishima S, et al. Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *eCAM.* 2005;2(2):201-07.
18. Shri R, Bora KS. Neuroprotective effect of methanolic extracts of *Allium cepa* on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Fitoterapia.* 2008;79:86-96.
19. Grant MM, Barber VS, Griffiths HR. The presence of ascorbate induces expression of brain derived neurotrophic factor in SH-SY5Y neuroblastoma cells after peroxide insult, which is associated with increased survival. *Proteomics.* 2005;5:534-40.
20. Guo S, Kim WJ, Lok J, Lee SR, et al. Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial cells and neurons. *PNAS.* 2008;105(21):7582-87.