

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Pemberian Vitamin E (*α -Tokoferol*) terhadap Kerusakan Sel Saraf Otak Hamster Kultur Primer yang Dipapar Etanol

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik dengan ANAVA tunggal tentang pengaruh pemberian vitamin E (*α -tokoferol*) terhadap kerusakan sel saraf otak hamster kultur primer, diperoleh data yang menunjukkan bahwa $F_{hitung} > F_{tabel} 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh yang nyata dari pemberian vitamin E terhadap kerusakan sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol sebagaimana tercantum dalam tabel 4.1.

Tabel 4.1 Ringkasan ANAVA tunggal tentang pengaruh pemberian vitamin E terhadap kerusakan sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol

SK	db	JK	KT	F _{Hitung}	F _{tabel 0,05}
Perlakuan	6	17329	2888,2	23*	2,85
Galat	14	1767	126		
Total	20				

Keterangan : (*) Berbeda nyata

Untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan yang ada dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji Jarak Duncan (UJD) 0,05. Uji Jarak Duncan digunakan berdasarkan nilai KK (Koefisien Keragaman) dari data perhitungan kerusakan sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol sebesar 24%. Berdasarkan hasil UJD 0,05 dari rata-rata kerusakan sel saraf otak hamster kultur primer, maka didapatkan notasi UJD 0,05 seperti pada tabel 4.2 berikut ini.

Tabel 4.2 Ringkasan UJD 0,05 tentang pengaruh pemberian vitamin E terhadap kerusakan sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol

Perlakuan	Rata-rata (%)	Notasi UJD 0,05
K+	83	a
P1	78	a
P2	67	a
P3	42	b
P4	33	b
P5	18	c
K-	1,7	c

Keterangan : Angka yang didampingi dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 0,05

Berdasarkan Tabel 4.2 dari hasil UJD pada taraf signifikansi 0,05 tentang pengaruh pemberian vitamin E (*α -tokoferol*) terhadap kerusakan sel saraf otak yang dipapar etanol dapat diketahui bahwa pada perlakuan P2 (vitamin E 50 μ M dan etanol 10 mM) tidak berbeda nyata dengan P1 (vitamin E 25 μ M dan etanol 10 mM), dan kontrol positif (hanya etanol 10mM), tetapi berbeda nyata dengan P3 (vitamin E 75 μ M dan etanol 10 mM) P4 (vitamin E 100 μ M dan etanol 10 mM) P5 (vitamin E 125 μ M dan etanol 10 mM), dan kontrol negatif (tanpa paparan). Pada P3 tidak berbeda nyata dengan P4, begitu pula dengan P5 tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif, tetapi P3 dan P4 berbeda nyata dengan P5 dan kontrol negatif .

Berdasarkan notasi UJD 0,05 dapat diketahui bahwa pemberian vitamin E yang sudah mampu menjaga sel saraf otak hamster kultur primer dari kerusakan akibat paparan etanol yaitu P3 (vitamin E 75 μ M). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa vitamin E mampu menjaga sel saraf otak kultur primer dari kerusakan akibat paparan etanol 10 mM selama 24 jam. Hal ini dapat dilihat

pada tabel 4.2. kelompok kontrol positif mempunyai angka rerata tertinggi yaitu 83% terhadap kerusakan sel saraf otak hamster kultur primer dibandingkan dengan kelompok perlakuan vitamin E.

Peningkatan kerusakan sel saraf otak hamster kultur primer yang terjadi pada kontrol positif disebabkan karena adanya radikal bebas etanol yang mengganggu interaksi antara sel dengan lingkungannya, baik secara fisik yaitu perlekatan sel dengan substrat, dan perlekatan sel dengan sel, dan secara kimiawi yaitu adanya protein membran yang membantu komunikasi antar sel. Menurut Istanti dkk, (1999) membran sel yang melekat pada substrat banyak mengandung integrin yang mengikat substrat atau materi ekstrasel yang melapisi substrat dengan sitoskeleton. Pada saat membran sel mulai menempel pada substrat, protein integrin dan mikrofilamen akan menyusun membentuk struktur yang dinamakan *focal contact* di tempat membran menempel pada substrat.

Perlekatan sel antar sel dipengaruhi oleh adanya protein integral membran yaitu molekul dari kelompok immunoglobulin, integrin dan cadherin (Istanti dkk, 1999). Cadherin mengikat sel yang satu dengan sel yang lain melalui ikatan antara cadherin yang terdapat pada permukaan membran sel yang satu dengan sel yang lain. Bentuk ikatan tersebut yang menyebabkan adanya interaksi antara sel yang sejenis, sedangkan integrin merupakan protein ekstraseluler yang membantu sel melekat pada matriks dan berinteraksi dengan zat ekstraseluler. Pada penelitian ini, diduga adanya etanol ini memicu kerusakan sel dengan mengganggu protein integral membran baik protein cadherin maupun integrin

Pertumbuhan sel melibatkan dua jenis sinyal yang bekerja secara bersamaan. Sinyal pertama berasal dari molekul terlarut, seperti faktor pertumbuhan dan penghambat pertumbuhan polipeptida. Sinyal yang kedua melibatkan unsur tidak terlarut pada ekstraseluler matrik yang berintegrasi dengan integrin sel (Robbins *et al.*, 2007).

Menurut Moulder *et al.*, (2001), bahwa pemaparan etanol dengan konsentrasi 10mM bersifat toksik pada kultur neuron hipocampal yang ditunjukkan dengan adanya kematian dan kerusakan pada sel hingga menyebabkan apoptosis sel. Stanczyk (2005), menjelaskan bahwa kerusakan sel saraf otak yang terjadi akibat paparan etanol merupakan kondisi sel yang sudah tidak mampu melakukan fungsinya secara optimal dikarenakan kurangnya nutrisi yang dibutuhkan sel untuk beregenerasi, sehingga menyebabkan abnormalitas sel. Kerusakan sel saraf otak dapat dicegah dan diperbaiki dengan adanya antioksidan berupa vitamin E.

Vitamin E mempunyai kemampuan untuk mengurangi adanya suatu senyawa yang tidak seimbang dalam sel menjadi metabolit yang seimbang dengan memberikan gugus hidrogennya (Gallagher, 2004). Vitamin E digunakan sebagai penyeimbang sel saraf otak hamster kultur primer dari paparan etanol. Sebagaimana firman Allah Swt. dalam Alqur'an surat al-Infithar ayat 7, yang menjelaskan bahwa Allah Swt. menciptakan segala sesuatu dengan seimbang.

الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّاكَ فَعَدَلَكَ ﴿٧﴾

"Yang telah menciptakan mu lalu menyempurnakan kejadianmu dan menjadikan (susunan tubuh)mu seimbang" (Qs. al-Infithar: 7).

Secara ilmiah dalam tingkat molekuler telah dijelaskan bahwa proses metabolisme yang dilalui sel saraf otak hamster kultur primer harus seimbang, ketika proses metabolisme dalam kondisi yang tidak seimbang karena adanya radikal bebas maka akan menimbulkan berbagai macam kerusakan pada sel dan menyebabkan kematian sel. Hakekatnya produksi radikal bebas secara alamiah tidak bersifat toksik terhadap sel saraf otak, tetapi setelah pemaparan etanol akan menyebabkan peningkatan radikal bebas yang memicu kondisi stres oksidatif.

Kondisi stres oksidatif terjadi ketika produksi radikal bebas prooksidan dan antioksidan tidak seimbang, sehingga berpengaruh terhadap kerusakan sel saraf otak. Stanczyk (2005) melaporkan bahwa adanya produksi radikal bebas yang berlebihan karena paparan etanol mampu menyebabkan kerusakan pada sel dan menimbulkan berbagai macam penyakit degeneratif baik dilihat *in vivo* maupun *in vitro*. Etanol merupakan zat kimia yang menyebabkan proses metabolisme menjadi tidak seimbang, dengan ketidakseimbangan tersebut maka dibutuhkan suatu penyeimbang radikal bebas etanol berupa vitamin E.

Apabila ditinjau dari pengaruh perlakuan konsentrasi vitamin E, maka dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi vitamin E yang diberikan maka semakin rendah kerusakan sel saraf otak hamster kultur primer setelah dipapar etanol 10 mM selama 24 jam, besar kemungkinan hal tersebut terjadi karena peran vitamin E yang mampu mengikat lipid peroksidasi dari radikal bebas etanol penyebab kerusakan sel. Hal tersebut dijelaskan oleh Tafazoli (2005) bahwa vitamin E mampu memutuskan rantai lipid peroksidasi akibat paparan zat kimia. Mekanisme kerusakan sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar

etanol yaitu ketika kadar radikal bebas dari etanol dalam sel tinggi melebihi kadar antioksidan, maka radikal tersebut akan berikatan dengan lipid, yang menyebabkan peroksidasi lipid.

Jalur metabolisme etanol dapat menyebabkan pembentukan ROS (*reactive oxygen species*) sehingga kadar antioksidan dalam sel rendah dan menyebabkan permeabilitas membran terganggu, serta interaksi sel dengan lingkungan menjadi terganggu. Gangguan interaksi sel saraf otak terjadi karena adanya ikatan antara protein integrin dan cadherin dengan gugus polar etanol (OH). Adanya ikatan tersebut menyebabkan pengelupasan sel dari substrat dan antar sel tidak mengalami ekspansi, sehingga menyebabkan kerusakan pada sel saraf otak dan berakhir dengan kematian sel.

4.2 Pengaruh Pemberian Vitamin E (*α-Tokoferol*) terhadap Abnormalitas Sel Saraf Otak Hamster Kultur Primer yang Dipapar Etanol

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik dengan ANAVA tunggal tentang pengaruh pemberian vitamin E (*α-tokoferol*) terhadap abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer, diperoleh data yang menunjukkan bahwa $F_{hitung} > F_{tabel}$ 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh yang nyata dari pemberian vitamin E terhadap abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer yang telah dipapar etanol sebagaimana tercantum dalam tabel 4.3.

Tabel 4.3 Ringkasan ANAVA tunggal tentang pengaruh pemberian vitamin E terhadap abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol

SK	db	JK	KT	F _{Hitung}	F _{0,05}
Perlakuan	6	2965	494,2	11*	2,85
Galat	14	658	47		
Total	20				

Keterangan : (*) Berbeda nyata

Untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan yang ada dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji Jarak Duncan (UJD) 0,05. Uji Jarak Duncan digunakan berdasarkan nilai KK (Koefisien Keragaman) dari data perhitungan abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol sebesar 43%. Berdasarkan hasil UJD 0,05 dari rata-rata abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer, maka didapatkan notasi UJD 0,05 seperti pada tabel 4.4 berikut ini.

Tabel 4.4 Ringkasan UJD 0,05 tentang pengaruh pemberian vitamin E terhadap abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol

Perlakuan	Rata-rata (%)	Notasi UJD 0,05
K+	40	a
P1	25	b
P2	17	b
P3	14	b
P4	7	c
K-	6	c
P5	3	c

Keterangan : Angka yang didampingi dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 0,05

Berdasarkan Tabel 4.4. dari hasil UJD pada taraf signifikansi 0,05 tentang pengaruh pemberian vitamin E terhadap abnormalitas sel saraf otak

hamster kultur primer, dapat diketahui bahwa kontrol positif (hanya etanol 10 mM) berbeda nyata dengan P1 (vitamin E 25 μ M dan etanol 10 mM), P2 (vitamin E 50 μ M dan etanol 10 mM), P3 (vitamin E 75 μ M dan etanol 10mM), P4 (vitamin E 100 μ M dan etanol 10 mM), P5 (vitamin E 125 μ M dan etanol 10 mM), dan kontrol negatif (tanpa paparan). Pada P1 tidak berbeda nyata dengan P2, dan P3, tetapi berbeda nyata dengan P4, P5, dan kontrol negatif.

Berdasarkan notasi UJD 0,05 dapat diketahui bahwa pada P1 (vitamin E 25 μ M) sudah mampu menurunkan abnormalitas sel saraf otak dari paparan etanol dibandingkan dengan kontrol positif. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemaparan etanol 10mM selama 24 jam mampu meningkatkan abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer dari paparan etanol. Hal ini dapat dilihat pada tabel 4.4.

Perlakuan kontrol positif mempunyai nilai rerata abnormalitas sel saraf otak tertinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberi vitamin E. Peningkatan rerata abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer pada kontrol positif diduga akibat dari pemaparan etanol 10 mM yang memicu terjadinya radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif akibat ketidakseimbangan antara kadar radikal bebas dengan antioksidan, sedangkan pada kelompok perlakuan terlihat bahwa vitamin E mampu meminimalisir aktifitas abnormalitas sel Saraf Otak Hamster Kultur Primer dari paparan etanol.

Etanol memicu produksi radikal bebas yang membentuk rantai peroksidasi lipid dan menyebabkan kerusakan yang disebut stres oksidatif. Stres oksidatif merupakan suatu keadaan dimana tingkat oksigen reaktif yang toksik

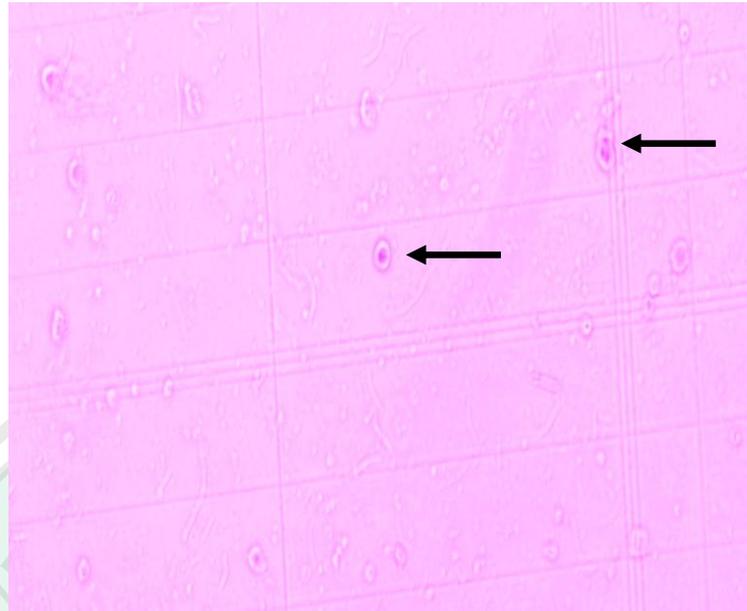
melebihi pertahanan antioksidan endogen (Stanczyk, 2005). Etanol larut dalam air, sehingga akan benar-benar mencapai setiap sel setelah dikonsumsi (Miller dan Mark, 1991). Produksi radikal etanol yang berlebihan mampu menyebabkan abnormalitas sel saraf otak kultur primer.

Mekanisme abnormalitas sel saraf otak hamster kultur primer ini dipengaruhi oleh produksi radikal bebas etanol yang merusak membran sel, kemudian berikatan dengan komponen dalam sel sehingga membentuk peroksidasi lipid dan menghasilkan beberapa produk radikal misalnya malondialdehida (MDA), adanya MDA menggambarkan banyaknya ROS, semakin banyak ROS yang dihasilkan akan meningkatkan MDA di dalam sel, MDA yang meningkat akan menurunkan rasio NAD^+/NADH dan meningkatkan Ion Ca^{2+} di dalam sel (Pospos, 2002).

Menurunnya NAD^+/NADH akan menurunkan produksi ATP sehingga mengganggu aktifitas mitokondria yang memiliki peran penting dalam respirasi sel, bahkan siklus sel, kondisi tersebut juga menyebabkan mitokondria kehilangan potensial membrannya, dan kemudian melepaskan ion kalsium ke dalam sel (Fakhrurrazy *et al.*, 2005). Peningkatan kalsium dalam sel akan memicu peningkatan aktifitas enzim protease yang menyebabkan kerusakan sitoskeleton bahkan kerusakan pada DNA, ketika repair DNA masih berfungsi maka abnormalitas akan terhambat tetapi jika repair DNA tidak mampu untuk memperbaiki kembali maka akan mengakibatkan lisis sel dan berakhir dengan kematian sel yaitu nekrosis (Pospos, 2002).

Konsumsi etanol yang berlebihan akan mengakibatkan kematian pada sel berupa nekrosis sel. Nekrosis merupakan kematian sel yang terjadi pada organisme hidup yang dapat disebabkan oleh *injury* maupun infeksi. Pada nekrosis terjadi perubahan pada inti yang pada akhirnya dapat menyebabkan inti menjadi lisis dan membran plasma menjadi pecah (Lumongga, 2008).

Pada penelitian ini ditemukan perubahan bentuk sel yang abnormal yaitu nekrosis sel berupa inti piknotik, karioreksis, maupun kariolisis. Nekrosis dapat terjadi secara mendadak atau akut tanpa didahului berbagai tahap kematian sel. Gambaran mikroskopis sel nekrosis yaitu bentuk sel masih tampak, inti sel dapat hilang (kariolisis), atau tampak fragmentasi sebagai butir kecil dalam sitoplasma akibat proses karioreksis dan dapat pula berubah menjadi gumpalan kecil hiperkromatik yang disebut piknotik (Kevin, 2010). Peningkatan radikal bebas akibat pemberian alkohol akan mengaktifkan *nuclear factor* yang akan meningkatkan *tumor necrosis factor* (TNF alfa) yang berperan terhadap nekrosis. Pada kelompok perlakuan terlihat sel-sel dengan batas tidak jelas dan inti sel yang gelap mengalami degenerasi dan nekrosis. Terlihat pada gambar 4.1 berikut :



Gambar 4.1 Sel saraf otak hamster kultur primer yang menunjukkan terjadinya nekrosis (kematian sel) (ditunjukkan anak panah) setelah dipapar etanol 24 jam dengan perbesaran 100x

Adanya antioksidan dalam sel mampu meminimalisir kerusakan dan abnormalitas yang terjadi akibat zat toksik etanol. Vitamin E merupakan antioksidan yang larut dalam lemak, dan mampu mencegah terjadinya kerusakan oksidatif pada sel saraf dan menghambat terjadinya reaksi berantai lipid peroksidasi pada membran sel otak (Halliwell, 2002). Bursell *et al.*, (1999) juga menyatakan bahwa vitamin E dapat melindungi membran sel dari berbagai zat toksik dan meningkatkan daya hidup sel otak.

Finch dan Turner (2004) menjelaskan bahwa vitamin E merupakan antioksidan pencegah oto-oksidasi pada asam lemak tak jenuh, dan menghambat timbulnya peroksidasi lipid pada membran sel. Peroksidasi lipid merupakan reaksi penyerangan radikal bebas terhadap asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) yang mengandung sedikitnya tiga ikatan rangkap (Halliwell, 1994).

Mekanisme penghambatan peroksidasi lipid oleh vitamin E dimulai pada saat lipid (LH) kehilangan satu hidrogen dan menjadi produk radikal ($L\bullet$), yang bereaksi dengan oksigen bebas untuk menghasilkan *radikal peroksil* ($LOO\bullet$), dengan adanya reaksi *radikal peroksil* selanjutnya akan diikuti reaksi berantai, hal ini sering terjadi misalnya dalam selaput sel yang dapat mengganggu integritas struktural membran. Vitamin E dapat mengganggu reaksi berantai oleh interaksi dengan *peroksil lipid* membentuk *radikal hidroperoksida* ($LOOH$), berikut mekanisme peroksida lipid oleh vitamin E (Landes, 2005).

4.3 Pengaruh Pemberian Vitamin E (*α -Tokoferol*) terhadap Viabilitas Sel Saraf Otak Hamster Kultur Primer yang Dipapar Etanol

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik dengan ANAVA tunggal tentang pengaruh pemberian vitamin E (*α -tokoferol*) terhadap viabilitas sel saraf otak hamster kultur primer, diperoleh data yang menunjukkan bahwa $F_{hitung} > F_{tabel}$ 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh yang nyata dari pemberian vitamin E terhadap viabilitas sel saraf otak hamster kultur primer yang telah dipapar etanol sebagaimana tercantum dalam tabel 4.5.

Tabel 4.5 Ringkasan ANAVA tunggal tentang pengaruh pemberian vitamin E terhadap viabilitas sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol

SK	db	JK	KT	F_{Hitung}	$F_{0,05}$
Perlakuan	6	14081	2347	186,3*	2,85
Galat	14	176,2	12,6		
Total	20				

Keterangan : (*) Berbeda nyata

Untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan yang ada dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 0,05. Uji BNT digunakan berdasarkan nilai KK (Koefisien Keragaman) dari data perhitungan viabilitas sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol sebesar 7,2%. Berdasarkan hasil BNT 0,05 dari rata-rata viabilitas sel saraf otak hamster kultur primer, maka didapatkan notasi BNT 0,05 seperti pada tabel 4.6 berikut ini.

Tabel 4.6 Ringkasan BNT 0,05 tentang pengaruh pemberian vitamin E (*α-tokoferol*) terhadap viabilitas sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol

Perlakuan	Rata-rata(%)	Notasi
K+	12	a
K-	26	b
P1	29	b
P2	51	c
P3	72	d
P4	75	d
P5	83	e

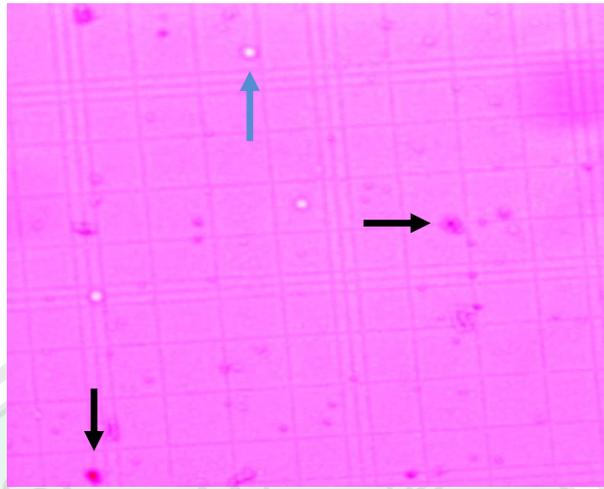
Keterangan : Angka yang didampingi dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 0,05

Berdasarkan Tabel 4.6. dari hasil BNT pada taraf signifikansi 0,05 tentang pengaruh vitamin E terhadap viabilitas sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol dapat diketahui bahwa pada kontrol positif (hanya etanol 10mM) berbeda nyata dengan kontrol negatif (tanpa paparan), P1 (vitamin E 25 μ M dan etanol 10 mM), P2 (vitamin E 50 μ M dan etanol 10 mM), P3 (vitamin E 75 μ M dan etanol 10 mM), P4 (vitamin E 100 μ M dan etanol 10 mM), dan P5 (vitamin E 125 μ M). Kontrol negatif tidak berbeda nyata dengan P1, tetapi berbeda nyata dengan P2, begitu pula P2 berbeda nyata dengan P3 dan

P4, sedangkan P5 berbeda nyata dengan kontrol positif, kontrol negatif, P1, P2, P3, dan P4.

Berdasarkan notasi BNT 0,05 dapat diketahui bahwa pada P2 (vitamin E 50 μM) sudah mampu meningkatkan viabilitas sel saraf otak hamster kultur primer dari paparan etanol. Hal ini sesuai dengan penelitian Warren (1999) bahwa pemberian vitamin E dengan konsentrasi 25 μM , 50 μM dan 75 μM mampu meningkatkan viabilitas sel 20% lebih tinggi daripada kontrol. Hasil notasi BNT 0,05 tersebut, diperoleh setelah menghitung persentase viabilitas sel saraf otak menggunakan metode pewarnaan dengan *tripan blue* 0,4%.

Menurut Trenggono (2009), *tripan blue* tidak mengubah integritas membran plasma, memperlambat proses kematian sel, dan memfasilitasi identifikasi sel yang akan dilihat dengan mikroskop. Sel yang masih hidup akan berpendar dan berwarna bening sedangkan sel yang mati akan menyerap tripan blue karena permeabilitas membrannya telah rusak, sehingga sel yang mati akan terwarnai biru, hal tersebut sesuai penelitian yang dilakukan Sukardiman (2006). Terlihat pada gambar 4.2. Berikut ini :



Gambar 4.2 Viabilitas sel saraf otak hamster kultur primer dengan pewarnaan *tripan blue* dan menggunakan mikroskop *inverted* perbesaran 200x : sel hidup (panah biru), sel mati (panah hitam)

Trenggono (2009), menjelaskan bahwa pada umumnya uji viabilitas sel didasarkan pada kerusakan membran, karena sel dengan membran yang rusak dan sel mati akan menyerap zat warna, sedangkan membran sel normal bersifat impermeabel terhadap zat warna. Membran sel yang tidak menyerap warna diduga karena membran sel yang bertahan hidup, ikatan rantai fosfolipidnya mampu berinteraksi dengan vitamin E. Vitamin E memiliki 16-*carbon phytyl* dengan rantai sisi yang mampu membentuk suatu bagian integral membran.

Then (2009) melaporkan bahwa penambahan vitamin E (*α-tokoferol*) dari konsentrasi 75 μM sudah mampu meningkatkan proliferasi sel dengan mengamati viabilitas neuron cerebellar, sedangkan konsentrasi dibawah 75 μM menunjukkan keadaan viabilitas sel kultur yang konstan setelah dipapar zat toksik. Penurunan viabilitas oleh paparan etanol 10 mM tanpa pemberian antioksidan disebabkan karena zat tersebut mampu memicu terjadinya radikal bebas.

Etanol menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas dengan berbagai mekanisme sehingga terjadi stres oksidatif yang merusak sel dan mempengaruhi proliferasi sel kultur terutama viabilitas sel. Hal ini sesuai penjelasan Moulder *et al.*, (2002) bahwa paparan etanol 10 mM menyebabkan penurunan tingkat viabilitas sel saraf.

Etanol dan radikal reaktif spesies yang lain mampu membentuk radikal *hidroksietil* yang merupakan oksidan kuat. Radikal *hidroksietil* tersebut dapat mengoksidasi lipid dan protein sel sehingga terjadi kerusakan. Radikal ini akan bereaksi dengan *polyunsaturated fatty acid's* (PUFAs) atau asam lemak tidak jenuh ganda yang menyebabkan terbentuknya lipid peroksida. Reaksi tersebut terjadi secara berantai, akibat akhir dari reaksi rantai tersebut akan terbentuk *hidrogen peroksida* (H_2O_2) yang dapat menyebabkan dekomposisi beberapa produk aldehyd yang toksik terhadap sel (Edyson, 2003).

Menurut Hariyatmi (2004), bila radikal menyerang lemak tidak jenuh ganda dengan adanya oksigen bebas, peroksida lemak akan terbentuk dalam rantai yang makin panjang. Produksi radikal bebas mengakibatkan kerusakan sel secara langsung, gangguan membran, proses metabolisme, dan fungsi gen *p53*. Pada penelitian ini, fungsi gen *p53* berperan penting sebagai pengatur proliferasi sel dan mediator pada apoptosis. Hilangnya fungsi gen *p53* atau terjadinya mutasi gen tersebut menjadikan pertumbuhan dan kematian sel tidak terkontrol, pembelahan sel terjadi secara terus menerus tanpa mengalami apoptosis, dan berakhir pada disfungsi sel.

Jika jumlah radikal bebas melebihi jumlah antioksidan yang diproduksi secara intraseluler maka dapat menimbulkan gangguan pada berbagai komponen sel, vitamin E dengan kadar tertentu dibutuhkan secara ekstraseluler untuk meningkatkan viabilitas sel saraf otak kultur primer dan menjaga keseimbangan adanya radikal bebas yang berlebihan. Sebagaimana dijelaskan dalam firman Allah Swt. Alqur'an surat ar-Ra'd ayat 8 yaitu:

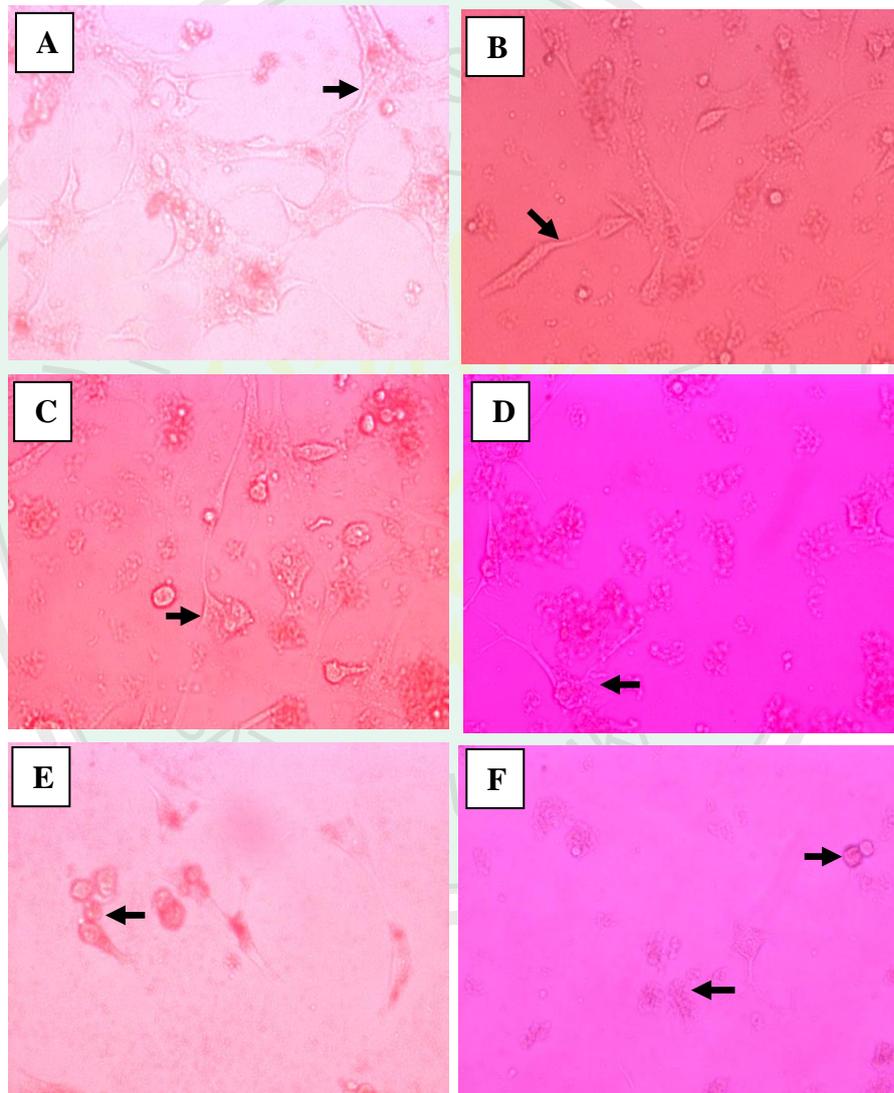
وَكُلُّ شَيْءٍ عِنْدَهُ بِمِقْدَارٍ ﴿٨﴾

”Dan segala sesuatu pada sisi-Nya ada ukurannya” (Qs. Ra'd: 8).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah Swt. menciptakan segala sesuatu berdasarkan kadarnya, seperti vitamin E pada sel saraf otak kultur primer memiliki kadar tertentu dalam perannya sebagai antioksidan, dari hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian vitamin E 25 μ M meningkatkan viabilitas sebesar 51%, vitamin E 125 μ M meningkatkan viabilitas sebesar 83%, dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi vitamin E yang diberikan maka viabilitas sel saraf otak setelah dipapar etanol semakin meningkat. Hal ini sesuai penelitian Then (2009) bahwa pemberian vitamin E hingga kadar 750 μ M masih mampu meningkatkan viabilitas hipocampal yang diinduksi zat toksik. Penelitian lain oleh Permadhy (2007) melaporkan bahwa vitamin E yang digunakan dalam jangka panjang dengan kadar lebih dari 800 mg – 3,2 g bersifat toksik dalam kondisi *in vivo*.

Berdasarkan beberapa penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa pemberian vitamin E pada sel saraf otak hamster kultur primer memiliki kadar

tertentu dalam aktifitasnya sebagai antioksidan. Pada penelitian ini, pemberian vitamin E dengan kadar tertentu mampu meningkatkan viabilitas sel saraf otak yang dipapar etanol. Pengaruh vitamin E terhadap viabilitas sel saraf otak hamster kultur primer yang dipapar etanol dapat dilihat dalam gambar 4.3 berikut :



Gambar 4.3 Sel saraf otak hamster kultur primer yang diamati dengan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100x: (A) kontrol negatif (tanpa vitamin E dan etanol), (B) pemberian vitamin E 125 µM dan etanol 10 mM, (C) pemberian vitamin E 100 µM dan etanol 10 mM, (D) pemberian vitamin E 50µM dan etanol 10 mM, (E, F) kontrol positif (hanya paparan etanol 10mM)

Mekanisme yang menyebabkan peningkatan viabilitas sel saraf otak, berawal ketika sel saraf otak dipapar etanol, maka etanol mampu berikatan langsung dengan komponen dalam membran sel dan menghasilkan banyak *reactive oxygen species* (ROS), serta berikatan dengan PUFA pada sel saraf otak. Menurut Aksenova (2005), bahwa otak merupakan salah satu organ dengan kandungan lemak tinggi (kurang lebih 80%) sehingga otak rentan terhadap radikal bebas.

Adanya ROS ini mengganggu mitokondria sehingga mitokondria mengalami proses *mitochondrial permeability transtition* (MPT), selama proses tersebut mitokondria kehilangan potensial membrannya, sehingga saluran mitokondria yaitu saluran yang mengandung protein transport berupa *porin* akan terbuka dan melepaskan kalsium (Fakhrurrazy *et al.*, 2005). Etanol merupakan pemicu terbentuknya radikal bebas dengan menghasilkan senyawa *hidroksiletil* yang bersifat toksik pada sel dan membentuk peroksidasi lipid.

Etanol memicu peningkatan Ca^{2+} dan menyebabkan protein yang ada pada membran sel terdegradasi, sehingga membran sel tidak mampu bekerja secara maksimal. Adanya peningkatan Ca^{2+} memicu peningkatan enzim-enzim *protease*, dan menyebabkan signal sel yang seharusnya disampaikan ke sel selanjutnya menjadi terhambat sehingga perintah untuk pembelahan sel menjadi terhambat pula dan viabilitas sel menjadi berkurang. Pemberian vitamin E berpotensi melindungi fosfolipid pada membran sel saraf otak dan mampu memutuskan peroksidasi lipid dari adanya etanol, sehingga viabilitas sel

saraf otak hamster kultur primer dapat ditingkatkan dan meminimalisir terjadinya kerusakan akibat paparan etanol.

Vitamin E mampu melindungi dan meningkatkan proliferasi sel saraf otak kultur primer, ditandai dengan bertambahnya jumlah sel dan menyebabkan sel tersebut berformasi membentuk karakteristik sel serta berekspansi. Pada sistem kultur, karakteristik sel saraf otak sebelum konfluen berbentuk seperti fibroblas yang multipolar dan setelah konfluen sel tersebut berbentuk epitelial (sel selapis yang poligonal dengan ukuran yang teratur).

Ekspansi antar sel saraf otak dipengaruhi oleh perlekatan sel dengan substrat, dan perlekatan sel dengan sel. Perlekatan sel dengan substrat dibantu oleh adanya protein membran antara lain integrin, beberapa saat setelah suspensi sel ditumbuhkan dalam substrat, sel mulai menempel pada permukaan cawan yang menjadi substratnya. Penempelan ini akan dilanjutkan dengan pembentukan juluran-juluran sel, kemudian sel akan memipih dan melebar serta berekspansi antara sel satu dengan sel yang lain (Istanti, 1999).

Membran sel yang melekat pada substrat banyak mengandung integrin. Integrin ini akan mengikat substrat atau materi ekstrasel yang melapisi substrat dengan sitoskeleton. Proses perlekatan dengan substrat melibatkan perubahan organisasi sitoskeleton dan protein-protein membran. Pada saat membran sel mulai menempel pada substrat, protein integrin dan mikrofilamen akan berformasi membentuk *focal contact* di tempat membran menempel pada substrat, selanjutnya akan terjadi perlekatan sel dengan sel.

Perlekatan sel saraf satu dengan yang lain dipengaruhi oleh adanya protein integral membran yaitu N-cadherin (Istanti dkk, 1999). N-cadherin mengikat sel saraf otak yang satu dengan yang lain melalui ikatan antara cadherin yang terdapat pada permukaan kedua sel. Bentuk ikatan tersebut menyebabkan adanya interaksi antara sel yang sejenis, sehingga terbentuklah ekspansi sel seperti pada gambar 4.3.

