

Gambaran Histopatologis Sel Pyramid *Cerebrum* Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Metilmerkuri dengan Pemberian CDP-Choline Sebagai Neuroprotektan

Histopathological View Pyramid Cell on *Cerebrum* of White Rat (*Rattus norvegicus*) were Exposed with Methylmercury which Administrated with CDP-Choline As Neuroprotective Agent

¹Agung Budianto Achmad, ²Paulus Sugianto, ³Widjiati

¹Mahasiswa Program Magister Ilmu Biologi Reproduksi Universitas Airlangga

²Departemen Syaraf RSUD Dr Soetomo

³Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampus C Unair, Jalan Mulyorejo, Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email :agung.budianto.08@hotmail.com

Abstract

The experiment was conducted to know the histopathological view of pyramid cell on cerebrum of white rat (*Rattus norvegicus*) due to methylmercury exposure which administrated with CDP-Choline as neuroprotective agent. Twenty five rat's divided into five group with 30 day treatment. The control grup (P_0) was given 0,5 ml aquades, P_1 (methylmercury 0,02 mg/kg), P_2 (methylmercury 0,04 mg/kg), P_3 (methylmercury 0,02 mg/kg + CDP-Choline 100 mg/kg) and P_4 (methylmercury 0,04 mg/kg + CDP-Choline 100 mg/kg). ANOVA showed histopathological pyramid cell necrosis significantly different between group. Subsequently continued with Duncan multiple range test. Duncan test showed histopathological view of P_0 , P_1 and P_2 , significantly different between group with P_2 have higher necrosis rate than P_0 and P_1 . Group P_1 and P_3 showed significantly different, with P_3 have lower necrosis rate than P_1 , as well as with P_2 and P_4 , group P_4 have lower necrosis rate than P_2 . The conclusion of this research is methylmercury with dose 0,04 mg/kg (P_2) has higher necrosis rate than the other group and CDP-Choline dose 100 mg/kg can protected pyramid cell from cell damage (necrosis), consequent from methylmerkuri exposure.

Keywords: *Methylmercury, CDP-Choline, Pyramid Cell, Necrosis, Lipid Peroxidation.*

Pendahuluan

Dalam beberapa dekade terakhir ini, Indonesia mengalami perkembangan ekonomi yang cukup signifikan. Hal ini dapat dilihat dari pesatnya pertumbuhan industri di Indonesia dalam beberapa tahun terakhir memberikan dampak positif berupa kemakmuran dan peningkatan taraf hidup masyarakat. Akan tetapi dengan adanya dampak positif tentu juga diikuti dampak negatif berupa adanya pencemaran lingkungan, baik pencemaran udara, air, dan tanah, hal ini dapat mengakibatkan gangguan keseimbangan lingkungan hidup (Rahayu, 2002). Salah satu pencemaran yang saat ini sering terjadi adalah pencemaran air. Pencemaran air pada umumnya

banyak mengandung zat organik, bakteri patogen, logam berat berbahaya dan pestisida. Salah satu logam berat sebagai sumber pencemaran adalah merkuri.

Pencemaran logam berat pada lingkungan perairan, baik di laut dan sungai akan menyebabkan kontaminasi terhadap organisme laut yang sering dikonsumsi oleh manusia dan hewan seperti ikan, kerang, cumi-cumi dan hewan laut lainnya (Aschner and Aschner, 2007). Metilmerkuri yang mencemari makanan dapat dengan mudah diserap oleh tubuh melalui saluran pencernaan. Setelah diserap metilmerkuri akan dibawa oleh darah menuju seluruh jaringan tubuh (Paterson and Talcott, 2006).

Metilmerkuri merupakan pencemar lingkungan yang paling banyak saat ini dan merupakan agen yang sangat neurotoksik, yang dapat menyebabkan gangguan saraf pusat dengan target organ utama adalah otak (NRC, 2000) serta dapat menyebabkan gangguan perkembangan pada hewan dan manusia (Franco *et al.*, 2009). Merkuri dapat menyebabkan keracunan secara sistemik yang dapat membahayakan tubuh, sehingga akan terlihat gejala utama berupa kerusakan sistem saraf pusat. Oleh karena itu diperlukan suatu neuroprotektan yang dapat melindungi kerusakan otak akibat keracunan metilmerkuri, memperbaiki membran sel otak yang rusak, melakukan penggantian membran sel yang telah rusak ataupun yang mampu mengeliminasi logam berat metilmerkuri. Salah satu neuroprotektan yang telah diketahui saat ini adalah CDP-Choline. Pemberian CDP-Choline pada kasus neurotoksisitas akibat keracunan metilmerkuri dimaksudkan untuk memperbaiki fungsi sel otak melalui pencegahan kerusakan sel pyramid.

Materi dan Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang mulai dilakukan pada tanggal 18 Maret 2012 sampai dengan tanggal 18 April 2012. Pembuatan sediaan histopatologis otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan di dua tempat yaitu di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan di Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan untuk mengukur berat badan tikus, mikroskop binokuler (OLYMPUS ® DP 12 *Microscope Digital Camera System*) untuk memeriksa sediaan histopatologis cerebrum tikus putih, kandang tikus. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah metilmerkuri dalam bentuk *Methylmercury(II)chloride* dengan rumus kimia (CH_3ClHg) buatan *Sigma-Aldrich*, aquadest, dan CDP-Choline dengan nama produk register *Braintact* ®.

Hewan Coba

Penelitian ini dilaksanakan selama 90 hari dengan menggunakan 25 ekor tikus betina dengan pemberian lima perlakuan yang berbeda. Sebelum perlakuan hewan percobaan dikelompokkan secara acak menjadi lima kelompok yaitu P₀, P₁, P₂, P₃, dan P₄ (kelompok perlakuan). Masing-masing perlakuan terdiri dari lima ekor tikus. Tikus yang telah dikelompokkan kemudian diadaptasikan selama seminggu dengan diberi pakan dan minum secara ad libitum.

Dosis Perlakuan

Dalam penentuan dosis metil-merkuri pada tikus, digunakan dosis 0,02 mg/kg bb (Huang *et al.*, 2011) dan 0,04 mg/kg bb (Sugianto dkk., 2011). Dosis toksik yang diberikan berdasarkan fraksi yang tidak membunuh tikus tetapi berpotensi menimbulkan efek toksik (Sugianto dkk., 2011). Dosis CDP-Choline menggunakan dosis 100 mg/kg bb. Dosis tersebut digunakan berdasarkan penelitian Baskaya *et al.*, (2000) dalam Secades (2011), dikatakan bahwa dosis CDP-Choline 100 mg/kg bb merupakan dosis efektif yang telah mampu mengurangi *cerebral oedema* dan ruptur *blood brain barrier* akibat cedera traumatik otak (*Traumatic Brain Injury*).

Perlakuan

Hewan coba yang digunakan sebanyak 25 ekor yang telah dibagi secara acak menjadi lima perlakuan. Kelompok kontrol (P_0) diberikan aquadest sebanyak 0,5 ml, kelompok P_1 (metilmerkuri 0,02 mg/kg bb), kelompok P_2 (metilmerkuri 0,04 mg/kg bb), kelompok P_3 (metilmerkuri 0,02 mg/kg bb + CDP-Choline 100 mg/kg bb), kelompok P_4 (metilmerkuri 0,04 mg/kg bb + CDP-Choline 100 mg/kg bb).

Perlakuan diberikan dengan menggunakan spuit tuberculin disposable 1 ml untuk perlakuan metilmerkuri dan spuit 3 ml untuk perlakuan CDP-Choline dengan jarum sonde secara peroral. Perlakuan percobaan dilakukan setiap hari selama 30 hari. Setelah perlakuan selama 30 hari, 24 jam setelah perlakuan terakhir, perlakuan P_0 , P_1 , P_2 , P_3 , P_4 dieuthanasia dengan menggunakan chloroform dan diseksi untuk diambil otaknya. Selanjutnya organ otak dimasukkan ke dalam pot yang telah diisi oleh formalin 10% dan difiksasi selama 24 jam. Setelah itu dibuat preparat histologi dan kemudian dilakukan pemeriksaan secara mikroskopik.

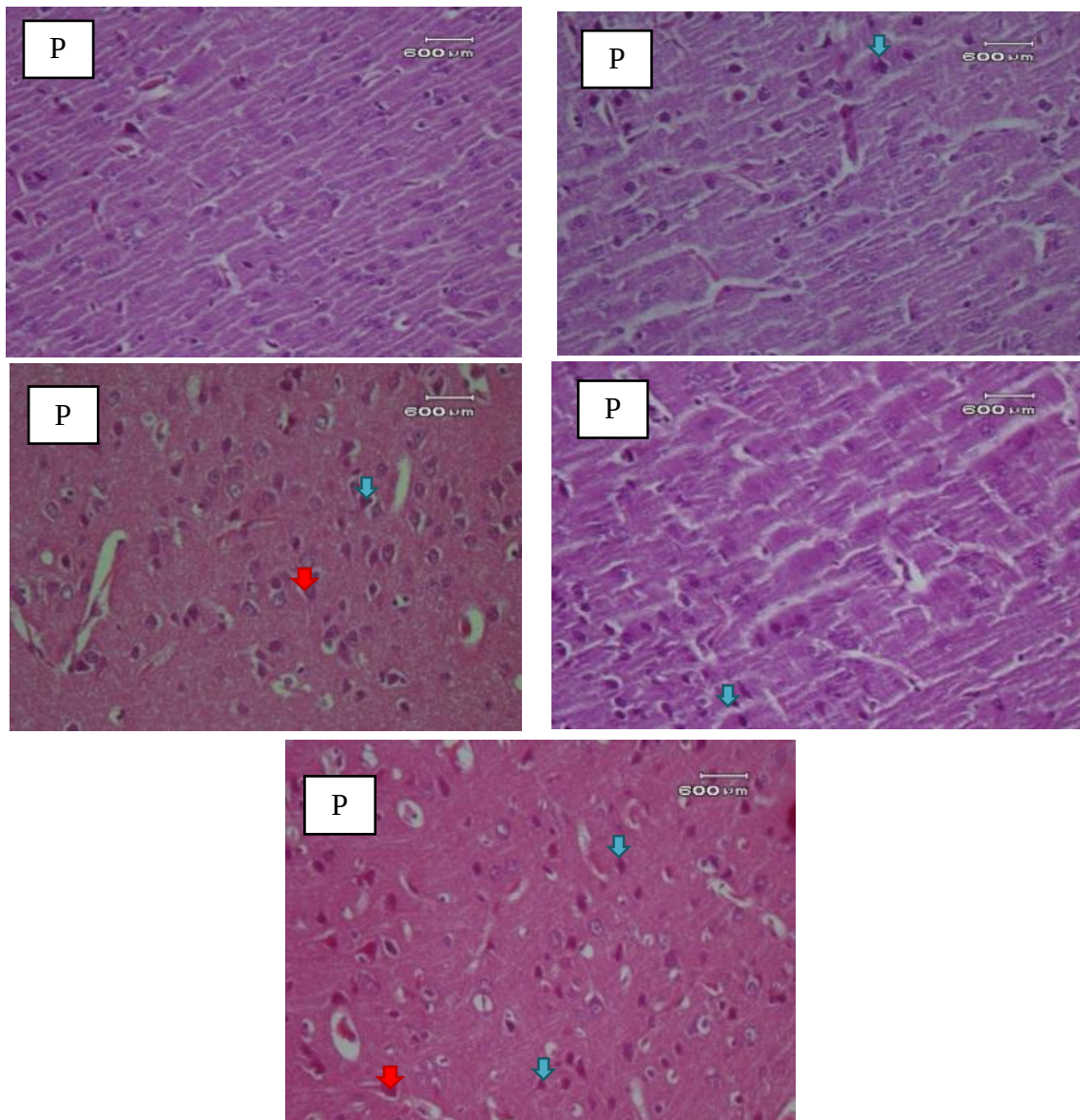
Peubah yang Diamati

Penilaian pada otak dilakukan pengamatan secara mikroskopis terhadap perubahan histopatologi yang terjadi pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*). Perubahan histologi yang diamati adalah pada bagian korteks *cerebrum* otak tikus (*Rattus norvegicus*) pada sel pyramid yang mengalami kerusakan membran sel sehingga akan tampak sel pyramid yang mengalami nekrosis (piknotis, karyoreksis dan karyolisis). Pengamatan dilakukan sebanyak lima lapangan pandang berbeda. Pengamatan dilakukan masing-masing lapangan pandang dengan cara dimulai dari sudut kanan, bawah, ke sudut kanan, ke atas serta bagian kanan dari preparat, kemudian dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x.

Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan lima ulangan untuk masing-masing perlakuan. Untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan menggunakan sidik ragam (ANOVA). Bila terdapat perbedaan antara perlakuan dilakukan uji jarak berganda Duncan dengan signifikansi 5% (Kusriningrum, 2008).

Hasil dan Pembahasan



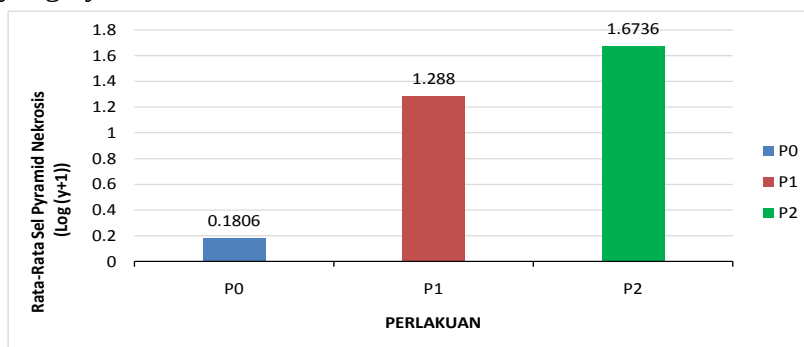
Gambar 1. Gambaran mikroskopis otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) bagian korteks *cerebrum*, perlakuan P₀, P₁, P₂, P₃ dan P₄. Tanda panah biru menunjukkan sel pyramid yang mengalami nekrosis dan tanda panah merah menunjukkan sel pyramid yang normal. Pewarnaan H.E 400x

Dengan pengamatan secara mikroskopik pada masing-masing perlakuan terdapat perubahan pada gambaran histopatologis sel pyramid korteks *cerebrum* tikus putih (*Rattus norvegicus*). Berdasarkan data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik dengan menggunakan sidik ragam (Anava) diperoleh F (hitung)= 146,101 > F_{tabel} . Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian perlakuan memberikan pengaruh yang nyata diantara perlakuan terhadap jumlah sel pyramid yang mengalami kerusakan (nekrosis).

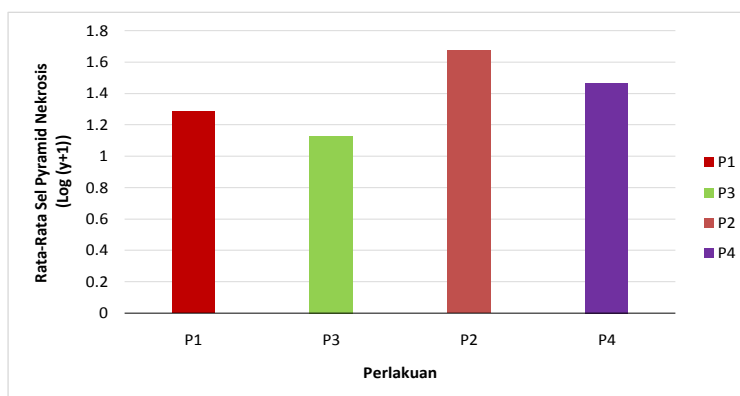
Tabel 1. Hasil rata-rata dan simpangan baku sel pyramid yang mengalami nekrosis.

Perlakuan	Sel Pyramid yang nekrosis ($\bar{X} \pm SD$)
P0	$0,1806^a \pm 0,164$
P1	$1,2880^c \pm 0,6962$
P2	$1,6736^e \pm 0,1027$
P3	$1,1313^b \pm 0,4916$
P4	$1,4670^d \pm 0,1097$

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata.

Gambar 2. Diagram batang perbandingan rata-rata sel pyramid yang mengalami kerusakan antara perlakuan P₀, P₁ dan P₂

Dari analisis statisitka yang dilakukan dapat diketahui pada perlakuan P₀ (kontrol), P₁ (pemberian metilmerkuri 0,02 mg/kg bb) dan P₂ (pemberian metilmerkuri 0,04 mg/kg bb), menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan. Hal ini menunjukkan peningkatan jumlah sel pyramid yang mengalami nekrosis seiring pemberian dosis metilmerkuri yang semakin meningkat.

Gambar 3. Diagram batang perbandingan rata-rata sel pyramid yang mengalami kerusakan antara perlakuan P₀, P₁ dan P₂

Pada perlakuan P₁ (pemberian metilmerkuri 0,02mg/kg bb) dan P₃ (pemberian metilmerkuri 0,02 mg/kg bb + CDP-Choline 100 mg/kg bb) menunjukkan perbedaan yang nyata. Pada perlakuan P₃ jumlah sel pyramid yang mengalami nekrosis lebih sedikit dibandingkan dengan P₁. Hal yang sama juga terjadi pada perlakuan P₂ (pemberian metilmerkuri 0,04 mg/kg bb) dan P₄ (pemberian metilmerkuri 0,04 mg/kg bb + CDP-Choline 100 mg/kg bb) yang memberikan perbedaan yang nyata terhadap jumlah sel pyramid yang mengalami nekrosis dengan jumlah sel pyramid yang nekrosis pada P₄ lebih sedikit dibandingkan P₂. Dari data ini membuktikan bahwa pemberian CDP-Choline 100 mg/kg bb mampu melindungi sel pyramid dari kerusakan sel (nekrosis) akibat keracunan metilmerkuri.

Pada perlakuan P₀ (kontrol), P₁ (metilmerkuri 0,02 mg/kg bb) dan P₂ (metilmerkuri 0,04 mg/kg bb) memperlihatkan hasil yang signifikan. Hal ini terlihat dari jumlah sel pyramid nekrosis mengalami peningkatan dengan bertambahnya dosis metilmerkuri yang diberikan. Menurut Waldichuk (1974) dalam Ulum (2005), tingkat toksisitas merkuri di dalam tubuh organisme tergantung pada banyaknya zat tersebut dalam tubuh, tempat masuknya zat serta jangka waktu kontak antara merkuri dengan organ yang rentan terhadap merkuri sehingga semakin seringnya kontak dengan merkuri dapat menyebabkan efek toksik yang semakin tinggi.

Beberapa jenis logam berat termasuk metil merkuri, menginduksi terjadinya apoptosis pada sel neuronal. Mekanisme yang memungkinkan untuk memicu kejadian tersebut termasuk adanya intake kalsium overload dan pembentukan Reactive Oxygen Spesies (ROS) oleh metilmerkuri. (Aschner and Aschner, 2007). Sel pyramid memiliki jumlah antioksidan glutathion dan metallothionein lebih rendah dibandingkan dengan sel astrosit, sehingga sel pyramid lebih peka terhadap peningkatan ROS (Aschner and Aschner, 2007). Metilmerkuri dapat menginduksi terbentuknya ROS. Reactive Spesies Oxygen (ROS) yang terbentuk akan mengakibatkan terjadinya peroksidasi lemak (Arif, 2005). Proses peroksidasi lemak ini akan membuat penurunan aktifitas pompa Natrium-Kalium, disregulasi volume sel, dan peningkatan kalsium secara intraseluler yang masif sehingga menyebabkan kematian sel (nekrosis). Peningkatan kalsium intraseluler dapat mengaktifkan beberapa enzim yang berperan dalam kematian sel seperti protease, fosfolipase, ATPase, dan endonuklease. Fosfolipase A akan diaktifasi oleh Ca²⁺ yang bebas. Fosfolipase yang aktif akan merusak fosfolipase yang normal pada membran mitokondrial bagian dalam serta pada membran sel lainnya. Kalsium juga mengaktifasi protease yang dapat mengakibatkan kerusakan cytoskeleton dan membran sel. Selain itu kalsium juga mengaktifasi Adenosintriphosphatase (ATPase) yang akan mempercepat penurunan ATP, serta endonuklease yang akan mengakibatkan degradasi kromatin (Gavin and Zachry, 2007).

Neuroprotektan CDP-Choline memiliki susunan yang terdiri dari atas ribosa, pyrophosphate, cytosine, dan choline. Ketika CDP-Choline diberikan secara per-oral, akan dihidrolisasi di usus halus dan akan diabsorpsi dalam bentuk choline dan cytidine. Setelah diabsorpsi choline dan cytidine akan didistribusikan ke seluruh tubuh dan dapat melewati sawar darah otak menuju sistem saraf pusat (Arenth *et al.*, 2011). CDP-Choline setelah melalui proses di dalam tubuh dapat menghasilkan phosphatidilcholin yang berfungsi untuk memperbaiki membran sel yang rusak akibat keracunan metilmerkuri. Peningkatan glutathion memiliki kontribusi terhadap neuroproteksi dari proses peroksidasi lipid. Choline yang dibebaskan dari CDP-Choline dapat dimetabolisme menjadi glutathion melalui AdoMet *pathway* (Adibhatla *et al.*, 2002). Glutathion memiliki peranan spesifik dalam melindungi tubuh dari keracunan

metilmerkuri. Glutathion secara spesifik berikatan dengan metil-merkuri membentuk sebuah kompleks yang mencegah merkuri dari ikatan protein selular lain yang dapat menyebabkan kerusakan enzim dan jaringan (Patrick, 2002). Ikatan spesifik dari glutathion dengan metilmerkuri dikarenakan glutathion merupakan senyawa thiol yang mengandung gugus sulfhydryl. Dengan meningkatnya kadar glutathion dalam sel pyramidal dapat mengikat metilmerkuri dan mengeluarkannya dari dalam tubuh.

Daftar Pustaka

- Adibhatla R.M, J.F. Hatcher and R.J. Dempsey. 2002. Citicoline:Neuro-protective Mechanism in Cerebral Ischemia. *J. Neurochem.* 80:12-23
- Arenth P.M, K.C. Russel, J.H. Ricker, R.D. Zafonte. 2011. CDP-Choline as Biological Supplement During Neurorecovery: A Focused Review. *Am. Acad. Phy. Med. and Rehab.* 3: S123-S131
- Arief, S. 2005. Radikal Bebas. [//www.pediatrik.com/buletin/06224113752-x0zu6l.pdf](http://www.pediatrik.com/buletin/06224113752-x0zu6l.pdf). [22 Februari 2012]
- Aschner J.L and M. Aschner. 2007. Methylmercury Neurotoxicity: Exploring Potential Novel Target. *J. Toxicol.* 1:1-9
- Baskaya MK, Dogan A, Rao AM, Dempsey RJ. 2000. Neuroprotective Effects of Citicoline on Brain Edema and Blood-Brain Barrier Breakdown After Traumatic Brain Injury. *J. Neurosurg.* 92: 448-52.
- Franco J.L, T. Posser, P.R Dunkley, P.W Dickson, J.J. Mattos, R. Martins, A.C.D. Baily, M.R. Marques, A.L. Dafre, M. Farina. 2009. Methylmercury Neurotoxicity is Associated with Inhibition of the Antioxidant Enzyme Glutathione peroxidase. *Free Rad. Biol. Med.* 47:449-457
- Gavin M.D.M and J.F. Zachry. 2007. *Pathologic Basic of Veterinary Medicine*. 4th Ed. Mosby Elsevier. USA.
- Kusriningrum R.S. 2010. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya
- National Research Council (2000). *Toxicological Effects of Methyl-mercury*. National Academy Press. Washington, D.C
- Paterson M and A.P. Talcott. 2006. *Small Animal Toxicology*. 2nd edition. Elsevier Saunders. United States of America
- Patrick, Lyn. 2002. Mercury Toxicity and Antioxidants: part I: Role of Glutathione and Alpha-lipoic Acid in the Treatment of Mercury Toxicity. *J. Altern. Med. Rev.* 7(6): 456-471
- Rahayu, Sri. 2002. Pengaruh Pemberian Merkuriklorida Terhadap Gam- baran Histopatologi Mencit (*Mus musculus*) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Secades, J.J. 2011. Citicoline:Pharmaco-logical and Clinical Review. *Rev. Neurol*; 52 (Suppl 2):S1-S62
- Setiawan B. dan E. Suhartono. 2007. Peroksidasi Lipid dan Penyakit Terkait Stres Oksidatif Pada Bayi Prematur. *Maj. Kedok. Indon.* 57 (1): 10-14
- Shanker G., T. Syversen, and M. Aschner. 2003. Astrocyte-Mediated Methyl-mercury Neurotoxicity. *J. Biol. Trac. Elem. Research.* 95:1-9

- Sugianto P, A. Machin, dan Auliani'am. 2011. Pemakaian Neuroprotektan Sebagai Terapi Keracunan Merkuri Dalam Memperbaiki Kerusakan Membran Sel Neuron dan Menurunkan Apoptosis Pada Sel Otak. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Ulum, R. 2005. Pengaruh Pemberian Merkuriklorida (HgCl_2) Terhadap Gambaran Histopatologi Otak Mencit (*Mus musculus*) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Waldichuk, M. 1974. Some Biological Concern In Metall Polution. Academic Press Lond