

# Pengaruh Pemberian Etanol Secara Kronik Terhadap Jumlah Sel Piramidal di Ca1 Hippocampus Tikus (*Rattus Norvegicus*) Remaja

Muh. Ihwan Narwanto<sup>1</sup>, Soedjono Aswin<sup>2</sup>, Mustofa<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

<sup>2</sup> Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

<sup>3</sup> Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

## ABSTRACT

Chronic ethanol administration may cause morphological changes in the hippocampus. The aim of this study is to investigate the changes of the number of pyramidal cell in CA1 hippocampus of adolescent rats after chronic ethanol administration.

The subjects of this study were 25 adolescent (30 days of age) male rats (*Rattus norvegicus*) divided into 5 groups : control without treatment (K1), control with treatment (K2), treatment 1 (P1), treatment 2 (P2) and treatment 3 (P3) group. Each group consist of 5 rats. K2 group were given physiological saline, P1, P2, and P3 group were given ethanol with doses 1 g/kg/day, 2 g/kg/day, and 3 g/kg/day respectively for 30 days by intraperitoneal injection. After 12 days free from ethanol, the rats were killed and the brains were removed to make paraffin block and Cresyl violet stain. The number of pyramidal cells of CA1 were counted per field of view at 400x magnification.

The results of this study showed that chronic ethanol administration at adolescent age caused morphological changes in hippocampus. The number of pyramidal cells of CA1 in each group: K1=55,03±2,87; K2=54,38±2,21; P1=49,98±2,16; P2=51,82±4,71; P3=46,28±3,29 (p<0,05). It is concluded that in rats, chronic ethanol administration at adolescent age caused decreasing number of pyramidal cells of CA1 hippocampus.

**Key words :** Ethanol, Pyramidal cell, Adolescence, *Rattus norvegicus*

## PENGANTAR

Etanol atau alkohol termasuk dalam kelompok NAPZA (narkotika, alkohol, psikotropika, dan zat adiktif lainnya). Diprediksi sekitar 1,5% dari seluruh populasi penduduk Indonesia merupakan penyalahgunaan NAPZA, dengan estimasi terakhir mencapai lima juta jiwa. Di Indonesia pengungkapan kasusnya meningkat rata-rata 28,9 % per tahun<sup>1</sup>.

Usia remaja merupakan usia bagi banyak orang mulai mencoba mengkonsumsi etanol. Usia remaja adalah saat terjadinya neuromaturasi, hal ini menyebabkan otak lebih rentan terhadap kerusakan akibat etanol dibanding dengan otak pada usia dewasa yang relatif stabil<sup>2,3</sup>.

Komplikasi fisik yang ditimbulkan setelah beberapa tahun mengkonsumsi etanol dapat mengenai sistem saraf pusat<sup>4</sup>. Perubahan morfologi, neuro-

fisiologis, dan biokimiawi pada sistem saraf pusat akan berakibat penurunan fungsi kognisi<sup>5</sup>. Salah satu kerusakan pada sistem saraf pusat akibat mengkonsumsi etanol ditandai dengan berkurangnya neuron-neuron di hippocampus<sup>6</sup>. Hippocampus (*cornu ammonis*) terlibat dalam pembentukan memori kerja bersama dengan komponen cortex prefrontalis. Informasi spasial dikonsolidasikan di hippocampus dan selanjutnya digunakan oleh cortex prefrontalis ketika dipakai untuk perencanaan respon mencari makan<sup>7,8,9,10</sup>. Bagian hippocampus yang menyokong terjadinya *long-term potentiation* (substrat biologi memori) adalah CA1, sedangkan jalur-jalur saraf yang mendukung terjadinya LTP diantaranya adalah kolateral Schaffer yang berasal dari CA3 menuju CA1<sup>11</sup>.

Kerusakan pada otak akibat mengkonsumsi etanol diduga disebabkan oleh efek langsung etanol terhadap jaringan saraf atau efek tidak langsung, yaitu melalui defisiensi vitamin B1<sup>12</sup>. Efek langsung etanol menyebabkan peningkatan fluiditas membran dan mengganggu reseptor membran, terutama terkait ion klorida dan kalsium yang menimbulkan respon eksitotoksik (neurotoksik), selanjutnya meningkatkan apoptosis<sup>13,14</sup>. Selain itu, diduga efek etanol juga dapat mengganggu neurogenesis<sup>12</sup>.

Karena alasan etika dan kesulitan teknik penelitian dalam mempelajari alkoholisme pada manusia, terutama masalah intoksikasi dan ketergantungan pada etanol, maka digunakan hewan sebagai model penelitian. Tikus sebagai hewan coba dirasa sangat berpotensi dalam menerangkan dasar neurobiologi akibat mengkonsumsi etanol dan menguatkan proses yang terjadi pada manusia<sup>15,16</sup>.

Penelitian ini bertujuan untuk mengungkapkan pengaruh pemberian etanol secara kronik terhadap jumlah sel piramidal di CA1 hippocampus tikus (*Rattus novergicus*) remaja.

## CARA PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus novergicus*) jantan remaja, berumur 30 hari<sup>17</sup>, galur Sprague-Dawley, berat badan 50-75 gram, diperoleh dari UPHP UGM sebanyak 25 ekor. Pakan tikus berupa pellet dan air minum diberikan setiap hari secara *ad libitum*. Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah etanol absolut, cairan fisiologis, dan bahan untuk pembuatan preparat histologis, dengan teknik blok parafin dengan pewarnaan Cresyl violet. Alat-alat yang digunakan adalah mikroskop cahaya, kamera digital, alat bedah minor, dan alat pembuatan sediaan histologis.

Rancangan penelitian ini adalah eksperimental sederhana *posttest-only-control group design*. Subjek dibagi menjadi lima kelompok dipilih secara random, yaitu kelompok kontrol tanpa perlakuan (K1), kelompok kontrol perlakuan (K2), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3) masing-masing sebanyak 5 ekor tikus. Selama 30 hari semua kelompok

perlakuan diberikan injeksi intraperitoneal etanol satu kali sehari dengan dosis masing-masing untuk kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 adalah 1, 2, dan 3 g/kgbb/hari. Kelompok kontrol perlakuan diberikan pelarut etanol (cairan fisiologis) secara intraperitoneal, sedang kelompok kontrol tanpa perlakuan tidak diberi perlakuan apapun.

Setelah pemberian etanol selesai, semua kelompok dibebaskan dari pemberian etanol selama 12 hari. Selanjutnya semua tikus dikorbankan dan diambil otaknya. Otak tikus dimasukkan dalam larutan formalin 10% selama 2 hari, selanjutnya dipotong bagian otak yang mengandung hippocampus yaitu ± 3,8 mm di posterior bregma<sup>18</sup>. Setelah itu dilakukan proses pembuatan preparat histologis dengan pewarnaan Cresyl violet dengan ketebalan irisan 4 µm, inti sel terwarnai biru-transparan, sedangkan substansia Nissl dan nucleolus berwarna ungu tua-biru. Setiap otak tikus dibuat 3 preparat, masing-masing preparat diamati dan dihitung jumlah sel piramidal dalam 10 lapang pandang. Jumlah sel piramidal dihitung berdasarkan terlihatnya inti sel<sup>19</sup>. Sediaan dilihat menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x, dan dinyatakan dalam jumlah rerata perlapang pandang.

Perbedaan jumlah sel piramidal antar kelima kelompok (skala rasio) diuji dengan ANAVA satu jalur dilanjutkan uji *post hoc* dengan Tukey HSD. Pengambilan keputusan adanya perbedaan bermakna jika nilai probabilitas  $p < 0,05$ .

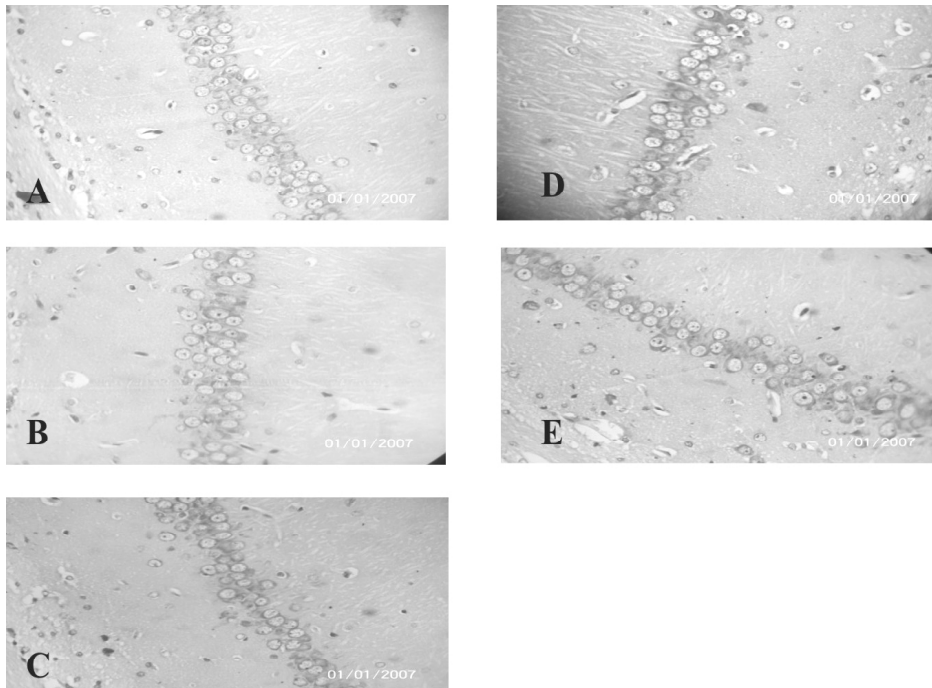
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

Setelah dilakukan perhitungan jumlah sel piramidal di CA1 hippocampus didapatkan hasil jumlah rerata sel per lapang pandang kelompok perlakuan lebih sedikit dibanding kelompok kontrol (Tabel 1 dan Gambar 1). Dengan uji ANAVA satu jalur di dapatkan hasil ada perbedaan bermakna dengan nilai F hitung 5,690 dan nilai signifikansi 0,003 ( $p < 0,05$ ), selanjutnya dilakukan uji *post hoc* dengan uji Tukey HSD didapatkan hasil bermakna antara kelompok kontrol (K1 dan K2) dengan kelompok P3 (Tabel 2).

Tabel 1. Jumlah sel piramidal /lapang pandang di CA1 hippocampus (rerata ± SD)

Jml sel / lap.pandang	Kelompok				
	K1	K2	P1	P2	P3
CA1	55,03 ± 2,87	54,38 ± 2,21	49,98 ± 2,16	51,82 ± 4,71	46,28 ± 3,92



**Gambar 1.** Sel piramidal CA1 hippocampus. Pewarnaan Cresyl violet, inti sel terlihat berwarna biru-transparan, pembesaran 400x, A : Kelompok K1, B : Kelompok K2, C : Kelompok P1, D : Kelompok P2, E : Kelompok P3.

**Tabel 2.** Ringkasan hasil uji *post hoc* Tukey HSD dari kelima kelompok

(I) kelompok	(J) kelompok	Sig.
K1	K2	,998
	P1	,156
	P2	,559
	P3	,004*
K2	K1	,998
	P1	,264
	P2	,745
	P3	,008*
P1	K1	,156
	K2	,264
	P2	,902
	P3	,423
P2	K1	,559
	K2	,745
	P1	,902
	P3	,102
P3	K1	,004*
	K2	,008*
	P1	,423
	P2	,102

\* Significant at the .05 level

## Pembahasan

Pada penelitian ini didapat hasil terdapat perbedaan bermakna jumlah sel piramidal di CA1 antara kelompok kontrol (K1 dan K2) dengan kelompok P3. Penelitian pada manusia dengan teknik *magnetic resonance image* (MRI) menunjukkan adanya pengurangan volume hippocampus pada remaja dengan penyalahgunaan etanol<sup>20</sup>. Hasil penelitian ini sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya, dengan hasil terdapat pengurangan jumlah sel piramidal di CA1 hippocampus sebanyak 5%-18% setelah pemberian etanol peroral selama 9 bulan diikuti 3 bulan *withdrawal*<sup>6</sup>. Hasil penelitian yang lain juga mengungkapkan adanya pengurangan jumlah sel granuler gyrus dentatus dan sel piramidal hippocampus sebanyak 20% setelah 5 bulan pemberian etanol peroral diikuti 2 bulan *withdrawal*<sup>1</sup>.

Mekanisme yang mendasari terjadinya kerusakan struktur otak akibat pengaruh etanol belum diketahui secara pasti, namun ada beberapa kemungkinan yang berusaha untuk menerangkan. Terdapat penelitian yang mengungkapkan adanya peningkatan bentuk protein karbonil (protein oksidatif) di hippocampus tikus neonatal setelah pemberian etanol peroral selama 3 hari<sup>22</sup>. Pemberian etanol secara akut pada tikus remaja menghambat neurogenesis terutama pada fase proliferasi sel neuroprogenitor<sup>23</sup>. Penelitian lain menyebutkan pemberian etanol pada tikus dewasa menurunkan neurogenesis melalui penghambatan proliferasi sel neuroprogenitor dan mengganggu ketahanan hidup sel tersebut<sup>24</sup>. Kematian sel piramidal anak tikus setelah terpapar etanol dalam kandungan induknya dan selama 18 hari *post natal* diduga melalui jalur apoptosis<sup>25</sup>. Peningkatan apoptosis kemungkinan besar melalui *mitochondrial pathway* (jalur intrinsik).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian etanol dengan dosis semakin tinggi secara kronik saat usia remaja menurunkan jumlah sel piramidal di CA1 hippocampus tikus.

## KEPUSTAKAAN

1. Djatmiko P. Berbagai Indikator Taraf Kesehatan Jiwa Masyarakat, [http://pdskijaya.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=110&itemid=1](http://pdskijaya.org/index.php?option=com_content&task=view&id=110&itemid=1), 7 Desember 2007.
2. Spear LP. The Adolescent Brain and The college Drinker : Biological Basis of Propensity to Use and Misuse Alcohol. *Journal of Studies on Alcohol*. 2002; 14: 71-81.

3. Zeigler DW, Wang CC, Yoast RA, Dickinson BD, McCaffree MA, Robinowitz CB. *et al* The Neurocognitive Effects of Alcohol on Adolescents and College Students. *Preventive Medicine*. 2005; 40: 23-32.
4. Ballinger A and Patchett S. Poisoning, Drug and alcohol Abuse. *Saunders Pocket Essentials of Clinical Medicine*. 4<sup>th</sup> edition. London: W.B. Saunders Company. 1995.
5. Mikolajczak P, Kozaryn Io, Nowaczyk M and Kaminska E. Ethanol Facilitation Short-Term Memory in Adult Rats with a Disturbed Circadian Cycle, *Alcohol & Alcoholism*. 2001; 36 (4): 292-97.
6. Lescaudron L and Verna A. Effects of Chronic Ethanol Consumption on Pyramidal Neurons of The Mouse Dorsal and Ventral Hippocampus : A Quantitative histological analysis. *Exp. Brain. Res*. 1985; 58: 362-67.
7. Burt AM. Limbic System, *Text Book of Neuroanatomy*, International edition, Philadelphia: WB Saunders Company 1993.
8. Kiernan JA. Limbic System Hippocampus and Amygdala, *Barr's The Human Nervous System An Anatomical View Point*. 7<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1998.
9. Martin JH. 1989. *The Limbic System, Neuroanatomy Text and Atlas*, 10<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier. 1989.
10. Seamans JK, Floresco SB and Phillips AG. D1 Receptor Modulation of Hippocampal-Prefrontal cortical circuits Integrating Spatial memory with Executive Function in The Rat, *J. Neurosci*. 1998;18 (4): 1613-21.
11. Lynch MA. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol. Rev*. 2004; 84: 87-126.
12. Anonim Alcohol's Damaging Effects on The Brain *Alcohol Allert*. 2000; 63: 1-7.26.
13. Ropper AH. and Brown RH. *Alcohol and Alcoholism & Dementia and The Amnesic Syndrome*, *Adam's and Victor's Principles of Neurology*. 8<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill Companies Inc. 2005.
14. Harper LK and Matsumoto. Ethanol and Brain Damage, *Current Opinion in Pharmacology*. 2005; 5: 73-78.
15. Tabakoff B. And Hoffman, P. *Animal Models in Alcohol Research*. *Alcohol Research & Health*. 2000; 24(2): 78-84.
16. Spanagel R. *Recent Animal Models of Alcoholism*. *Alcohol Research & Health*. 2000; 24 (2): 124-31.
17. Spear LP. *Alcohol's Effects on Adolescent*. *Alcohol Research & Health*. 2002; 26 (4): 287-91.
18. Paxinos G. and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2<sup>nd</sup> edition. San Diego: Academic Press inc. 1986.
19. Drury R A, Wallington E A, and Cameron SR. *The Nervous System, Carleton's Histological Technique*. 4<sup>th</sup> edition, London. 1976.
20. De Bellis, MD, Clark DB., Beers SR., Soloff PH, Boring AM, Hall J, et al. *Hippocampal Volume in Adolescent*

- Onset Alcohol Use Disorders. *American Journal of Psychiatry*. 2000; 157 (5); 737-44.
21. Walker DW, Barnes D E, Zornetzer SF, Hunter BE. and Kubanis P. Neuronal Loss in Hippocampus Induced by Prolonged Ethanol Consumption in Rats. *Science*. 1980; 209: 711-13.
  22. Marino DM, Aksenov MY and Kelly SJ. Vitamine E Protects Against Alcohol-induced Cell Loss and Oxidative Stress in Neonatal Rat Hippocampus. *Int. J. Devl. Neurosci*. 2004; 22: 363-77.
  23. Crews FT, Mdzinarishvili A, Kim D, He J. and Nixon, K. Neurogenesis in Adolescent Brain is Potently Inhibit by Ethanol. *Neuroscience*. 2006; 137: 437-45.
  24. Nixon K and Crews FT. Binge Ethanol Exposure Decreases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. *J. Neurochem*. 2002; 83:1087-93.
  25. Milotova M, Riljak V, Jandova K, Langmeier M, Maresova D, Pokorny J., et al. Alcohol Abuse in Mothers during Gravidity and Breastfeeding Brings Changes of Hippocampal Neurons in their Offspring. *Prague Medical Report*. 2006; 107(1): 103-7.