

**PENGARUH PEMBERIAN ECTASY
(METHYLENEDIOXYMETHAMPHETAMINE)
TERHADAP POLA KEMATIAN SEL SYARAF MENCIT
MUS MUSCULLUS SPECIES INVITRO**

*(The effects of ecstasy (methylenedioxyamphetamine) on the mus
musculus species neuronal death types invitro study)*



**Tesis
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**Gatot Suharto
G4A097002**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
MARET
2002**

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN ECSTACY (METHYLENEDIOXYMETHAMPHETAMINE) TERHADAP POLA KEMATIAN SEL SYARAF MENCIT MUS MUSCULLUS SPECIES INVITRO

(The effects of ecstasy (methylenedioxyamphetamine) on the mus musculus
species neuronal death types invitro study)

Disusun oleh :

Gatot Suharto
G4A097002

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji Tesis pada tanggal
20 Maret 2002
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui :
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama



Dr. dr. H.M. Rofiq Anwar, SpPA(K)
NIP. 130 368 077


Pembimbing Kedua



dr. H. Parno Widjojo, SpFK
NIP. 130 354 873



Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik,


Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K)
NIP. 130 352 549

PERNYATAAN

1. Tesis ini merupakan hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi atau lembaga tinggi lainnya.
2. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan akan dijelaskan sumbernya dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Mei 2005

GATOT SUHARTO

G4AO97002

UPT-PUSTAK-UNDIP	
No. Daft:	4302/T/MS/c ₁
Tgl.	1/6 06

BIO DATA PENULIS

Identitas :

Nama : dr. H. Gatot Suharto, SpF., M.Si Med., SH.
Tempat/tanggal lahir : Surakarta, 20 Februari 1952
Alamat Rumah : Jl. Taman Kelud Selatan No.12 Semarang
Pekerjaan : Staf Pengajar pada Fakultas Kedokteran UNDIP
Alamat Kantor : Bagian Ilmu Kedokteran Forensik FK UNDIP
Jl. Dr. Sutomo No.18 Semarang

Istri :

Nama : dr. Hj. Endang Hari Wisma Kertahati
Tempat/tanggal lahir : Magelang, 27 Februari 1956
Pekerjaan : Dokter (Kepala Puskesmas)

Anak :

1. Rizal Hari Magnadi (21 th)
2. Aulia Parvasani (17 th)

Riwayat Pendidikan :

1. Doktorandus Medicus (S1) Fakultas Kedokteran UNDIP, lulus tahun 1978.
2. Dokter Umum Fakultas Kedokteran UNDIP, lulus tahun 1982.
3. Dokter Spesialis Forensik (Sp.1) FK UNDIP lulus tahun 1990.
4. Magister Ilmu Biomedik (S2) Program Pasca Sarjana UNDIP lulus tahun 2002.

5. Sarjana Hukum (SI) Fakultas Hukum Universitas Tujuh Belas Agustus
Semarang, lulus tahun 2005.

Riwayat Pekerjaan / Profesi :

- Staf Pengajar pada Bagian Ilmu Kedokteran Forensik FK UNDIP tahun 1982 –
sekarang.
- Staf Pengajar pada Bagian Ilmu Kedokteran Forensik FK UNISSLA tahun 1990
– sekarang.
- Ketua Bagian Ilmu Kedokteran Forensik FK UNDIP tahun 2004 - sekarang
- Sekretaris Ikatan Dokter Indonesia Wilayah Jawa Tengah tahun 2003 –
sekarang.
- Sekretaris Majelis Tenaga Kesehatan Propinsi (MTKP) Jawa Tengah tahun 2004
– sekarang.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah S.W.T atas segala karunia-Nya sehingga tesis ini dapat kami selesaikan. Penghargaan dan ucapan terima kasih kami haturkan kepada :

1. Kedua pembimbing kami yaitu : Dr. dr. H.M. Rofiq Anwar, SpPA(K) dan dr. H. Parno Widjojo, SpFK yang telah memberikan bimbingan dan motivasi sejak persiapan proposal hingga penyelesaian tesis ini.
2. Nara sumber kami yaitu : Prof. Dr. dr. Soeharyo Hadisaputro, SpPD(K) yang telah memberikan banyak masukan yang sangat berharga dalam penyusunan dan perbaikan tesis ini.
3. Para penguji tesis yaitu : Dr. dr. Zainal Muttaqien, SpBS dan dr. Wahyu Rochadi, MSc yang telah memberikan penilaian kritis dan memberikan masukan yang sangat berharga dalam penyusunan dan perbaikan tesis ini.
4. Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K) selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan Sekretaris Program Studi Dr. dr. Edi Dharmana, M.Sc yang telah memberikan segala fasilitas dan kemudahan kepada kami dalam menempuh pendidikan S-2 pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
5. Rektor Universitas Diponegoro, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Ketua Bagian Ilmu Kedokteran Forensik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang telah memberi ijin dan kesempatan kepada kami untuk menempuh pendidikan S-2 pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
6. Staf Lembaga Riset Bioteknologi Fakultas Matematika dan ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) ITB yang telah membantu menyediakan hewan percobaan.
7. Ketua Unit Microbiology, Jabatan Patologi, Universiti Kebangsaan Malaysia yang telah memberikan berbagai kemudahan penggunaan fasilitas laboratorium dalam proses penelitian.
8. Beberapa perseorangan diantaranya : Tauhid Nur Azhar, S.Ked, M.Kes dan dr. Noor Wijayahadi, M.Kes, atas bantuan dan bimbingan teknis laboratorium, juga

kepada dr. Hadi yang telah membantu pencarian beberapa literatur yang bermanfaat.

9. Kepada Istri, dr. Endang Hari Wisma Kertahati dan kedua anak saya : Rizal Hari Magnadi dan Aulia Parvasani atas semua perhatian dan kasih sayangnya.
10. Semua staf pada Bagian Ilmu Kedokteran Forensik FK UNDIP atas segenap perhatian dan kerjasamanya.
11. Semua pihak yang telah membantu baik langsung maupun tidak langsung yang belum kami sebutkan satu persatu.

Teriring do'a yang tulus semoga menjadi amal yang baik dan mendapat balasan berlipat ganda dari Allah S.W.T.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis ini ipasti tidak luput dari adanya kekurangan dan kelemahan, oleh karena itu dengan tangan terbuka kami menerima kritik dan saran yang sifatnya membangun.

Akhir kata penulis berharap tesis ini akan memberi manfaat, utamanya bagi diri penulis dan pengembangan ilmu secara lebih luas.

Semarang, Mei 2005

Penyusun,

Gatot Suharto

DAFTAR ISI

	halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan	iii
Bio Data Penulis	iv
Kata Pengantar	vi
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	xi
Daftar Gambar	xii
Daftar Grafik	xiii
Abstract	xiv
Abstrak	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.3.1 Tujuan Umum	2
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Perbedaan apoptosis dan nekrosis	4
2.1.1 Perubahan morfologi apoptosis	5
2.1.2 Metode identifikasi apoptosis	6

2.1.3 Mekanisme apoptosis pada sel	7
2.1.3.1 Fase pengambilan keputusan	9
2.1.3.2 Fase eksekusi	10
2.2 Relevansi klinik apoptosis pada system syaraf	11
2.3 Amphetamin dan turunannya	12
2.4 Pengaruh MDMA pada sel syaraf	14
BAB III KERANGKA TEORI, KERRANGKA KONSEP DAN	
HIPOTESIS	16
3.1 Kerangka teori	17
3.2 Kerangka konsep	17
3.3 Hipotesis	18
3.3.1 Hipotesis mayor	18
3.3.2 Hipotesis minor	18
BAB IV METODE PENELITIAN	19
4.1 Rancangan Penelitian	19
4.2 Rencana Perlakuan	19
4.3 Populasi, sampel dan besar sampel	20
4.3.1 Populasi Penelitian	20
4.3.2 Sampel Penelitian	20
4.3.3 Besar Sampel	21
4.4 Variabel Penelitian	21
4.4.1 Variabel bebas	21
4.4.2 Variabel tergantung	21
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	21

4.6	Prosedur perlakuan dan pengambilan data	22
4.6.1	Prosedur perlakuan	22
4.6.2	Prosedur pengambilan data	23
4.7	Prosedur analisis data	23
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		25
5.1	Hasil penelitian	25
5.1.1	Pertumbuhan sel syaraf invitro	25
5.1.2	Uji viabilitas dan penentuan pola kematian sel syaraf	26
5.1.3	Hubungan antara dosis MDMA dengan persentase apoptosis	27
5.1.4	Hubungan lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase apoptosis	28
5.1.5	Hubungan antara dosis MDMA dengan persentase nekrosis	29
5.1.6	Hubungan lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase nekrosis	31
5.1.7	Analisis regresi hubungan antara berbagai variable penelitian	32
5.2	Pembahasan	34
5.3	Kelemahan penelitian	36
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN		37
6.1	Simpulan	37
6.2	Saran	38
DAFTAR PUSTAKA		39
LAMPIRAN		

DAFTAR GAMBAR

No.	Gambar	Halaman
1.	Gambar 5.1 Kultur sel syaraf umur 9 hari invitro. Mikroskop fase kontras dengan pembesaran 400X	23

DAFTAR GRAFIK

No.	Grafik	Halaman
1.	Grafik Box Plot 5.1 Hubungan antara dosis MDMA dengan peningkatan persentase apoptosis sel syaraf invitro.	27
2.	Grafik Bax Plot 5.2 Hubungan antara lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase apoptosis sel syaraf invitro.	29
3.	Grafik Box Plot 5.3 Hubungan antara dosis MDMA dengan peningkatan persentase nekrosis sel syaraf invitro.	30
4.	Grafik Box Plot 5.4 Hubungan antara lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase nekrosis sel syaraf invitro.	32

ABSTRACT

Background : 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") is a derivative of amphetamine that has become extensively used as a recreational drug. Although MDMA has been popularly considered as a safe drug, there are increasing evidences of its toxicity. MDMA is neurotoxic for serotonergic and dopaminergic neurons and produces a decrease of 5-HT transporters. Other side-effects of MDMA are hyperthermia, rhabdomyolysis and cardiac dysrhythmias. Recent publication data shows that the neurotoxic effects of MDMA is increasing by the degree of an animal model. Neuron to be affected will undergoing degeneration and finally to be death. When the cell is exposed to physical, biochemical or biological injury, or deprived of necessary substances, it activates a series of stress-response genes. With minimal insults, the cell may recover. With greater insults, single cell death, or apoptosis, results; the cell dies and is recycled to its neighbours. If the insult overwhelms a large number of cells then necrosis ensues, with an accompanying inflammatory response. Otherwise, there was lack of publication data according to the effects of MDMA neurotoxicity, especially types of neuronal cell death in vitro study.

Objective : To establish effects of MDMA dose and time duration according to apoptosis and necrosis of the nerve cell in vitro study.

Method : The Study using *Simple Randomize Subject Design*. Tissue culture was done according to the common method. MDMA treatment was conducting to the optimized culture (cell count 10^6 /ml). Control group only get Nacl 0,9%. Group I under 0,250 mg of MDMA. Group II under 0,500 mg of MDMA. Group III under 0,750 mg of MDMA. Group IV under 1,000 mg of MDMA. Group V under 1,250 mg of MDMA. Dual

staining with Acridine Orange (AO) dan Propidium Iodide (PI) were done to differentiated of apoptosis and necrosis cells. We were conducting examination in four time series (i.e 4 hours, 12 hours, 24 hours, and 48 hours). Mean difference among the group were calculated using one-way anova. To determined power and direction of the independence variable (dose and time duration of MDMA exposure) influences the dependence variable (percentage apoptosis or necrosis of the cell) using linear regression analysis. Data analysis was conducted using SPSS version 11.01 for Widows under 0,05 significance level.

Result : There were significant difference of the mean percentage of apoptotic cells among the groups of MDMA dose.($p=0,004$) The increasing dose of MDMA is correlated to the increasing percentage of apoptotic nerve cells in vitro study.($r=0,339$) There were significant difference of the mean percentage of apoptotic cells among the groups of duration time of MDMA exposure.($p=0,000$) The increasing duration time of MDMA exposure is correlated to the increasing percentage of apoptotic nerve cells in vitro study.($r=0,710$) There were significant difference of the mean percentage of necrotic cells among the groups of MDMA dose.($p=0,005$) The increasing dose of MDMA is correlated to the increasing percentage of necrotic nerve cells in vitro study.($r=0,329$) There were significant difference of the mean percentage of necrotic cells among the groups of duration time of MDMA exposure.($p=0,000$) The increasing duration time of MDMA exposure is correlated to the increasing percentage of necrotic nerve cells in vitro study.($r=0,769$)

Conclusion : Statistically, there were correlation between dose and time durations of MDMA exposure to the percentage of apoptotic and necrotic nerve cell invitro study.

Key words : Ecstasy (MDMA), Dose, Duration Time of Exposure, Apoptosis, Necrosis.

ABSTRAK

Latar Belakang : Penyalahgunaan Ecstasy atau Methylendioxyamfetamine (MDMA) cenderung meningkat walaupun telah didapatkan cukup bukti adanya pengaruh buruk terhadap berbagai organ (jantung, hati, ginjal, dan otak). Telah banyak publikasi tentang sifat neurotoksisitas MDMA yang dilakukan pada berbagai hewan percobaan. Makin tinggi derajat hewan percobaan sifat neurotoksikinya makin tinggi. Sifat neurotoksik MDMA terutama terhadap syaraf serotonergik dan dopaminergik. Neuron yang terkena akan mengalami degenerasi dan berakhir dengan kematian. Secara umum kematian sel terjadi melalui nekrosis atau apoptosis. Belum banyak penelitian yang dilakukan untuk membuktikan kejadian apoptosis atau nekrosis sel syaraf akibat pengaruh ecstasy. Penelitian ini dilakukan invitro dengan alasan agar dapat mengendalikan factor-faktor pengganggu sehingga diharapkan efek yang timbul benar-benar hanya disebabkan pengaruh pemaparan MDMA.

Tujuan Penelitian : Membuktikan adanya pengaruh dosis dan lama waktu pemaparan MDMA terhadap apoptosis dan nekrosis sel syaraf invitro.

Metode Penelitian : Penelitian dilakukan secara invitro dengan menumbuhkan sel syaraf pada suatu tabung (flask). Setelah kultur mencapai tingkat pertumbuhan yang optimun selanjutnya diberi perlakuan dengan pemberian MDMA dengan dosis tertentu sesuai dengan kelompok penelitian. Kelompok kontrol hanya mendapatkan cairan fisiologis, Kelompok I mendapatkan dosis 0,250 mg, Kelompok II mendapatkan dosis 0,500 mg, Kelompok III mendapatkan 0,750 mg, Kelompok IV mendapatkan 1,000 mg, dan Kelompok V mendapatkan 1,025 mg. Pemeriksaan adanya apoptosis dan nekrosis dilakukan dengan pengecatan *dual staining* dengan Acridine Orange (AO) dan

Propidium Iodide (PI). Pemeriksaan pada masing-masing kelompok dilakukan sebanyak 4 kali yaitu pada jam ke-6, 12, 24 dan 48. Untuk mengetahui perbedaan rerata variable tergantung (persentase sel apoptosis atau persentase sel nekrosis) pada masing-masing kelompok dilakukan dengan uji statistik analisis varian satu arah (one-way anova). Untuk mengetahui kekuatan dan arah hubungan antara variable tergantung (persentase sel apoptosis atau persentase sel nekrosis) dengan variable bebas (dosis dan lama waktu pemaparan MDMA) dilakukan dengan analisis regresi linear. Analisis data dilakukan dengan program SPSS 11.01 for Window's. Batas signifikansi $\alpha=0,05$.

Hasil Penelitian : Terdapat perbedaan bermakna rerata persentase apoptosis sel syaraf pada berbagai kelompok dosis MDMA.($p=0,004$) Peningkatan dosis MDMA meningkatkan persentase apoptosis sel syaraf invitro. ($r=0,339$) Terdapat perbedaan bermakna rerata persentase apoptosis sel syaraf pada berbagai kelompok lama waktu pemaparan MDMA.($p=0,000$) Peningkatan lama waktu pemaparan MDMA meningkatkan persentase apoptosis sel syaraf invitro. ($r=0,710$) Terdapat perbedaan bermakna rerata persentase nekrosis sel syaraf pada berbagai kelompok dosis MDMA. ($p=0,005$) Peningkatan dosis MDMA meningkatkan persentase nekrosis sel syaraf invitro.($r=0,329$) Terdapat perbedaan bermakna rerata persentase nekrosis sel syaraf pada berbagai kelompok lama waktu pemaparan MDMA.($p=0,000$) Peningkatan lama waktu pemaparan MDMA meningkatkan persentase nekrosis sel syaraf invitro. ($r=0,769$).

Simpulan : Secara statistik terdapat hubungan antara dosis dan lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase apoptosis maupun nekrosis sel syaraf invitro.

Kata Kunci : Ecstasy (MDMA), Dosis, Lama Waktu Pemaparan, Apoptosis, Nekrosis.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penyalahgunaan obat, seperti opiate (morfin, heroin atau psikostimulan (cocain dan MDMA, biasa disebut "ecstasy") mempunyai implikasi besar dalam bidang kesehatan dan sosial kemasyarakatan. Penyalahgunaan 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") terus meningkat walaupun terdapat berbagai peraturan yang membatasi penggunaan senyawa tersebut. Juga telah didapatkan adanya bukti bahwa MDMA bersifat neurotoksik terhadap sel syaraf serotonergik dan dopaminergik pada hewan percobaan⁽¹⁾ Penyalahgunaan NAZA di Indonesia mulai mendapat perhatian sekitar tahun 1969. Pada saat itu NAZA yang sering disalahgunakan terbatas pada jenis opiate (morphine), ganja, psikotropika dan alcohol. Pada kurun waktu tahun 1969-1973 yang banyak disalahgunakan adalah morphine dan ganja. Penyalahgunaan amphetamine dan turunannya mulai merebak pada tahun 1990. Pemerintah menyebutkan angka resmi penyalahgunaan NAZA 0,0065% dari 200 juta jumlah penduduk atau sama dengan 130.000 orang⁽²⁾. Ecstasy (MDMA) banyak digunakan karena fungsinya sebagai halusinogen yang dapat menimbulkan perasaan bahagia berlebihan (*euforia*), dan juga dapat meningkatkan energi sehingga pengguna tidak cepat merasa lelah walaupun telah beraktifitas dalam waktu yang lama. Efek samping lain dari MDMA adalah hipertermia, *rhadomyolisis* dan aritmia jantung.⁽⁴⁾

Secara teoritis terdapat dua jenis kematian sel yaitu nekrosis dan apoptosis. Nekrosis terjadi apabila sel tubuh tidak mampu beradaptasi dengan jejas (misalnya : jejas terlalu besar, dalam waktu yang sangat singkat atau terlampau banyak

sel yang terkena jejas). Apoptosis terjadi pada keadaan yang sebaliknya walaupun pada akhirnya sel mengalami kematian namun sel masih sempat beradaptasi dengan jejas yang dialaminya dan mengaktifkan mekanisme kematian sel yang terprogram "*Programme cell death*". Secara genetic apoptosis diatur oleh 2 macam gen yaitu Bcl-2 dan p53. Bcl-2 ditemukan pada mitochondrial membrane dan reticulum endoplasma yang berperan mengatur chanel kalsium. Protein mirip Bcl-2 dan Bcl-xL berfungsi mencegah apoptosis, sedangkan Bcl-2 terkait x protein (Bax) seperti Bax, Bad, Bak dan Bcl-xS berfungsi memicu apoptosis.⁽⁵⁾

Dalam penelitian ini akan dibuktikan pengaruh MDMA terhadap pola kematian sel syaraf secara invitro. Metode invitro dipilih dengan pertimbangan untuk mengendalikan faktor-faktor pengganggu. MDMA yang diberikan berupa pil Ecstasy yang bersumber dari hasil sitaan (barang bukti) pihak Kepolisian Kota Besar Semarang dengan alasan bahwa sediaan MDMA tersebut yang sering disalahgunakan.

1.2 Perumusan Masalah

Dari latar belakang masalah yang dikemukakan di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

Apakah terdapat hubungan antara dosis dan lama waktu pemaparan MDMA terhadap terjadinya kematian apoptosis dan nekrosis sel syaraf secara invitro?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum :

Mengetahui pengaruh pemaparan MDMA terhadap pola kematian sel syaraf secara invitro.

1.3.2 Tujuan khusus :

1. Membuktikan hubungan antar dosis MDMA dengan persentase apoptosis sel syaraf invitro..
2. Membuktikan hubungan lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase apoptosis sel syaraf invitro..
3. Membuktikan hubungan dosis MDMA dengan persentase nekrosis sel syaraf invitro.
4. Membuktikan hubungan lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase nekrosis sel syaraf invitro.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Memperoleh data pengaruh MDMA terhadap pola kematian sel syaraf secara invitro.
2. Memberikan informasi pengaruh buruk MDMA terhadap sel syaraf.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Perbedaan Apoptosis dan Nekrosis

Kematian sel yang terjadi secara terprogram disebut dengan apoptosis keadaan sebaliknya disebut dengan nekrosis.⁽⁶⁾ Apoptosis merupakan peristiwa bunuh diri sel, yang mekanismenya diatur dalam kromosom sel berinti. Secara fisiologis proses matinya sel dengan tujuan menghilangkan sel-sel yang tidak diinginkan, berperan penting dalam homeostasis jaringan dan pertahanan terhadap infeksi virus maupun jejas genetik kearah mutasi. Apoptosis diatur oleh sistem signal molekuler yang sangat kompleks. Proses apoptosis membutuhkan energi untuk memecah sel menjadi fragmen molekul tertentu, Asam Deoksiribu Nukleat (DNA), lipid dan makromolekul lain, selanjutnya bagiab-bagian tersebut dikemas dalam vesikel-vesikel untuk difagosit atau didaur ulang sel sekitarnya. Sel yang mengalami apoptosis akan mati dan menghilang tanpa mengganggu ketenangan sel disekitarnya.⁽⁷⁾ Sebaliknya sel yang mengalami nekrosis ditandai dengan inflamasi dan kerusakan yang luas. Apoptosis memegang peranan penting dalam patogenesis beberapa penyakit apabila gen yang mengatur proses apoptosis tertekan, berlebihan atau mengalami mutasi.^(8,9)

Karakteristik apoptosis adalah *energy-dependent*, berlangsung secara serentak, dikontrol secara genetic berlaku pada sel tunggal yang tidak diperlukan lagi akan mengalami penghancuran sendiri ketika gen apoptosis diaktifkan.^(10,11) Ringkasnya, sel mengkerut dan melepaskan diri dari sel sekitarnya dan kemudian inti selnya rusak. Terjadi kondensasi fragmen inti dan organella dan selanjutnya dikemas dalam vesikel terbungkus membrane, dikeluarkan dari dalam sel selanjutnya diserap oleh sel-sel

sekitarnya. Integritas membran tetap terjaga dan hanya rusak pada tahap apoptosis lanjut. Tidak adanya inflamasi membedakan apoptosis dari nekrosis. Secara ringkas perbedaan apoptosis dan nekrosis disajikan dalam tabel.1

Tabel 1. Perbedaan nekrosis dengan apoptosis

	Nekrosis	Apoptosis
Stimuli	Hipoksia, kimiawi	Fisiologis maupun patologis
Histologi	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sekelompok sel, jaringan atau organ ▪ Sel membengkak ▪ Kerusakan organella 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sel tunggal ▪ Kondensasi kromatin ▪ Badan apoptotic
Kerusakan DNA	Random, difuse	Internucleosomal
Mekanisme	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kekurangan ATP ▪ Cidera membran sel ▪ Kerusakan akibat radikal bebas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aktifasi gen ▪ Aktivasi enzim endonuklease ▪ Aktivasi enzim protease
Reaksi jaringan	Inflamasi	Tidak ada inflamasi Proses fagositosis

Kematian sel akibat iskemia atau jejas fisik ditandai dengan pembengkakan sel atau onkosis (dari bahas yunani kata onkos, artinya pembengkakan), sehingga terjadi pembengkakan inti dan hancurnya inti *karyolisis*. Pada onkosis selalu disertai dengan inflamasi. Kadang-kadang antara apoptosis dan onkosis/nekrosis terletak dalam spektrum yang tumpang tindih (*overlapping*).⁽¹²⁾ Sel yang terpapar stimulus yang kuat, seperti iskemia atau toksin menyebabkan terjadinya apoptosis dan onkosis.⁽¹³⁾

2.1.1 Perubahan morfologi Apoptosis

Perubahan morfologi apoptosis dibagi dalam 3 fase yaitu : Fase 1 : Sel terangkat dari tempatnya menempel (stratum dan sel sekitarnya) sebagai akibat hilangnya mikrovili dan *junctional complex* atau desmosom.⁽¹⁴⁾ DNA mengalami digesti oleh endonuklease spesifik menjadi fragmen-fragmen dan selanjutnya dikemas dalam

vesikel. Perubahan pada DNA meliputi pemutusan rantai ganda (*karyoreksis*) dan kondensasi kromatin inti (*pyknosis*). Kromatin yang piknotik dibawah mikroskop cahaya tampak seperti gambaran bulan sabit *crescent-shaped 'caps'*. Retikulum endoplasma membengkak dan mengeluarkan seluruh isinya. Sel tampak lebih transparan akibat sitoplasma mengkerut dan mengalami involusi. Fase ke-2 : Sel tampak menghasilkan kaki semu (*pseudopodia*) atau mirip tunas yang mengandung organelle atau fragmen inti dan selanjutnya lepas membentuk banyak vesikel terbungkus membrane. Sel yang tersisa menjadi berbentuk bulat, tetap terbungkus membrane halus, selanjutnya disebut *apoptotic bodies*.^(8,9) Fase ke-3 : Membran sel menjadi permeable terhadap zat pewarna seperti *Tryphan Blue*. Badan apoptotic dan tunas-tunas terbungkus membrane selanjutnya difagosit oleh makrofag, sel epitel, endotel vaskuler atau sel tumor. Keseluruhan proses tersebut memakan waktu sekitar 15 menit, sehingga mungkin tidak terdeteksi pada sediaan histology jaringan.^(11,12)

Sebaliknya, onkosis ditandai dengan pembengkakan sel dan pembengkakan organelle dengan diakhiri kerusakan dan fragmentasi inti oleh enzim lisosomal. Pembengkakan terjadi karena kurangnya produksi ATP, menyebabkan kegagalan pompa ion pada membrane sehingga permeabilitas membrane meningkat. Selanjutnya terjadi gelembung (blebs) (*blister-like, fluid-filled structures*) pada membrane plasma yang sangat mudah pecah.⁽¹²⁾ Netrofil dan makrofag menginvasi sekitar jaringan, menyebabkan peradangan hebat.

2.1.2 Metode Identifikasi Apoptosis

Beberapa metode identifikasi perubahan morfologi apoptosis sel diantaranya adalah pengecatan inti dengan Hoechst 33258 untuk memperlihatkan adanya clumping

kromatin inti. Dengan alat video mikroskopik mampu merekam sekuens tertentu yang membutuhkan waktu selama 15-60 menit hingga 24 jam.⁽¹¹⁾ Pengecatan dengan *Acridine Orange* (AO) mampu melihat clumping kromatin inti dibawah mikroskop fluoresens segera setelah pengecatan. Metode yang lebih baik diantaranya comet assay, yang mampu memperlihatkan degradasi DNA.⁽⁷⁾ Cara identifikasi yang lebih akurat untuk menunjukkan apoptosis dicapai dengan metode yang secara spesifik mencirikan adanya pemotongan untaian DNA (DNA cleavages).⁽¹⁵⁾ Adanya apoptosis juga dapat ditunjukkan dengan formasi *DNA ladder* pada elektroforesis gel agarose terhadap fragmen DNA hasil ekstraksi. DNA pendek hasil degradasi dapat membebtuk formasi 'rosettes'.⁽⁹⁾ Sedang sel yang nekrotik tidak menunjukkan pola tertentu.⁽⁸⁾ Metode yang paling akurat adalah untuk identifikasi apoptosis secara kualitatif dan kuantitatif adalah dengan flow sitometri dengan pengecatan pada *Terminal transferase deoxyuridine nick-end labelling* (TUNEL) pada pemutusan untaian DNA yang melabel residu uridin pada fragmen DNA inti. Metode TUNEL dapat dikerjakan pada sediaan histopatologi jaringan atau pada kultur jaringan.⁽¹⁶⁾

2.1.3 Mekanisme kematian sel

Setelah sel mendapatkan stimulus apoptosis maka tahap pertama yang terjadi adalah '*decision phase*' yang dikontrol secara genetik. Selanjutnya diikuti tahap '*execution*' yang berpengaruh terhadap perubahan morfologi selama apoptosis berlangsung.

Secara garis besar terdapat 4 kelompok stimulus apoptosis.⁽¹⁷⁻²⁰⁾ Berbagai kondisi fisiologis maupun patologis yang dapat merangsang terjadinya apoptosis, secara ringkas tercantum dalam tabel 2. Kelompok pertama yaitu kerusakan DNA akibat

radiasi pengion atau obat antikanker golongan alkylating agent. Kelompok kedua induksi apoptosis melalui mekanisme reseptor, yang mana reseptor diaktifkan oleh hormone glukokortikoid (terjadi pada thymus). TNF- α , penurunan madaad factor pertumbuhan (*Nerve growth factor* dan IL-3).⁽¹⁶⁻¹⁷⁾ Kelompok ketiga terdiri dari substansi biokimia yang memperkuat jalur komponen apoptosis meliputi phosphatase dan kinase inhibitor (misal calphostin C, staurosporine). Kelompok keempat terdiri dari agent yang secara langsung menyebabkan kerusakan membrane yang meliputi panas, sinar ultra violet dan agent oksidatif (superoxide anion, hydrogen peroxide). Apabila dalam jumlah yang berlebihan *reactive oxygen species* (ROS) seperti superoxide, hydrogen peroxide and the hydroxyl radicals dapat menyebabkan kerusakan membran lipid, protein, asam nukleat dan glikosaminoglikan. Keadaan tersebut menghasilkan nekrosis. Cedera pada membrane sel menginduksi apoptosis dengan aktivasi enzim acid sphingomyelinase yang menghasilkan *second messenger* ceramide dari membrane lipid.^(18,19)

Table 2 Berbagai stimulus terjadinya apoptosis

<i>DNA (genome) damage</i>	<i>Ionising radiation</i> <i>Anti-cancer drugs (e.g. alkylating agents)</i>
<i>Activation of death receptors</i>	<i>Binding of 'death receptors' (e.g. Fas receptor, TNF receptor)</i> <i>Withdrawal of growth factors (e.g. nerve growth factor, IL-3)</i>
<i>Stimulation of apoptotic pathway</i>	<i>Phosphatases, kinase inhibitors</i>
<i>Direct physical cell damage</i>	<i>Heat, ultraviolet light, oxygen free radicals, hydrogen peroxide</i>

DNA, *deoxyribonucleic acid*; TNF, *tumour necrosis factor*; IL-3, *interleukin-3*.

Sinyal yang memulai apoptosis mungkin dihasilkan dari adanya ikatan reseptor pada permukaan membrane *'death' receptor* atau dari kerusakan genom. *Death receptor*

yang menginisiasi apoptosis meliputi Fas reseptor dan TNF reseptor. Fas reseptor dulunya dikenal sebagai CD95 or APO-1, yang merupakan Death receptor glikoprotein yang aktif bila berikatan dengan Fas ligand (Fas-L) pada permukaan membrane. didalam sel dihasilkan molekul yang dinamakan *Fas associated death domain* (FADD). Reseptor Fas dijumpai pada jaringan epitel, sel tumor, jaringan hemopoietik dan mungkin dapat diinduksi pada jaringan yang lain. Jalur Fas memegang peranan penting dalam pengaturan respon imun. Sel T sitotoksik mengekspresikan Fas ligand yang mengaktifkan sel-sel yang mempunyai reseptor Fas untuk menginduksi apoptosis.⁽¹⁶⁾

Sistem reseptor TNF memfasilitasi berbagai jalur biokimiawi.^(16,17) Telah ditemukan adanya *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). Sel kanker cenderung melakukan apoptosis dengan induksi TRAIL. Setelah berikatan dengan reseptor TNF di dalam sel terbentuk molekul yang disebut '*death domains*'. Telah ditemukan adanya *TNF receptor associated death domain* (TRADD). TNF mungkin menghambat apoptosis dengan cara berikatan dengan reseptor TNFR2, yang mengaktifasi suatu protein yang dinamakan *Nuclear Factor kB* (NF-kB) yang diklasifikasikan sebagai inhibitor of apoptosis protein (IAP) yang berfungsi mencegah dijalankannya tahap-tahap apoptosis. TNF merupakan protein yang mudah berikatan dengan DNA yang berfungsi mengatur berbagai gen untuk menghasilkan sitokin dan molekul pro-inflamatori yang lain.⁽¹⁸⁾

2.1.3.1 Fase Pengambilan Keputusan

Secara genetik apoptosis diatur oleh 2 macam gen yaitu Bcl-2 dan p53. Bcl-2 ditemukan pada membrane mitokondria dan retikulum endoplasma^(21,22) mungkin berperan mengatur channel kalsium. Protein mirip Bcl-2 dan Bcl-xL berfungsi mencegah

apoptosis, sedangkan Bcl-2 terkait x protein (Bax) seperti Bax, Bad, Bak dan Bcl-xS berfungsi memicu apoptosis.^(23,24) Gen p53 merupakan phospho-protein inti dengan berat molekul 53-kDa yang apabila berikatan dengan DNA berakut sebagai factor transkripsi, mengatur proliferasi sel dan perbaikan DNA (DNA repair).⁽²¹⁾ Mutasi gen p53 dijumpai pada 50% kanker (misal : kanker kolon) dan berhubungan dengan resistensi terhadap pengobatan.⁽²²⁾ Gen c-myc merupakan proto-oncogen yang mengkode sequence-specific DNA-binding protein yang berlaku sebagai factor transkripsi dan menginduksi apoptosis bila ada p53.

2.1.3.2 Fase eksekusi

Proses kejadian utama dalam apoptosis adalah proteolisis dan inaktivasi mitokondria. Kerusakan intraseluler terjadi akibat aktivasi golongan cysteine protease yang disebut caspase (CASP).⁽²³⁻²⁵⁾ Caspases merupakan proenzim yang memiliki kemiripan antara yang terdapat dalam nematode dan manusia. Telah diidentifikasi 10 jenis Caspases pada manusia (CASP 1-10). Penelitian apoptosis tingkat molekuler semula dipelajari pada nematode *C.elegans*. Gen yang berperan dalam eksekusi apoptosis disebut ced-3. Terdapat 2 subfamili enzim caspases yaitu subfamily ced-3 (dihasilkan oleh gen ced-3) dan subfamily ICE (*IL-1 β -converting enzyme*).^(26,27) Caspases 1, yang berkaitan dengan ICE, terutama berperan dalam inflamasi.^(26,27) Caspase ced-3 berperan penting dalam efektor apoptosis. Caspase 8 atau *FADD-like interleukin converting enzyme* (FLICE) merupakan enzim yang paling penting diantara subfamily ced-3.⁽²⁷⁾ Aksi enzim caspase bervariasi, beberapa diantaranya sebagai endonuklease yang memotong DNA, ada yang memotong cytoskeletal proteins dan yang lain menyebabkan hilangnya adhesi sel. Integritas membrane tetap terjaga

sehingga tidak ada kebocoran enzim lisosomal yang membahayakan sel sekitarnya atau mencetuskan respon imun.⁽²⁸⁾ Sel yang mengalami apoptosis mengekspresikan sinyal pada membrane yang mengundang fagositosis.⁽²⁹⁾

2.1.4 Relevansi klinik apoptosis pada system syaraf

Pada masa pertumbuhan organisme, terdapat bentuk khusus dari kematian sel yang biasanya dikenal sebagai apoptosis kini disebut sebagai *programmed cell death* (PCD).⁽³⁰⁾ Selama perkembangan embriogenik system syaraf apabila terjadi kelebihan neuron maka PCD akan mengeliminasi neuron yang mempunyai akson gagal mencapai target. Hal itu terjadi dengan penurunan mendadak substansi pertumbuhan seperti *nerve growth factor*, atau hilangnya kontak simpatik dengan input aferens. Sitokin (misal TNF-a) dan ROS mungkin berperan sebagai trigger PCD.⁽³¹⁾

Oksidatif stress, glutamate excitotoxicity dan calcium influx dapat menginduksi apoptosis pada syaraf matur. Produksi berlebihan ROS menyebabkan '*oxidative Stress*', merusak lipid membrane, protein, asam nukleat dan ekstraselular matrix glycosaminoglycans. Kadar rendah ROS atau penurunan kadar antioksidan (misal : superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase) akan menyebabkan apoptosis. Kadar berlebihan ROS menyebabkan kerusakan lebih besar dan berakibat nekrosis.⁽³⁰⁾ Glutamat juga dapat menyebabkan apoptosis pada sel syaraf.⁽³²⁾ Kalsium merupakan second messenger penting, yang merupakan instrumen penginduksi apoptosis dengan jalan menstimulasi pelepasan neurotransmitter, induksi gen dan aktifasi enzim (proteases, phosphatases, protein kinases, endonucleases, phospholipases and nitric oxide synthase)⁽³³⁾.

Peningkatan apoptosis berkaitan erat dengan penyakit neurodegeneratif. Pada penyakit Alzheimer's terjadi akumulasi b-amyloid peptide didalam plaque otak dan vascular mengakibatkan apoptosis pada neuron kortikal.⁽³⁴⁾, atau kemungkinan lain melalui nitric oxide (NO).⁽³⁵⁾ Penyakit Parkinson's berkaitan dengan hilangnya neuron dopaminergik dalam substansia nigra, dan dopamine diduga menyebabkan apoptosis dalam neuron terekspose.⁽²⁰⁾

Kegagalan apoptosis yang disebabkan oleh karena mutasi gen apoptosis berperan dalam pertumbuhan tumor otak. Mutasi p53 terjadi pada tumor astrosit.⁽³⁶⁾ Inhibitor protein kinase C (misal : hypericin dan calphostin) dapat menyebabkan glioma pada *cell lines*. Teknik gen transfer juga digunakan untuk mengirim Bcl-xs kedalam sel neuroblastoma dan retrovirus ICE kedalam sel gliosarkoma yang akan menginduksi apoptosis pada kedua jenis tumor tersebut.^(54,55) Beberapa penyakit terkait dengan mekanisme apoptosis terangkum dalam tabel 3.

Table 3 Human diseases associated with disordered apoptosis.

<i>Increased apoptosis</i>	
Central nervous system	Degenerative diseases (Alzheimer's and Parkinson's disease)
	Cerebral ischaemia
Myocardium	Peri-infarct border zones
Lymphocytes	Lymphocyte depletion in sepsis and HIV infection
Macrophages	Bacillary dysentery (<i>Shigella dysenteriae</i>)
<i>Decreased apoptosis</i>	
Epithelial tissues	Carcinogenesis
Blood vessels	Intimal hyperplasia
Lymphocytes	Autoimmune disorders
Haemopoietic system	Leukaemia, lymphoma

2.2 Amphetamin dan Turunannya.

Pada tahun 1912 Merck, sebuah perusahaan farmasi terkemuka di Jerman mendapatkan senyawa kimia baru, yang merupakan produk sampingan pada saat mensintesis hydrastinin, suatu vasokonstriktor.⁽³⁹⁾ Senyawa tersebut diberi nama "methylenedioxymenthamphetamine" disingkat MDMA dan dipatenkan pada tahun 1914 sebagai penekan nafsu makan. MDMA diklasifikasikan sebagai entactogen oleh Merck yang secara kimiawi merupakan gabungan antara amphetamine dan mescaline.⁽⁴⁰⁾

Terdapat dua kelompok yang berbeda dalam penggunaan MDMA, yaitu kalangan medis terutama bidang psikiatri dan para penyalahguna "recreational users". Diantara indikasi medis pemakaian MDMA adalah : penekan nafsu makan, mengurangi nyeri fisik dan stress emosional, kelainan stress pasca trauma, depresi, fobia, adiksi, kelainan psikosomatik dan problem personal dalam masalah rumah tangga⁽⁴¹⁾. Komplikasi sering terjadi pada kelompok penyalahguna yang meliputi hepatotoxicity⁽⁴²⁾, inflammatory CNS⁽⁴³⁾, intracranial hemorrhage⁽⁴⁴⁾, kelainan jantung⁽⁴⁵⁾, pneumomediastinum⁽⁴⁶⁾, aplastic anemia⁽⁴⁷⁾, nephrotoxicity⁽⁴⁸⁾, dan neurotoxicity⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾. Para penyalahguna menyebut MDMA dengan nama populer : Ecstasy, E, XTC, X, Adam, Clarity, Lover's, Speed, Inex, dll.

Methylenedioxymethamphetamine tidak identik dengan istilah Ekstasi yang sering digunakan masyarakat. Industri kimia gelap merupakan pemasok "pil ecstasy" yang beredar di jalanan. Secara sengaja maupun tidak mereka memasukkan berbagai zat dalam "pil ecstasy" produksinya. Berbagai zat tambahan tersebut adalah kapur, parasetamol, lysergic acid (LSD), amphetamine (speed), heroin (smack), caffeine, methamphetamine (ice), methyldioxyamphetamine (MDA; love), ketamine (special K), N-methyl-1-(3,4-metylenedioxyamphetamine (MBDB), methylenedioxyethamphetamine (MDEA; Eve), 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylethylamine (2C-B; Venus), ephedrine,

pseudoephedrine dan triprolidine⁽⁵²⁾. Efek yang terjadi merupakan kombinasi dari berbagai zat yang terkandung dalam pil ecstasy tersebut.

Efek farmakologik MDMA murni dengan dosis 1.7 mg/kgBB pada sukarelawan sehat adalah : peningkatan mood, well-being dan sensitifitas emosional; kecemasan ringan tetapi tidak ada halusinasi dan reaksi panik; depersonalisasi dan derealisasi ringan; kelainan pikiran, kehilangan kontrol diri dan delusi personal. Selanjutnya akan mengalami badan lemah dan napsu makan menurun, tidak bisa diam, sukar tidur, rahang kaku dan sukar berkonsentrasi⁽⁵³⁾.

Methylenedioximethamphetamine (MDMA), sejak disintesis dan dipatenkan sebagai penekan napsu makan oleh Merck tahun 1912 tidak menarik banyak perhatian dari para ilmuwan. Baru pada tahun 1970-an diteliti efek terhadap tingkah laku pada berbagai hewan coba karena strukturnya yang mirip mescaline⁽⁵⁴⁾. MDMA mempengaruhi kewaspadaan, emosi dan sensasi sehingga direkomendasikan sebagai terapi penunjang psikiatri⁽⁵⁵⁾. Tahun 1985 *Drug Enforcement Agency* (DEA) memasukkan MDMA ke dalam obat *Schedule I of controlled substance*⁽⁵⁶⁾. Saat itu DEA melaporkan tingginya angka penyalahguna MDMA dan kemungkinan bahaya terhadap kesehatan masyarakat dengan ditemukannya bukti kerusakan syaraf serotonergik otak golongan rodensia⁽⁵⁷⁾. DEA menyatakan MDMA tidak mempunyai manfaat klinik, hal ini ditentang oleh para spesialis kesehatan jiwa yang menganggap bahwa MDMA menunjang psycoterapi^(59,59). Di pihak lain MDMA menjadi sangat populer dikalangan kampus⁽⁶⁰⁾ walaupun telah ditemukan adanya bukti bahwa MDMA seperti halnya MDA toksik terhadap saraf serotonergik pada berbagai hewan coba⁽⁶¹⁾.

2.3 Pengaruh MDMA pada sel syaraf

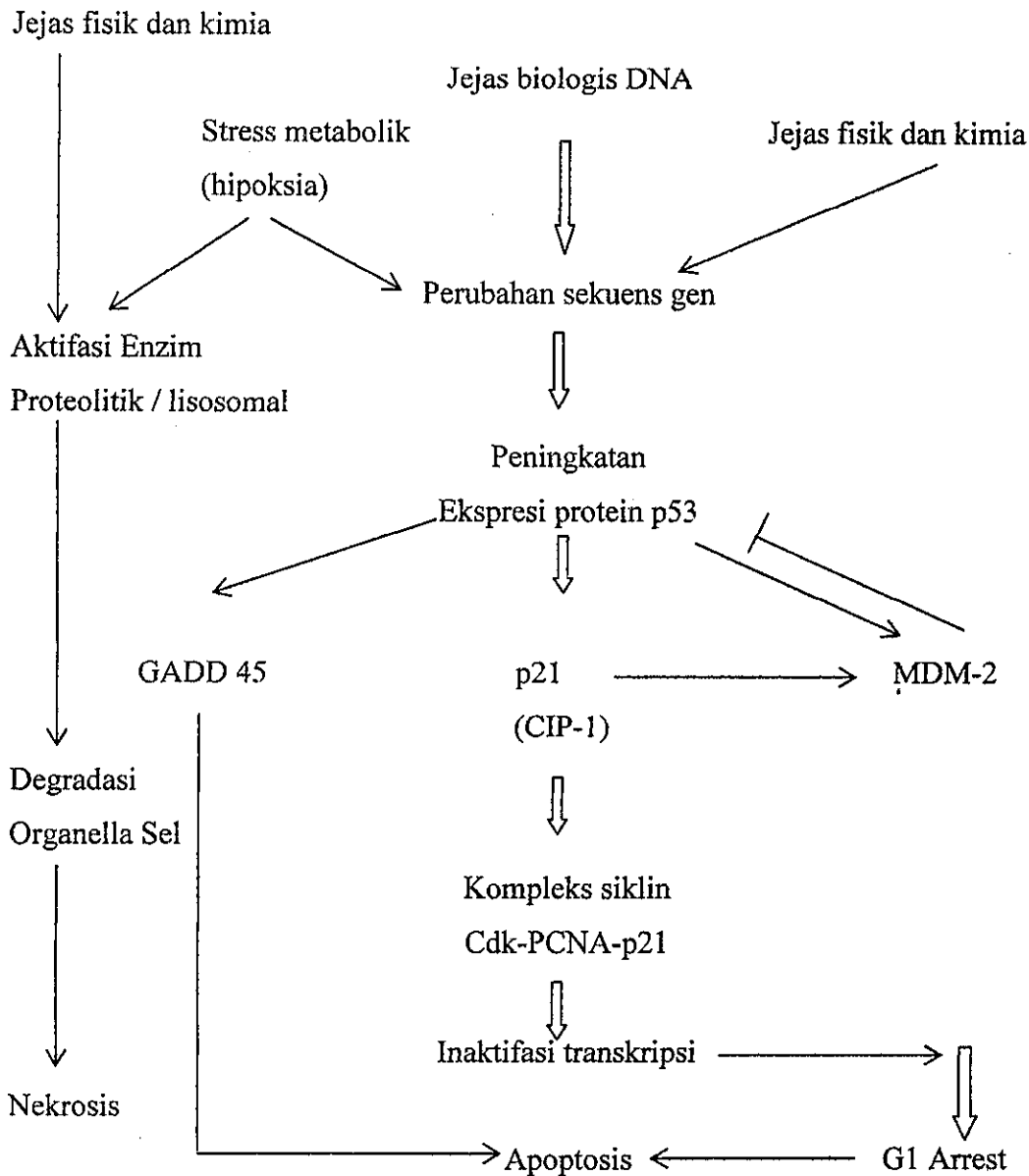
Pada dosis tinggi MDMA menyebabkan kejang pada hewan coba tikus, anjing dan kera⁽⁵⁴⁾. Hasil nekropsi pada anjing yang mendapat dosis oral dosis 15mg/kgBB selama 28 hari terjadi atrofi testis dan hipertrofi prostat. LD50 pada tikus adalah 80-150mg/kgBB⁽⁶¹⁾.

Pada berbagai hewan coba, telah dibuktikan bahwa MDMA menyebabkan turunnya kadar serotonin (5-HT) dan *hydroxyindolacetic acid* (5-HIAA) otak, peningkatan reuptake serotonin dan aktifitas tryptophan hydroxylase. Defisit neurochemical selama pemberian MDMA berkaitan dengan hilangnya immunoreactive serotonin. Hal ini menunjukkan adanya kerusakan axon. Profil perubahan neurodegeneratif yang disebabkan oleh MDMA berbeda dari berbagai species meliputi tikus, guinea pigs, dan primata non-human⁽⁶²⁻⁶⁵⁾. Dari data tersebut diduga semakin tinggi derajat species MDMA semakin neurotoxic.

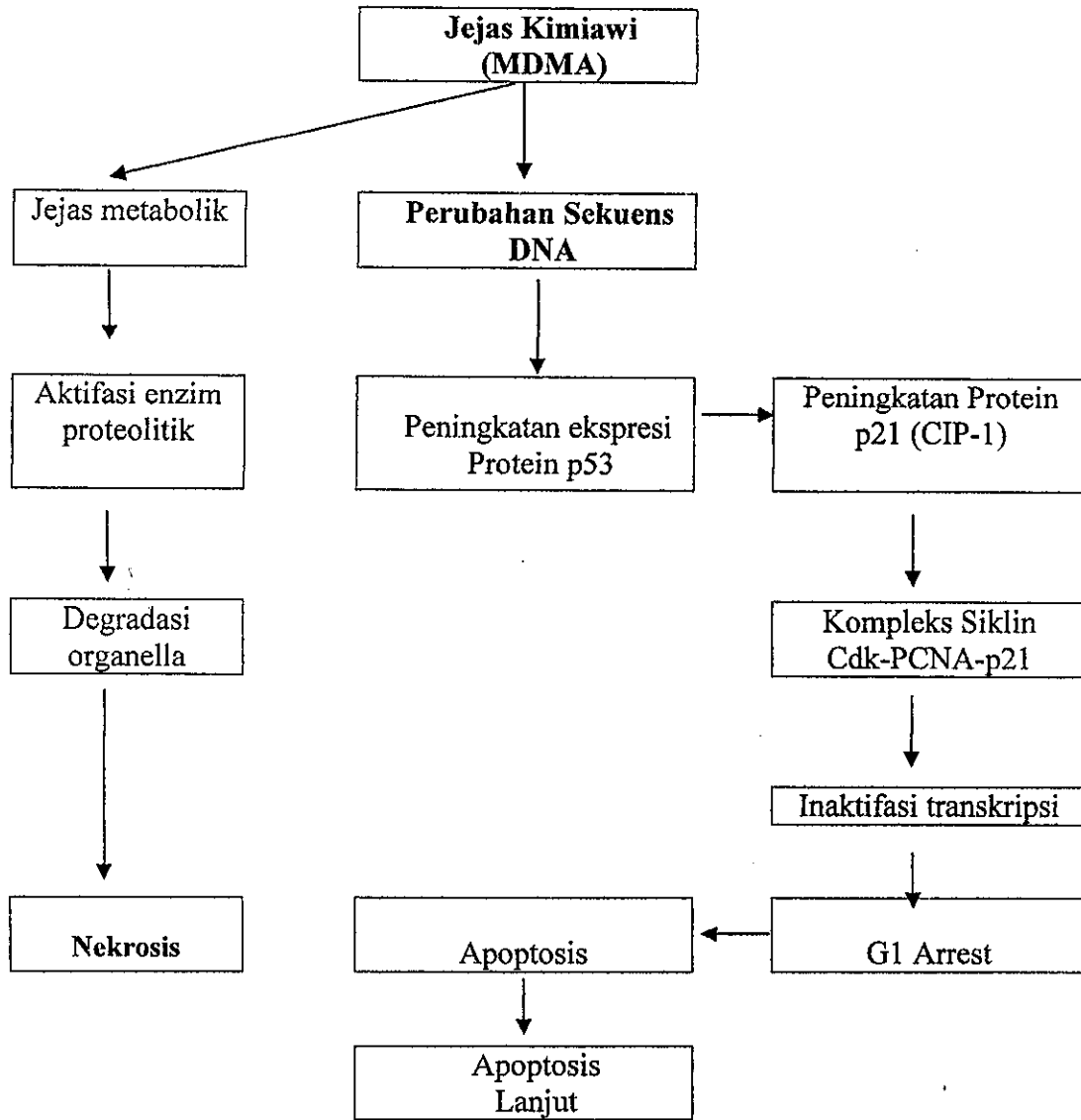
BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

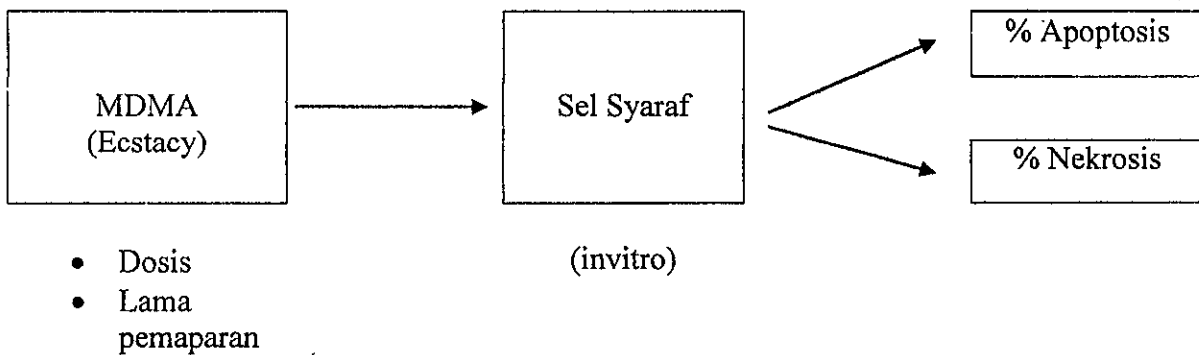
Dari tinjauan pustaka pada bab terdahulu maka disusun kerangka teori secara ringkas sebagai berikut :



3.1 Kerangka Teori Penelitian



3.2 Kerangka Konsep



3.3 Hipotesis

3.3.1 Hipotesis Mayor

Dosis dan lama waktu pemaparan MDMA mempengaruhi terjadinya apoptosis dan nekrosis pada sel syaraf (invitro)

3.3.2 Hipotesis Minor

1. Terdapat perbedaan bermakna antar berbagai kelompok dosis MDMA dengan persentase apoptosis sel syaraf invitro.
2. Peningkatan dosis MDMA meningkatkan persentase apoptosis sel syaraf invitro.
3. Terdapat perbedaan bermakna antara berbagai kelompok lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase apoptosis sel syaraf invitro.
4. Peningkatan lama waktu pemaparan MDMA meningkatkan persentase apoptosis sel syaraf invitro.
5. Terdapat perbedaan bermakna antar berbagai kelompok dosis MDMA dengan persentase nekrosis sel syaraf invitro.
6. Peningkatan dosis MDMA meningkatkan persentase nekrosis sel syaraf invitro.
7. Terdapat perbedaan bermakna antara berbagai kelompok lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase nekrosis sel syaraf invitro.
8. Peningkatan lama waktu pemaparan MDMA meningkatkan persentase nekrosis sel syaraf invitro.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *Simple Randomize Subject Design*. Subyek penelitian adalah kultur sel saraf. Perlakukan dengan pemaparan MDMA dalam enam tingkatan dosis dan satu kelompok kontrol. Respon berupa kematian sel yang berupa apoptosis maupun nekrosis. Pengukuran pada masing-masing kelompok dilakukan sebanyak 4 kali yaitu jam ke-6, 12, 24 dan 48.

Tabel 4.1 Skema rancangan penelitian

Group	Treatment	Respon (jam 6,12, 24,48)	
		Apoptosis	Nekrosis
Kelompok Kontrol	Cairan fisiologis	Y0(apop)	Y0(nekro)
Kelompok I	MDMA dosis-1	Y1(apop)	Y1(nekro)
Kelompok II	MDMA dosis-2	Y2(apop)	Y2(nekro)
Kelompok III	MDMA dosis-3	Y3(apop)	Y3(nekro)
Kelompok IV	MDMA dosis-4	Y4(apop)	Y4(nekro)
Kelompok V	MDMA dosis-5	Y5(apop)	Y5(nekro)

4.2 Rencana Perlakuan

Perlakuan dilaksanakan dengan memberikan pemaparan MDMA yang telah dilarutkan dalam cairan fisiologis pada kultur sel saraf yang mempunyai kepadatan 10^6 sel/ml.

- Kelompok kontrol, hanya mendapatkan cairan fisiologis.
- Kelompok I, diberi pemaparan MDMA dengan dosis 0,250 mg.
- Kelompok II, diberi pemaparan MDMA dengan dosis 0,500 mg.
- Kelompok III, diberi pemaparan MDMA dengan dosis 0,750 mg.
- Kelompok IV, diberi pemaparan MDMA dengan dosis 1,000 mg.

- Kelompok V, diberi pemaparan MDMA dengan dosis 1,250 mg.

• Kelompok VI, diberi pemaparan MDMA dengan dosis 1,500 mg.

Tabel 4.2 Skema rencana perlakuan

No.	Kelompok	Jumlah Flask	Perlakuan berdasarkan waktu			
			6 jam	12 jam	24 jam	48 jam
1.	Kontrol	12	3	3	3	3
2.	Dosis 0,250 mg	12	3	3	3	3
3.	Dosis 0,500 mg	12	3	3	3	3
4.	Dosis 0,750 mg	12	3	3	3	3
5.	Dosis 1,000 mg	12	3	3	3	3
6.	Dosis 1,250 mg	12	3	3	3	3

4.3 Populasi, sampel dan besar sampel

4.3.1 Populasi Penelitian

Populasi target : mencit (*Mus musculus* sp) yang dikembangbiakan di Lembaga Riset Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Ilmu Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Institut Teknologi Bandung (ITB).

Populasi terjangkau : mencit baru lahir, umur 1-2 hari, yang berada di unit pemurnian galur (pembuatan strain homozigot) di Lembaga Riset Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA ITB.

Alasan pemilihan sampel : data dasar biologis mencit telah lengkap. Penelitian ini dilakukan secara invitro dengan maksud agar peneliti dapat mengendalikan faktor-faktor pengganggu. Efek yang terjadi hanya disebabkan oleh karena pemaparan MDMA pada sel saraf. Dipilih mencit baru lahir karena sel syaraf lebih mudah dibiakkan secara invitro pada otak yang masih sangat muda. Penelitian lain ada yang mengambil syaraf dari fetus dengan melakukan bedah cesar terhadap tikus pada usia kehamilan tertentu.

4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah mencit baru lahir umur 1-2 hari yang diambil secara acak dari populasi terjangkau yang berada di unit pemurnian galur lembaga riset bioteknologi jurusan biologi Fakultas Ilmu Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Institut Teknologi Bandung (ITB).

4.3.3 Besar Sampel

Besar sampel minimal dihitung dengan rumus Federer $t(n-1) \geq 15$ dimana $t =$ jumlah perlakuan, $n =$ besar sampel minimal. Dalam penelitian ini banyaknya perlakuan adalah sebagai berikut :

Beda tingkatan dosis = 6, Perbedaan lama waktu amatan adalah = 4, jadi $(t) = 10$ sehingga jumlah minimal sampel perkelompok adalah $10(n-1) \geq 15$ jadi $n \geq 2.5$ dibulatkan menjadi 3.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas (*independence variable*) dalam penelitian ini adalah Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) yang meliputi dosis dan lama pemberian. Dosis MDMA dihitung dalam satuan miligram. Pemaparan hanya dilakukan satu kali. Waktu dihitung mulai waktu pemaparan hingga pemeriksaan dilakukan, dengan menggunakan satuan jam.

4.4.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung (*dependence variable*) adalah persentase jumlah sel yang mati secara apoptosis ataupun nekrosis.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan percobaan akan dilakukan di Lembaga Riset Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Ilmu Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Institut Teknologi Bandung (ITB). Kultur sel saraf dilakukan di Laboratorium Tissue Culture, Unit Mikrobiologi, Department Patologi Hospital Universiti Kebangsaan Malaysia. Perlakuan dengan MDMA dilaksanakan di Laboratorium Tissue Culture, Unit Mikrobiologi, Department Patologi Hospital Universiti Kebangsaan Malaysia. Identifikasi apoptosis atau nekrosis dilakukan dengan pengecatan *dual staining* menggunakan *Acridin Orange* (AO) dan *Propidium Iodide* (PI). Sel yang mengalami apoptosis tampak berwarna terang (oranye) sedangkan sel nekrosis tampak berwarna gelap karena menyerap zat warna PI. Penelitian dilakukan pada bulan April - juli 2001.

4.6 Prosedur Perlakuan dan pengambilan data

4.6.1 Prosedur perlakuan

Pemeliharaan mencit percobaan. Mencit dipelihara dalam ruangan berventilasi cukup, suhu ruangan berkisar antara 28-32 derajat celcius, kelembaban nisbi 98%. Makanan dan minuman diberikan *ad libitum* (semaunya). Kandang dibersihkan tiap 2 hari.

Pembuatan kultur sel saraf. Secara ringkas pembuatan kultur sel saraf dilakukan sebagai berikut : Pengangkatan seluruh jaringan otak. Pembuluh darah dan simpai dibersihkan. Dilakukan pencacahan (*mincing*) hingga halus, disaring kemudian disentrifuge. Sel-sel tunggal yang dihasilkan kemudian diinokulasikan pada flask. Dilakukan inkubasi pada temperature 37°C dengan konsentrasi O₂ 95% dan CO₂ 5%. Dilakukan perhitungan viabilitas pada hari ke-9. Selama periode waktu tertentu dilakukan hitung jumlah sel dan ganti medium.

Pemaparan MDMA. Setelah konsentrasi sel mencapai 10^6 sel/ml dilakukan pemaparan MDMA. Keadaan tersebut dicapai pada umur kultur 11-17 hari. Dalam penelitian ini dibuat enam kelompok perlakuan yaitu dosis 0,250 mg; 0,500 mg; 0,750 mg; 1,000 mg; 1,250 mg dan 1,500 mg; serta satu kelompok kontrol yang hanya diberi larutan fisiologis. Perhitungan viabilitas sel dilakukan sebanyak 4 kali, yaitu pada jam ke-6, 12, 24 dan 48.

4.6.2 Perhitungan viabilitas sel saraf

Pemeriksaan viabilitas sel dilakukan untuk membedakan apakah sel saraf dalam keadaan nekrosis, apoptosis atau sehat. Dilakukan pengecatan *dual staining Acridine Orange (AO)* dan *Propidium Iodide (PI)* interpretasi dilakukan dengan bantuan mikroskop fluorescent. Sel berfluoresen terang dihitung sebagai apoptosis, sel yang tercat sitoplasmanya dengan PI sebagai nekrosis atau apoptosis lanjut sedangkan sel utuh yang tidak tercat sebagai sel hidup (*viable*) dan dihitung hingga dua ratus sel.

4.6.3 Prosedur Pengambilan data

Dilakukan perhitungan jumlah sel yang mengalami apoptosis, nekrosis dan sel sehat pada setiap flask sesuai dengan dosis dan lamanya pemaparan MDMA. Jumlah sel apoptosis, nekrosis atau viable dihitung hingga mencapai total 200 sel dalam lapang pandang. Hasil perhitungan kemudian dikonversi dalam bentuk presentase. Selanjutnya disajikan dalam tabel untuk dilakukan analisis.

4.7 Prosedur analisis data

Data disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Untuk mengetahui hubungan antara dosis MDMA dengan persentase sel apoptosis dilakukan uji beda varian satu arah antar kelompok perlakuan (One-Way ANOVA) dilanjutkan dengan uji post hoc Bonferroni. Cara yang sama dipergunakan untuk mengetahui hubungan antara lama waktu pemaparan dengan persentase sel nekrosis, hubungan antara dosis MDMA dengan persentase sel apoptosis dan hubungan antara lama waktu pemaparan dengan persentase sel nekrosis. Untuk mengetahui arah dan kekuatan hubungan antara peningkatan dosis MDMA dengan peningkatan persentase sel apoptosis digunakan analisis regresi linear. Cara yang sama dipergunakan untuk mengetahui arah dan kekuatan hubungan antara lama waktu pemaparan dengan persentase sel nekrosis, hubungan antara dosis MDMA dengan persentase sel apoptosis dan hubungan antara lama waktu pemaparan dengan persentase sel nekrosis. Analisis dilakukan dengan bantuan program SPSS for Windows versi 11.01. Batas signifikansi $\alpha = 0,05$.

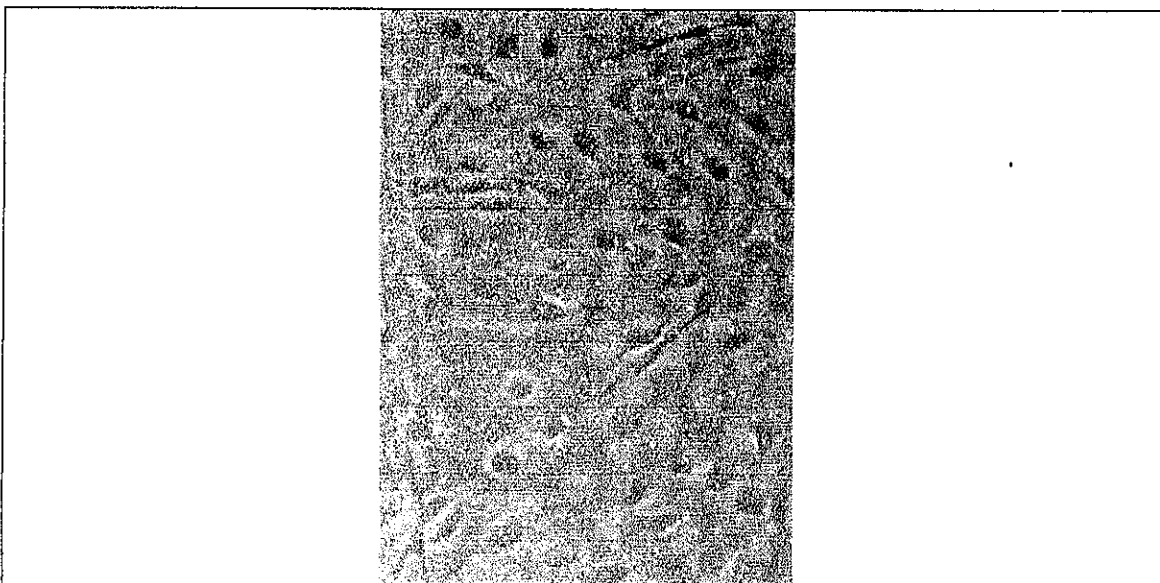
BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

5.1 Pertumbuhan sel syaraf invitro

Untuk memperoleh pertumbuhan kultur yang baik perlu mengikuti prosedur yang sangat ketat. Setelah dicoba berulang kali diperoleh fakta bahwa sel syaraf mempunyai kecepatan tumbuh yang lambat. Kultur mencapai konfluen pada hari ke-9 dan sel masih dalam keadaan imatur. Antara hari ke-11 sampai 17 terjadi perkembangan neuron yang cepat, termasuk di dalamnya adalah tumbuhnya serabut-serabut syaraf, dendrite dan axon. Myelinisasi terjadi antara hari ke 18-19 hari invitro. Pembentukan sinaps terjadi pada hari ke-21-30.. Mulai hari ke 28 neuron mulai menunjukkan tanda-tanda penuaan berupa inti yang piknotik. Uji neurotoksisitas dengan pemaparan MDMA idealnya dilakukan pada umur kultur antara 11-17 hari invitro.⁽⁶⁶⁾



Gambar 5.1 Kultur sel syaraf umur 9 hari invitro. Mikroskop fase kontras dengan pembesaran 400X

5.2 Uji viabilitas dan penentuan pola kematian sel syaraf

Sebelum dilakukan pemaparan dengan MDMA dilakukan uji viabilitas sel dalam kultur dengan cara pengecatan dengan Tryphan Blue. Sel syaraf yang mati akan menyerap warna Tryphan Blue sehingga tampak biru kehitaman. Sedangkan sel syaraf yang hidup tampak terang karena membrane sel tetap intak sehingga warna Tryphan Blue tidak merembes masuk ke dalam sitoplasma sel. Perlakuan dilakukan dengan cara penetesan medium dengan larutan yang mengandung MDMA sesuai dengan kelompok perlakuan. Kelompok control hanya mendapatkan cairan fisiologis, Kelompok I mendapat 0,250 mg MDMA, Kelompok II mendapat 0,500 mg MDMA, Kelompok III mendapat 0,750 mg MDMA, Kelompok IV mendapat 1,000 mg MDMA dan Kelompok VI mendapat 1,250 mg MDMA. Pemeriksaan pola kematian sel syaraf dilakukan sebanyak 4 kali yaitu pada jam ke-6, 12, 24 dan 48. Anggota masing-masing kelompok adalah 3 sumur kultur. Adanya Apoptosis dan nekrosis diketahui dengan cara pengecatan ganda "*dual staining*" dengan Acridin Orange (AO) dan Propidium Iodid (PI). Dibawah mikroskop fluorencen sel yang mengalami apoptosis tampak berwarna terang (oranye) dan sel yang mengalami nekrosis tampak berwarna gelap/hitam.⁽⁶⁷⁾

5.3 Hubungan antara dosis MDMA dengan persentase apoptosis.

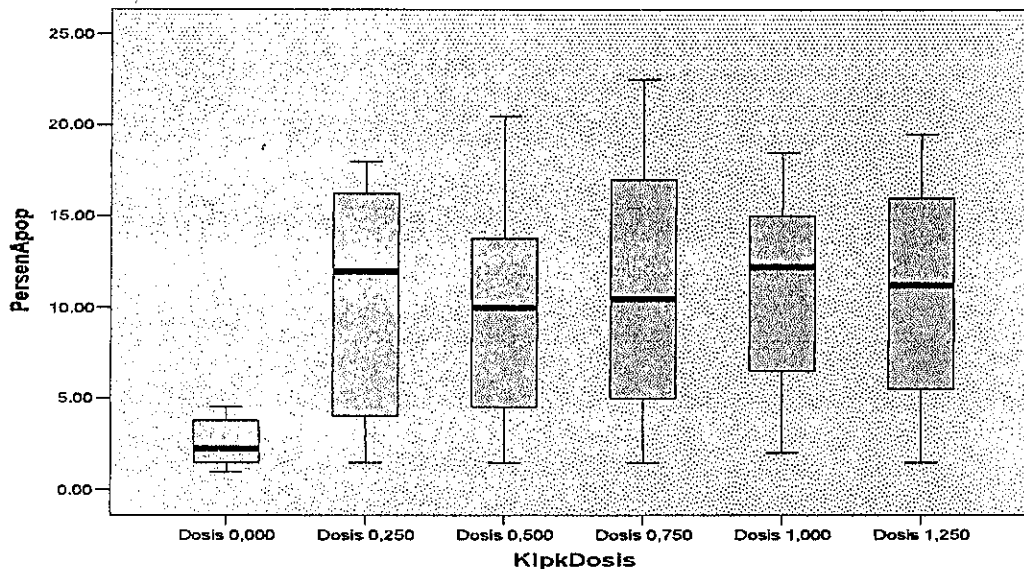
Persentase jumlah sel yang mengalami apoptosis dilakukan dengan cara menghitung sel yang berwarna terang dalam lapang pandang hingga 200 sel. Selanjutnya angka yang didapat dibagi 200 dikalikan 100%. Secara ringkas hubungan antara dosis MDMA dengan persentase apoptosis dirangkum dalam tabel 4.

Tabel 4. Rerata persentase sel apoptosis berdasarkan kelompok dosis

Kelompok	% Apoptosis		
	Mean	SD	SE
Dosis kontrol	2.5833	1.29393	1.704
Kelompok I (dosis 0,250 mg)	10.5000	6.61953	1.704
Kelompok II (dosis 0,500 mg)	9.9167	6.25530	1.704
Kelompok III (dosis 0,750 mg)	11.1250	7.32718	1.704
Kelompok IV (dosis 1,000 mg)	11.0833	5.70818	1.704
Kelompok V (dosis 1,250 mg)	10.9167	6.17853	1.704

P = 0,004

Dari tabel 4. diperoleh hasil bahwa rerata persentase sel yang mengalami apoptosis tertinggi terjadi pada Kelompok III (11.1250 ± 7.32718), tertinggi kedua pada Kelompok IV (11.0833 ± 5.70818), tertinggi ketiga pada kelompok V (11.0833 ± 6.17853) tertinggi keempat pada Kelompok I (10.5000 ± 6.61953) dan terendah pada Kelompok II (9.9167 ± 6.25530). Pada kelompok kontrol rerata persentase sel apoptosis sebesar (2.5833 ± 1.29393). Analisis univariat dengan SPSS for Windows versi 11.01 diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan bermakna rerata persentase sel apoptosis kelompok kontrol dengan dengan semua kelompok perlakuan. Uji post Hoc Bonferroni diperoleh nilai $p=0,004$. Batas signifikansi $\alpha=0,05$. Hubungan antara dosis dengan persentase apoptosis sel syaraf dapat dilihat pada Grafik box plot 1.



Grafik Box Plot 1. Hubungan antara dosis MDMA dengan peningkatan persentase apoptosis sel syaraf invitro.

Dari grafik box plot 1 tampak bahwa terdapat kecenderungan bahwa peningkatan dosis MDMA meningkatkan persentase apoptosis sel syaraf invitro.

5.3 Hubungan lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase apoptosis.

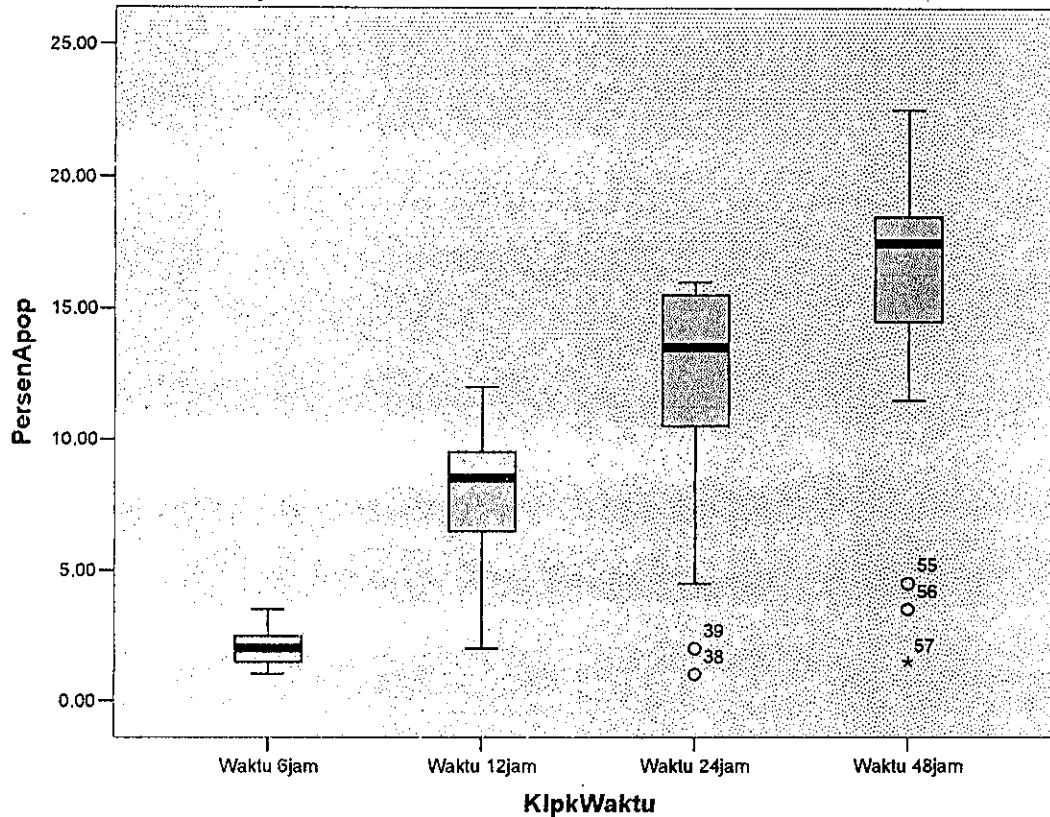
Persentase jumlah sel yang mengalami apoptosis dilakukan dengan cara menghitung sel yang berwarna terang dalam lapang pandang hingga 200 sel. Selanjutnya angka yang didapat dibagi 200 dikalikan 100%. Secara ringkas hubungan antara dosis dengan persentase apoptosis dirangkum dalam tabel 5.

Tabel 5. Rerata persentase sel apoptosis berdasarkan kelompok lama waktu pemaparan MDMA

Kelompok	% Apoptosis		
	Mean	SD	SE
Kelompok I (6 jam)	2.1111	.65430	.994
Kelompok II (12 jam)	8.0000	2.86459	.994
Kelompok III (24 jam)	11.8333	4.89898	.994
Kelompok IV (48 jam)	15.4722	6.21069	.994

P=0,000

Dari tabel 5 diperoleh hasil bahwa rerata persentase sel yang mengalami apoptosis tertinggi terjadi pada Kelompok IV (15.4722 ± 6.21069), tertinggi kedua pada Kelompok III (11.8333 ± 4.89898), tertinggi ketiga pada kelompok II (8.0000 ± 2.86459), dan terendah pada Kelompok I ($2.1111 \pm 0,65430$). Analisis univariat dengan SPSS for Windows versi 11.01 diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan bermakna rerata persentase sel apoptosis kelompok kontrol dengan dengan semua kelompok perlakuan. Uji post Hoc Bonferroni diperoleh nilai $p=0,000$. Batas signifikansi $\alpha=0,05$. Hubungan antara dosis dengan persentase apoptosis sel syaraf dapat dilihat pada Grafik box plot 2.



Grafik Bax Plot 2. Hubungan antara lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase apoptosis sel syaraf invitro.

Dari Grafik Box Plot 2. tampak bahwa terdapat kecenderungan bahwa peningkatan lama waktu pemaparan MDMA meningkatkan persentase apoptosis sel syaraf invitro.

5.4 Hubungan antara dosis MDMA dengan persentase nekrosis

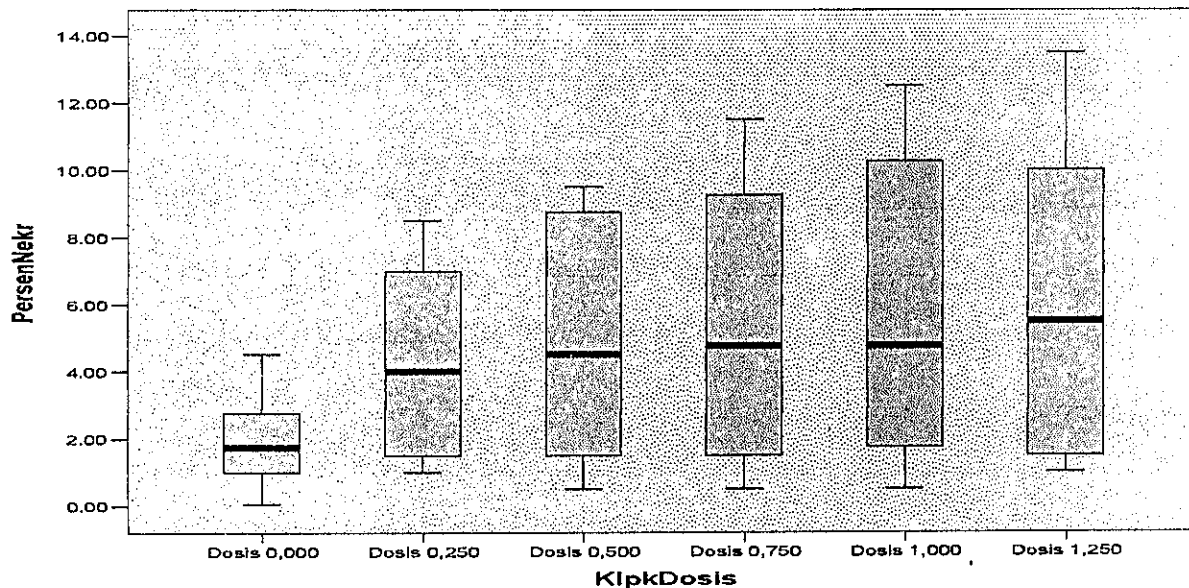
Persentase jumlah sel yang mengalami nekrosis dilakukan dengan cara menghitung sel yang berwarna gelap dalam lapang pandang hingga 200 sel. Selanjutnya angka yang didapat dibagi 200 dikalikan 100%. Secara ringkas hubungan antara dosis MDMA dengan persentase nekrosis dirangkum dalam tabel 6.

Tabel 6. Rerata persentase sel nekrosis berdasarkan kelompok dosis.

Kelompok	% Nekrosis		
	Mean	SD	SE
Dosis kontrol	1.9625	1.33265	1.095
Kelompok I (dosis 0,250 mg)	4.2500	3.04884	1.095
Kelompok II (dosis 0,500 mg)	4.8750	3.68119	1.095
Kelompok III (dosis 0,750 mg)	5.4167	4.22026	1.095
Kelompok IV (dosis 1,000 mg)	5.9583	4.63906	1.095
Kelompok V (dosis 1,250 mg)	6.0833	4.73782	1.095

P = 0,097

Dari tabel 6. diperoleh hasil bahwa rerata persentase sel yang mengalami apoptosis tertinggi terjadi pada Kelompok V (6.0833 ± 4.73782), tertinggi kedua pada Kelompok IV (5.9583 ± 4.63906), tertinggi ketiga pada kelompok III (5.4167 ± 4.22026) tertinggi keempat pada Kelompok II (4.8750 ± 3.68119) dan terendah pada Kelompok I (4.2500 ± 3.04884). Pada kelompok kontrol rerata persentase sel apoptosis sebesar (1.9625 ± 1.33265). Analisis univariat dengan SPSS for Windows versi 11.01 diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan bermakna rerata persentase sel apoptosis kelompok kontrol dengan dengan semua kelompok perlakuan. Uji post Hoc Bonferroni diperoleh nilai $p=0,097$. Batas signifikansi $\alpha=0,05$. Hubungan antara dosis dengan persentase apoptosis sel syaraf dapat dilihat pada Grafik Box Plot 3.



Grafik Box Plot 3. Hubungan antara dosis MDMA dengan peningkatan persentase nekrosis sel syaraf invitro.

Dari grafik box plot 3. tampak bahwa terdapat kecenderungan bahwa peningkatan dosis MDMA meningkatkan persentase nekrosis sel syaraf invitro.

5.5 Hubungan lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase nekrosis.

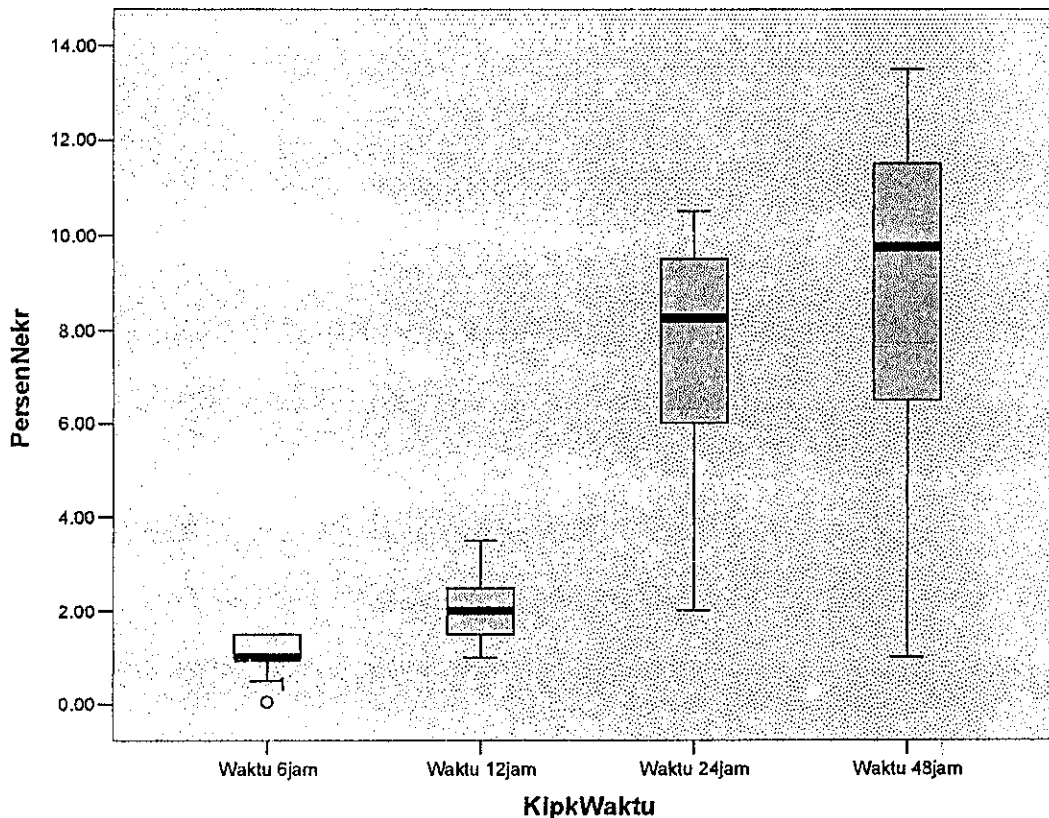
Persentase jumlah sel yang mengalami apoptosis dilakukan dengan cara menghitung sel yang berwarna terang dalam lapang pandang hingga 200 sel. Selanjutnya angka yang didapat dibagi 200 dikalikan 100%. Secara ringkas hubungan antara lama waktu pemaparan dengan persentase nekrosis dirangkum dalam table 7.

Tabel 7. Rerata persentase sel nekrosis berdasarkan kelompok lama waktu pemaparan MDMA

Kelompok	% Nekrosis		
	Mean	SD	SE
Kelompok I (6 jam)	1.0306	.42948	.513
Kelompok II (12 jam)	2.0556	.70479	.513
Kelompok III (24 jam)	7.3056	2.40183	.513
Kelompok IV (48 jam)	8.6389	3.53056	.513

P=0,000

Dari tabel 7. diperoleh hasil bahwa rerata persentase sel yang mengalami nekrosis tertinggi terjadi pada Kelompok IV (8.6389 ± 3.53056), tertinggi kedua pada Kelompok III (7.3056 ± 2.40183), tertinggi ketiga pada kelompok II ($2.0556 \pm .70479$), dan terendah pada Kelompok I ($1.0306 \pm .42948$). Analisis univariat dengan SPSS for Windows versi 11.01 diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan bermakna rerata persentase sel apoptosis kelompok kontrol dengan dengan semua kelompok perlakuan. Uji post Hoc Bonferroni diperoleh nilai $p=0,000$. Batas signifikansi $\alpha=0,05$. Hubungan antara dosis dengan persentase nekrosis sel syaraf dapat dilihat pada Grafik Box Plot 4.



Grafik Box Plot 4. Hubungan antara lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase nekrosis sel syaraf invitro.

Dari Grafik Box Plot 4. tampak bahwa terdapat kecenderungan bahwa peningkatan lama waktu pemaparan MDMA meningkatkan persentase nekrosis sel syaraf invitro.

5.6 Analisis regresi hubungan antara berbagai variable penelitian

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan terbukti bahwa secara statistik terdapat perbedaan antar berbagai kelompok dosis MDMA dengan persentase apoptosis sel syaraf ($p=0,004$). Regresi linear untuk mendapatkan kekuatan hubungan antara dosis MDMA dengan persentase sel apoptosis diperoleh nilai koefisien (r) =0,339 dan nilai konstanta (c)=6,167. Dari kedua parameter tersebut dapat disimpulkan bahwa peningkatan dosis MDMA berkorelasi positif dengan peningkatan persentase sel

apoptosis. Secara ringkas kekuatan hubungan antara berbagai variable dependence dan independent dalam penelitian ini dirangkum pada tabel 8.

Tabel 8. Koefisien regresi linear hubungan antara berbagai variable penelitian pemaparan MDMA dengan apoptotosis dan nekrosis sel syaraf invitro

Hubungan Variabel Independence - Dependence		B	Std error	Beta	t	sig
Dosis MDMA - % Apoptosis	dosis	5.100	1.692	.339	3.014	.004
	(Constant)	6.167	1.281		4.815	.000
Lama Waktu pemaparan - % Apoptosis	waktu	.284	.034	.710	8.432	.000
	(Constant)	2.975	.930		3.198	.002
Dosis MDMA - % Nekrosis	dosis	3.002	1.029	.329	2.918	.005
	(Constant)	2.881	.779		3.699	.000
Lama waktu pemaparan - % Nekrosis	waktu	.186	.018	.769	10.072	.000
	(Constant)	.569	.511		1.114	.269

Dari tabel 8. terlihat bahwa analisis regresi linear untuk mendapatkan kekuatan hubungan antara dosis MDMA dengan persentase sel apoptosis diperoleh nilai koefisien (r)=0,339 dan nilai konstanta (c)=6,167 Dari koefisien tersebut dapat disimpulkan bahwa peningkatan dosis MDMA berkorelasai positif dengan peningkatan persentase sel apoptosis. Atau dengan kata lain bahwa peningkatan dosis MDMA akan meningkatkan persentasae sel apoptosis sel syaraf invitro. Regresi linear untuk mendapatkan kekuatan hubungan antara lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase apoptosis sel syaraf diperoleh nilai koefisien regresi (r)=0,710 dan nilai konstanta (c)=2,975. Dari koefisien tersebut dapat disimpulkan bahwa peningkatan lama waktu pemaparan MDMA berkorelasai positif dengan peningkatan persentase sel apoptosis. Atau dengan kata lain bahwa peningkatan lama waktu pemaparan MDMA akan meningkatkan persentasae apoptosis sel syaraf invitro. Regresi linear untuk mendapatkan kekuatan hubungan antara dosis MDMA dengan persentase sel nekrosis diperoleh nilai koefisien (r)=0,329 dan nilai konstanta (c)=2,881 Dari koefisien tersebut dapat disimpulkan bahwa peningkatan dosis MDMA berkorelasai positif dengan

peningkatan persentase sel nekrosis. Atau dengan kata lain bahwa peningkatan dosis MDMA akan meningkatkan persentase nekrosis sel syaraf invitro. Regresi linear untuk mendapatkan kekuatan hubungan antara lama waktu pemaparan MDMA dengan persentase sel syaraf nekrosis diperoleh nilai koefisien regresi (r)=0,769 dan nilai konstanta (c)=0,589. Dari koefisien tersebut dapat disimpulkan bahwa peningkatan lama waktu pemaparan MDMA berkorelasi positif dengan peningkatan persentase sel nekrosis. Atau dengan kata lain bahwa peningkatan lama waktu pemaparan MDMA akan meningkatkan persentase nekrosis sel syaraf invitro.

5.2 Pembahasan

Dari kepustakaan telah dijelaskan perbedaan antara apoptosis dengan nekrosis yang secara ringkas telah disajikan dalam tabel 1. Acuan perbedaan tersebut tentunya pada kondisi *invivo* dimana sel-sel tubuh berada dalam lingkungan biologis yang sangat kompleks. Kondisi *in vitro* tidaklah demikian karena lingkungan *invitro* tidak memungkinkan terjadinya reaksi inflamasi dan tidak adanya reaksi imunologi. Akibatnya sel yang mengalami apoptosis tidak dapat dieliminasi oleh sel fagosit maupun sel sehat sekitarnya. Sehingga sel apoptosis lanjut tampak seperti sel nekrosis. Karena pada tahap lanjut membrane sel apoptosis tidak lagi dapat dipertahankan sehingga terjadi kebocoran dan akibatnya akan menyerap zat warna Propidium iodide (PI) yang ada disekitarnya. Kesimpulanya walaupun secara statistik terdapat hubungan antara dosis dan lama waktu pemaparan MDMA terhadap nekrosis, belum tentu pemaparan MDMA menyebabkan nekrosis sel syaraf pada dosis dan keadaan tersebut.

Apoptosis terjadi dengan melalui reaksi yang sangat kompleks. Dimulai dengan adanya stimulus baik yang datang dari luar maupun yang datang dari luar sel. Berbagai

stimulus apoptosis secara ringkas dapat dilihat pada tabel 2 pada bab 2. Dalam penelitian ini MDMA berperan sebagai stimulus yang berupa bahan kimia yang datangnya dari luar sel syaraf. Stimulus tersebut dianggap sebagai stress atau jejas pada sel syaraf. Apabila sel syaraf dapat mengatasi jejas tersebut maka sel syaraf akan tetap hidup. Sebaliknya apabila jejas tersebut melampaui batas kemampuan adaptasi sel maka sel tersebut akan mati. Kematian sel dapat terjadi melalui jalur apoptosis maupun nekrosis. Jalur apoptosis atau nekrosis yang terjadi dipengaruhi oleh berbagai factor diantaranya factor genetic, kualitas dan kuantitas serta lamanya jejas berlangsung.

Apabila jalur apoptosis yang dipilih maka sel akan mengaktifkan berbagai gen untuk mensintesis protein dan enzim untuk melakukan apoptosis serta menonaktifkan berbagai gen yang menghambat apoptosis. Gen p53, dan gen Bcl-2 terkait x protein (Bax) seperti Bax, Bad, Bak dan Bcl-xS berfungsi memicu apoptosis akan diaktifkan. Sedangkan gen Bcl-2 dan Bcl-xL akan dinonaktifkan. Dalam penelitian ini memang terbukti secara statistic terdapat hubungan antara MDMA dengan apoptosis tetapi belum dapat menjelaskan jalur apoptosis mana yang diaktifkan. Dari kepustakaan dijelaskan beberapa jalur apoptosis yang mungkin berbeda antar sel yang satu dengan lainnya. Untuk dapat lebih memahami apoptosis pada sel syaraf perlu dilakukan pemeriksaan berbagai variable antara diantaranya adalah ekspresi protein p53 yang proapoptotik dan ekspresi Bcl-xL yang berperan sebagai antiapoptotik.

Parameter yang digunakan dalam menilai apoptosis dalam penelitian ini adalah pengecatan dual staining dengan menggunakan *Acridine Orange* (AO) dan *Propidium Iodide* (PI). Kelemahan dari metode tersebut diantaranya adalah tidak dapat membedakan antara apoptosis yang sangat lanjut dengan nekrosis. Secara molekuler pengecatan dengan AO sebenarnya sudah merupakan tahap lanjut dari apoptosis.

Sehingga dengan pengecatan AO ada sebagian sel yang sudah apoptosis tetapi tidak dapat atau belum dapat terdeteksi. Metode yang lebih akurat menentukan apoptosis secara kualitatif dan kuantitatif adalah dengan metode TUNEL yang dapat diterapkan pada sediaan histopatologi jaringan maupun flow sitimetri hasil kultur jaringan. Alasan pemilihan metode dual staining AO dan PI dalam penelitian ini adalah dapat menilai apoptosis dan nekrosis secara kualitatif dan kuantitatif, lebih sederhana dan lebih murah.

Kelemahan penelitian ini diantaranya adalah : Metode pengecatan dual staining AO dan PI cukup spesifik tetapi kurang sensitive membedakan morfologi sel apoptosis dan nekrosis. Dan tidak dapat menjelaskan mekanisme terjadinya apoptosis karena tidak dilakukannya pemeriksaan berbagai variable perantara yang berperan dalam apoptosis diantaranya (p53, Bcl-2, Bcl-xL, dll).

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

Dari hasil penelitian dan pembahasan diperoleh simpulan sebagai berikut :

1. Terdapat perbedaan bermakna rerata persentase apoptosis sel syaraf pada berbagai kelompok dosis MDMA. ($p=0,004$)
2. Peningkatan dosis MDMA meningkatkan persentase apoptosis sel syaraf invitro. ($r=0,339$)
3. Terdapat perbedaan bermakna rerata persentase apoptosis sel syaraf pada berbagai kelompok lama waktu pemaparan MDMA. ($p=0,000$)
4. Peningkatan lama waktu pemaparan MDMA meningkatkan persentase apoptosis sel syaraf invitro. ($r=0,710$)
5. Terdapat perbedaan bermakna rerata persentase nekrosis sel syaraf pada berbagai kelompok dosis MDMA. ($p=0,005$)
6. Peningkatan dosis MDMA meningkatkan persentase nekrosis sel syaraf invitro. ($r=0,329$)
7. Terdapat perbedaan bermakna rerata persentase nekrosis sel syaraf pada berbagai kelompok lama waktu pemaparan MDMA. ($p=0,000$)
8. Peningkatan lama waktu pemaparan MDMA meningkatkan persentase nekrosis sel syaraf invitro. ($r=0,769$).

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan pemeriksaan apoptosis dengan metode yang lebih sensitive, misalnya dengan metode TUNEL.
2. Perlu dilakukan pemeriksaan berbagai variable perantara antar MDMA sebagai jejas dengan apoptosis sebagai hasil akhir sehingga dapat menjelaskan mekanisme apoptosis yang terjadi sel syaraf akibat pemaparan MDMA diantaranya protein p53, Bcl-2, Bcl-xL, dll.

DAFTAR PUSTAKA

1. T.D. Steele, U.D. McCann and G.A. Ricaurte , 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"): pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* 89 (1994), pp. 539–551.
2. Hawari D, *Penyalahgunaan & Ketergantungan NAZA (Narkotika, Alkohol & Zat Adiktif)*, BP UI, Jakarta, 2001.
3. Henry Ja, Jefreys KJ, Dawling S. Toxicity and deaths from 3,4 methylenedioxymethamphetamine (" ecstasy "). *Lancet*. 1992 ; 340 : 384 – 7.
4. C.M. Milroy, J.C. Clark and A.R. Forrest , Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse. *J. Clin. Pathol.* 49 (1996), pp. 149–153.
5. Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-32.
6. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972; 26: 239-57.
7. BaËr PR. Apoptosis, the cell's silent exit. *Life Science* 1996; 59: 369-78.
8. Thatte U, Dahanukar S. Apoptosis, clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs* 1997; 54: 511-32.
9. Pritchard DM, Watson AJM. Apoptosis and gastrointestinal pharmacology. *Pharmacological Therapeutics* 1996; 72: 149-69.
10. Martin SJ. Apoptosis: suicide, execution or murder? *Trends in Cell Biology* 1993; 3: 141-4.
11. Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinions in Cell Biology*

1995; 7: 337-43.

12. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis ± an overview of cell death. *American Journal of Pathology* 1995;146: 3-15.
13. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely divergent stimuli. *Cell Proliferation* 1991; 24: 203-14.
14. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *International Reviews of Experimental Pathology* 1991; 32: 223-54.
15. Bortner CD, Oldenburg NBS, Cedlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 1995; 5: 21-6.
16. Gavrieli Y, Sherman Y, Benasson SA. Identification of programmed cell death in situ via special labelling of nuclear DNA fragments. *Journal of Cell Biology* 1992; 119: 493-501.
17. MacLellan WR, Schneider MD. Death by design ± programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research* 1997; 81: 137-44.
18. Haimovitz-Friedman A, Kan C, Enleiter D, et al. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 1994; 180: 525-35.
19. Santana P, PenÅa LA, Haimovitz-Friedman A, et al. Acid sphingomyelinase deficient lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 1996; 86:189-99.
20. Narula J, Kharbanda S, Khaw B-A. Apoptosis and the heart. *Chest* 1997; 112: 1358-62.
21. Miyashita T, Reed JC. Tumour suppressor p53 is a direct transcriptional activator

- of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-9.
22. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; 356: 215-21.
 23. Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, et al. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO Journal* 1993; 12: 3679-84.
 24. Whyte M. ICE/CED-3 proteases in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 1996; 6: 245-8.
 25. Thornberry NA, Rosen A, Nicholson DW. Control of apoptosis by proteases. *Advances in Pharmacology* 1997; 41:155-77.
 26. Enari M, Hug H, Nagata S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1995; 375: 78-81.
 27. Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *British Medical Bulletin* 1996; 53: 478-90.
 28. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *British Medical Bulletin* 1997; 53: 491-508.
 29. Savill J. Phagocytic docking without shocking. *Nature* 1998; 392: 442-3.
 30. Savitz SI, Daniel BA, Rosenbaum MD. Apoptosis in neurological disease. *Neurosurgery* 1998; 42: 555-72.
 31. Louis J, Magal E, Takayama S, Varon S. CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumour necrosis factor-induced death. *Science* 1993; 259: 689-92.
 32. Choi DW, Malucci-Gedde M, Kriegstein SR. Glutamate neurotoxicity in cortical

cell culture. *Journal of Neuroscience* 1987; 7: 357-68.

33. Tymianski M, Tator CH. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurones: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischaemic central nervous system injury. *Neurosurgery* 1996; 38: 1176-95.
34. Loo D, Copani A, Pike C, Whittemore E, Walencewicz A, Cotman C. Apoptosis is induced by β -amyloid in cultured central nervous system neurones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1993; 90: 7951-5.
35. Lee WD, Colom LV, Xie WJ, Smith RG, Alexianu M, Appel SH. Cell death induced by β -amyloid 1-40 in MES 23.5 hybrid clone: the role of nitric oxide and NMDA-gated Ca^{2+} channel activation leading to apoptosis. *Brain Research* 1995; 686: 49-60.
36. Wu JY, Darras B. Frequency of p53 tumor suppressor gene mutations in human primary brain tumors. *Neurosurgery* 1993 33: 824-30.
37. Clarke MF, Appel IJ, Benedict MA, et al. A recombinant bcl-2 adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1995; 92: 11024-8.
38. Yu J, Sena-Esteves M, Paulus W, Breakfield X, Reeve DS. Retroviral delivery and tetracycline-dependent expression of IL-1 β -converting enzyme (ICE) in a rat glioma model provides controlled induction of apoptotic death in tumor cells. *Cancer Research* 1996; 56: 5423-7.
39. Gamma A. 1998. Footnote on the history of MDMA. *MAPS* 8(1):4.
40. Hardman HF, Hamilton RW, Morse BM, et al. 1973 Relationship of the structure of mescaline and seven analogs to toxicity and behaviour in five species of laboratory animals. *Toxicology and applied Pharmacology* 25:299-309.

41. Grob, CS, Poland, RE, 1997. MDMA. In, Substance Abuse: A Comprehensive Textbook, Third Edition, JH Lowinson, P Ruiz, RB Millman, JG Lanford (Eds), William & Wilkins, Baltimore, pp. 269-275
42. Andrew V, Mas A, Bruguera M, Salmeron JM, et al, 1998 Ecstasy : a Common Cause of severe acute hepatotoxicity. *Journal of Hepatology* 29(3):394-397
43. Bitsch A, Thiel A, Rieckmann P, Prange H. 1996. Acute inflammatory CNS Disease after MDMA ('Ecstasy'). *European Neurology* 36(5):328-329.
44. Hughes JC, McCabe M, Evans RJ. 1993. Intracranial haemorrhage associated with ingestion of 'Ecstasy'. *Archives of Emergency Medicine* 10:372-374.
45. Suarez RV, Riemersma R. 1988. "Ecstasy" and sudden cardiac death. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 9(4):339-341.
46. Levine AJ, Drew S, Rees GM. 1993. 'Ecstasy' induced pneumomediastinum. *Journal of the Royal Society of Medicine* 86:232-233.
47. Marsh JCW, Abboudi ZH, Gibson FM, Scopes J, Daly S, O'Shaunnessy DF, Baughan ASJ, Gordon-Smith EC. 1994. Aplastic anaemia following exposure to 3,4- methylenedioxy-methamphetamine ('Ecstasy'). *British Journal of Haematology* 88:281-285.
48. Podraza J, 2000, MDMA (Ecstasy): Does It Play A Causal Role In Nephropathy? A Review Department of Biological Sciences, Harwick College, Oneonta, New York
49. Green AR, Goodwin GM. 1996. Ecstasy and neurodegeneration. *BMJ* 312:1493-1494.
50. Ricaurte GA, McCann UD. 1994-1995. National Institutes of Health MDMA research controlled study of MDMA's neurotoxic potential in humans. MAPS

5(3):8-9.

51. Simantov R, Tauber M. 1997. The abused drug MDMA (Ecstasy) induces programmed death of human serotonergic cells. *The FASEB Journal* 11:141-146.
52. Wolff K, Hay AWM, Sherlock K, Connor M. 1995. Contents of "ecstasy". *Lancet* 346:1100-1101.
53. Vollenweider, F.X. et al, Physiological and cardiovascular effects and short-term sequelae of MDMA ("ecstasy") in MDMA-naïve healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 19(4):241-51. 1998.
54. Hardman HF, Haavik CO, Seevers MH. 1973. Relationship of the structure of mescaline and seven analogs to toxicity and behavior in five species of laboratory animals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 25:299-309.
55. Shulgin A.T, 1986 The background and chemistry of MDMA, *Journal of Psychoactive Drugs*, 18(4) pp.291-304.
56. Lawn J.C, 1986, Schedules of controlled substance, Sheduling of 3,4-methyldioxymethamphetamine (MDMA) into Schedule I of the controlled substance act, *Federal Register*, 51, pp-3655236560.
57. Ricaute G, Bryan G, Staruss L, et al, 1985 Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals, *Science*, 229, pp 986-988
58. Greer G. 1985. Using MDMA in psychotherapy. *Advances* 2:57-59.
59. Greer G, Strassman R.J. 1985. Information on "Ecstasy." *Am J Psychiatry* 142:1391.
60. Petrouka S.J, 1987 Incidence of recreational use of 3,4-methyldioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) on an undergraduate campus, *New England Journal of Medicine*