

# **Apoptosis Neuron Nukleus Merah pada Tikus Model Penyakit Parkinson Akibat Induksi Parakuat Diklorida**

**(APOPTOSIS RED NUCLEUS NEURONS OF PARKINSON DISEASE RAT MODEL INDUCED BY PARAQUAT DICHLORIDE)**

**Ayu Miftahul Khasanah, Niswah Nurul Fahma,  
Tri Wahyu Pangestiniingsih\***

Departemen Anatomi,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada  
Jl. Fauna No. 2, Kampus UGM, Karangmalang,  
Caturtunggal, Depok, Sleman, Yogyakarta, Indonesia 55281,  
Email: [estifkh@ugm.ac.id](mailto:estifkh@ugm.ac.id)

## **ABSTRAK**

Nukleus merah berperan dalam pengontrolan motorik, sehingga kerusakan atau gangguan pada area ini akan menyebabkan gangguan motorik. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa parakuat diklorida (PQ) dapat menginduksi penyakit Parkinson, suatu penyakit neurodegeneratif yang mempengaruhi substansia nigra pars kompakta dengan gejala klinis berupa gangguan motorik. Apoptosis merupakan proses kematian sel yang terprogram secara fisiologis normal, namun apabila kejadiannya meningkat menggambarkan kematian sel yang progresif. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati terjadinya apoptosis pada neuron NM tikus yang diinjeksi parakuat diklorida. Sepuluh ekor tikus Wistar jantan umur 3 bulan dikelompokkan menjadi dua kelompok masing-masing lima ekor. Kelompok kontrol diberi akuades dan kelompok perlakuan diberi parakuat diklorida dosis 7 mg/kg bb melalui injeksi intraperitoneal dua kali seminggu selama tiga minggu. Hari ke 24 tikus dianestesi dengan ketamin 40 mg/kg BB dan xylazine 5 mg/kg BB, diperfusi, difiksasi dengan paraformaldehid 4%, dan mesensephalon dikoleksi. Selanjutnya mesensephalon diproses untuk pembuatan preparat histologi menggunakan metode parafin, dipotong secara stereologi dengan arah koronal dengan ketebalan 4 µm, kemudian dilakukan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi caspase 3 sebagai penanda apoptosis. Data dianalisis secara deskriptif dan kuantitatif. Hasil pada kedua kelompok menunjukkan neuron NM pada tikus berukuran besar, berbentuk stelat dan fusiformis. Persentase neuron NM pada kelompok perlakuan mengalami kenaikan signifikan (80,4%±13,8%) dibandingkan kelompok kontrol (26,6%±18,32%) (P<0,01). Kesimpulan, terjadi peningkatan apoptosis pada neuron NM akibat paparan parakuat diklorida pada tikus model penyakit Parkinson.

Kata-kata kunci: apoptosis; caspase 3; neuron nukleus merah; parakuat diklorida

## **ABSTRACT**

Red nucleus plays a role in motoric control, so that disturbed of neurons in this nucleus could be affected on motor impairment. Previous study reported that paraquat (PQ) could induced Parkinson disease, a neurodegeneratif disease that affected substantia nigra pars compacta and clinically characterized by motoric disorders. Apoptosis is a programmed cell death that physiologically normal for the body, but in large quantities will cause progressive cell death. This study aimed to observed apoptosis in rats RN neurons following by PQ injection. Ten male Wistar rats with the aged of 3 month, divided into two groups of five. Control group was given aquadest and treatment group was given PQ, injected intraperitoneally, dosage 7 mg/kg BW, twice a week for three weeks. At day 24<sup>th</sup> all rats were anesthetized using ketamin dosage 40 mg/kg BW and xylazine dosage 5 mg/kg BW, perfused intracardially using 4% paraformaldehyde and mesencephalons were collected. Mesencephalons were processed for histological preparations using the paraffin method and cut stereologically in coronal section, in 4 µm thickness. Immunohistochemistry staining was done using caspase 3 antibody as a marker of apoptosis. Data were analyzed descriptively

and quantitatively. The results in both groups showed RN neurons were large size and stelat or fusiform in shape. The percentage of apoptotic neurons in the RN of treatment group was significantly increased ( $80,4\% \pm 13,8\%$ ) compared to the control group ( $26,6\% \pm 18,32\%$ ) ( $P < 0.01$ ). In conclusion, following PQ exposure there is a significant increased of apoptosis neurons number in the RN of rat model of Parkinson disease.

Keywords: apoptosis; caspase 3; paraquat dichloride; red nucleus neurons

## PENDAHULUAN

Nukleus merah (NM) merupakan kelompok neuron yang berukuran besar dan secara anatomi terletak di ventromedial mesencephalon (Martinez-Lopez *et al.*, 2015). Posisi NM berbatasan dengan nukleus parabrachial pigmented dan medial *lemniscus* di bagian bawah, dengan nukleus medial aksesoris okulomotor di bagian kanan, dengan nukleus *Cajal Shell* interstitial di bagian atas, serta dengan medial *lemniscus* dan nukleus retroethmoid di bagian kiri (Paxinos dan Watson, 2007). Nukleus merah terdiri atas dua bagian yaitu nukleus merah pars magnocellularis (NMPM) dan nukleus merah pars parvocellularis (NMPP). Pada mamalia NMPM berada di area kaudal sedangkan NMPP di area rostral (Paul dan Gould, 2010). Neuron pada NMPM berukuran besar dengan bentuk multipolar (Crumble, 2020), sedangkan NMPP berukuran medium hingga kecil berbentuk stelat atau fusiformis (Massion, 1967). Secara fisiologis NM berperan dalam pengaturan sistem motorik (Ding *et al.*, 2018). Neuron pada area NMPM menerima input afferen dari nukleus bagian dalam serebelum (nukleus interpositus) untuk diproyeksikan menuju medulla spinalis melalui traktus rubrospinal, sedangkan neuron di area NMPP menerima input afferen dari nukleus bagian dalam serebelum (nukleus dentatus) untuk diproyeksikan ke nukleus olivari inferior secara ipsilateral membentuk sistem olivocerebellar (Cacciola *et al.*, 2019). Traktus rubrospinal berperan penting dalam pengaturan motorik pada ekstremitas anterior (Jang dan Kwon, 2015), sedangkan sistem olivocerebellar berpartisipasi langsung dalam pengaturan motorik yang dikeluarkan oleh serebelum (Lang *et al.*, 2017).

Fungsi normal neuron NM dalam pengaturan motorik menyebabkan terjadinya gangguan motorik apabila terjadi kerusakan pada neuron tersebut. Neuron pada NM dan serebelum secara independen memainkan peran dalam gejala motorik pada penyakit Parkinson (Bonnet *et al.*, 2018), yaitu suatu penyakit

neurodegeneratif yang ditandai dengan gangguan motorik berupa kelambatan bergerak (bradikinesia), *resting tremor*, dan ketidakstabilan postur tubuh (Caudle *et al.*, 2012). Penyakit Parkinson merupakan penyakit neurodegenerative yang memiliki prevalensi tertinggi kedua setelah penyakit alzheimer (Deng *et al.*, 2018). Angka kejadian PP di Amerika Utara sebanyak 20 pasien per 100.000 penduduk, sedangkan di Indonesia pada tahun 2005 sebesar 90.000 orang dan di tahun 2030 diperkirakan akan meningkat dua kali lipatnya (Hanriko dan Anzani, 2018; Muliawan *et al.*, 2018). Penurunan neuron dopaminergik di substansia nigra menjadi karakteristik PP yang salah satunya disebabkan oleh substansi neurotoksik seperti paraquat diklorida, rotenon, maneb, dan MPTP (Bertabet *et al.*, 2002; Uversky, 2004).

Paraquat diklorida (PQ) adalah salah satu jenis herbisida yang sangat beracun dan berbahaya karena bersifat karsinogenik (Arfi *et al.*, 2015). Penggunaan PQ dapat menyebabkan kerusakan pada susunan saraf pusat (Windarti *et al.*, 2015). Toksisitas PQ pada PP menurut Bertabet *et al.* (2002) mirip dengan toksisitas akibat MPTP yaitu menyebabkan terjadinya stres oksidatif karena mengganggu respirasi sel di mitokondria. Penelitian Adi *et al.* (2018), melaporkan bahwa induksi PQ dengan dosis 7 mg/kg BB menyebabkan penurunan neuron dopaminergik di substansia nigra sebanyak 53%. Stres oksidatif dapat menyebabkan terjadinya apoptosis yaitu proses kematian sel secara terprogram dalam situasi tertentu (Anita *et al.*, 2014). Apoptosis ditandai dengan teraktivitasnya caspase 3 sebagai eksekutor utama (Dos-santos *et al.*, 2017) sehingga pewarnaan imunohistokimia (IHC) menggunakan antibodi caspase 3 dapat menjadi penanda terjadinya apoptosis pada sel (Bressenot *et al.*, 2009)

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kerusakan neuron NM pada hewan model PP yang ditandai berupa peningkatan neuron yang mengalami apoptosis melalui teknik pewarnaan *immunohistochemistry*/IHC menggunakan antibodi caspase 3.

## METODE PENELITIAN

Hewan coba yang digunakan adalah 10 ekor tikus Wistar jantan umur tiga bulan. Bahan yang digunakan antara lain *paraquat diklorida*, aquadest pro injection, otak tikus putih, ketamin, xylazin, larutan NaCl fisiologis, larutan etanol bertingkat, xylol, akuades, parafin cair, *phosphate buffer saline* (PBS), PBS paraformaldehid 4%, antibodi primer *caspase 3* (1:100; Booster immunoleader Cat No: PA 1302-2), kit *Star Trek Universal HRP Detection System*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dan entelan. Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain infus set, gunting, forsep, pinset, *blade* dan *scalpel*, kotak lembap, pot jaringan, kertas tisu, mikropipet, parafilm, *staining jar*, gelas beker, *microtome rotary*, inkubator, *slide warmer*, gelas objek, *deck glass* dan mikroskop.

Sebanyak 10 ekor tikus dikelompokkan menjadi dua, yaitu kelompok kontrol yang diinjeksi dengan aquadest pro injektion dan kelompok perlakuan yang diinjeksi dengan paraquat diklorida dosis 7 mg/kg BB. Keduanya diinjeksikan secara intraperitoneal dua kali seminggu selama tiga minggu. Hari ke-24 semua tikus dianestesi dengan ketamin dosis 40 mg/kg BB dan xylazine dosis 5 mg/kg BB, dikorbankan nyawanya, diperfusi, difiksasi dengan PBS paraformaldehid 4%, mesensephalon yang telah dikoleksi dan diproses untuk pembuatan preparat histologi menggunakan metode parafin. Potongan blok parafin mesensephalon mulai dari cranial, secara serial stereologi sesuai metode Boyce *et al.* (2010), ketebalan 4 µm, sayatan ke-11 digunakan sebagai sayatan awal kemudian diambil 10 sayatan dengan interval 204 µm. Metode koleksi sampel dan pemotongan preparat ini telah dilaporkan oleh Adi *et al.* (2018) dengan perbedaan pada sayatan organ yang diteliti yaitu area neuron NM dan antibodi yang dipakai untuk pewarnaan IHC yaitu antibodi caspase-3. Teknik koleksi sampel pada hewan coba telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada dengan nomor 00018/04/LPPT/V/2016.

Potongan organ pada gelas objek diinkubasi semalam pada suhu 45°C. Proses selanjutnya yaitu deparafinisasi menggunakan xylol I, II, III masing-masing selama lima menit. Selanjutnya dilakukan proses rehidrasi menggunakan etanol absolut I dan II, 90% I dan II, 80%, dan 70% masing-masing selama lima

menit. Setelah itu slide jaringan dicelupkan, hingga etanol hilang. Kemudian dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Proses selanjutnya adalah pembukaan epitop dengan merendam slide jaringan menggunakan sitrat buffer (pH 6.0) mendidih kemudian diinkubasikan selama satu jam pada suhu 60°C kemudian didinginkan pada suhu ruang selama satu jam. Slide jaringan dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Proses selanjutnya adalah *blocking* enzim peroksidase menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dalam aquades selama tiga puluh menit. Slide jaringan dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Proses selanjutnya adalah *blocking background* dengan menggunakan Sniper selama 60 menit, kemudian dilanjutkan dengan pemberian antibodi primer caspase 3 (1:100; Booster immunoleader Cat No: PA 1302-2) yang diinkubasi selama dua malam dengan suhu 4°C. Slide organ kemudian dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Proses selanjutnya yaitu pemberian antibodi sekunder Trekkie Universal Link selama 60 menit. Slide jaringan dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Kemudian ditetesi TrekAvidin-HRP selama 60 menit. Slide jaringan dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama lima menit. Selanjutnya ditetesi dengan larutan *Betazoid DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)* yang dicampur dengan substrat ditunggu selama lima menit pada kondisi gelap. Slide jaringan dicuci dengan aquades hingga bersih. Proses selanjutnya slide jaringan diwarnai dengan hematoksilin selama satu menit sebagai *counter stain*, kemudian dicuci dengan aquades sebanyak tiga kali masing-masing selama satu menit. Setelah itu slide jaringan dicuci dengan air mengalir selama lima menit dan dicuci kembali dengan aquades selama dua menit. Tahap akhir pewarnaan yaitu dilakukan dehidrasi dengan merendam slide jaringan dalam etanol 70%, 80%, 90%, etanol absolut I dan etanol absolut II masing-masing selama satu menit. Kemudian dilakukan proses *clearing* dengan menggunakan xylol I, II, dan III masing-masing selama dua menit. Tahap akhir yaitu dilakukan proses *mounting* yang bertujuan sebagai pelindung dan pengawet jaringan menggunakan entelan kemudian ditutup dengan *deck glass*.

Preparat yang telah diwarnai kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya.

Pengamatan area NM berdasarkan letaknya pada *Figure 76* sampai *Figure 86* seperti yang digambarkan oleh Paxinos dan Watson (2007). Setiap sampel mesencephalon rata-rata terdapat 4-5 area NM. Sepuluh bidang pandang foto dengan perbesaran 10 x 40 kali diambil dari setiap sampel. Pengamatan hasil pewarnaan meliputi morfologi neuron dan perhitungan neuron NM yang imunoreaktif terhadap caspase 3 (NM Casp-3-Imunoreaktif). Neuron NM Casp-3-Imunoreaktif (NM Casp-3-IR) ditunjukkan adanya neuron berwarna coklat kekuningan, sedangkan neuron NM Casp-3-nonImunoreaktif (NM Casp-3-nonIR) berwarna biru. Data jumlah neuron yang mengalami apoptosis dinyatakan sebagai proporsi (persentase) jumlah neuron NM Casp-3-IR dibandingkan dengan jumlah seluruh neuron NM per bidang pandang. Contoh perhitungan untuk kelompok kontrol yaitu dari 12 neuron NM dalam satu bidang pandang terdapat tiga neuron NM Casp-3-IR, sehingga diperoleh persentase jumlah neuron NM Casp-3-IR sebesar 25%. Contoh perhitungan untuk kelompok perlakuan yaitu dari 11 neuron NM dalam satu bidang pandang terdapat 9 NM Casp-3-IR, sehingga diperoleh persentase jumlah neuron NM Casp-3-IR sebesar 82%. Hasil pengamatan morfologi neuron NM dianalisis secara diskriptif, dilanjutkan analisis secara kuantitatif pada hasil perhitungan neuron NM Casp-3-IR dengan *software* SPSS versi 16. Analisis menggunakan uji normalitas dan uji homogenitas, kemudian dilanjutkan dengan *independent t-test*.

## HASIL PEMBAHASAN

Pada penelitian ini teramati bahwa neuron NMPM berukuran besar (Gambar 1.) dan neuron NMPP berukuran medium dan kecil (Gambar 3.). Gambaran mikroskopik bentuk neuron NM ini memiliki kesamaan dengan mamalia, pada neuron NMPM berbentuk multipolar, sesuai dengan pendapat Crumble (2020) sedangkan pada neuron NMPP berbentuk stelat atau fusiformis (Massion, 1964).

Terlihat adanya perbedaan gambaran pewarnaan IHC dengan antibodi caspase 3 pada kelompok kontrol yang diinjeksi akuades (Gambar 2.) dengan kelompok perlakuan yang diinjeksi parakuat diklorida dosis 7 mg/kg BB (Gambar 1. dan Gambar 3.). Pada kelompok kontrol terlihat dominasi neuron NM Casp-3-nonIR digambarkan dengan warna neuron NM

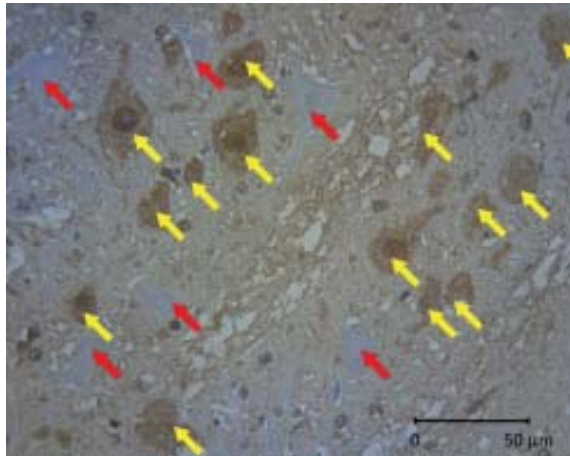
biru. Pewarnaan pada kelompok perlakuan menunjukkan dominasi neuron NM Casp-3-IR ditandai dengan munculnya warna coklat akibat adanya ikatan antara caspase 3 yang berada dalam neuron NM dengan antibodi caspase 3 yang digunakan dan divisualisasikan oleh kromogen DAB.

Warna coklat muncul pada sitoplasma, nukleus, serta dendrit neuron NM diartikan sebagai adanya akumulasi caspase 3 dalam neuron NM yang menjadi penanda proses apoptosis. Pada kelompok perlakuan meskipun didominasi neuron NM Casp-3-IR, tetapi ada juga neuron NM Casp-3-nonIR menandakan masih ada neuron NM yang tidak apoptosis.

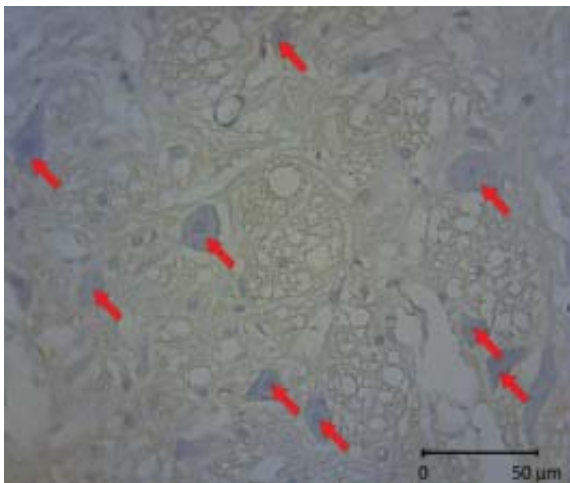
Hasil perhitungan persentase jumlah neuron NM Casp-3-IR pada kelompok kontrol pada masing-masing hewan yaitu 20%, 24%, 21%, 10%, dan 58% (Tabel 1.), sedangkan pada kelompok perlakuan yaitu 65%, 92%, 86%, 93%, dan 66% (Tabel 2.) dengan rerata persentase jumlah neuron NM Casp-3-IR untuk kelompok kontrol sebesar  $26,6\% \pm 18,32\%$ , dan kelompok perlakuan sebesar  $80,4\% \pm 13,8\%$ .

Pada penelitian ini teramati apoptosis neuron NM pada kelompok kontrol sebesar  $26,6\% \pm 18,32\%$ . Hal ini menunjukkan bahwa apoptosis terjadi pada hewan sehat (tidak diberi PQ), sesuai dengan pendapat Choudhury *et al.* (2012) bahwa apoptosis sebagai proses kematian sel yang terprogram merupakan kondisi biologis normal.

Data persentase jumlah neuron pada kelompok perlakuan menunjukkan adanya neuron NM Casp-3-nonIR (Tabel 2.), hal tersebut menunjukkan bahwa pada tikus yang diberi PQ ada juga neuron NM yang tidak mengalami apoptosis. Besarnya dosis dan lamanya waktu pemberian parakuat diklorida dapat menjadi faktor-faktor penyebab peningkatan apoptosis. Data yang diperoleh kemudian dilakukan uji normalitas dengan Shappiro-Wilk menggunakan SPSS Versi 16. Didapatkan hasil uji homogenitas dengan nilai signifikansi 0,911 ( $P > 0,05$ ) berarti dapat diasumsikan bahwa data homogen. Kemudian dilanjutkan dengan uji normalitas, didapatkan hasil pada hewan kontrol dengan nilai signifikansi 0,088 ( $P > 0,05$ ) dan hewan perlakuan dengan nilai signifikansi 0,089 ( $P > 0,05$ ) berarti dapat diasumsikan bahwa data normal. Selanjutnya hasil analisis menggunakan *independent t-test* menunjukkan perbedaan yang signifikan yaitu 0,001 ( $P < 0,01$ ), persentase neuron yang mengalami apoptosis pada kelompok perlakuan lebih besar

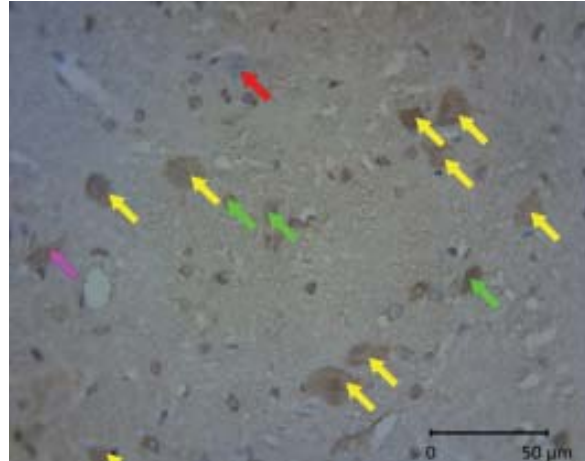


Gambar 1. Gambaran histologi neuron nukleus merah pars magnoselularis tikus kelompok perlakuan dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi caspase 3. Terlihat neuron berukuran besar dengan bentuk multipolar (panah kuning dan merah). Neuron imunoreaktif terhadap caspase 3 (panah kuning) berwarna coklat menandakan adanya proses apoptosis, dan neuron yang tidak imunoreaktif terhadap caspase 3 (bintang satu) berwarna biru menandakan tidak adanya proses apoptosis.



Gambar 2. Gambaran histologi neuron nukleus merah tikus kelompok kontrol dengan pewarnaan imunohisto-kimia menggunakan antibodi caspase 3. Terlihat neuron yang tidak imunoreaktif terhadap caspase 3 berwarna biru (panah merah) menandakan tidak adanya proses apoptosis.

dibandingkan dengan kelompok kontrol. Perbedaan tersebut membuktikan bahwa pada tikus kelompok perlakuan proporsi neuron yang mengalami apoptosis lebih tinggi akibat pemberian PQ, dibandingkan dengan terjadinya apoptosis pada kelompok kontrol. Sesuai dengan



Gambar 3. Gambaran histologi neuron nukleus merah pars parvoselularis tikus kelompok perlakuan dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi caspase 3. Neuron NMPP berukuran kecil (bintang dua ungu) dan medium (bintang dua merah) dengan bentuk stelat (panah hijau) dan fusiformis (panah kuning, ungu dan merah). Terlihat neuron imunoreaktif terhadap caspase3 berwarna coklat (panah kuning, hijau dan ungu) menandakan adanya proses apoptosis, dan neuron yang tidak imunoreaktif terhadap caspase 3 berwarna biru (panah merah) menandakan tidak adanya proses apoptosis.

pendapat Berry *et al.* (2010) bahwa PQ digolongkan sebagai obat sitotoksik yang menjadi salah satu stimuli terjadinya apoptosis melalui jalur intrinsik. Secara spesifik PQ akan mengoksidasi bentuk sitosolik dari tioredoxin dan mengaktifasi JNK dan caspase 3. Parakuat diklorida menyebabkan toksisitas seluler yang diakibatkan oleh terjadinya stress oksidatif. Melalui sistem transport asam amino netral PQ dapat mencapai jaringan otak, kemudian terlibat dalam siklus reduksi-oksidasi membentuk *reaktive oxyn spesies* (ROS) intraseluler mengakibatkan stres oksidatif.

Caspase (*cysteinyl aspartate-specific protease*) merupakan senyawa untuk inisiasi dan perkembangan apoptosis, terdiri atas caspase inisiator (Caspase 8, Caspase 9, Caspase 10) dan caspase eksekutor (Caspase 3, Caspase 6, dan Caspase 7) (Dos Santos *et al.*, 2017). Caspase 3 merupakan eksekutor utama dalam proses apoptosis. Stres oksidatif yang tinggi menyebabkan terjadinya peningkatan permeabilitas mitokondria, sehingga sitokrom c pada intermembran mitokondria dikeluarkan ke dalam sitosol (Anita *et al.*, 2014). Menurut

Tabel 1. Rata-rata persentase jumlah neuron nukleus merah pada kelompok hewan kontrol (diinjeksi *aquades pro injection*) dengan teknik pewarnaan IHC menggunakan antibodi caspase 3.

Bidang pandang ke-	Hewan 1 Hewan 2 Hewan 3 Hewan 4 Hewan 5					Rata-rata
	Persentase (%)					
1	0	60	0	0	96	
2	0	37	0	4	100	
3	18	0	0	32	0	
4	0	9	0	0	12	
5	0	25	0	0	32	
6	13	50	0	0	74	
7	26	22	0	0	39	
8	14	31	92	13	84	
9	67	9	100	44	67	
10	60	0	18	8	78	
Rata-rata	20	24	21	10	58	26,6 ± 18,32

Tabel 2. Rata-rata jumlah neuron nukleus merah pada kelompok hewan perlakuan (diinjeksi parakuat diklorida) dengan teknik pewarnaan IHC menggunakan antibodi caspase 3.

Bidang pandang ke-	Hewan 1 Hewan 2 Hewan 3 Hewan 4 Hewan 5					Rata-rata
	Persentase (%)					
1	40	92	100	100	45	
2	0	96	38	90	17	
3	89	95	89	76	83	
4	19	97	89	91	95	
5	94	93	76	77	100	
6	87	92	83	98	90	
7	100	96	100	95	68	
8	95	82	100	98	78	
9	71	84	100	100	69	
10	55	96	82	100	11	
Rata-rata	65	92	86	93	66	80,4 ± 13,8

Hasan *et al.*, (2014) terjadinya reaksi antara sitokrom c, *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1), dATP, dan caspase 9 membentuk apoptosome. Procaspase 9 dirubah menjadi caspase 9 yang mengaktifkan caspase 3 untuk memecah protein menyebabkan kematian sel (Pfeffer and Singh, 2018). Selain sitokrom c, *Apoptosis inducing factor* (AIF) dan Smac/DIABLO juga dikeluarkan dari intramembran mitokondria (Pfeffer and Singh, 2018). *Apoptosis inducing factor* (AIF) menyebabkan fragmentasi DNA, sedangkan Smac/DIABLO mengikat inhibitor apoptosis (XIAP) menyebabkan XIAP terlepas dari procaspase 3, sehingga procaspase tiga dapat mengaktifkan caspase 3 menyebabkan apoptosis (Anita *et al.*, 2014).

Menurut Martinez-Lopez *et al.* (2015) neuron NM berperan dalam fungsi motorik, sehingga apoptosis neuron NM yang sangat tinggi dikarenakan pemberian parakuat diklorida dapat menyebabkan gangguan motorik. Menurut Yulianti *et al.* (2016), paparan neurotoksin seperti induksi parakuat diklorida dapat menyebabkan PP. Penyakit Parkinson memiliki ciri spesifik terjadinya kerusakan pada substansia nigra pars kompakta (Alves da Costa dan Checler, 2011), dan perubahan substansia nigra akibat induksi PQ dengan dosis dan waktu yang sama dengan penelitian ini dilaporkan oleh Adi *et al.* (2018). Diduga pada penelitian ini terjadinya peningkatan apoptosis pada tikus yang diberi

PQ karena terjadinya gangguan pada respirasi sel yang mengakibatkan stres oksidatif.

### SIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu terjadi peningkatan apoptosis pada neuron nukleus merah akibat paparan paraquat diklorida pada tikus model penyakit Parkinson.

### SARAN

Caspase terdiri atas caspase inisiator dan eksekutor dalam proses apoptosis, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai proses apoptosis yang lebih lengkap dengan menggunakan antibodi caspase yang lain seperti caspase 8, 9, atau 10.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Universitas Gadjah Mada yang telah mendanai dan memfasilitasi pelaksanaan penelitian melalui dana Peneliti Unggulan Perguruan Tinggi Tahun 2016 dan dana Penelitian Kompetitif 2017 Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada.

### DAFTAR PUSTAKA

- Adi YK, Widayanti R, Pangestiniingsih TW. 2018. N-Propranol Extract of Boiled and Fermented Koro Benguk (*Mucuna Pruriens* Seed) Shows A Neuroprotective Effect in Paraquat Dichloride-Induced Parkinson's Disease Rat Model. *Vet World* 11(9): 1250–1254.
- Alves da Costa C, Checler F. 2011. Apoptosis in Parkinson's Disease: Is P53 The Missing Link Between Genetic and Sporadic Parkinsonism?. *Cell Signal* 23(6): 963–968.
- Anita, Sharma HP, Jain P, Amit P. 2014. Apoptosis (Programmed Cell Death) - A Review. *World J Pharm Research* 3(4): 1854-1872.
- Arfi F, Safni S, Abdullah, Z. 2017. Degradasi Senyawa Paraquat Dalam Pestisida Gramoxone Secara Sonolisis dengan Penambahan ZnO. *Lantanida J* 3(1): 71.
- Berry C, La Vecchia C, Nicotera P. 2010. Paraquat and Parkinson's Disease. *Cell Death Differ* 17(7): 1115–1125.
- Bertarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT (2002) Animal models of Parkinson's disease. *Bioassays* 24: 308–318
- Bonnet A, Sanford R, Riou A, Drapier S, Jeune FL, Vérin M, Rennes DLC. 2018. Parkinson's Disease Motor Symptoms are Linked to Red Nucleus Volume and Cerebellar Metabolism. *Mov Disord (Suppl 2.)* 33: 1–2.
- Boyce RW, Dorph-Petersen AK, Lyck L, Gundersen HJG. 2010. Design-based stereology: Introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicol Pathol* 38(7): 1011-1025.
- Bressenot A, Marchal S, Bezdetnaya L, Garrier J, Guillemin F, Plénat F. 2009. Assessment of Apoptosis by Immunohistochemistry to Active Caspase-3, Active Caspase-7, or Cleaved PARP in Monolayer Cells and Spheroid and Subcutaneous Xenografts of Human Carcinoma. *J Histochem Cytochem* 57(4): 289–300.
- Cacciola A, Milardi D, Basile GA, Bertino S, Calamuneri A, Chillemi G, Paladina G, Impellizzeri F, Trimarchi F, Anastasi G, Bramanti A, Rizzo G. 2019. The Cortico-Rubral And Cerebello-Rubral Pathways Are Topographically Organized Within The Human Red Nucleus. *Sci Rep* 9(1): 1–12.
- Caudle WM, Guillot TS, Lazo CR, Miller GW. 2012. Industrial Toxicants and Parkinson's Disease. *Neurotoxicol* 33(2): 178–188.
- Choudhury JD, Kumar S, Mayank V, Mehta J, Bardalai D. 2012. A Review on Apoptosis & Its Different Pathway. *Int J Biol Phar Res* 3(7): 848–861.
- Crumble L. 2020. Red Nucleus. <http://www.kenhub.com/en/library/anatomy/red-nucleus>. [Akses: 3 Mei 2020].
- Deng H, Wang P, Jankovic J. 2018. The Genetics of Parkinson Disease. *Ageing Res Rev* 42: 72–85.
- Ding CP, Guo YJ, Li HN, Wang JY, Zeng XY. 2018. Red Nucleus Interleukin-6 Participates in the Maintenance of Neuropathic Pain Through JAK/STAT3 and

- ERK Signaling Pathways. *Exp Neurol* 300: 212–221.
- Dos Santos NFG, Silva RF, Pinto MMPL, Da Silva EB, Tasat DR, Amaral A. 2017. Active Caspase-3 Expression Levels as Bioindicator of Individual Radiosensitivity. *An Acad Bras Cienc* 89(1): 649–659.
- Hanriko R, Anzani BP. 2018. Penyakit Parkinson: Ancaman Kesehatan bagi Komunitas Pertanian. *J Agromed* 5: 508–512.
- Jang SH, Kwon HG. 2015. Change of Neural Connectivity of the Red Nucleus in Patients with Striatocapsular Hemorrhage: A Diffusion Tensor Tractography Study. *Neural Plasticity*, Article ID 679815, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/679815>
- Lang EJ, Apps R, Bengtsson F, Cerminara NL, Zeeuw CID, Ebner TJ, Heck DH, Jaeger D, Jorntell H, Kawato M, Otis TS, Ozyildirim O, Popa LS, Reeves AMB, Schweighofer N, Sugihara I, Xiao J. 2017. The Roles of the Olivocerebellar Pathway in Motor Learning and Motor Control A Consensus Paper. *Cerebell* 16(1): 230-252.
- Martinez-Lopez JE, Moreno-Bravo JA, Madrigal MP, Martinez S, Puellas E. 2015. Red Nucleus and Rubrospinal Tract Disorganization in the Absence of Pou4f1. *Front Neuroanat* 9: 1–8.
- Massion J. 1967. The Mammalian Red Nucleus. *Physiol Rev* 47(3): 383–436.
- Muliawan E, Jehosua S, Tumewah R,. 2018. Diagnosis dan Terapi Deep Brain Simulation Pada Penyakit Parkinson. *J Sinaps* 1(1): 67-84.
- Paul G, Gould DJ. 2010. The Red Nucleus: Past, Present, and Future. *Neuroanat* 9: 1–3.
- Paxinos G, Watson C. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London. Elsevier Inc. Gruber. Hlm. 76-86.
- Pfeffer CM, Singh ATK. 2018. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci* 19(2): 448. <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>.
- Uversky VN. 2004. Neurotoxicant-Induced Animal Models of Parkinson's Disease: Understanding The Role Of Rotenone, Maneb and Paraquat in Neurodegeneration. *Cell Tissue Res* 318(1): 225–241.
- Windarti I, Widayana IGE, Muhartono. 2015. Effect Paraquat Dichloride Herbicides Orally on the Stage of Esophagus Damage in Male Rats *Jurnal Kedokteran Unila* 5(9): 9–12.
- Yulianti AB, Irasanti SN, Maulida M, Kusmiati M, Rahmatullah AP. 2016. Deteksi Dini Penyakit Parkinson: Pengetahuan, Sikap, dan Perilaku Petani Desa Tanjung Wangi Cicalengka Mengenai Bahaya Pestisida bagi Kesehatan. *Glob Med Health Com* 4(1): 16.