

## Efek Neuroprotektif Vitamin D<sub>3</sub> terhadap Jumlah Sel Purkinje Cerebellum yang Diinduksi Etanol

### *Neuroprotective Effect of Vitamin D3 on Number of Cerebellar Purkinje Cells Induced By Ethanol*

Junaedy Yunus<sup>1</sup>, Dwi Cahyani Ratna Sari<sup>1</sup>

Bagian Anatomi, Embriologi, dan Antropologi, Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta.

E-mail: dokterjun\_fkugm@yahoo.com

#### Abstrak

Vitamin D<sub>3</sub> dapat bertindak sebagai antioksidan yang melindungi neuron terhadap kerusakan disebabkan stres oksidatif. Efek neurotoksik yang dimediasi oleh meningkatnya stress oksidatif dapat disebabkan oleh etanol. Otak kecil adalah salah satu daerah otak yang paling sensitif terhadap efek neurotoksik yang disebabkan oleh etanol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek neuroprotektif vitamin D<sub>3</sub> untuk mencegah penurunan jumlah sel Purkinje cerebellum terhadap efek neurotoksik diinduksi etanol. Lima belas jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) dibagi secara acak menjadi tiga kelompok. Kelompok kontrol diberi larutan garam normal, kelompok etanol diberi larutan etanol 20% dengan dosis 3 g / kg BB / hari dan vitamin D3 kelompok diberikan vitamin D3 1 µg / kg BB / hari dalam etanol 20% solusi dengan dosis 3 g / kg BB / hari, intraperitoneal. Setelah 30 hari perlakuan, tikus perfusi dan otak kecil itu dibedah untuk persiapan histologis. Pewarnaan histologi dengan violet cresyl dengan metode fractionator. Hasil penelitian menunjukkan jumlah sel Purkinje cerebellum kelompok etanol (744,552 ± 208.172,22) lebih kecil dari kelompok kontrol (957,240 ± 160.353,03) dan vitamin D3 (983,448 ± 152.387,49), tetapi secara statistik tidak berbeda bermakna (p> 0,05) jumlah sel Purkinje cerebellum antara ketiga kelompok. Disimpulkan bahwa vitamin D3 belum terbukti memiliki efek neuroprotektif untuk mencegah penurunan jumlah sel Purkinje cerebellum disebabkan oleh pemberian etanol selama 30 hari.

Kata kunci: vitamin D3, etanol, stres oksidatif, Purkinje, fractionator

#### Abstract

*Vitamin D<sub>3</sub> can act as an antioxidant that protects neurons against damage caused by oxidative stress. Neurotoxic effects that are mediated by increased oxidative stress can be induced by the ethanol. Cerebellum is one of the brain regions most sensitive to neurotoxic effects induced by the ethanol. The purpose of this study was to determine the neuroprotective effects of vitamin D<sub>3</sub> to prevent the decrease in the number of cerebellar Purkinje cells to the neurotoxic effects induced by ethanol. Fifteen male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were randomly divided into three groups. The control group was given normal saline solution; the ethanol group was given 20% ethanol solution at a dose of 3 g/kg BW/day; and the vitamin D<sub>3</sub> group was given vitamin D<sub>3</sub> 1 µg/kg BW/day in 20% ethanol solution at a dose of 3 g/kg BW/day, intraperitoneally. After 30 day treatment, the rats were perfused and the cerebellum was dissected for histological preparations. Histological staining with cresyl violet was performed to assess the number of cerebellar Purkinje cells by the method of fractionator. The results showed the number of cerebellar Purkinje cells in the ethanol group (744.552 ± 208.172,22) was less than the control group (957.240 ± 160.353,03) and vitamin D<sub>3</sub> (983.448 ± 152.387,49), but statistically not significant difference (p>0.05) on the number of cerebellar Purkinje cells among the three groups. It can be concluded that vitamin D<sub>3</sub> had not been proven for its neuroprotective effect to prevent the decrease in the number of cerebellar Purkinje cells caused by ethanol administration for 30 days.*

Key words: vitamin D<sub>3</sub>, ethanol, oxidative stress, Purkinje, fractionators

## PENDAHULUAN

Vitamin D<sub>3</sub> merupakan vitamin larut lemak yang dimetabolisme oleh tubuh menjadi bentuk aktif yang memiliki berbagai efek biologis, termasuk di antaranya adalah efek klasik vitamin D<sub>3</sub> sebagai regulator dalam metabolisme kalsium.<sup>1</sup> Telah banyak dilaporkan berbagai efek non-klasik vitamin D<sub>3</sub>, meliputi sebagai regulator dalam sekresi hormon, fungsi imun dan proses proliferasi dan diferensiasi sel.<sup>2</sup> Vitamin D<sub>3</sub> juga dilaporkan berperan sebagai antioksidan membran yang melindungi neuron terhadap kerusakan akibat stres oksidatif.<sup>3</sup> Vitamin D<sub>3</sub> terakumulasi pada membran sel dan menurunkan peroksidasi lipid.<sup>4</sup> Penelitian Lin *et al.* (2003),<sup>5</sup> menunjukkan bahwa vitamin D<sub>3</sub> memiliki efek neuroprotektif terhadap apoptosis yang diinduksi oleh *zinc* pada substansia nigra, sedangkan penelitian Landfield dan Cadwallader-Neal (1998),<sup>6</sup> menunjukkan bahwa pemberian terapi jangka panjang dengan calcitriol (1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>) menghambat penurunan kepadatan neuron hippocampus akibat proses penuaan. Penelitian Sardar *et al.* (1996),<sup>7</sup> menyebutkan bahwa fungsi vitamin D<sub>3</sub> sebagai antioksidan lebih poten daripada vitamin E.

Proses apoptosis yang dimediasi oleh adanya peningkatan stres oksidatif dapat diinduksi oleh berbagai jenis induser, antara lain stimuli fisiologis, kondisi patologis, pestisida, obat-obatan, dan lain-lain.<sup>8</sup> Etanol merupakan salah satu senyawa yang telah banyak dikenal dapat menimbulkan efek neurotoksik yang dapat menginduksi apoptosis neuron otak akibat peningkatan stres oksidatif.<sup>9</sup>

Sampai saat ini minuman beralkohol masih banyak dikonsumsi secara luas di seluruh dunia, walaupun konsumsi berlebihan dalam jangka waktu lama telah dilaporkan dapat menyebabkan keru-

sakan organ permanen atau bahkan kematian.<sup>10</sup> Menurut laporan WHO (2004),<sup>11</sup> tren konsumsi alkohol per kapita penduduk Indonesia dewasa (berusia lebih dari 15 tahun) dalam 40 tahun terakhir cenderung terus meningkat. Pada tahun 1961, tingkat konsumsi alkohol sebesar 0,02 liter, dan pada tahun 2001 meningkat 5 kali lipatnya, yaitu sebesar 0,1 liter.<sup>11</sup>

Banyak penelitian menunjukkan efek neurotoksik etanol pada sistem saraf pusat, baik yang sudah dewasa ataupun yang sedang berkembang.<sup>12</sup> Kerusakan akibat etanol pada otak dewasa menyebabkan defisit kognitif seperti gangguan belajar dan memori.<sup>13</sup> Sedangkan konsumsi etanol selama periode kehamilan dan laktasi dapat menyebabkan disfungsi otak janin dengan cara menginduksi apoptosis neuron otak.<sup>10,14</sup> Bagaimana mekanisme etanol menginduksi apoptosis neuron otak masih belum begitu jelas.<sup>10</sup> Beberapa peneliti mengaitkannya dengan stres oksidatif yang menginduksi terbentuknya radikal bebas yang menyebabkan kerusakan dan kematian sel.<sup>9, 15</sup>

Konsentrasi antioksidan yang rendah menyebabkan jaringan otak rentan terhadap kerusakan akibat adanya stres oksidatif. Cerebellum dan hippocampus merupakan bagian otak yang paling rentan terhadap kerusakan oleh stres oksidatif karena bagian tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang rendah.<sup>16</sup> Banyak penelitian sebelumnya menunjukkan adanya penurunan secara signifikan jumlah sel Purkinje cerebellum yang diinduksi oleh pemberian etanol.<sup>17,18,19,20</sup> Beberapa penelitian menunjukkan pemberian suplemen antioksidan dapat mengurangi efek neurotoksik etanol.<sup>9,10</sup> Efek neuroprotektif vitamin D<sub>3</sub> terhadap kerusakan neuron akibat stres oksidatif yang diinduksi oleh etanol perlu

diteliti lagi untuk membuktikan peran vitamin D<sub>3</sub> sebagai antioksidan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek neuroprotektif vitamin D<sub>3</sub> untuk mencegah penurunan jumlah sel Purkinje cerebellum terhadap efek neurotoksik yang diinduksi oleh etanol.

## BAHAN DAN CARA

Subyek penelitian yang digunakan adalah 15 ekor tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan berusia 2 bulan dengan berat badan  $\pm 200$  gram. Hewan coba diperoleh dari Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Semua subyek dipelihara di kandang berukuran 40 x 30 x 15 cm<sup>3</sup> dan ditutup dengan anyaman kawat. Masing-masing kandang berisi 1 ekor tikus. Subyek diberi makanan dan minuman dalam jumlah *ad libitum*.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan rancangan *post-test only control group design*. Subyek penelitian dibagi secara random ke dalam 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol, kelompok etanol, dan kelompok vitamin D<sub>3</sub>. Ketiga kelompok hewan coba mengalami habituasi dalam kandang selama 7 hari. Setelah itu, selama 30 hari berikutnya, setiap kelompok mendapat perlakuan yang berbeda. Dilakukan pengukuran berat badan setiap 2 hari sekali untuk determinasi banyaknya etanol dan vitamin D<sub>3</sub> yang akan diberikan.

Kelompok kontrol mendapat perlakuan dengan pemberian larutan NaCl fisiologis secara injeksi intraperitoneal. Kelompok etanol dan vitamin D<sub>3</sub> mendapat perlakuan dengan pemberian etanol secara injeksi intraperitoneal dengan dosis 3 g/kg BB sekali sehari. Etanol dipersiapkan sebagai larutan dengan konsentrasi 20% dalam larutan salin nor-

mal. Kelompok vitamin D<sub>3</sub> juga mendapat perlakuan dengan pemberian calcitriol (1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>) (Merck-Darmstadt, Jerman) secara injeksi intraperitoneal 1 ¼g/kg BB sekali sehari. Calcitriol (1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>) dipersiapkan sebagai larutan dengan konsentrasi 1 ¼g/mL dalam larutan etanol 20%.

Sebelum mendapatkan perlakuan secara injeksi intraperitoneal setiap harinya, pada semua hewan coba dilakukan uji memori spasial menggunakan *Morris water maze* dengan 3 hari latihan sebelumnya. Jarak waktu antara *Morris water maze* dengan pemberian perlakuan adalah 1-2 jam.

Pada hari ke-31 semua tikus dari ketiga kelompok dikorbankan. Tikus dibius dengan kloroform, kemudian diperfusi dengan teknik perfusi transkardial menggunakan larutan PBS selama 10 menit dan larutan formaldehid 4% selama 20 menit. Selanjutnya dilakukan dekapitasi dan pengambilan otak bagian cerebellum. Jaringan otak kemudian difiksasi dalam larutan formalin 4%.

Pemeriksaan Sampel Cerebellum. Jumlah total sel Purkinje pada korteks cerebellum dihitung dengan menggunakan metode fraksionator. Metode ini menghitung jumlah total sel Purkinje di tiap irisan jaringan cerebellum yang diambil dengan prosedur acak dan sistematis. Untuk menghitung sel Purkinje pada tiap irisan, yang dijadikan sebagai unit hitung adalah nucleolusnya. Hal ini dikarenakan sel Purkinje hanya memiliki sebuah nucleolus.

Seluruh cerebellum diiris dengan ketebalan yang sama, yaitu 1-2 mm. Hasil irisan diurutkan sesuai urutan. Irisan cerebellum diambil dengan randomisasi sistematis. Randomisasi tahap pertama diambil 1 dari 2 irisan ( $f_1 = 2$ ). Hasil randomisasi irisan tahap pertama dipotong membentuk irisan

yang lebih kecil, dengan ketebalan 1-2 mm. Irisan ini kemudian diambil lagi secara random sistematis. Randomisasi tahap kedua diambil 1 dari 3 irisan ( $f_2 = 3$ ). Hasil randomisasi irisan tahap kedua dipotong lagi membentuk irisan yang lebih kecil, dengan ketebalan 1-2 mm. Irisan ini kemudian diambil lagi secara random sistematis. Randomisasi tahap ketiga diambil 1 dari 3 irisan ( $f_3 = 3$ ). Hasil randomisasi irisan tahap ketiga diproses menjadi blok parafin. Blok parafin yang ada dipotong dengan ketebalan 6  $\mu\text{m}$ , diambil secara serial tiap 20 irisan ( $f_4 = 20$ ). Irisan serial tersebut kemudian diwarnai dengan *cresyl violet*, diberi *mounting medium*, dan ditutup dengan kaca penutup untuk dijadikan preparat histologis.

Preparat histologis yang sudah jadi diperiksa dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali. Sel Purkinje yang dihitung adalah yang tampak nucleolusnya (n). Penghitungan dilakukan dalam keadaan peneliti tidak tahu dari kelompok coba yang mana preparat cerebellum yang sedang diperiksa. Jumlah total sel Purkinje (N) dihitung dengan rumus:  $N = f_1 \times f_2 \times f_3 \times f_4 \times n$

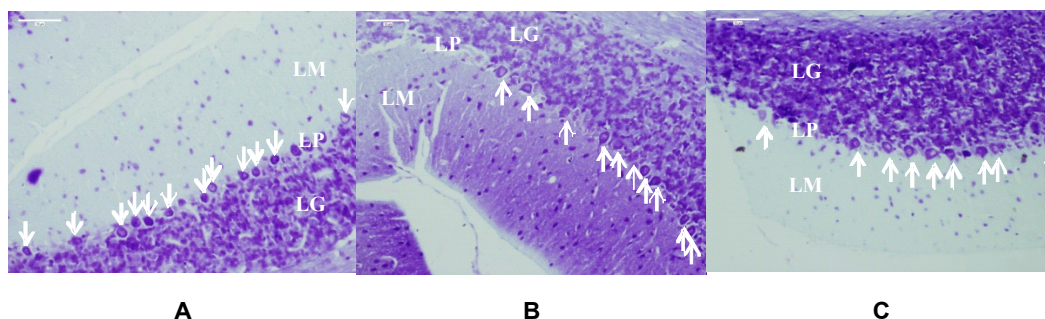
Data kuantitatif jumlah sel Purkinje cerebellum (skala rasio) dianalisis dengan uji statistik ANOVA

yang dilanjutkan analisis *Post hoc* dengan Tukey HSD. Data digambarkan dengan  $mean \pm SD$  dan perbedaan signifikan secara statistik diterima bila  $p < 0,05$ .

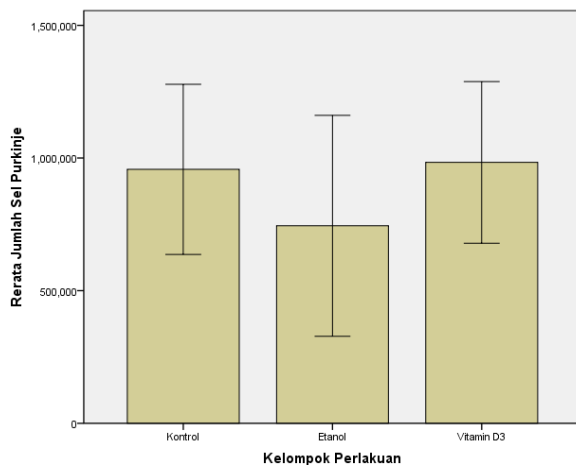
## HASIL

Pada pemeriksaan dengan mikroskop cahaya, tidak tampak perbedaan yang mencolok pada gambaran morfologis sel Purkinje cerebellum dari ketiga kelompok perlakuan. Sel Purkinje cerebellum dengan pengecatan *cresyl violet* terlihat substansia Nissl dan nukleolus berwarna ungu tua, inti sel berwarna ungu muda-transparan, dengan latar belakang tidak berwarna.

Hasil penelitian ini didapatkan hasil rerata jumlah total sel Purkinje cerebellum pada kelompok kontrol adalah  $957.240 \pm 160.353$ , kelompok etanol adalah  $744.552 \pm 208.172$  dan kelompok vitamin D<sub>3</sub> adalah  $983.448 \pm 152.387$ . Rerata jumlah sel Purkinje cerebellum pada kelompok etanol lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol dan vitamin D<sub>3</sub>, namun, dengan uji statistik didapatkan tidak ada perbedaan bermakna di antara ketiga kelompok. Hal ini menunjukkan pemberian etanol selama 30 hari dengan dosis 3 g/kg BB/hari belum dapat



**Gambar 1.** Gambaran Histologis Sel Purkinje Cerebellum (Tanda Panah). Pengecatan dengan *Cresyl Violet*, Perbesaran 100x. LG: Lapisan Granuler, LP: Lapisan Purkinje, LM: Lapisan Molekuler. A: Kelompok Kontrol, B: Kelompok Etanol, C: Kelompok Vitamin D<sub>3</sub>



**Gambar 2. Rerata Jumlah Total Sel Purkinje cerebellum (Rerata ± SD)**

menyebabkan penurunan secara signifikan pada jumlah sel Purkinje cerebellum.

## DISKUSI

Pada penelitian ini, rerata jumlah sel Purkinje cerebellum pada kelompok etanol cenderung mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok vitamin D3, walaupun dengan uji statistik didapatkan perbedaan yang tidak bermakna. Hasil penelitian ini tidak sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Ge *et al.* (2004),<sup>21</sup> yang menyebutkan terdapat penurunan jumlah sel Purkinje cerebellum setelah pemberian etanol secara intubasi intragaster pada bayi tikus galur *Sprague-Dawley* usia 4 hari dengan dosis tunggal 3 g/kg BB, 4,5 g/kg BB dan 6 g/kgBB. Penelitian oleh Pauli *et al.* (1995),<sup>22</sup> juga menyebutkan terdapat penurunan jumlah sel Purkinje cerebellum pada tikus galur Wistar usia 52-54 hari setelah pemberian etanol secara intubasi intragaster pada saat tikus tersebut berusia 5 hari dengan dosis tunggal 7,5 g/kg BB.

Terdapat beberapa kemungkinan yang dapat menjelaskan perbedaan hasil penelitian ini. Yang pertama adalah lamanya pemberian etanol. Penelitian Renis *et al.* (1996),<sup>23</sup> menunjukkan adanya beberapa perubahan biokimiawi sel akibat pemberian etanol. Beberapa perubahan terjadi segera setelah pemberian etanol, seperti penurunan kadar GSH intraseluler dan inaktivasi parsial kompleks rantai respirasi. Target potensial seperti DNA inti dan mitokondria termasuk ke dalam kategori struktur seluler atau subseluler yang membutuhkan waktu paparan yang lebih lama terhadap efek oksidatif etanol.

Penelitian Miki *et al.* (1999),<sup>17</sup> terkait dengan umur tikus pada saat pemberian paparan etanol, menyebutkan sel Purkinje cerebellum rentan terhadap paparan etanol sampai usia postnatal 9 hari. Setelah usia tersebut, seiring dengan semakin maturnya cerebellum, sel Purkinje relatif lebih resisten terhadap efek samping yang ditimbulkan oleh etanol. Paparan etanol pada usia postnatal 4 dan 5 hari dapat menurunkan jumlah total sel Purkinje sebesar 42% dibandingkan kelompok kontrol, sedangkan paparan etanol pada usia postnatal 8 dan 9 hari menghasilkan penurunan yang lebih sedikit, yaitu sebesar 15%.<sup>20</sup>

Mekanisme etanol yang dapat menginduksi apoptosis neuron otak masih belum begitu jelas.<sup>10</sup> Tiga kemungkinan perlu diperhatikan untuk menjelaskan efek neurotoksik tersebut. Pertama, etanol dengan sifat larut lemaknya memiliki efek biologis secara fisik dapat mendenaturasi atau menyebabkan disagregasi organisasi makromolekul seluler (misal, mitokondria, retikulum endoplasmikum, dan lain-lain.). Kedua, efek sitotoksik etanol dikaitkan

dengan metabolismenya dan paling mungkin dimediasi oleh pembentukan radikal bebas melalui jalur metabolisme oksidatif etanol.<sup>9,15</sup> Etanol dapat meningkatkan pembentukan ROS dengan cara menginduksi sitokrom p4502E1 (CYP2E1), yang terdistribusi secara luas pada jaringan otak.<sup>24</sup> Ketiga, efek sitotoksik etanol berasal dari kombinasi sifat fisik, kimiawi, dan metabolismenya.<sup>23</sup> Pada kondisi fisiologis, antioksidan intraseluler akan mengkonversi radikal bebas menjadi senyawa yang tidak berbahaya bagi sel sehingga dapat melindungi sel dari kerusakan yang diinduksi oleh radikal bebas.<sup>25</sup> Konsentrasi antioksidan yang rendah menyebabkan jaringan otak rentan terhadap kerusakan akibat adanya stres oksidatif. Pemberian etanol secara kronik telah dapat dibuktikan dapat menurunkan enzim antioksidan, misal glutathion peroksidase, dan mengganggu homeostasis glutathion.<sup>26</sup> Hippocampus dan cerebellum merupakan bagian otak yang paling rentan terhadap kerusakan oleh stres oksidatif karena bagian tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang rendah.<sup>16</sup> Kegagalan mekanisme proteksi antioksidan akibat produksi berlebihan dari radikal bebas dan penurunan aktivitas enzim *scavenger* menyebabkan peroksidasi lipid yang berujung pada kerusakan atau kematian sel. Hal ini dibuktikan oleh penelitian Shirpoor *et al.* (2008),<sup>10</sup> yang menyebutkan kadar hidroperoksida lipid dan karbonil protein meningkat secara signifikan pada bagian hippocampus dan cerebellum yang diinduksi oleh etanol dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Mekanisme tentang bagaimana vitamin D<sub>3</sub> dapat mengurangi efek neurotoksik yang diinduksi oleh stres oksidatif mungkin dapat dijelaskan oleh 3 mekanisme berikut. Pertama, efek proteksi antioksidan terhadap stres oksidatif yang diinduksi oleh

etanol mungkin berasal dari modulasi ekspresi molekul yang meningkatkan ketahanan hidup, misal dari keluarga gen bcl-2. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa protein yang meningkatkan ketahanan hidup tersebut, misal Bcl-2 dan Bcl-xl, berperan dalam jalur antioksidan untuk menghambat apoptosis, dan bahkan ekspresi berlebihan dari protein tersebut dapat menghambat proses oksidasi, misal peroksidasi lipid.<sup>27</sup> Vitamin D<sub>3</sub> telah dilaporkan berperan dalam *up*-regulasi faktor neurotropik, misal GDNF (*glial cell-derived neurotrophic factor*), sehingga dapat mencegah kerusakan otak akibat proses iskemia dan neurotoksisitas yang diinduksi oleh stres oksidatif.<sup>5</sup> Penelitian Ibi *et al.* (2001),<sup>28</sup> menyebutkan vitamin D<sub>3</sub> tidak berperan langsung sebagai *scavenger* radikal bebas, melainkan menginduksi sintesis protein yang menyediakan efek neuroproteksi terhadap efek sitotoksik yang diinduksi oleh ROS.

Berbagai efek fisiologis vitamin D<sub>3</sub> dimediasi oleh VDR.<sup>28</sup> VDR terlokalisasi pada berbagai daerah di sistem saraf pusat, salah satunya sel Purkinje cerebellum.<sup>29</sup> Interaksi antara vitamin D<sub>3</sub> dengan reseptornya dapat menstimulasi sintesis faktor neurotropik yang terlibat pada proses neuroprotektif di sistem saraf pusat.<sup>30</sup> Penelitian *in vitro* saat ini juga menunjukkan vitamin D<sub>3</sub> meningkatkan kandungan glutathion intraseluler dan dapat memproteksi neuron dopaminergik terhadap efek neurotoksisitas glutamat dan ROS pada kultur mesencephalon.<sup>28</sup>

Kedua, vitamin D<sub>3</sub> berperan sebagai antioksidan membran yang melindungi neuron terhadap kerusakan akibat stres oksidatif.<sup>3</sup> Vitamin D<sub>3</sub> terakumulasi pada membran sel dan menurunkan peroksidasi lipid.<sup>4</sup> Beberapa penelitian menyebutkan

bahwa fungsi vitamin D<sub>3</sub> sebagai antioksidan lebih poten daripada vitamin E, melatonin, dan estrogen.<sup>5, 7</sup> Ketiga, vitamin D<sub>3</sub> memiliki efek proteksi dengan cara meregulasi homeostasis Ca<sup>2+</sup> pada sel otak. Vitamin D<sub>3</sub> diketahui dapat mempengaruhi pengambilan Ca<sup>2+</sup> pada beberapa sel yang dapat dirangsang dan memodulasi saluran *voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup>*. Hal ini dibuktikan pada penelitian dengan kultur neuron hippocampus, dimana vitamin D<sub>3</sub> dapat memiliki efek neuroprotektif kuat terhadap eksitotoksitas yang dimediasi glutamate.<sup>6</sup>

Oleh karena itu, penelitian lebih jauh tentang mekanisme aksi vitamin D<sub>3</sub> pada neuron masih dibutuhkan. Dengan demikian vitamin D<sub>3</sub> dapat dikembangkan menjadi salah satu alternatif antioksidan yang lebih poten untuk mencegah efek degeneratif yang diinduksi oleh senyawa-senyawa toksik, seperti etanol dan oksidan lainnya.

## SIMPULAN

Pemberian vitamin D<sub>3</sub> dengan dosis 1 µg/kg BB/hari tidak menunjukkan memiliki efek protektif mencegah penurunan jumlah sel Purkinje cerebellum tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinduksi oleh pemberian etanol dengan dosis 3 g/kg BB/hari selama 30 hari.

Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang efek neuroprotektif vitamin D<sub>3</sub> terhadap efek neurotoksik etanol pada subyek bayi tikus (periode prenatal dan postnatal), terhadap aktivitas lokomotor dan koordinasi motorik dan keterlibatan bagian otak lain yang juga lebih rentan terhadap efek neurotoksik yang diinduksi oleh etanol.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh dana penelitian masyarakat Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Feldman D, Malloy PJ, Gross C. Vitamin D: Biology, Action and Clinical Implications. In: Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ, editors. *Osteoporosis*, 2<sup>nd</sup> edition. San Diego: Elsevier Academic Press, 2001 :257-302
2. Bikle D. Nonclassic Actions of Vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009; 94 (1): 26-34.
3. Wiseman H. Vitamin D is A Membrane Antioxidant: Ability to Inhibit Iron-Dependent Lipid Peroxidation in Liposomes Compared to Cholesterol, Ergosterol and Tamoxifen and Relevance to Anticancer Action. *FEBS Lett*, 1993; 326 (1-3): 285-8.
4. Sardar S, Singh M. Vitamin D<sub>3</sub> as A Modulator of Cellular Antioxidant Defence in Murine Lymphoma. *Nutrition Research*, 2000; 20 (1): 91-102.
5. Lin AMY, Fan SF, Yang DM, Hsu LL, Yang CHJ. Zinc-Induced Apoptosis in Substantia Nigra of Rat Brain: Neuroprotection by Vitamin D<sub>3</sub>. *Free Radic Biol Med*, 2003; 34 (11): 1416-25.
6. Landfield PW, Cadwallader-Neal L. Long-term Treatment with Calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub> vit D<sub>3</sub>) Retards A Biomarker Of Hippocampal Aging in Rats. *Neurobiol Aging*, 1998; 19 (5): 469-77.
7. Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. Comparative Effectiveness of Vitamin D<sub>3</sub> and Di-

- etary Vitamin E on Peroxidation of Lipids and Enzymes of the Hepatic Antioxidant System in *Sprague-Dawley* Rats. *Internat J Vitam Nutr Res*, 1996; 66 (1): 39-45.
8. Kannan K, Jain SK. Oxidative Stress and Apoptosis. *Pathophysiology*, 2000; 7 (3): 153-63.
  9. Heaton MB, Mitchell JJ, Paiva M. Amelioration of Ethanol-Induced Neurotoxicity in the Neonatal Rat Central Nervous System by Antioxidant Therapy. *Alcohol Clin Exp Res*, 2000; 24 (4): 512-8.
  10. Shirpoor A, Minassian S, Salami S, Khadem-Ansari MH, Ghaderi-Pakdel F, Yeghiazaryan M. Vitamin E Protects Developing Rat Hippocampus and Cerebellum Against Ethanol-Induced Oxidative Stress and Apoptosis. *Food Chemistry*, 2008; 113 (2009): 115-20.
  11. World Health Organization. *WHO Global Status Report on Alcohol 2004*. Geneva: World Health Organization, 2004. Available from URL: [http://www.searo.who.int/LinkFiles/Alcohol\\_and\\_Substance\\_abuse\\_Indonesia.pdf](http://www.searo.who.int/LinkFiles/Alcohol_and_Substance_abuse_Indonesia.pdf).
  12. Diamond I, Messing RO. Neurologic Effects of Alcoholism. *West J Med*, 1994; 161 (3): 279-87.
  13. Butterfield DA, Howard B, Yatin S, Koppal T, Drake J, Hensley K, *et al*. Elevated Oxidative Stress in Models of Normal Brain Aging and Alzheimer's Disease. *Life Sci*, 1999; 65 (18-19): 1883-92.
  14. Maier SE, West JR. Alcohol and Nutritional Control Treatments During Neurogenesis in Rat Brain Reduce Total Neuron Number in Locus Coeruleus, But Not in Cerebellum or Inferior Olive. *Alcohol*, 2003; 30 (1): 67-74.
  15. Chen SY, Sulik KK. Free Radical and Ethanol-Induced Cytotoxicity in Neural Crest Cells. *Alcohol Clin Exp Res*, 1996; 20 (6): 1071-6.
  16. Henderson GI, Chen JJ, Schenker S. 1999. Ethanol, Oxidative Stress, Reactive Aldehydes and the Fetus. *Front Biosci*, 1999; 4: D541-50.
  17. Miki T, Harris S, Wilce P, Takeuchi Y, Bedi KS. The Effect of the Timing of Ethanol Exposure During Early Postnatal Life on Total Number of Purkinje cells in Rat Cerebellum. *J Anat*, 1999; 194 (Pt 3): 423-31.
  18. Chen WJ, Parnell SE, West JR. Neonatal Alcohol and Nicotine Exposure Limits Brain Growth and Depletes Cerebellar Purkinje Cells. *Alcohol*, 1998; 15 (1): 33-41.
  19. Maier SE, West JR. Regional Differences in Cell Loss Associated with Binge-Like Alcohol Exposure During the First Two Trimesters Equivalent in the Rat. *Alcohol*, 2001; 23 (1): 49-57.
  20. Thomas JD, Goodlett CR, West JR. Alcohol-Induced Purkinje Cell Loss Depends on Developmental Timing of Alcohol Exposure and Correlates with Motor Performance. *Brain Res Dev Brain Res*, 1998; 105 (2): 159-66.
  21. Ge Y, Belcher SM, Pierce DR, Light KE. Detection of Purkinje Cell Loss Following Drug Exposures to Developing Rat Pups using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis for Calbindin-D28k mRNA Expression. *Toxicol Lett*, 2004; 150 (3): 325-34.
  22. Pauli J, Wilce P, Bedi KS. Acute Exposure to Alcohol during Early Postnatal Life Causes A Deficit in the Total Number of Cerebellar



- Purkinje Cells in the Rat. *J Comp Neurol*, 1995; 360 (3): 506-12.
23. Renis M, Calabrese V, Russo A, Calderone A, Barcellona ML, Rizza V. Nuclear DNA Strand Breaks during Ethanol-Induced Oxidative Stress in Rat Brain. *FEBS Lett*, 1996; 390 (2): 153-6.
  24. Montoliu C, Sancho-Tello M, Azorin I, Burgal M, Valles S, Renau-Piqueras J, *et al.* Ethanol Increases Cytochrome P4502E1 and Induces Oxidative Stress in Astrocytes. *J Neurochem*, 1995; 65 (6): 2561-70.
  25. Hunt JV, Smith CC, Wolf SP. Autooxidative Glycosylation and Possible Involvement of Peroxides and Free Radicals in LDL Modification by Glucose. *Diabetes*, 1990; 39 (11): 1420-4.
  26. Coleman MD, Eason CR, Bailey JC. The Therapeutic use of Lipoic Acid in Diabetes: A Current Perspective. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2001; 10 (4): 167-72.
  27. Hockenbery H, Oltvai Z, Yin X, Milliman C, Korsmeyer S. Bcl-2 Functions in an Antioxidant Pathway to Prevent Apoptosis. *Cell*, 1993; 75 (2): 241-51.
  28. Ibi M, Sawada H, Nakanishi M, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, *et al.* Protective Effects of 1 Alpha, 25-(OH)(2)D(3) Against the Neurotoxicity of Glutamate and Reactive Oxygen Species in Mesencephalic Culture. *Neuropharmacology*, 2001; 40 (6): 761-71.
  29. Prufer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R. Distribution of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Receptor Immunoreactivity in the Rat Brain and Spinal Cord. *J Chem Neuroanat*, 1999; 16 (2): 135-45.
  30. Langub MC, Herman JP, Malluche HH, Koszewski NJ. Evidence of Functional Vitamin D Receptors in Rat Hippocampus. *Neuroscience*, 2001; 104 (1): 49-56.