

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Traumatic Brain Injury (TBI)

2.1.1 Pengertian Traumatic Brain Injury (TBI)

Traumatic Brain Injury (TBI) merupakan perubahan dalam fungsi otak yang bermanifestasi sebagai kebingungan, tingkat kesadaran yang berubah, kejang, koma, dan defisit motoris neurologis diakibatkan tekanan benda tumpul atau penetrasi benda tajam masuk dalam kepala [9]. Gangguan yang ditimbulkan dapat bersifat sementara maupun menetap, seperti defisit kognitif, psikis, intelektual, serta gangguan fungsi fisiologis lainnya. Hal ini disebabkan karena trauma kepala dapat mengenai berbagai komponen dari kepala [10]. TBI terjadi ketika kepala mengalami suatu trauma yang membuat otak bergerak cepat didalam tempurung tengkorak, sehingga bermanifestasi menjadi cedera otak [4].

Menurut *Brain Injury Association of America* (2013), cedera kepala adalah suatu kerusakan pada kepala, bukan bersifat congenital ataupun degenerative, tetapi disebabkan oleh serangan atau benturan fisik sari lut, yang dapat mengurangi atau mengubah kesadaran yang mana menimbulkan kerusakan kemampuan kognitif dan fungsi fisik. Cedera primer disebabkan oleh benturan pertama, yaitu saat otak bergeser dari tempat semula, mengakibatkan cedera jaringan langsung dan kematian sel nekrotik. Selanjutnya akan terjadi cedera sekunder di tingkat seluler dimana sel-sel sekitar lokasi trauma secara bertahap akan mengalami kematian sel akibat tidak terjadi perbaikan, ditandai dengan peningkatan tekanan intrakraineral dan penurunan aliran darah otak [4].

2.1.2 Mekanisme Terjadinya Cedera

Mekanisme utama dari TBI diklasifikasikan sebagai kerusakan otak fokal/kerusakan otak difus yang dapat mengakibatkan cedera oksonal atau pembengkakan otak. Cedera sekunder berlangsung secara bertahap dalam beberapa jam hingga beberapa hari

pasca trauma. Tahap pertama berlangsung ditandai dengan kerusakan jaringan langsung dan gangguan aliran darah ke otak, menyebabkan akumulasi asam laktat karena glikolisis anaerob, peningkatan permeabilitas membrane dan pembentukan endema [1].

Tahap kedua ditandai dengan depolarisasi membrane sel bersama dengan rilis berlebihan dari neurotransmitter glutamate dan aspartat. Aktivasi N-metil-D-aspartat, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoxazolpropionate, dan voltage-dependant Ca^{2+} dan Na^{2+} channel influx. Ca^{2+} dan Na^{2+} secara berturut-turut memicu terjadinya katabolisme intraseluler. Ca^{2+} mengakibatkan peroksidase lipid, protease, dan fosfolipase yang meningkatkan konsentrasi intraseluler asam lemak bebas dan radikal bebas. Secara bersamaan, mekanisme tersebut menyebabkan degradasi membrane struktur pembuluh darah dan sel serta kematian sel dan berujung pada nekrosis atau apoptosis pada sel [1].

Keadaan patologis yang diamati pada TBI ialah degenerasi dan demielinasi progresif akson, inflamasi yang menetap, kerusakan milin, dan akumulasi amyloid- β , caspase-3 dan produk seluler lainnya. Selain itu terjadi pula kematian pada sel penunjang saraf, salah satunya ialah oligodendrosit. Sel ini berperan penting pada pemeliharaan kesehatan akson dan pembentukan myelin. Kematian oligodendrosit disebabkan beberapa mekanisme diantaranya, kerentanan terhadap stress oksidatif, adanya sitokin pro-inflamasi (IFN- γ dan TNF- α) serta excitotoksitas dari pelepasan glutamate dan ATP yang tidak terkontrol [11]

2.2 Inflamasi

2.2.1 Inflamasi dan *Reactive Oxygen Species* (ROS)

Inflamasi adalah respon positif normal terhadap cedera jaringan yang melibatkan aktivasi enzim, pelepasan mediator, cairan ekstraseluler, migrasi sel, kerusakan dan perbaikan jaringan. Inflamasi merupakan proses kompleks yang sering dikaitkan dengan rasa sakit dan melibatkan kejadian seperti peningkatan permeabilitas pembuluh darah, peningkatan denaturasi protein dan membrane. Proses inflamasi jika tidak diatasi dapat mengarah pada timbulnya

penyakit seperti *vasomotor*, *rhinorrhoea*, *rheumatoid arthritis* dan *aterosklerosis* [12]. *Natrium diklofenak* merupakan salah satu pilihan obat untuk mengatasi respon inflamasi. *Natrium diklofenak* adalah obat *non-steroidal anti-inflammatory drug* (NSAID) yang terkuat daya antiinflamasinya. Aktivitasnya dengan jalan menghambat enzim siklo-oksigenase sehingga pembentukan prostaglandin terhambat [13].

Reactive oxygen species (ROS) adalah molekul oksigen tunggal yang diproduksi secara berkesinambungan pada keadaan aerobik dan terlibat pada berbagai proses didalam tubuh seperti regulasi, dan atau degradasi [12]. Ketidaksinambungan oksidatif seperti gangguan keseimbangan produksi ROS atau radikal bebas atau prooksidan dengan antioksidan dikenal dengan stress oksidatif. Molekul ROS secara fisiologis berperan sebagai second messenger dalam regulasi proses apoptosis dalam mengaktivasi factor transkripsi, seperti NFkB yang berperan pada aktivasi gen respon imun dan gen yang mengkode enzim-enzim antioksidan. Peran stress oksidatif sangat krusial pada modulasi fungsi selular, terutama pada apoptosis. Apoptosis dan produksi ROS berlebih akhirnya akan menimbulkan disfungsi mitokondria. Stress oksidatif erat kaitannya dengan respon inflamasi. Sehingga secara teori respon inflamasi akan meningkatkan produk ROS [13].

Pada saat cedera otak maka beberapa sel inflamasi akan teraktifasi seperti makrofag. Inflamasi pada cedera kepala juga akan mengaktivasi sel inflamatori seperti eosinofil, neutrofil, monosit, limfosit, sel microglia dan sel mast. Sel inflamatori yang teraktifasi akan memicu terjadinya ROS. Munculnya oksigen reaktif karena aktivasi sel-sel tersebut akan melepaskan suatu enzim yaitu myeloperoksidase yang akan menghasilkan oksigen reaktif kemudian akan terjadi reaksi yang bersifat kompleks dengan asam lipid tidak jenuh penyusun fosfolipid. Peroksidasi lipid terjadi karena adanya stress oksidatif dan membuat ketidak sinambungan antara oksida radikal bebas dengan antioksidan didalam tubuh. Target utama peroksidasi oleh ROS adalah asam lipid tidak jenuh majemuk (PUFA) dalam membrane lipid [5].

Ketika cedera otak, juga terjadi kerusakan sel (sel debris). Adanya kerusakan sel tersebut akan difagositosis oleh makrofag. Makrofag yang memfagositosis sel debris tersebut akan menjadi aktif dan melepaskan beberapa sitokin. Terlepasnya mediator inflamasi, sel microglia akan memicu terjadinya radikal bebas dalam tubuh sehingga membuat ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan. Produksi radikal bebas yang melebihi kapasitas normal dapat menimbulkan terjadinya stress oksidatif. Hal ini dapat memicu timbulnya reaksi inflamasi, perubahan patofisiologi secara kompleks dan dapat mengakibatkan kerusakan pada sel. Terjadnya reaksi inflamasi disebabkan oleh stress oksidatif sehingga merangsang sitokin proinflamasi seperti TNF- α [13]. Radikal bebas dapat distabilkan oleh antioksidan yang berfungsi sebagai penangkap radikal bebas dengan melepaskan atom hydrogen dari gugus hidroksil. Pemberian atom hydrogen ini akan mengakibatkan radikal bebas menjadi stabil dan tidak mengaktifkan mediator inflamasi, tidak merusak lipid, protein dan DNA yang menjadi target kerusakan sel [14].

2.2.2 Interleukin-10 terhadap Inflamasi

Sitokin IL-10 merupakan protein yang larut terdiri dari 160 asam amino dengan berat molekul sekitar 18 kD. Terdiri dari dua ikatan disulfide intra molekul dan bersifat labil. Sitokin IL-10 merupakan salah satu sitokin anti-inflamasi yang merupakan serangkaian molekul imuno regulator yang mengontrol respon sitokin proinflamasi. Sitokin bekerja dalam kaitan dengan inhibitor sitokin spesifik dan reseptor sitokin yang larut untuk mengukur respon kekebalan tubuh, peran fisiologis sitokin anti-inflamatori terjadi dalam respon peradangan dan peran patologis pada kondisi inflamasi sistemik [15]. Interleukin-10 merupakan inhibitor makrofag dan sel dendritik yang berperan dalam mengontrol reaksi imun non-spesifik dan imun seluler. IL-10 diproduksi terutama oleh sel makrofag yang diaktifkan. Makrofag yang teraktivasi tampak lebih besar dengan pseudopodia yang bertambah panjang. Produksi enzim yang berada dalam makrofag seperti, katepsin G, asam fosfatase, lisozim, β -glukosidase, esteroprotease, hidrolase, myeloperoksidase, dan arylsulfatase akan meningkat sehingga sekresi IL dalam sel makrofag juga meningkat [16].

Sitokin IL-10 merupakan sitokin anti inflamatori yang memiliki sifat yang berbanding terbalik dengan IFN- γ dan TNF- α yang merupakan sitokin pro inflamantori. IL-10 diproduksi terutama oleh makrofag yang diaktifkan, memiliki fungsi untuk respon tindakan dari APC, menghalangi limfosit T melalui penghambatan ekspresi molekul MHC kelas II [17]. Peningkatan produksi IFN- γ TNF- α menyebabkan penurunan produksi IL-10 karena terjadinya peningkatan aktivitas sel T, sehingga IFN- γ mengaktifkan makrofag untuk memproduksi ROI dan enzim-enzim yang dapat membunuh bakteri. IFN- γ TNF- α merangsang produksi isotop antibody yang mengaktifkan komplemen dan melapisi bakteri, sehingga dapat meningkatkan fungsi makrofag [18].

2.2.3 Aktivitas Protease terhadap Inflamasi

Protease merupakan enzim yang berperan sebagai katalis dalam pemecahan protein [19]. Protease dapat mengkatalisis pemecahan peptide rantai pendek dalam asam amino dengan menggunakan reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsure air pada ikatan spesifik substrat [20]. Mekanisme pelepasan protease pada jaringan dimulai dengan adanya rangsangan berupa produk bakteri, cedera fisik, toksin maupun obat-obatan dapat memicu aktivasi makrofag (proses fagositosis) yang dilakukan sebagian besar oleh ROS. Aktivasi makrofag tersebut dapat merangsang terbentuknya sitokin yang dihasilkan Selma terjadi respon radang dan imun, yaitu IL-1, dan TNF- α . TNF- α menyebabkan agregasi (perpindahan) dan aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim proteolitik sehingga berperan dalam kerusakan jaringan [5]. Protease berperan dalam penyembuhan luka untuk membunuh bakteri pada sel yang mengalami inflamasi. Namun, peningkatan jumlah protease dalam jaringan mengalami inflamasi dapat menyebabkan aktivitas protease tidak terkendali sehingga merusak factor pertumbuhan dan reseptornya, mencegah angiogenesis dan memecah granulasi jaringan sehingga menyebabkan kerusakan jaringan [21]. Jenis protease yang dapat menyebabkan kerusakan sel adalah protease serin (elastase neutrofil). Neutrofil merupakan salah satu sel yang berperan pada proses inflamasi. Protease yang tersimpan dalam neutrofil berfungsi sebagai pertahanan anti-mikroba dengan mekanisme penelanan

mikroorganisme dalam fagolisosom tetapi juga dapat merusak sel maupun jaringan inang [22]

2.3 Manggis (*Garcinia mangostana* L.)

2.3.1 Takonomi Manggis

Manggis (*Garcinia mangostana* L.) merupakan salah satu tanaman buah asli Indonesia. Tanaman manggis berasal dari hutan tropis yang teduh dikawasan Asia Tenggara. Kedudukan tanaman manggis dalam sistematika tumbuhan (taksonomi) diklasifikasikan sebagai berikut [22]:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub-divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledone
Ordo	: Guttiferales
Family	: Guttiferae
Genus	: Garcinia
Spesies	: Garcinia Mangostana L



Gambar 2.1 Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.)

2.3.2 Kandungan Bahan Aktif Manggis

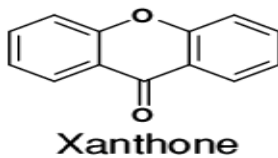
Selain buahnya yang banyak kandungan kimiawi, kulit buah manggis pun terdapat banyak kandungan kimiawi yang biasa dimanfaatkan untuk pewarna alami dan bahan baku obat-obatan. Kulit buah manggis mengandung beberapa senyawa dengan aktivitas

farmakologi misalnya antiinflamasi, antihistamin, pengobatan penyakit jantung, antibakteri, anti jamur bahkan untuk pengobatan atau terapi penyakit HIV. Kulit buah manggis mengandung senyawa xanthone yang bertanggung jawab atas beberapa aktivitas farmakologi, meliputi mangostin, trapezifolixanthone, totophyllin B, α dan γ -mangostins, garcinone B, mangostinone, mangostanol, flavonoid epicatechin, antosianin, asam folat dan tanin [7].

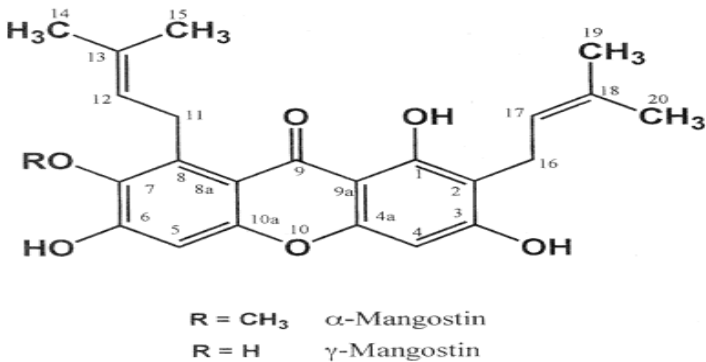
2.3.3 Peranan Senyawa Xanthone dalam Kulit Buah Manggis sebagai Anti-Inflamasi

Ekstrak kulit manggis dalam menurunkan kadar $\text{TNF-}\alpha$ diduga akibat adanya senyawa antioksidan dalam zat aktif xanthone yang terdapat dalam kulit manggis. Xanthone bekerja dengan cara menangkap radikal bebas dan menurunkan peroksidasi lipid. Penangkapan radikal bebas yang merupakan mediator inflamasi dapat memicu keluarnya sitokin. Efek antioksidan yang terdapat kulit manggis berupa xanthone dapat menetralkan radikal bebas yang ada dengan cara mendonorkan elektronnya untuk ion O^{2-} , dan OH^- sehingga terbentuk H_2O dan O_2 yang akan berubah menjadi H_2O_2 , kemudian meningkatkan kadar antioksidan endogen GPx dan CAT yang dapat menetralkan H_2O_2 menjadi H_2O . Xanthone, terutama α dan β mangosteen mampu menekan ROS yang ada, sehingga stress oksidatif dapat diturunkan dan proses aterosclerosis dapat dihambat [23]. Penelitian mengenai aktivitas inflamasi dari kulit buah manggis sampai saat ini baru dilakukan pada tahapan *in vitro* dan untuk tahap *in vivo* baru pada penelitian dengan metode tikus terinduksi karagenin. Dari hasil penelitian diduga bahwa senyawa yang mempunyai aktivitas anti-inflamasi adalah gamma-mangostin yang dapat berperan dalam menghambat produksi enzim siklooksigenase (COX). Gamma-mangostin merupakan xanthone bentuk diprenilasi tetraoksigenasi γ -mangostin merupakan xanton bentuk diprenilasi teraoksigenasi. [24]. Penelitian selanjutnya terhadap sintesis prostaglandin estradiol2 (PGE2) dan siklooksigenase (COX) dalam sel glioma tikus. Kedua senyawa dan enzim tersebut merupakan mediator terpenting dalam terjadinya reaksi inflamasi. γ -mangostin menghambat perubahan asam arakidonat menjadi PGE2 dalam mikrosomal, ada kemungkinan menghambat pada jalur COX. Pada

percobaan enzimatik in vitro, senyawa ini mampu menghambat aktivitas enzim COX-1 dan COX-2. γ -mangostin menghambat ekspresi protein dan mRNA COX-2 yang diinduksi lipopolisakarida, namun tidak berefek terhadap ekspresi protein COX-1 [25]. Enzim COX-2 lebih bersifat inducible yang akan merangsang terjadinya proses inflamasi. Kondisi normal COX-2 dalam sel tubuh ada dalam jumlah sedikit. COX-2 akan meningkat pada tempat-tempat yang mengalami inflamasi, mitogenesis dan onkogenesis.



Gambar 2.2 Struktur Senyawa Xanthone

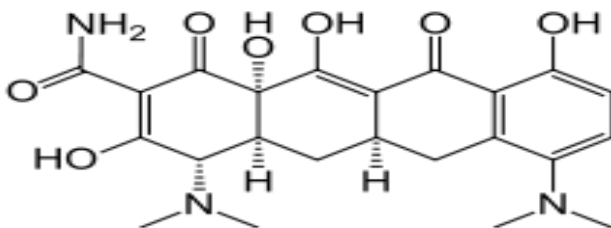


Gambar 2.3 Struktur α -Mangostin dan γ -mangostin

2.4 Minocycline Sebagai Anti-Inflamasi

Minocycline atau bisa disebut 7-dimethylamino-6-deoxytetracycline merupakan turunan semi sintetik tetracycline yang awalnya diperkenalkan pada tahun 1960. Minocycline telah banyak

digunakan sebagai antibiotic untuk mengobati jerawat dan beberapa infeksi staphylococcal [26]. Tetrasiklin dan turunannya, yaitu doxycycline dan minocycline selain memiliki sifat antibiotic, baru-baru ini ditemukan memiliki sifat anti-inflamasi dan anti-apoptosis [6]. Dalam percobaan iskemia serebral tindakan ini sebagian karena down regulasi caspase-1 dan bentuk terinduksi dari nitrat oksida sintase (iNOS) [27]. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa minocycline memperlambat perkembangan penyakit pada model tikus penyakit Huntington. Minocycline memiliki efek yang menguntungkan dalam penyakit kronik serta neurodegenerative. Mekanisme minocycline dalam mencegah peradangan dan kematian sel saraf pada model tikus ini tidak sepenuhnya dipahami, tetapi kemungkinan karena kemampuannya untuk mengurangi ekspresi caspase-1, caspase-3, iNOS, dan siklooksigenase-2 (COX-2) [28].



Gambar 2.4 Struktur Senyawa Minocycline

Caspase-1 atau juga dikenal sebagai interleukin-1 β (IL-1 β) merupakan enzim pengonversi yang mampu mengkatalisis konversi dari pro- IL-1 β menjadi mature IL-1 β , yang mempunyai peran penting dalam mediasi apoptosis. Caspase-1 berimplikasi sebagai mediator penting dari kematian sel dalam kondisi neurologis. Caspase-3 juga terlibat dalam kematian sel neuronal. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa caspase-3 seperti protease diaktifkan dan berkontribusi pada disfungsi neurologis pasca TBI. Studi ini menemukan bahwa ekspresi dan aktivitas caspase-3 meningkat dan dapat terdeteksi secara imunohistokimia di sel apoptosis setelah eksperimental TBI [28].

Minocycline mampu memodulasi aktivitas dari caspase-1 dan caspase-3 yang memainkan peran fungsional dalam TBI.

Pengobatan dengan minocycline setelah TBI mampu meningkatkan fungsi motorik. Mekanisme minocycline dalam menghambat apoptosis dan peradangan disebabkan karena minocycline dapat menghambat produksi mature IL-1 β [28] .

2.5 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Hewan percobaan merupakan hewan yang digunakan dalam suatu penelitian yang telah disesuaikan dengan kebutuhan penelitian. Dalam penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah tikus putih. Berikut adalah klasifikasi tikus putih [29] :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub filum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Sub ordo	: Myomorpha
Family	: Muridae
Sub family	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: Rattus norvegicus



Gambar 2.5 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Penggunaan tikus *Rattus norvegicus* sebagai hewan coba dikarenakan memiliki kemiripan dengan manusia baik dalam hal pola makan, saluran pencernaan, anatomi, dan kebutuhan nutrisi [29].

2.6 Pengukuran aktivitas protease

Prinsip penentuan aktivitas enzim protease berdasar pada hidrolisis enzimatis substrat kasein. Asam-asam amino yang terbentuk harus dipisahkan terlebih dahulu dari substrat yang tidak terhidrolisis, tirosin yang terukur per menit menentukan besarnya aktivitas enzim protease. Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai satu mikromol produk per menit pada kondisi optimal enzim tersebut [30]. Pemisahan asam-asam amino dengan substrat yang tidak terhidrolisis dilakukan dengan penambahan TCA yang akan menyebabkan produk yang mengandung peptide dan asam amino akan larut dalam TCA, sedangkan protein yang tidak terhidrolisis akan mengendap. Penambahan TCA juga digunakan untuk meninaktifkan enzim protease [31]. Aktivitas protease dapat ditentukan dari berdasarkan jumlah tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis kasein yang dapat ditentukan secara spektrofotometri, dimana tirosin yang merupakan asam amino aromatic dapat diukur dengan spektrofotometer UV pada absorpsi maksimum pada λ 278 nm. Untuk memperoleh hasil akurat digunakan larutan standar tirosin yang memiliki kandungan asam amino aromatic yang mirip dengan larutan sampel [32].

2.7 Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan teknik pewarnaan untuk mendeteksi keberadaan molekul tertentu dalam jaringan dengan menggunakan prinsip reaksi antigen dengan antibody. Teknik ini menggabungkan tiga jenis disiplin ilmu yaitu imunologi, histologi, dan kimia. Imunologi berhubungan dengan reaksi ag-ab, histology berhubungan dengan penggunaan jaringan yang digunakan dalam pewarnaan, sedangkan kimia berhubungan dengan reaksi-reaksi kimia dalam proses pewarnaan [33].

Tujuan dari teknik imunohistokimia adalah identifikasi dan karakterisasi komponen bioaktif sel atau jaringan. Antigen yang dideteksi bisa berupa virus atau bakteri ataupun suatu protein tertentu. Terdapat dua jenis imunohistokimia antara lain, direct immunohistochemistry dan indirect immunohistochemistry. direct immunohistochemistry berbeda dengan indirect

immunohistochemistry karena adanya antibody sekunder yang berikatan dengan antibody primer dan dilabel dengan enzim, kemudian kompleks ini berikatan dengan kromogen dalam proses pewarnaan [33]