

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Traumatic Brain Injury* (TBI)

2.1.1 Definisi

Cedera otak traumatik atau *Traumatic Brain Injury* (TBI) didefinisikan sebagai benturan, penetrasi atau pergerakan cepat otak di dalam tulang tengkorak akibat gaya dari luar yang dapat menyebabkan penurunan kesadaran dan gangguan fungsi otak pada penderitanya (Prins *et al.*, 2013). TBI sering didefinisikan sebagai perubahan fungsi otak yang bermanifestasi sebagai kebingungan, perubahan tingkat kesadaran yang berubah, kejang, koma, dan defisit sensoris fokal atau motoris neurologis akibat tekanan benda tumpul atau penetrasi benda tajam masuk ke dalam kepala (Weissenberg dan Siren., 2010).

2.1.2 Epidemiologi

Traumatic Brain Injury (TBI) menjadi penyebab morbiditas dan mortalitas utama pada individu yang berusia dibawah 45 tahun di seluruh dunia (Werner *and* Engelhard, 2007). Di Amerika Serikat sekitar 1,5 juta pasien menderita cedera otak setiap tahun, dan angka kematian pada cedera otak berat berada pada kisaran 35-40% (Beauchamp *et al.*, 2008). Data epidemiologis tentang cedera kepala di Indonesia hingga saat ini belum banyak tersedia, namun dari data yang ada dikatakan dari tahun ke tahun mengalami peningkatan. Angka kejadian cedera kepala di RSUD Dr. Moewardi dari bulan Januari-Oktober 2012 sebanyak 453 kasus, dan selama bulan Juli 2012 di RSUD Dr.Moewardi Surakarta terdapat 43 kasus cedera kepala ringan sampai berat. Pasien dengan cedera kepala ringan (CKR) sebanyak 21 orang (48,8%) , cedera kepala sedang (CKS) 8 orang (18,6%) dan cedera kepala berat (CKB) 14 orang (32,5%). Cedera

ini mayoritas disebabkan oleh kecelakaan lalu lintas. Menurut data Direktorat Keselamatan Transportasi Darat Departemen Perhubungan (2005), jumlah korban kecelakaan lalu lintas pada tahun 2003 terdapat 24.692 orang dengan jumlah kematian 9.865 orang (39,9%), tahun 2004 terdapat 32.271 orang dengan jumlah kematian 11.204 orang (34,7%), dan pada tahun 2005 menjadi 33.827 kasus dengan jumlah kematian 11.610 orang (34,4%) (Hariyani, 2012).

Angka kematian pada laki-laki tercatat tiga kali lebih tinggi (28,8 tiap 100.000 penduduk) dibandingkan angka kematian pada perempuan (9,1 tiap 100.000 penduduk). Tingginya insiden pada laki-laki disebabkan karena laki-laki dominan melakukan aktivitas beresiko tinggi, resiko kerja, dan cedera yang berhubungan dengan kekerasan, jika dibandingkan dengan perempuan. Perkiraan insiden cedera otak meningkat dua kali lipat pada umur 5 hingga 14 tahun. Puncak insiden pada laki-laki dan perempuan dewasa dan dewasa muda mencapai 250 kasus tiap 100.000 populasi, 20% diantaranya mengalami cedera otak sedang hingga berat (CDC, 2011).

2.1.3 Patofisiologi TBI

Cedera Otak Traumatik dapat terjadi pada 3 jenis keadaan :

1. Kepala diam dibentur oleh benda yang bergerak.

Kekuatan benda yang bergerak akan menyebabkan deformitas akibat percepatan, perlambatan dan rotasi yang terjadi secara cepat dan tiba-tiba terhadap kepala dan jaringan otak. Trauma tersebut bisa menimbulkan kompresi dan regangan yang bisa menimbulkan robekan jaringan otak dan pergeseran sebagian jaringan otak terhadap jaringan otak yang lain.

2. Kepala yang bergerak membentur benda yang diam.

Kepala yang sedang bergerak kemudian membentur suatu benda yang keras, maka akan terjadi perlambatan yang tiba-tiba, sehingga mengakibatkan kerusakan otak di tempat benturan dan pada sisi yang berlawanan. Pada tempat benturan terdapat tekanan yang paling tinggi, sedang pada tempat yang berlawanan terdapat tekanan negatif paling rendah sehingga terjadi rongga dan akibatnya dapat terjadi robekan.

3. Kepala yang tidak dapat bergerak karena menyender pada benda lain dibentur oleh benda yang bergerak (kepala tergencet). Pada kepala yang tergencet pada awalnya dapat terjadi retak atau hancurnya tulang tengkorak. Bila gencetannya hebat tentu saja dapat mengakibatkan hancurnya otak.

Cedera otak yang terjadi akibat kontak secara langsung pada kepala yang mengakibatkan kontusio, laserasi dan pendarahan intrakranial, disebut sebagai cedera otak fokal. Dan cedera yang terjadi akibat akselerasi dan deselerasi yang menyebabkan komusio serebri, edema otak atau cedera aksonal difus, disebut cedera otak difus (Werner dan Engelhard, 2007).

Cedera pada otak mempunyai 2 proses yang substansial, yaitu cedera otak primer yaitu kerusakan jaringan otak langsung akibat trauma dan cedera otak sekunder yaitu akibat perluasan kerusakan pada jaringan otak melalui proses patologis yang berkelanjutan. Cedera otak sekunder dideskripsikan sebagai konsekuensi gangguan fisiologis, seperti iskemia, reperfusi, dan hipoksia pada area otak yang beresiko, beberapa saat setelah terjadinya cedera awal (cedera otak primer). Cedera otak sekunder sensitif terhadap terapi dan proses terjadinya dapat dicegah (Mauritz *et al*, 2008).

2.1.3.1 Cedera Otak Primer

Cedera otak primer merupakan cedera langsung dari kekuatan mekanik yang merusak jaringan otak saat trauma terjadi (hancur, robek, memar, dan perdarahan). Cedera ini berasal dari berbagai bentuk kekuatan/tekanan seperti akselerasi rotasi, kompresi, dan distensi akibat dari akselerasi atau deselerasi. Tekanan itu mengenai tulang tengkorak, yang dapat memberi efek pada neuron, glia, dan pembuluh darah, dan dapat mengakibatkan kerusakan lokal, multifokal ataupun difus (Werner dan Engelhard, 2007; Mauritz *et al*, 2008).

Cedera otak dapat mengenai parenkim otak dan / atau pembuluh darah. Cedera parenkim berupa kontusio, laserasi atau *Diffuse Axonal Injury* (DAI), sedangkan cedera pembuluh darah berupa perdarahan epidural, subdural, subarachnoid dan intraserebral (Graham, 2000), yang dapat dilihat Pada CT-scan. Cedera difus meliputi kontusio serebri, perdarahan subarachnoid traumatik dan DAI. Sebagai tambahan sering terdapat perfusi iskemik baik fokal maupun global (Valadka, 1996).

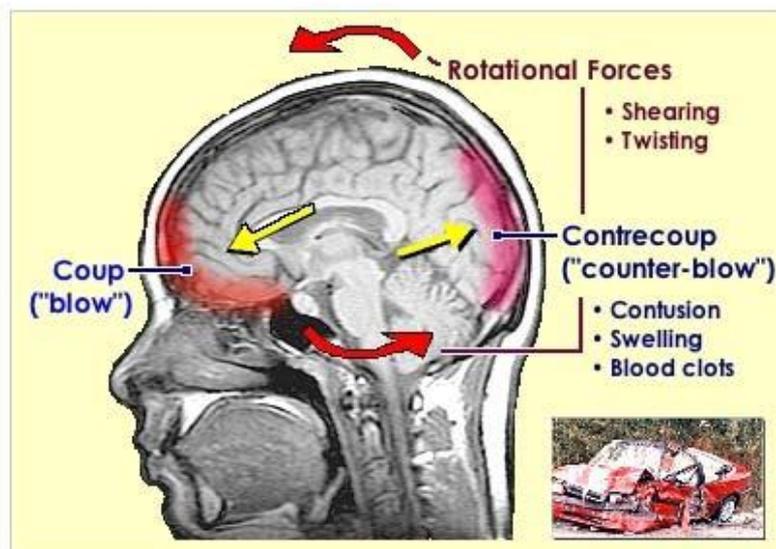
Dikatakan bersifat fokal bila melibatkan bagian bagian tertentu dari otak. Kerusakan fokal yang timbul dapat berupa :

1. Kontusio Serebri (Memar Otak)

Kontusio serebri merupakan cedera fokal kepala yang paling sering terjadi. Dilaporkan bahwa 89% mayat yang diperiksa postmortem mengalami kontusio serebri (Cooper, 1982). Depreitere *et al* (2007) melaporkan bahwa kasus kontusio serebri paling sering disebabkan oleh kecelakaan lalu lintas, jatuh dari ketinggian dan cedera olahraga (Depreitere *et al.*, 2007). Kontusio serebri adalah memar pada jaringan otak yang disebabkan oleh trauma tumpul maupun cedera akibat akselerasi dan deselerasi yang dapat menyebabkan kerusakan parenkim otak dan perdarahan mikro di sekitar kapiler pembuluh darah otak.

Pada kontusio serebri terjadi perdarahan di dalam jaringan otak tanpa adanya robekan jaringan yang kasat mata, meskipun neuron-neuron mengalami kerusakan atau terputus. Pada beberapa kasus kontusio serebri dapat berkembang menjadi perdarahan serebral. Namun pada cedera berat, kontusio serebri sering disertai dengan perdarahan subdural, perdarahan epidural, perdarahan serebral ataupun perdarahan subaraknoid (Hardman, 2002).

Freytag dan Lindenberg (1957) mengemukakan, bahwa pada daerah kontusio serebri terdapat dua komponen, yaitu daerah inti yang mengalami nekrosis dan daerah perifer yang mengalami pembengkakan seluler yang diakibatkan oleh edema sitotoksik. Pembengkakan seluler ini sering dikenal sebagai *pericontusional zone* yang dapat menyebabkan keadaan lebih iskemik sehingga terjadi kematian sel yang lebih luas. Hal ini disebabkan oleh kerusakan autoregulasi pembuluh darah di *pericontusional zone* sehingga perfusi jaringan akan berkurang akibat dari penurunan mean arterial pressure (MAP) atau peningkatan tekanan intrakranial. Proses pembengkakan ini berlangsung antara 2 hingga 7 hari. Penderita yang mengalami kontusio ini memiliki risiko terjadi kecacatan dan kejang di kemudian hari (Davis G, 2009).



Gambar 2.1. Mekanisme Terjadinya Cedera Otak Primer (Mesiano, 2010)

Kerusakan otak yang bersifat difus merupakan kondisi patologis penderita tidak sadar tanpa gambaran *space occupying lesion* (SOL) pada CT-Scan atau *Magnetic Resonance Imaging* (MRI). Berdasarkan gambaran patologi, kerusakan difus mencakup (Japardi, 2004) :

2. Diffuse Axonal Injury

Pada *Diffuse axonal injury* cedera yang terjadi lebih dominan pada area otak tertentu yang mengalami percepatan yang tinggi dan cedera deselerasi dengan durasi yang panjang. DAI merupakan ciri yang konsisten pada cedera kepala akibat kecelakaan lalu lintas dan beberapa olahraga tertentu. Gambaran patologi secara histologi dari DAI pada manusia adalah terdapat kerusakan yang luas pada akson dari batang otak, *parasagittal white matter* dari korteks serebri, korpus kallosum dan *gray-white matter junction* dari korteks serebri (Johnson *et al.*, 2013).

Pada DAI ringan dan sedang umumnya tidak terdapat kelainan pada pemeriksaan radiologi baik CT-scan dan MRI. Namun pada pemeriksaan mikroskopis akan dijumpai akson-akson yang membengkak dan putus. Mekanisme utama terjadinya DAI adalah akibat dari pergerakan rotasional dari otak saat akselerasi dan deselerasi. Hal ini diakibatkan oleh perbedaan densitas dari jaringan otak yaitu jaringan *white matter* lebih berat dibandingkan *grey matter*. Pada saat otak mengalami rotasi akibat kejadian akselerasi-deselerasi, jaringan dengan densitas lebih rendah bergerak lebih cepat dibandingkan dengan jaringan dengan densitas lebih besar. Perbedaan kecepatan inilah yang menyebabkan robekan pada akson neuron yang menghubungkan *grey matter* dan *white matter* (Kasan, 2006).

Terdapat dua fase dari cedera aksonal pada DAI yaitu fase pada cedera primer dan cedera sekunder atau fase lambat. Pada cedera primer robekan akson terjadi akibat regangan saat kejadian. Sedangkan pada fase lambat

terjadi perubahan biokimia yang mengakibatkan pembengkakan dan putusnya akson-akson. Perubahan biokimia yang terjadi yaitu peningkatan influks natrium yang juga memicu influks kalsium. Peningkatan kadar kalsium ini akan menyebabkan aktifnya *calcium-mediated proteolysis*. Kerusakan akson menyebabkan kerusakan dari pengangkutan sehingga terjadi penumpukan di dalam akson yang membengkak. Kerusakan akson yang luas akan menyebabkan atrofi otak dengan ventrikulomegali yang dapat menyebabkan kejang, spastisitas, penurunan fungsi intelektual dan yang paling berat adalah *vegetative state* (Park *et al.*, 2008).

2.1.3.2 Cedera Otak Sekunder

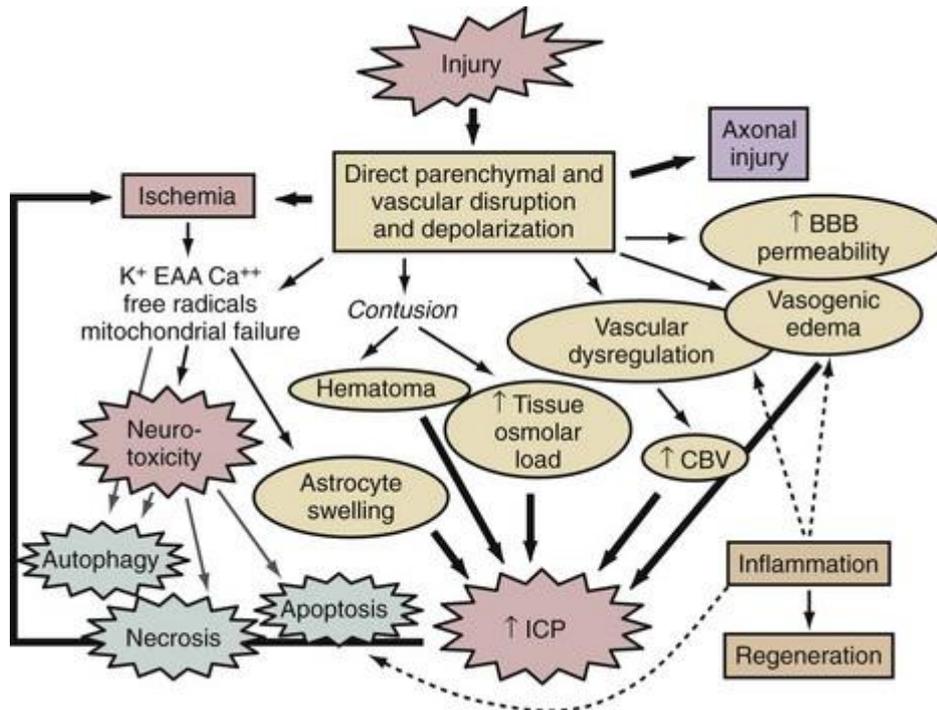
Cedera otak sekunder meliputi kerusakan endogen dalam otak dan efek tambahan sekunder otak, dimana merupakan lanjutan dari cedera otak primer yang dapat terjadi karena adanya reaksi inflamasi, biokimia, pengaruh neurotransmitter, gangguan autoregulasi, neuro-apoptosis dan inokulasi bakteri. Beberapa mekanisme cedera sekunder yang penting meliputi jalur kematian sel neuronal, aktivasi mikroglia, eksitotoksisitas, kadar Ca^{++} intrasellular meningkat, terjadi generasi radikal bebas dan peroxidasi lipid (Hoh, 2008).

Faktor intrakranial (lokal) yang memengaruhi cedera otak sekunder adalah adanya hematoma intrakranial, iskemia otak akibat penurunan tekanan perfusi otak, herniasi, penurunan tekanan arterial otak, Tekanan Tinggi Intrakranial (TTIK), demam, vasospasm, infeksi, dan kejang (Cohadon, 1995).

Sebaliknya faktor ekstrakranial (sistemik) yang dikenal dengan istilah *nine deadly H's* adalah hipoksemia (hipoksia, anemia), hipotensi (hipovolemia, gangguan jantung, pneumotorak), hiperkapnia (depresi nafas), hipokapnea (hiperventilasi), hipertermi (hipermetabolisme/respon stres), hiperglikemia, hipoglikemia, hiponatremia, hipoproteinemia, dan hemostasis (Cohadon, 1995).

Beratnya cedera primer karena lokasinya memberi efek terhadap beratnya mekanisme cedera sekunder (Li, 2004).

Kaskade cedera sekunder diketahui mencapai puncaknya pada hari ketiga (3) dan tujuh (7) setelah trauma dan dapat bertahan hingga tahunan (Dardiotis *et al.*, 2012). Beberapa penyebab hal ini adalah akumulasi leukosit pada daerah otak yang cedera. Leukosit pindah dari pembuluh darah ke parenkim otak yang cedera melalui ikatan endotel selektin P dan E dan *intercellular adhesion molecules* (ICAMs). Kemokin dari jaringan otak yang cedera berpengaruh pada ekspresi molekul endotel. Interaksi integrin dengan ICAM-1 dan ICAM-2 dalam endotel menyebabkan perubahan konformasi dan ekstravasasi leukosit. Akhirnya, leukosit pindah dari gradasi konsentrat kemokin ke area otak yang cedera. Puncak akumulasi neutrophil terjadi pada hari ketiga setelah trauma (Rhodes, 2011). Waktu induksi dan durasi aktivasi mikroglia setelah trauma diketahui memiliki perbedaan dengan kelainan otak lainnya, seperti iskemik otak. Studi-studi pada manusia dengan cedera otak traumatic menunjukkan bahwa marker aktivasi dan proliferasi mikroglia muncul pada hari ketiga (3) setelah trauma.



Gambar 2.2. Mekanisme biokimia, seluler dan molekuler pada cedera otak sekunder, pada cedera otak traumatika (Robert *et al.*, 2015). Tiga kategori mayor pada mekanisme cedera otak sekunder, meliputi (1) iskemia, eksitotoksisitas, kegagalan energi, dan kaskade kematian sel; (2) *cerebral swelling*; dan (3) *axonal injury*. Kategori keempat adalah inflamasi dan regenerasi, yang mempengaruhi semuanya.

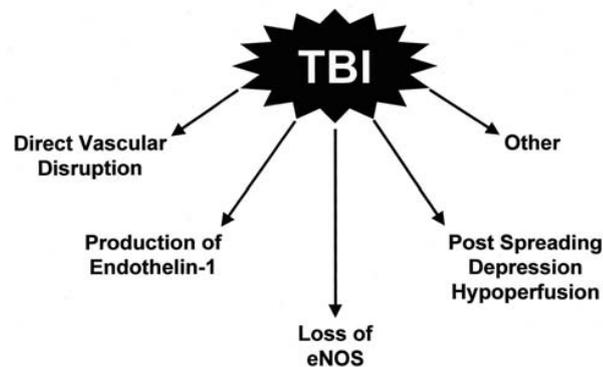
2.1.3.3 Patofisiologi Spesifik Pada TBI

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, ada tiga kategori mayor pada mekanisme terjadinya cedera otak sekunder, yaitu (1) iskemia, eksitotoksisitas, kegagalan energi, dan kaskade kematian sel; (2) edema otak dan (3) *axonal injury*. Cedera aksonal telah dibahas pada bagian cedera otak primer.

a. Iskemia Post Trauma

Studi klinis pada orang dewasa telah menunjukkan bahwa segera setelah TBI, *Cerebral blood flow* (CBF) akan berkurang. Hipoperfusi awal atau iskemia setelah TBI berat muncul dan berhubungan dengan hasil yang buruk (misalnya, hipotensi, hipoksemia) karena otak hipoperfusi memiliki efek yang buruk. Banyak mekanisme mendasari pasca trauma awal hipoperfusi. Armstead melaporkan penurunan respon vasodilatasi menjadi nitrat oksidasi (NO), cGMP, cAMP, dan

prostanoids setelah TBI, bersama dengan rilis anion superoksida, lebih besar rilis cedera yang disebabkan dari vasokonstriktor poten peptida endotelin-1. Penelitian lainnya menyebutkan kerugian hipoperfusi baik meningkatnya produksi NO atau kurangnya respons untuk NO sebagai mediasi hipoperfusi. Hilangnya vasodilator dan elaborasi vasokonstriktor, atau mekanisme lain, terlibat pada awal hipoperfusi pasca-trauma (Gambar 3). Peningkatan kebutuhan metabolik, yang berkaitan dengan rilis glutamat, dapat terlihat dari peningkatan asam laktat jaringan otak dan CSF awal setelah terjadi TBI (Zasler *et al.*,2007).



Gambar 2.3. Proses terjadinya iskemia post TBI (Zasler *et al.*,2007). Setelah terjadi TBI, akan muncul berbagai mekanisme, salah satunya terjadi hipoperfusi kerusakan vaskuler secara langsung, hilangnya eNOs dan produksi Endothelin-1).

b. Kaskade kematian sel neuron

Kematian sel neuron setelah cedera traumatik disebabkan karena gangguan homeostasis ion sebagai konsekuensi dari pelepasan besar ion K^+ dari neuron dan sebagai akibat dari kenaikan $[K^+]_{ekstrasel}$, neuron mengalami depolarisasi, melepaskan sejumlah glutamat, yang mengaktifkan reseptor *glutamat ionofor-linked* sehingga mengakibatkan peningkatan $[Ca^{2+}]_{intrasel}$, $[Na^+]_{intrasel}$, dan $[K^+]_{ekstrasel}$, dengan demikian masuknya ion Na^+ telah menyebabkan awal dari pengasaman dan pembengkakan pada berbagai organel seluler. Normalnya, aliran ion-ion keluar dan masuk sel diatur oleh suatu pompa ion yang menggunakan energi ATP. Pada trauma otak terjadi gangguan aliran

darah sehingga pasokan oksigen berkurang yang pada akhirnya menimbulkan gangguan metabolisme serebral. Kondisi yang demikian ini memicu sel melakukan metabolisme secara anaerob, dimana metabolisme anaerob ini hanya mampu memproduksi energi yang jauh lebih sedikit dibandingkan dengan metabolisme aerob. Karena metabolisme anaerob tidak cukup untuk memelihara ketersediaan energi seluler, akibatnya cadangan ATP habis serta terjadi kegagalan pompa ion pada membran sel yang tergantung ATP. Hilangnya homeostasis ionik inilah yang menjadi awal terjadinya eksitotoksisitas (Weissenberger dan Siren, 2010).

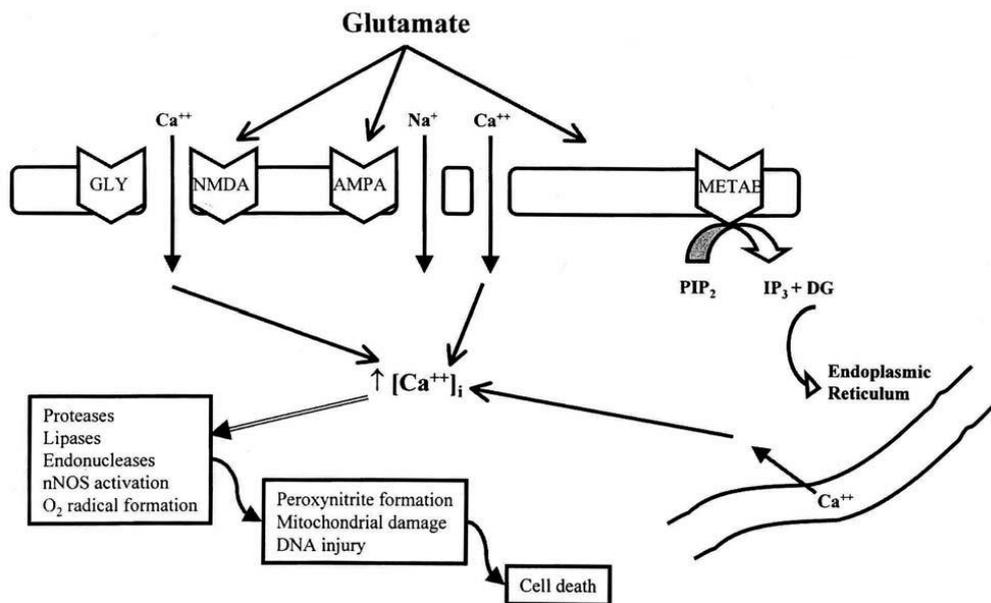
c. Eksitotoksisitas

Faktor signifikan yang dapat menyebabkan cedera otak sekunder adalah eksitotoksisitas yang keluar secara berlebihan. Eksitotoksisitas menggambarkan proses dari glutamat dan *excitatory amino acids* (EAAs) yang menyebabkan kerusakan neuron. Glutamat yang berlebihan dapat berasal dari sel-sel yang rusak, bocor atau karena gangguan reuptake dari glutamat. Paparan glutamat yang dihasilkan karena cedera neuron terdiri dari 2 fase. Beberapa saat setelah paparan Na^+ , menyebabkan pembengkakan saraf, dimana hal ini diikuti dengan degenerasi Ca^{2+} . Efek tersebut dimediasi oleh reseptor ionotropik yang bekerja cepat yaitu *N-methyl-D-aspartate* [NMDA], kainate dan *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA) dan reseptor metabotropik yang bekerja lama (Dardiotis *et al*, 2012).

Aktifasi dari reseptor tersebut diawali oleh influks kalsium melalui kanal *receptor gated* atau *voltage-gated* atau rilis dari kalsium intraseluler. Peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler merupakan pemicu dari sejumlah proses yang mengawali terjadinya kerusakan dan kematian sel (gambar 4). Salah satu mekanisme yang mengikuti yaitu aktivasi sintesa NO, yang mengawali produksi NO, formasi peroksinitrit dan kerusakan DNA. *Poly (ADP-*

ribose) polymerase (PARP) merupakan enzim pada perbaikan DNA dan pada kerusakan DNA, aktivasi PARP mengawali deplesi ATP, kegagalan metabolik dan kematian sel (Zasler *et al*, 2007).

Potassium juga keluar dari sel dan diabsorpsi oleh astrosit. Timbul gangguan keseimbangan ion yang berakibat depolarisasi membran sel dan influx cairan yang menyebabkan sel bengkak dan *cytotoxic edema* yang akhirnya dapat menyebabkan kematian sel neuron. Glutamat juga toksik terhadap sel-sel glial, termasuk astrosit dan oligodendroglia. Astrosit mempunyai kapasitas buffer dan terlibat dalam *clearance* glutamat dari ruang ekstrasellular. Berkurangnya energi selama iskemia dapat menyebabkan sistem regulasi glutamat rusak (Medikians dan Giza, 2006).



Gambar 2.4. Mekanisme terjadinya proses eksitotoksisitas (Zasler *et al*,2007). Glutamat menyebabkan peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler melalui stimulasi (i) reseptor NMDA dengan pembukaan reseptor terkait kalsium ionofor, (ii) reseptor AMPA dengan pembukaan kanal kalsium, dan (iii) reseptor metabotropik , dengan merilis kalsium intraseluler melalui 2nd mesengger inositol trifosfat dan diasilgliserol. Peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler menyebabkan aktivasi protease, lipase dan endonuklease, bersama dengan NOS rangsangan dan produksi radikal oksigen saraf. Hal ini menyebabkan pembentukan peroksinitrit, kerusakan mitokondria dan kerusakan DNA yang berlanjut dengan kematian sel).

d. Radikal Bebas

Peningkatan kadar Ca^{++} sebagai pencetus aktivasi enzim terlibat dalam produksi radikal bebas. Pada keadaan normal, *oxidative mitochondrial metabolism* memproduksi sejumlah kecil radikal bebas. Pada trauma, radikal bebas yang timbul berlebihan diproduksi oleh enzim *nitric oxide synthase* yang timbul akibat trauma (iNOS) ini dibedakan dengan eNOS (endothelial NOS yang sifatnya protektif) dan nNOS (neuronal NOS yang sifatnya konstitutif). Phospholipase, dan *xanthine oxidase* yang aktif bersamaan dengan aktivasi jalur Ca^{++} berpengaruh terhadap kerusakan rantai transpor elektron mitokondria. Timbulnya asidosis menyebabkan lepasnya ferrum dari transferrin dan ferritin. Radikal bebas menambah permeabilitas sel-sel membran melalui peroksidasi lipid yang merusak komponen phospholipid membran. Superoksid anion dan hidroksil anion membentuk peroksinitrit (yang lebih reaktif) dengan NO yang dibentuk iNOS. Penggabungan dengan ion Fe tadi akan membuat proses peroksidasi lipid pada membran meluas secara geometris (Hoh, 2008). Kerusakan DNA akibat radikal bebas akan mengaktifasi *Poly ADP Ribose Polymerase* (PARP) suatu enzim untuk perbaikan (repair) kerusakan DNA. Aktivasi PARP akan memicu enzim perbaiki DNA. Aktivitas berlebihan dari PARP akan mengurangi cadangan energi sel yaitu cadangan NAD^+ dan ATP. Kerusakan besar pada DNA akan menguras energi atau ATP sehingga sel yang dalam proses apoptosis kehabisan energi dan mati melalui proses nekrosis yang dalam hal ini disebut nekrosis sekunder. Caspase 3 yang menginaktivasi PARP berperan dalam proses apoptosis (Zhang *et al*, 2005).

e. Edema Otak

Yaitu terjadi peningkatan kandungan air dalam jaringan otak atau peningkatan volume darah (intravaskuler) atau kombinasi keduanya.

Edema serebri merupakan respon umum untuk berbagai bentuk cedera otak, dan sesuai penyebabnya dapat dikategorikan sebagai sitotoksik, vasogenik, interstisial, atau gabungan. Kelainan dapat dicirikan dalam hal lokasi, pola keterlibatan gray and white matter dan terkait efek massa yang dibuktikan dengan pergeseran garis tengah, sulcus, ventrikel, penipisan sisternal dan herniasi otak. Gejala edema serebri tidak spesifik dan berkaitan dengan efek sekunder massa, keterlibatan vaskular, dan herniasi. Edema serebri dapat dicegah dengan berbagai cara yaitu hiperventilasi, osmoterapi (manitol dan salin hipertonik), diuretik loop, hipotermia, sedasi (propofol, barbiturat), dan pelumpuh neuromuskuler (suksinilkolin). Kortikosteroid dapat digunakan untuk mengontrol edema vasogenik dengan cara memperbaiki sawar darah otak. Kraniektomi dekompresi dapat dilakukan pada kasus edema serebri yang berat (Nag et al., 2009).

f. Peranan proses Inflamasi pada TBI

Mekanisme cedera sekunder terdiri dari beragam proses antara lain terpicunya proses inflamasi dan munculnya sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 β , IL-6, IL-8, ekspresi *intercellular adhesion molecules* (ICAM), dan *vascular adhesion molecules* (VCAM) yang berinteraksi dengan PMN dan dapat menyebabkan tersumbatnya kapiler (*capillary plugging*) dan memperberat komponen iskemik TBI. Aktivasi lipooksigenase dan cyclo-oxygenase oleh Ca²⁺ menghasilkan radikal oksigen bebas (ROS) seperti anion superoksida dan hidroksil anion dan senyawa vasoaktif seperti prostaglandin dan thromboxan yang memperburuk mikrosirkulasi. Karena TBI juga menyebabkan meningkatnya iNOS diikuti peningkatan ekspresi NO, maka terbentuk juga peroksinitrit yang memperberat kerusakan peroksidatif pada membran sel, DNA dan makromolekul lain (Machfoed, 2011).

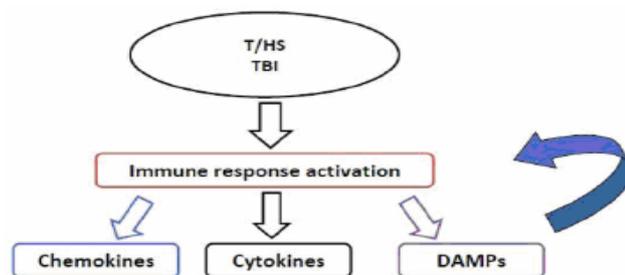
Terdapat aspek inflamasi baik akut dan subakut maupun kronis yang merugikan dan menguntungkan. Terdapat inflamasi akut yang kuat setelah TBI. Ini telah ditunjukkan dalam model TBI, dan pada pasien dewasa. NF-kB, TNF- α , IL-1 β , eicosanoid, neutrofil, dan makrofag berhubungan terhadap kerusakan sekunder dan juga perbaikan. Pada suatu penelitian yang dilakukan oleh Clark *et al*, Konsisten dengan peran IL-1 dalam evolusi kerusakan jaringan pada TBI, melakukan analisis pada sampel otak orang dewasa yang direseksi dengan hipertensi intrakranial refrakter akibat memar yang parah. *Interleukin-1-converting enzyme* (ICE) telah diaktifkan, dimana aktivasi ICE sangat penting untuk produksi IL-1 β , hal ini mendukung produksi IL-1 β , mediator pro-inflamasi yang penting dalam trauma cedera otak pada manusia (Zasler *et al*, 2007).

Pada penelitian studi LCS lebih mendukung peran inflamasi pada TBI. Peningkatan IL-1 β dalam LCS terlihat setelah TBI berat pada orang dewasa. Demikian pula, peningkatan jumlah sitokin termasuk IL-6 dan IL-8 dalam LCS setelah TBI parah. Memar dan nekrosis jaringan lokal juga penting untuk memicu masuknya neutrofil dengan resultan kerusakan jaringan sekunder. Masuknya neutrofil disertai peningkatan kadar *inducible Nitric oxide synthase* (iNOS) di otak dan diikuti dengan infiltrasi makrofag, dengan puncak antara 24-72 jam setelah cedera. Infiltrasi makrofag dan diferensiasi mikroglia endogen menjadi makrofag residen, mungkin menandakan hubungan antara inflamasi dan regenerasi, dengan elaborasi dari jumlah faktor trofik (yaitu, *Neuronal Growth factor* (NGF), nitrosothiols, *Vascular endothel growth factor* (VEGF) (Werner dan Engelhard, 2007).

Dalam penelitian oleh Kossmann dkk dilaporkan adanya hubungan antara produksi IL-6 dan produksi neurotrophin, seperti NGF. Astrosit yang dikultur dari yang diobati baik dengan IL-6, IL-8 atau LCS dari otak dewasa yang cedera, memproduksi NGF. Produksi sitokin setelah TBI mungkin penting untuk

plastisitas dan perbaikan saraf. Studi pada model TBI menyatakan bahwa aspek yang menguntungkan dari inflamasi tampak pada keluaran jangka panjang. Tikus dengan defisiensi TNF- α menunjukkan peningkatan keluaran fungsional setelah TBI. Namun, jangka panjang konsekuensi dari kekurangan TNF- α memberikan keluaran yang merugikan. Demikian pula, meskipun peran merugikan bagi iNOS dalam 72 jam awal post trauma, defisiensi iNOS pada tikus menunjukkan gangguan keluaran jangka panjang dibanding kontrol. iNOS penting dalam penyembuhan luka dan *iNOS-derived nitrosylation of protein* mungkin berperan. Tetapi peranan respon inflamasi terhadap TBI masih harus diperjelas. (Namas *et al.*, 2010).

Sitokin adalah hormon protein dari kelas yang luas yang memediasi respon inflamasi dan imunitas dengan cara yang kompleks. Tidak seperti syok septik, dimana kaskade sitokin telah ditentukan dengan baik, peran sitokin dalam trauma dan syok hemoragik tidak dijelaskan dengan baik. Kadar sitokin dalam sirkulasi telah terdeteksi pada model hewan dan pada pasien dengan sepsis berat, dan kadar ini memiliki beberapa korelasi dengan keluaran. Produksi radikal bebas nitrat oksida (NO), yang diproduksi dalam kondisi inflamasi oleh enzim *inducible NO synthase* (iNOS), ditunjukkan menjadi mediator sentral inflamasi pada tikus post- *Traumatic-Haemorrhagic shock* (T/HS) (Dardiotis *et al.*, 2012).



Gambar 2.5 Aktifasi respon imun pada TBI (Namas *et al.*, 2010). Respon inflamasi terhadap cedera jaringan. Signal cedera traumatik berbagai tipe sel memproduksi sitokin, kemokin, dan DAMPs. Reaktifasi DAMPs dan selanjutnya mendorong produksi mediator inflamasi, mendasari putaran *feedback* positif inflamasi → kerusakan → inflamasi

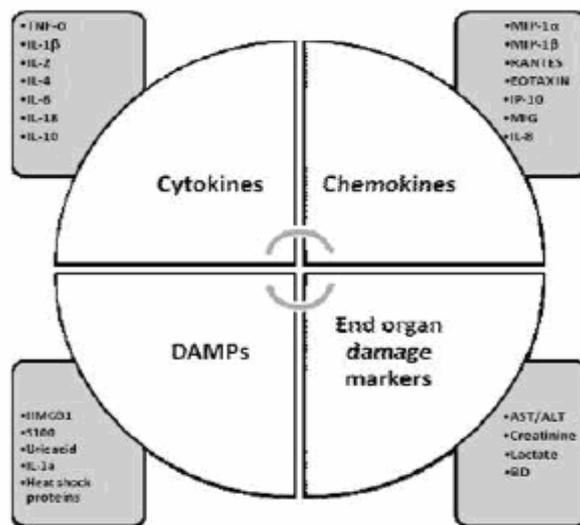
NO merupakan bagian dari radikal bebas. NO adalah molekul yang terdiri dari atom N dan O dengan muatan elektron yang berlebih. Kelebihan elektron tersebut menyebabkan *nitric oxide* mudah bereaksi dengan molekul yang lain (Platt, 2007). Sel dapat menghasilkan *nitric oxide* dari fosforilasi enzim argenin, yang dinamakan *nitric oxide synthase* (NOS). Terdapat tiga bentuk NOS yaitu *inducible* NOS (iNOS) yang dihasilkan oleh makrofag, *endothelial* NOS (eNOS) yang dihasilkan endotel pembuluh darah dan neuronal NOS (nNOS) yang dihasilkan oleh sel-sel neuron. Pada pasien trauma, hasil reaksi sirkulasi NO menggambarkan keparahan cedera selama dua jam pertama setelah dampak trauma dan menunjukkan bahwa produksi NO meningkat memainkan peran dalam periode sangat awal pasca cedera (Namas *et al*, 2010). Dalam keadaan iskemia, iNOS merupakan penghasil NO yang terbanyak serta merangsang keluarnya beberapa beberapa sitokin yang bertanggung jawab terhadap proses inflamasi seperti TNF α , IL-1, IL-3 dan IL-6 yang dapat mengakibatkan apoptosis (Huang, 2004).

Bila nitrit oksida bereaksi dengan anion superoksida (O_2^-) akan terbentuk peroksinitrit ($ONOO^-$). Pada kondisi pH normal peroksinitrit akan membentuk asam peroksinitrat, tetapi pada kondisi hipoksia atau asidosis peroksinitrit akan mengalami dismutasi menjadi dua bentuk oksidan yang poten yaitu radikal hidroksil (OH^\cdot) dan radikal nitrogen hidroksida (NO_2^\cdot). Hidrogen peroksida ($HOOH$) dapat bereaksi dengan peroksinitrit menjadi anion nitrogen dioksida (ONO^-), oksigen (O_2^-) dan H_2O . Peroksinitrit merupakan oksidan yang sangat kuat dengan waktu paruh yang panjang, lebih toksik dari NO ataupun superoksida. Semakin besar pembentukan peroksinitrit semakin besar kerusakan sel yang terjadi (Faul *et al*, 2010).

Kemokin mewakili kelas *cytokine-like immune* modulator yang mendapat perhatian sebagai target terapi yang potensial untuk berbagai penyakit inflamasi

(Namas *et al*, 2010). Kemokin diproduksi oleh berbagai sel imun seperti makrofag, limfosit, neutrofil dan sel dendritik yang memediasi berbagai fungsi sel. Interaksi yang kompleks antara sitokin dan kemokin mungkin mendasari peran penting dari modulator inflamasi dalam proses inflamasi *Traumatic/haemorrhagic shock* (T/HS) dan TBI dan dalam pengaturan penyakit lain seperti tumor, infeksi, dan penyakit autoimun (Katsanos *et al*, 2008).

Diantara kemokin, makrofag, *inflammatory protein-1 alpha* (MIP-1 α) muncul untuk mengatur baik respon inflamasi akut dan kronis host pada tempat cedera atau infeksi, terutama dengan merekrut sel-sel inflamasi. Selain itu, MIP-1 α menengahi aktivitas pro-inflamasi luas, termasuk merangsang sekresi TNF- α , IL-1, dan IL-6 oleh makrofag peritoneal. Studi pada tikus telah menunjukkan bahwa manipulasi MIP-1 α jangka pendek T/HS mungkin menguntungkan untuk mengurangi respon inflamasi dan memperbaiki disfungsi organ vital. Seperti dalam kebanyakan kasus terapi immunomodulasi, inhibisi MIP-1 α adalah pedang bermata dua, dalam peningkatan risiko infeksi akhir. *Monosit chemoattractant protein* (MCP-1), *macrophage inflammation Protein-1 beta* (MIP-1 β), *regulated on activation normal T cell Expressed and secreted* (RANTES), Eotaksin, *interferon-inducible Protein 10* (IP-10), *Monokine induced by Interferon gamma* (MIG), dan IL-8 adalah kemokin yang mungkin menawarkan sasaran terapi atau diagnostik baru untuk T / HS (Namas *et al*, 2010).



Gambar 2.6 Respon inflamasi dan imunitas pada TBI (Namas et al., 2010). Spektrum sitokin, kemokin, dan DAMPs pada *traumatic/haemorrhagic shock* (T/HS) dan TBI. Respon inflamasi terhadap T/HS atau TBI dinilai dari pengukuran sitokin, kemokin, DAMPs dan marker terakhir kerusakan organ akhir. Beberapa biomarker ini dapat juga menjadi kandidat intervensi terapi.

Pathogen-associated molecular pattern (PAMPs), *damage-associated molecular patterns* (DAMPs, juga dikenal sebagai alarmins), dan reseptor mereka (misalnya *Toll-like receptor* [TLR]-2 dan -4; *receptor for Advanced Glycation End Products* [RAGE]) merupakan sistem paralel dan mungkin integratif yang berjalan selama infeksi serta cedera jaringan, termasuk T/HS dan mungkin juga TBI. PAMPs mencakup beragam rangkaian molekul mikroba yang berbagi berbagai fitur biokimia yang dikenali yang waspada terhadap patogen yang mengganggu. Beberapa PAMPs eksogen seperti yang dikenali oleh sel-sel dari sistem imun bawaan dan didapat, terutama melalui TLRs, yang mengaktifkan jalur sinyal beberapa di antaranya NF-κB adalah yang paling khas (Katsanos et al, 2008).

Dalam model analog, DAMPs diproduksi oleh jaringan yang terluka dan merangsang atau menyebarkan peradangan melalui produksi sitokin; dengan cara ini, DAMPs memainkan peran penting dalam kaskade pro-inflamasi imunitas bawaan. Molekul mediator inflamasi pada kelas ini meliputi HMGB1, S100A dan

B, asam urat, IL-1 β , protein heat shock, dan molekul tambahan lain. HMGB1 diproduksi dalam kondisi beragam seperti infeksi, iskemia trauma, T/HS, dan TBI, yang dapat berkontribusi pada patogenesis sepsis berat, sitokin proinflamasi klasik seperti TNF- α dan IL-1 β (Perry *et al*, 2008).

Pada model hewan, IL-1 β dan TNF- α telah terlibat sebagai sitokin pro-inflamasi utama sedangkan yang berpotensi sebagai anti-inflamasi yang menguntungkan dianggap berasal dari IL-10. Interleukin-1 β telah ditandai secara ekstensif pada hewan model TBI sebagai promotor neuroinflamasi. Kerusakan saraf yang dihasilkan dari rilis IL-1 β tampaknya tidak langsung, akibat aksi sinergis dengan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α . Seperti IL-1 β , TNF- α telah dianggap sebagai sitokin pro-inflamasi murni dalam sejarah singkat penelitian TBI (Werner dan Engelhard, 2007).

. Pada cedera difus, kadar serum TNF- α meningkat dalam 24 jam dengan tidak adanya ekspresi dalam jaringan otak, menunjukkan bahwa cedera difus menginduksi respon imun yang berbeda. Mirip dengan TNF- α , IL-6 memiliki peran dalam neuroinflamasi yang dideteksi dalam 1 jam post cedera pada hewan, diikuti oleh konsentrasi puncak antara 2 dan 8 jam. Di sisi anti-inflamasi, penelitian eksperimental telah menunjukkan efek menguntungkan IL-10, dengan pemberian eksogen dari sitokin ini membantu pemulihan neurologis dan mengurangi ekspresi sitokin pro-inflamasi (Figiel, 2008).

Pada konsentrasi rendah, sitokin penting untuk respon host terhadap trauma sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi mereka merusak. Tanda terbaik dan tampak paling awal dan paling mendasar dalam kaskade pro inflamasi yang diinduksi trauma adalah TNF- α . TNF- α memicu produksi sitokin lainnya, yang memperkuat dan menyebarkan respon inflamasi di mana peningkatan TNF- α plasma telah ditemukan pada pasien syok hemoragik. TNF- α juga berpartisipasi dalam generasi radikal bebas seperti NO. Studi klinis telah

menunjukkan bahwa kadar beberapa mediator inflamasi, seperti IL-6, IL-8 dan IL-10, berhubungan erat dengan keparahan cedera dan tingkat komplikasi. Berbagai faktor intrinsik seperti usia, jenis kelamin, ras, suhu tubuh, resusitasi, dan periode hipotensi memainkan peran dalam bagaimana tubuh merespon cedera traumatik akut (Zasler *et al.*,2007).

2.2 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

2.2.1 Karakteristik Umum

Sitokin pro-inflamasi merupakan molekul yang muncul dan ikut berperan dalam berkembangnya proses patofisiologi setelah trauma otak. Sitokin merupakan pedang bermata dua, dimana dapat menguntungkan dan merugikan. Demikian pula TNF- α , terdapat keadaan tertentu sitokin ini dapat bermanfaat, tetapi dalam keadaan lain dalam konsentrasi tertentu menimbulkan efek yang merugikan (Dardiotis *et al*, 2012).

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) merupakan prototipikal sitokin inflamasi yang awalnya dikenal sebagai faktor serum *endotoxin-induced* yang disebabkan oleh nekrosis sel tumor jenis tertentu. *Tumor necrosis factor α* merupakan suatu sitokin pleiotropik yang memiliki efek beragam, antara lain proliferasi, diferensiasi, daya tahan hidup, atau kematian sel, yang melibatkan berbagai macam proses fisiologis dan patologis. *Tumor necrosis factor α* berikatan dengan reseptor spesifik pada permukaan sel target. Pada manusia, cDNA untuk TNF- α pertama kali diperbanyak pada tahun 1984 dan gen yang mengkode faktor transkripsi untuk TNF- α telah dipetakan pada kromosom 6, yaitu pada regio MHC (*major histocompatibility*) (Perry *et al.*,2008).

Tumor necrosis factor α , yang disebut juga dengan *cachectin*, ditemukan sebagai trimer dan merupakan salah satu produk utama dari makrofag yang teraktivasi, fibroblas, sel mast, dan beberapa sel T dan sel NK (*NK cell*). TNF- α

pada awalnya berbentuk prekursor (pTNF- α) dengan berat molekul 27 kD, melalui pembelahan proteolitik dihasilkan bentuk terlarut (*soluble*) (sTNF- α) dengan berat molekul 17 kD. Terdapat berbagai macam fungsi biologis yang dimediasi oleh TNF- α , diantaranya menjadi tombol pengatur respon kekebalan serta mampu menimbulkan efek seluler yang beragam, termasuk apoptosis, nekrosis, efek peradangan, efek proliferasi atau yang mempromosikan pertumbuhan, dan efek hematopoetik (Keystone dan Ware, 2010).

TNF- α yang terdapat pada sistem saraf pusat dapat berasal dari perifer (di luar sistem saraf pusat) atau dari sentral (dari sistem saraf pusat itu sendiri). TNF- α yang berasal dari perifer bisa masuk ke sistem saraf pusat dan bertindak langsung pada parenkim otak dengan melintasi sawar darah-otak, melalui mekanisme transpor aktif difusi pasif dalam beberapa organ *circumventricular*, termasuk area hipotalamus, pituitari, dan kelenjar pineal, sementara itu semua tipe sel saraf diperkirakan mengandung reseptor TNF- α dan mampu mensintesis TNF- α di bawah beberapa kondisi (Perry *et al*, 2002).

Ekspresi protein dan mRNA TNF- α meningkat pada kondisi iskemia otak, dengan puncak ekspresi protein bisa 6 jam setelah onset iskemia atau segera setelahnya (Costelli *et al.*, 2003), sedangkan penelitian lain menyebutkan bahwa TNF- α muncul setelah percobaan tikus model cedera sumsum tulang belakang dan mencapai puncaknya 1 jam setelah cedera. Otak dalam keadaan normal melepaskan TNF- α dalam aktivitas fisiologisnya dalam jumlah tertentu yang berbeda dengan keadaan patologis. TNF- α merupakan pengubah penting termoregulasi dan *hipotalamus-ptuitary-adrenal axis* (HPA-axis), TNF- α secara transien muncul dalam konsentrasi tinggi pada astrosit dan neuron embrionik yang belum matang saat perkembangan otak tikus, juga berguna dalam

pengaturan tidur dan makan. Dengan demikian, keberadaan TNF- α di otak tidak selalu dikaitkan dengan keadaan patologis (Figiel, 2008).

Pada keadaan patologis, misalnya cedera traumatis pada sistem saraf pusat, TNF- α dapat diproduksi oleh berbagai sel. Penelitian oleh Yune (2003) menyatakan bahwa dalam tikus model cedera sumsum tulang belakang, sumber produksi TNF- α memang tidak jelas, namun kemungkinan bahwa mikroglia, astrosit yang reaktif, neuron, sel-sel endotel, dan makrofag yang berinfiltrasi, semua dapat menghasilkan sitokin radang seperti TNF- α setelah cedera. Pendapat lain mengatakan bahwa sel-sel glia merupakan sumber utama dan target banyak sitokin dalam sistem saraf pusat, dan mereka dapat melepaskan banyak zat neuroaktif dalam menanggapi rangsangan sitokin. TNF- α dan IFN- γ secara langsung mempunyai efek racun untuk oligodendrosit, dan bersama-sama dengan sitokin lain, dapat merangsang produksi sitokin peradangan lokal TNF- α , sitokin pro-inflamasi yang dilepaskan oleh sel glia dan sel-sel radang pada daerah luka setelah cedera otak traumatik, juga ikut berperan dalam timbulnya eksitotoksitas. Ditambahkan, TNF- α bersifat toksik untuk kultur sel saraf manusia secara *in vitro*, menyebabkan kerusakan myelin dan toksistas untuk oligodendrosit (Park *et al.*,2008).

Protein TNF- α dan mRNA TNF- α teridentifikasi 1 jam setelah cedera mencapai konsentrasi puncak antara 12 – 24 jam kemudian menurun secara drastis setelah 72 jam. Penelitian lain juga menyatakan bahwa serum TNF- α meningkat kadarnya pada pasien dengan cedera otak traumatika. Dengan demikian, TNF- α merupakan salah satu mediator peradangan yang dilepaskan segera setelah terjadinya cedera (Huang *et al.*,2006).

2.2.2 Reseptor TNF- α

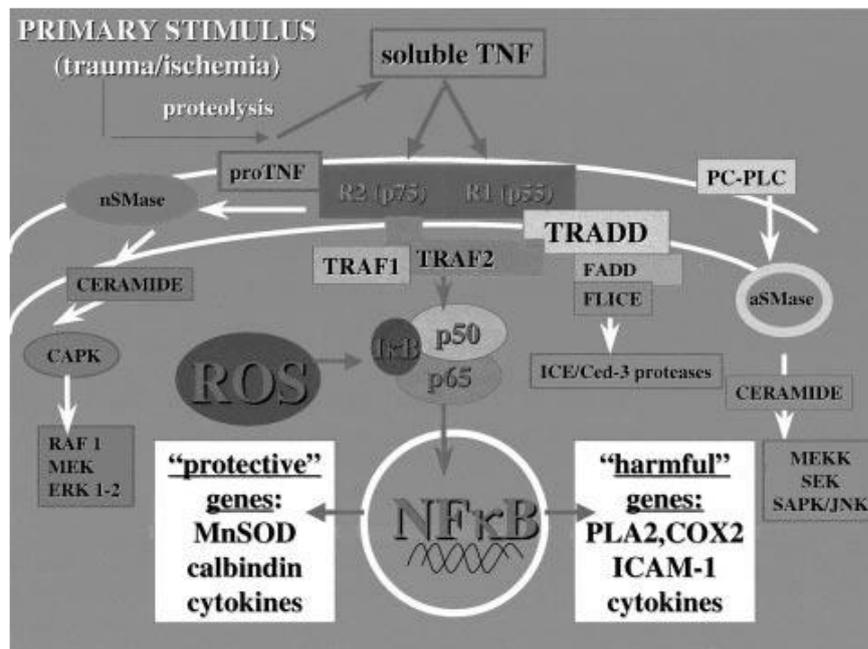
TNF- α memiliki dua *isotype* reseptor, yaitu TNFR1 (p55) dan TNFR2 (p75), dimana kedua reseptor tersebut memiliki profil ekspresi, afinitas *ligand*, struktur, dan jalur sinyal aktivasi yang berbeda-beda. Dalam otak, komponen yang menunjukkan imunoreaktivitas terhadap TNF- α antara lain adalah badan sel neuron, astrosit, mikroglia, sel *polymorphonuclear* (PMN) yang menginfiltrasi, sel endotel vaskuler, dan sel-sel di ruang perivaskuler. Sinyal yang dibawa oleh TNF- α melalui TNFR, memerlukan pembentukan reseptor tersebut pada permukaan membran sebagai trimer sebelum terjadi ikatan *ligand*. Proses trimerisasi tersebut terjadi melalui ekor reseptor sitoplasmik intraseluler. TNFR1 berpotensi degeneratif, sementara TNFR2 berpotensi protektif (Berridge, 2012). Kebanyakan efek yang disebabkan oleh TNF- α dimediasi oleh TNFR1, yang berisi domain kematian (*death domain*) yang berinteraksi langsung dengan TNFR1 dan dapat bertindak sebagai titik bifurkasi untuk sinyal yang berhubungan dengan kematian sel atau kelangsungan hidup sel. Penghantaran sinyal TNF- α melalui TNFR1 dan TNFR2 hingga mampu mencetuskan berbagai macam respon seluler, ditentukan oleh banyak faktor, diantaranya adalah status metabolik sel dan protein adaptor yang terdapat pada sel. Faktor-faktor tersebut mempengaruhi kemampuan sinyal yang dibawa TNF- α dalam mengaktivasi sejumlah jalur penghantaran sinyal intraseluler, termasuk jalur sinyal *nuclear factor kappa B* (NF- κ B), p38, *c-jun N-terminal kinase* (JNK), dan jalur *ceramide/sphingomyelinase*, yang menghasilkan sejumlah respon seperti inflamasi, proliferasi, migrasi sel, apoptosis, dan nekrosis (Figiel, 2008).

Sementara Rangamani (2007) menyebutkan bahwa sinyal jalur TNF- α merupakan jalur klasik yang dapat berfungsi baik untuk aktivasi jalur *survival* dimana dalam aktivitasnya menggunakan jalur NF- κ B, maupun jalur apoptosis

dimana dalam aktivitasnya menggunakan kaskade *caspase*. Mekanisme kerja TNF- α pada reseptornya berdasarkan pada pekerjaan yang dilakukan oleh Rangamani (2007), yang dimodelkan menjadi 4 modul yaitu pembentukan kompleks awal, pembentukan NF- κ B, pembentukan kaskade *caspase*, dan aktivitas inti.

2.2.3 Pembentukan kompleks awal

Setelah TNF- α berikatan dengan TNFR1, dimulailah pemanggilan terhadap domain-domain kematian. Domain yang pertama kali dipanggil untuk berikatan yaitu *TNF-receptor-associated death domain* (TRADD), domain selanjutnya yang dipanggil yaitu *TNF-receptor factor-2* (TRAF-2) dan *receptor-interacting protein* (RIP-1) (Keystone dan Ware, 2010).

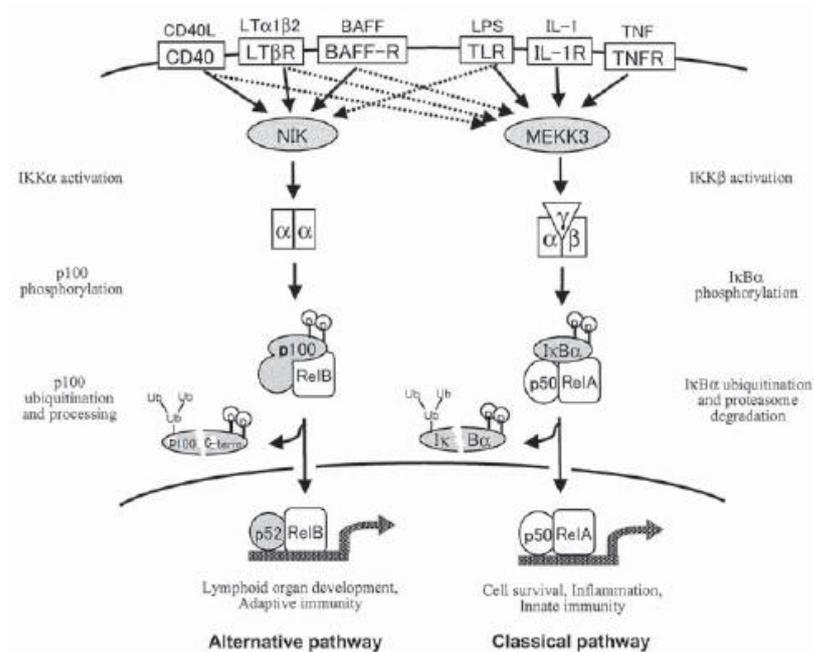


Gambar 2.7 Mekanisme proses dari pembentukan TNF- α (Shohami *et al.*,1999).TBI menginduksi sintesis TNF-peptida prekursor, proTNF- α , mengaktifkan enzim proteolitik yang menghidrolisis membran pro-TNF- α , dan melepaskan TNF- α ke ruang ekstraselular, melalui interaksi reseptor R1 (p55) dan R2 (p75). Setelah TNF- α berikatan, sitosol dari reseptor tersebut merekrut beberapa protein adapter intraseluler (TRADD). TRADD berinteraksi dengan domain kematian R1 melalui sinyal FADD, FLICE dan TRAF-1. TRAF2. R2 berinteraksi langsung dengan TRAF2 dan bergabung dengan TRAF1. TRAF2 mengaktifkan NF- κ B dengan menghambat protein I κ B, p50 dan p65. Aktivasi NF- κ B mempengaruhi ekspresi gen yang dapat berupa pelindung maupun berbahaya.

Pada akhirnya, pada tahap ini dihasilkan suatu rangkaian molekul yang terdiri atas TNF- α /TNFR1/TRADD/TRAF-2/RIP-1 yang selanjutnya disebut “kompleks awal”. “Kompleks awal” inilah yang selanjutnya dapat bereaksi dengan IKK atau *Fas-associated death domain* (FADD). Keberadaan TRADD sudah cukup untuk membangkitkan kaskade apoptosis, *FADD-like interleukin-1-converting enzyme* (FLICE alias *caspase-8*), sedangkan TRAF-2 yang berikatan dengan RIP-1 berguna untuk induksi NF- κ B (Perry *et al.*, 2008).

2.2.4 Pembentukan NF- κ B

Aktivasi NF- κ B diregulasi sangat ketat oleh sinyal yang mendegradasi I κ B pada sitoplasma sel. Pada proses *signaling* NF- κ B, protein I κ B (I κ B α atau p100) difosforilasi melalui aktivasi kompleks *I κ B kinase* (IKK) pada tempat spesifik (gambar 5). Fosforilasi protein I κ B selanjutnya akan mencetuskan poliubiquitinasi dari protein I κ B, sehingga dimer NF- κ B menjadi bebas. Kompleks IKK tersusun dari subunit katalitik IKK α dan IKK β , dan subunit regulator IKK γ , yang juga dikenal sebagai *NF- κ B essential modulator* (NEMO). Protein IKK α dan IKK β tersebut memediasi sinyal yang berbeda. Komponen IKK β penting untuk *signaling* aktivasi NF- κ B melalui jalur klasik dan memiliki karakteristik diaktifkan oleh ikatan *ligand* pada reseptor TNF tipe 1 atau 2 (TNFR1/2), *T-cell receptor* (TCR), *B-cell receptor* (BCR), atau *Toll-like receptor* (TLR). Komponen IKK α penting untuk *signaling* aktivasi NF- κ B melalui jalur alternatif dan diaktifkan melalui aktivasi anggota famili reseptor TNF tertentu, termasuk *lymphotoxin β receptor* (LT β R), *B-cell activating factor* milik *TNF family receptor* (BAFF-R), CD40, dan CD30 (Keystone dan Ware, 2010).

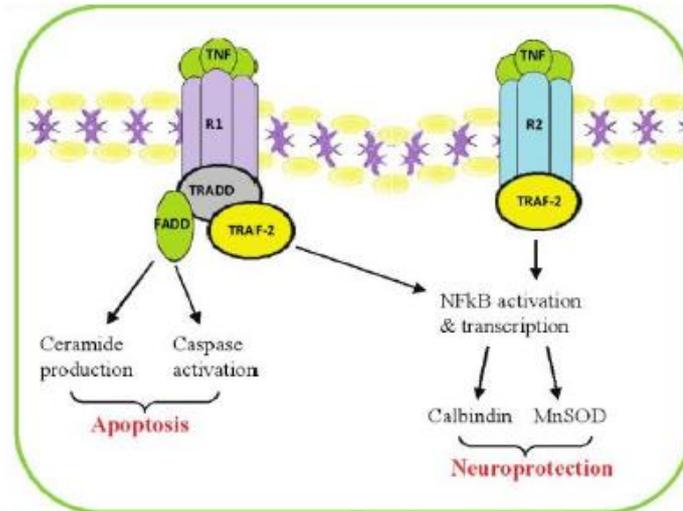


Gambar 2.8 Jalur klasik dan alternatif untuk aktivasi NF-κB (Nishikori, 2005). Aktivasi sinyal klasik NF-κB, biasanya dipicu melalui TNFR, IL-1R, atau TLR dan pada akhirnya sinyal dimediasi oleh MAP / ERK kinase kinase 3 (MEKK3) dan IKKb.

2.2.5 Aktivasi kaskade caspase

Caspase merupakan mesin utama dalam mekanisme apoptosis. Caspase dalam jalur apoptosis terkait TNF- α terdiri atas caspase inisiator (caspase-8), yang jika dalam bentuk inaktif disebut *procaspase-8*, dan caspase efektor (caspase-3) (Sugawara, 2004). “Kompleks awal” yang sudah terbentuk, berikatan dengan *Fas-associated death domain* (FADD). Setelah berikatan dengan FADD, “kompleks awal” melepaskan salah satu anggotanya, yaitu TNFR1. Sehingga terbentuklah kompleks baru dengan anggota tambahan FADD, tanpa TNFR1. Kompleks ini mengaktifkan *procaspase-8* menjadi caspase-8 teraktivasi. Dengan teraktivasinya caspase-8, maka kompleks yang baru terbentuk sebelumnya, terurai menjadi molekul yang terpisah-pisah. Caspase-8 sebagai suatu molekul inisiator mengaktifkan caspase efektor, yaitu caspase-3. Hasil akhir dari tahap ini

adalah *caspase-3* yang mampu bertranslokasi ke inti untuk memulai apoptosis (Perry *et al.*,2008)



Gambar 2.9 Reseptor dan jalur signaling TNF- α (Watters *et al.*, 2011). Setelah terjadinya TBI, akan memicu terjadinya TNF- α melalui interaksi reseptor R1 (p55) dan R2 (p75). Setelah TNF- α berikatan, sitosol dari reseptor tersebut merekrut beberapa protein adapter intraseluler (TRADD). TRADD berinteraksi dengan domain kematian R1 melalui sinyal FADD, FLICE dan TRAF-1, TRAF2. R2 berinteraksi langsung dengan TRAF2 mengaktifkan NF- κ B. FADD akan menyebabkan produksi ceramide dan mengaktifkan caspase sehingga berlanjut menjadi apoptosis. Sedangkan NF- κ B dan transkripsi mengaktifkan calbindin dan MnSOD dan berfungsi sebagai neuroprotektan.

2.2.6 Aktivitas inti

Proses selanjutnya terjadi aktivitas inti yang dilakukan oleh molekul-molekul akhir yang dihasilkan oleh perikatan TNF- α dengan TNFR1. Hasil yang diperoleh dari serangkaian tahapan sebelumnya yaitu NF- κ B dan *caspase-3* teraktivasi. Kedua molekul ini selanjutnya bertranslokasi ke inti sel untuk mengadakan aktivitasnya. *Caspase-3* teraktivasi sebagai mesin utama apoptosis, membelah DNA pada daerah *linker* menggunakan *caspase associated DNase* (CAD) dengan terlebih dahulu mendegradasi inhibitorynya, *inhibitor of CAD* (ICAD). Di lain pihak, NF- κ B mengadakan penghambatan terhadap proses apoptosis dengan berikatan dengan DNA untuk mentranskripsi protein penghambat apoptosis, yang disebut *inhibitor of apoptosis protein* (IAP) dan juga

I κ B diantaranya. c-IAP bekerja menghambat apoptosis dengan cara mengikat *caspase-3* teraktivasi (Figiel, 2008).

2.3 Apoptosis

2.3.1 Karakteristik Umum

Apoptosis merupakan kematian sel yang digambarkan perubahan pada sel (menyusut) dan kondensasi nuklear, fragmentasi DNA dan formasi apoptosis *bodies*. Apoptosis membutuhkan kaskade intraseluler untuk menyelesaikan kematian sel, selanjutnya disebut sebagai kematian sel yang terprogram. Beberapa sel menunjukkan fragmentasi yang membentuk pecahan-pecahan sel atau *apoptotic bodies* yang berada di sekitar sel tersebut. Fragmen-fragmen sel tersebut akan cepat difagositosis oleh makrofag sebelum sel pecah dan menyebabkan kerusakan pada jaringan. Fragmen sel terbungkus oleh membran sel dan berisi organela yang masih utuh. Sel akan kehilangan kontak interseluler yang normal. Jadi sel tidak mengalami proses inflamasi karena tidak adanya bahan-bahan sitosolik yang dilepas ke ruang interseluler. Proses ini memerlukan energi dalam bentuk ATP (Zhang *et al*, 2005).

Apoptosis terjadi beberapa jam atau hari setelah cedera primer. Translokasi phosphatidylserine mengawali pemisahan tetapi disintegrasi membran secara progresif terjadi bersama-sama dengan lisis membran inti, kondensasi kromatin, dan fragmentasi DNA. Apoptosis secara umum memerlukan suplai energi dan keseimbangan antara protein pro dan anti-apoptosis yang terjadi secara alami. Aktivasi dan deaktivasi yang berurutan dari *caspase*, yang merupakan protease spesifik dari interleukin-converting enzyme family, telah diidentifikasi sebagai mediator paling penting dari kematian sel terprogram (Werner dan Engelhard, 2007).

Karena apoptosis membutuhkan energi, maka bila dijumpai defisit energi prosesnya akan beralih menjadi nekrosis (*secondary necrosis*). Sel-sel yang mati dibuang dari jaringan melalui fagositosis yang terjadi pada jam jam pertama setelah kematian. Jika kapasitas fagositosis terbatas sehingga sel apoptosis masih terdapat dalam jaringan selama satu atau dua hari, maka membrannya akan mengalami disintegrasi dan terjadi nekrosis sekunder (Taylor *et al*, 2008).

Apoptosis juga berhubungan dengan kadar kalium di dalam sel. Pada awal proses apoptosis terjadi peningkatan effluks kalium dari dalam sel. Apabila kadar ion potassium dalam sel lebih rendah dari kadar fisiologis, maka akan terjadi aktivasi caspase-3 yang akan menyebabkan apoptosis dimana intensitas transformasi ini bergantung dari pada kadar kalium (Brunelle dan Letai *et al*, 2009).

2.3.2 Mekanisme Apoptosis

Mekanisme apoptosis terjadi melalui dua jalur, yaitu *caspase-dependent* dan *caspase-independent*. *Caspase-dependent pathway* dapat melalui jalur intrinsik yang dipicu oleh kegagalan metabolik mitokondria atau jalur ekstrinsik yang dipicu oleh “reseptor kematian”, yaitu kelompok TNF reseptor. *Caspase-independent pathway* dipicu oleh protein mitokondria seperti Apoptosis Inducing Factor (AIF) yang keluar dari membran mitokondria akibat depolarisasi membran luar mitokondria (Berridge, 2012). Sepertiga kematian sel berhubungan dengan caspase dependent apoptosis, sepertiga yang lain caspase independen, dan sepertiga sisanya berhubungan dengan nekrosis (Brunelle *et al*, 2009).

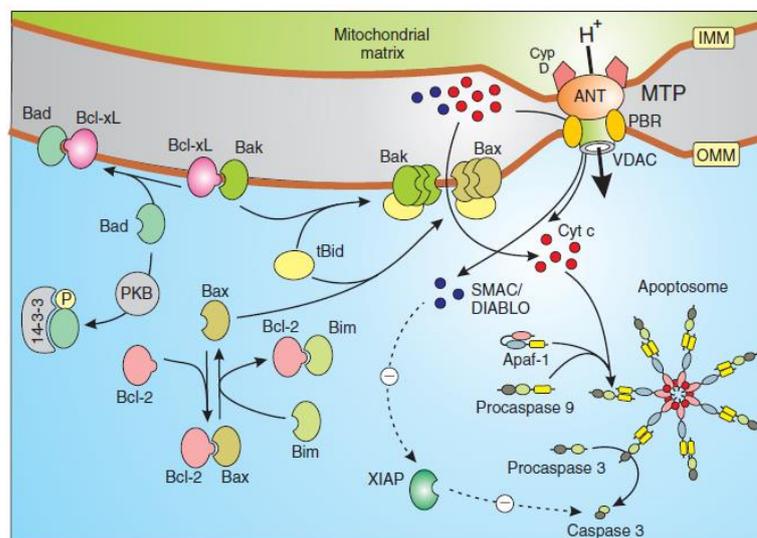
(i) Caspase-Dependent Apoptosis

Caspase-Dependent apoptosis ini berjalan melalui jaras intrinsik dan ekstrinsik. Ada 2 jalur yang terlibat, yaitu

a) Jalur Intrinsik

Pemicu apoptosis melalui jalur intrinsik adalah *cell-stress* yang merusak fungsi mitokondria dan retikulum endoplasmik. Membran mitokondria mengalami depolarisasi dan sitokrom c yaitu suatu enzim yang terletak di antara membran dalam dan luar mitokondria akan keluar ke sitoplasma melalui suatu pori yang disebut *Mitochondrial Permeability Transition Pore* (MPTP) (Werner dan Engelhard, 2007).

Selain *cell stress*, *glucocorticoid*, radiasi, kekurangan makanan, infeksi virus, dan hipoksia juga menjadi faktor pencetus. Pada sel yang sehat dijumpai ekspresi protein Bcl-2 pada permukaan membran luar mitokondria. Bcl-2 mengelilingi / berbatasan dengan protein *Apoptotic Protease Activating Factor-1* (Apaf-1). Kerusakan dalam sel menyebabkan Bcl-2 melepaskan Apaf-1 dan selanjutnya membuka MPTP yang melepaskan sitokrom c ke dalam *cytosol*. Sitokrom c dan Apaf-1 akan mengikat molekul *caspase-9*. Hasil kompleks sitokrom c, Apaf-1, *caspase-9*, dan ATP disebut *apoptosome* (Berridge, 2012).



Gambar 2.10 Aktivasi apoptosis dari dalam sel (*Intrinsic Pathway*) (Berridge et al., 2012). Kejadian apoptosis intrinsik pada mitokondria yang berespon terhadap pelepasan cytochrome c dan bentuk apoptosom. Kejadian kritis dari jalur intrinsik adalah pelepasan cytochrome (Cyt c) melalui mekanisme yang masih perlu diteliti. Satu hipotesis berdasarkan bahwa bentuk mitokondrial permeability transition pore (MTP) menyediakan suatu jalan lebar untuk cytochrome c melalui outer mitochondrial membrane (OMM). Hipotesis yang lain adalah Cyt c melalui channel bentuk dari polimerisasi factor-faktor apoptosis seperti Bak dan Bax, yang merupakan anggota superfamily Bcl-2. Baik bukan Bax dan Bak dapat polimerisasi tergantung jaringan kompleks interaksi dengan anggota yang lain dari superfamily Bcl-2. Bax dipertahankan

oleh batasan terhadap faktor anti-apoptosis Bcl-2, tetapi aksi inhibisi dapat diadukan oleh faktor pro-apoptotic Bim. Demikian juga, Bcl-2 dihambat oleh Bcl-XL, tetapi inhibisi ini dapat dikembalikan oleh Bad. Kemampuan Bad untuk menyingkirkan Bcl-XL diatur oleh jalur signaling PtdIns 3-kinase, yang aksinya melalui protein kinase B (PKB) yang memfosforilasi bad, yang selanjutnya dikeluarkan aksinya oleh ikatan dengan protein 14-3-3.

Apoptosome mengaktifkan caspase 3. Rangkaian aktivasi dari caspase ini akan membuat protein dalam sitoplasma dan DNA kromosom mengalami degradasi (Berridge *et al*, 2012).

b) Jalur Ekstrinsik

Jalur ini dipicu oleh ikatan dengan *Death Receptor*, yaitu reseptor yang tergolong *TNF-receptor family*, seperti *Fas receptor*. *Ligand* yang dapat memicu adalah FasL atau Apo-1/CD 95 dan TRAIL. Reseptor tersebut mempunyai bagian yang disebut:

- *Fas Associated Death Domain* (FADD),
- *TNF-receptor Associated Death Domain* (TRADD) atau
- *Caspase and RIP-adaptor with Death Domain* (CRADD)
- *Receptor Interacting Protein* (RIP).

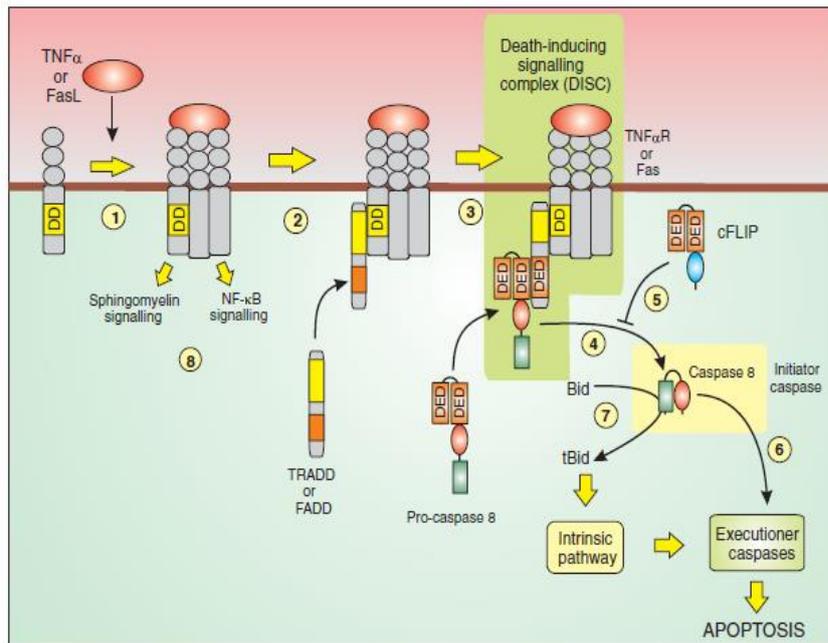
Saat diaktivasi, reseptor akan merekrut protein adaptor yang kemudian merekrut *pro-caspase 8* (*precursor caspase 8*) dan menjadikannya *caspase 8* yang aktif. *Caspase 8* akan mengaktifkan *caspase 3* untuk mengeksekusi proses selanjutnya. *Caspase 8* dan *9* disebut *initiator caspases* atau *upstream caspases* dan *caspase 3, 6, dan 7* disebut *executioner caspases* atau *down stream caspases* (Hoh, 2008).

Reseptor *Fas* berikatan dengan *Fas ligand* (FasL), yaitu suatu protein transmembran. Interaksi antara reseptor *Fas* dan FasL membentuk *death-inducing signaling complex* (DISC) yang berisi FADD, *caspase-8*, dan *caspase-10*. Dalam interaksi tersebut terdapat dua tipe aktivasi kaskade *caspase*, yaitu tipe I dan tipe II. Tipe I yaitu dengan pengaktifan *caspase-8* maka akan terjadi

aktivasi anggota lain dari *caspase family* yang berperan sebagai pencetus apoptosis. Tipe II, yaitu ikatan Fas-DISC akan membentuk *feedback loop* untuk menambah lepasnya faktor pro-apoptosis dari mitokondria dan memperkuat aktivasi *caspase-8*. Fas diketahui mempunyai dua jaras apoptosis. Daxx adalah suatu Fas yang mampu menghambat Bcl-2. Jaras Fas yang lain adalah melalui ikatan FADD, yang tidak menghambat Bcl-2 (Brunelle *et al*, 2009).

Sinyal faktor ekstrasellular seperti hormon, *growth factor*, *nitric oxide*, atau sitokin mengaktivasi apoptosis melalui jaras ekstrinsik. Sinyal ini bisa menambah atau menghambat proses apoptosis. TNF adalah suatu sitokin utama yang diproduksi oleh makrofag aktif dan merupakan mediator ekstrinsik utama dari apoptosis. Kebanyakan sel-sel dalam tubuh manusia mempunyai dua reseptor untuk TNF, yaitu TNF-R1 dan TNF-R2. Ikatan terhadap reseptor TNF-R1 secara tidak langsung dapat mengaktivasi faktor transkripsi yang terlibat dengan *cell survival* (Berridge, 2012).

Homodimer pro-apoptosis Bax yang dibentuk pada membran luar mitokondria diperlukan untuk membentuk saluran yang meningkatkan permeabilitas membran mitokondria dan melepaskan aktivator *caspase*, seperti sitokrom c dan SMAC (*Secondary Mitochondrial Activator of Caspase*) (Hoh, 2008).

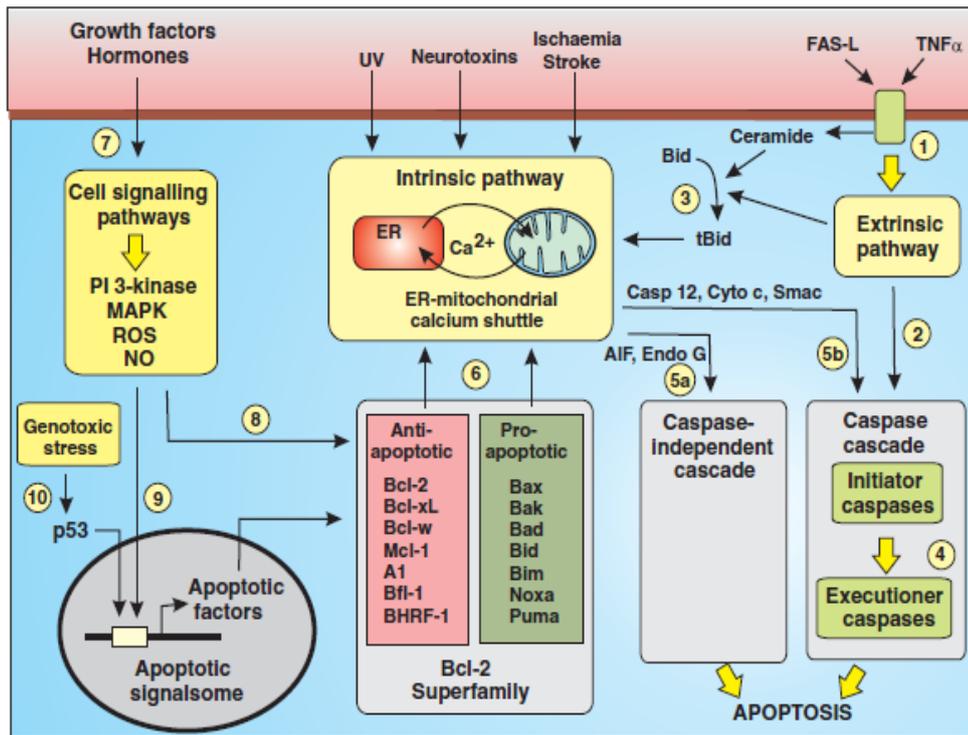


Gambar 2.11 Aktivasi apoptosis dari luar sel (*Extrinsic Pathway*) (Berridge, 2012). Aktivasi Tumour necrosis factor α ($\text{TNF } \alpha$) jalur apoptosis ekstrinsik. Ikatan apoptosis seperti $\text{TNF } \alpha$ atau Fas ligand (FasL) terikat terhadap anggota family reseptor trimeric $\text{TNF } \alpha$ ($\text{TNF } \alpha\text{R}$ atau Fas) untuk mengawali kaskade signaling ekstrinsik.

c) *Cross-talk*

Antara jalur intrinsik dan ekstrinsik bisa timbul kerjasama, misalnya *caspase 8* dapat membelah anggota famili Bcl-2 protein yang pro-apoptotik, yaitu Bid. Bid yang terbelah ini (*truncated Bid*) bertranslokasi ke mitokondria dan menyebabkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria serta menimbulkan perubahan konformasi pada Bax dan Bak (menyebabkan homo atau heterodimerisasi) yang hasilnya juga dapat membocorkan sitokrom c (Berridge, 2012).

Demikian juga *caspase 3* yang aktif dapat mengaktifkan *caspase* lain seperti *caspase 2*, *6*, *8*, dan *10* dan dapat membelah *procaspase 9* menjadi *caspase 9* yang aktif serta menciptakan amplifikasi dari jalur apoptotik melalui suatu *positive feed-back loop* (Elmore, 2007).



Gambar 2.12 Jalur apoptosis Intrinsik, Ekstrinsik dan Cross Talk (Berridge, 2012). Antara jalur intrinsik dan ekstrinsik bisa timbul *cross-talk*, misalnya *caspase 8* dapat membelah Bid. Selanjutnya Bid tersebut bertranslokasi ke mitokondria dan menyebabkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria serta menimbulkan perubahan konformasi pada Bax dan Bak yang hasilnya juga dapat melepaskan sitokrom c.

Tabel 2.1 Protein jalur eksekusi apoptosis (Elmore, 2007)

Abbreviation	Protein name	Select alternate nomenclature
Caspase-3	CysteinyI aspartic acid-protease-3	CPP32, Yama, Apopain, SCA-1, LICE
Caspase-6	CysteinyI aspartic acid-protease-6	Mch-2
Caspase-7	CysteinyI aspartic acid-protease-7	Mch-3, ICE-LAP-3, CMH-1
Caspase-10	CysteinyI aspartic acid-protease-10	Mch-4, FLICE-2
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase	ADP ribosyl transferase, ADPRT1, PPOL
Alpha fodrin	Spectrin alpha chain	Alpha-II spectrin, fodrin alpha chain
NuMA	Nuclear mitotic apparatus protein	SP-H antigen
CAD	Caspase-activated DNase	DNA fragmentation factor subunit beta, DFF-40, caspase-activated nuclease, CPAN
ICAD	Inhibitor of CAD	DNA fragmentation factor subunit alpha, DFF-45

References

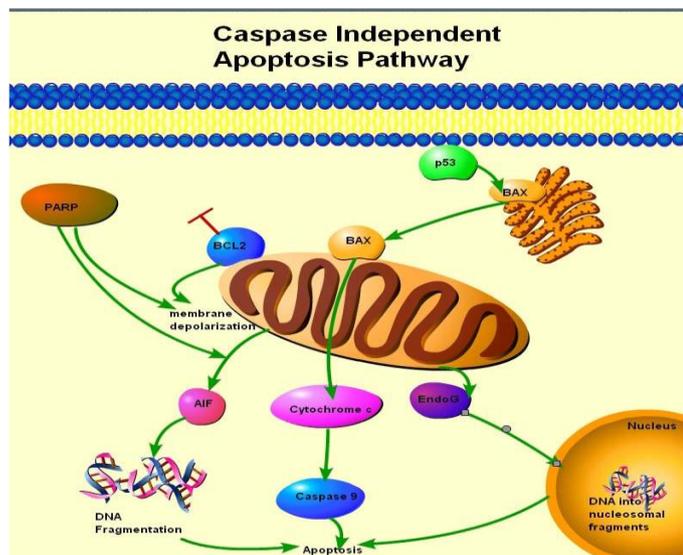
1. Human Protein Reference Database (<http://www.hprd.org/>)
2. ExPASy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org/>)

(ii) Caspase-Independent Apoptosis

Jalur ini tidak membutuhkan perantara *caspase*. Jalur ini mempunyai mekanisme tersendiri menuju kematian sel. Yang berperan di sini adalah molekul

protein mitokondria, yaitu *apoptosis inducing factor* (AIF) dan *Endonuclease G* (Hoh, 2008).

Mitokondria masih memiliki beberapa jenis protein lainnya untuk mencetuskan apoptosis antara lain HtrA2/Omi dan *second mitochondrial activator of caspases* (Smac). Mitokondria juga mempunyai senjata untuk mendukung pengaruh faktor survival yang berfungsi menghentikan proses apoptotik, yaitu *inhibitors of Apoptosis Protein* (IAP seperti cellular IAP-1, cIAP-2, *X-chromosome-linked IAP* (XIAP). HtrA2/Omi dan Smac menghentikan aktifitas IAP dan mendukung terjadinya apoptosis. Bcl-2 dan Bcl-xL adalah *oncoprotein* yang bersifat antiapoptotik. Smac dan Htr2A/Omi memblokir kerja IAP menghambat kerja XIAP sehingga mendukung terjadinya apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa mitokondria merupakan salah satu pusat penentu hidup sel (Berridge, 2012).



Gambar 2.13 *Jarar caspase independent apoptosis* (Hoh, 2008). Jalur **Caspase Independent Apoptosis**. Jalur ini tidak membutuhkan perantara caspase, yang berperan adalah molekul protein mitokondria, yaitu *apoptosis inducing factor* (AIF) dan *Endonuclease G*.

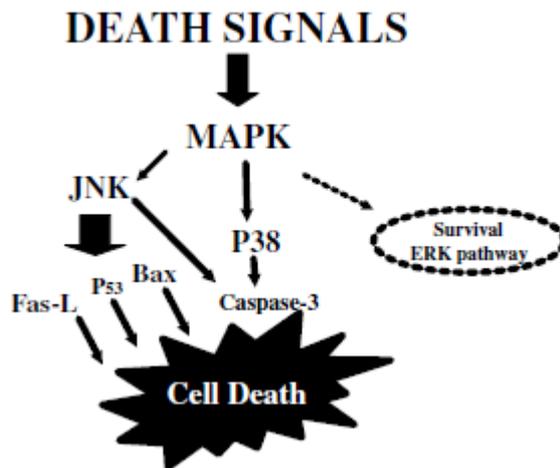
2.3.3 Abnormalitas Signal Sel Dan Kematian Neuron Pada TBI

Kematian neuron terjadi setelah ekperimental dan klinis TBI. Selain area otak yang kontusio, hipokampus sangat rentan terhadap TBI. Jalur kematian sel

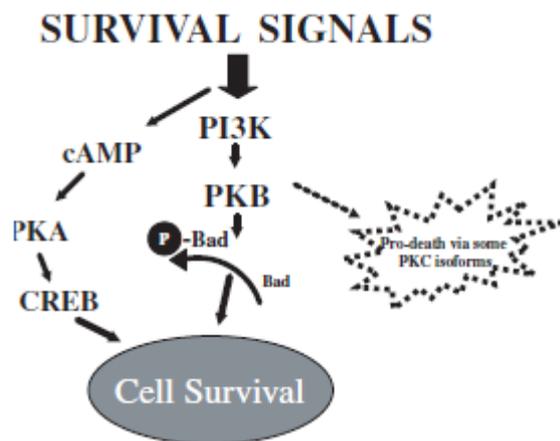
diaktifasi oleh TBI termasuk kerusakan mitokondria, rilis sitokrom C dengan aktifikasi kaspase, rilis AIF dan jalur *receptor- couple pro-death*. Neurotransmitter, neurotropin, sitokin, *growth factor*, dan stress oksidatif akan mengaktifasi signal aktivasi *pro-survival* dan *pro-death*. Reseptor berpasangan tersebut untuk signal jalur transduksi termasuk interaksi dan cross-talk diantara multiple serin dan kaskade protein tirosin kinase (Zasler *et al.*,2007).

Beberapa kinase termasuk proses kematian sel seperti serin atau threonin protein kinase. Partisipan penting pada kaskade kematian sel yaitu *mitogen activated protein kinase* (MAPK). Kaskade MAPKs dimediasi oleh protein kinase yang berurutan diaktifasi oleh fosforilasi. Komponen yang terlibat dalam kaskade kematian sel yaitu, *jun kinase* (JNK) dan 38 MAPK. Jalur JNK dan p38 mengaktifasi kaspase 3. Aktifikasi JNK mengawali induksi dari gen pro death termasuk *PasL*. JNK meningkatkan p53 dan Bax dan kematian sel juga meningkat. Fungsi JNK dan p38 berbeda jalur signalnya dan faktor transkripsi nuklear diaktifasi oleh stimulasi pro *death* seperti stress oksidasi (Zalmer *et al.*,2007)

Kaskade protein kinase memiliki peranan penting. *Phosphoinositide 3 kinase* (PI3-K), protein kinase B (PKB) dan protein kinase A (PKA) merupakan contoh dari protein kinase. PKB disebut juga sebagai akt, suatu nomenklatur kompleks dari kinase yang berkembang pada beberapa proses penyakit. PKB diaktifasi oleh respon PI4 pada signal survival, dan pro survival, pertumbuhan, aksi plastisitas sinaps. PKB mempengaruhi survival dari sejumlah mekanisme termasuk fosforilasi dan inaktivasi dari mediator pro death seperti Bad. Bad merupakan anggota dari Bcl-2 dimana difosforilasi oleh PKB pada ser136 yang menghasilkan disosiasi Bad dari Bcl-xL dan mengikat protein yang menghambat kematian sel (Faul *et al.*, 2008).



Gambar 2.14 Mekanisme proses kematian sel melalui peranan *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) dalam mentraduksi sinyal yang terlibat dalam kematian sel. (Zalmer *et al.*,2007). Stres oksidatif memicu aktivasi MAPK dengan mengaktifkan *jun kinase* (JNK) yang merupakan mediator terjadinya kematian sel dan dimediasi oleh beberapa mekanisme termasuk reseptor kematian sel (Fas-L, p53 dan Bax).



Gambar 2.15 Mekanisme peranan kelangsungan hidup sel (*survival cell*) melalui aktivasi sinyal kinase (Zalmer *et al.*,2007). Jalur yang terlibat adalah *Phosphoinositide 3-kinase* (PI3-K), *protein kinase B* (PKB), dan *proteinkinase A* (PKA). PKB mempengaruhi kelangsungan hidup sel melalui beberapa mekanisme termasuk fosforilasi dan inaktivasi mediator pro-kematian Bad. Fosforilasi Bad menghambat Bcl-xL. Aktivasi CAMP melalui PKA juga dapat menyebabkan pembentukan faktor transkripsi *cAMP response element binding protein* (CREB), yang juga menyebabkan kelangsungan hidup sel (*cell survival*).

2.4 Catechins Teh Hijau (*Green Tea Catechin*, GTC)

Catechins adalah senyawa dominan teh hijau yang merupakan senyawa sukar larut air dingin, tidak berwarna dan memberikan rasa pahit (Alamsyah, 2006). Komponen *catechins* ini lebih banyak terdapat dalam teh hijau dibandingkan teh hitam. Dalam teh hitam, sebagian besar *catechins* dioksidasi menjadi teaflavin dan tearubigin (Hartoyo, 2009).

Catechins bersifat asam lemah ($pK_{a1} = 7.72$ dan $pK_{a2} = 10.22$). tidak stabil di udara terbuka, mudah teroksidasi pada pH mendekati netral dan mudah terurai oleh cahaya dengan laju reaksi lebih besar pada pH rendah. (Lucida, 2009)

2.4.1 Jenis Teh

Secara umum, terdapat 4 jenis teh, yaitu

a. Teh hijau

Teh Hijau adalah teh yang tidak melewati proses oksidasi enzimatik. Teh jenis ini paling populer dan dipercaya berkhasiat untuk kesehatan. Setelah daunnya dipetik, kemudian memasuki tahapan pelayuan kemudian disangrai untuk mencegah terjadinya proses oksidasi pada daun. Proses terakhir adalah pengeringan daun, agar keharuman dan warna hijaunya tetap terjaga.

b. Teh oolong

Teh oolong merupakan teh semioksidasi enzimatis. Proses pengolahannya setelah dipetik, daun dijemur dibawah sinar matahari agar layu. Proses ini ditujukan untuk menurunkan kadar air dan membuat daun lebih lembut. Kemudian daun digiling untuk mengeluarkan airnya diikuti proses oksidasi enzimatik yang pendek sebelum dikeringkan di oven. Setelah diproses, warna daunnya berubah menjadi seperti tembaga dengan citarasa ringan, antara teh hijau dan teh hitam.

c. Teh hitam

Teh hitam merupakan teh yang mengalami proses oksidasi enzimatik sempurna. Proses pengolahannya dimulai dengan pelayuan selama 12-18 jam. Proses ini untuk mengurangi kadar air dalam daun. Setelah pelayuan, dilakukan penggilingan. Hancurnya membran daun saat penggilingan menyebabkan keluarnya sari teh dan minyak esensial sehingga memunculkan aroma khas

d. Teh Putih

Teh putih adalah teh yang dibuat dari pucuk daun yang tidak mengalami proses oksidasi dan sebelum dipetik, daun dilindungi dari sinar matahari untuk menghambat pembentukan klorofil.

(Heroniaty, 2012)

Teh hijau dikelompokkan menjadi tiga tipe berdasarkan perbedaan derajat fermentasinya, yaitu teh hijau (non fermentasi), oolong (semi fermentasi), dan teh hitam (fermentasi). Terdapat empat tahap dalam memproses teh. Teh awalnya dipetik dan dibiarkan sedikit dikeringkan, lalu dipanggang untuk menginaktivasi enzim *polyphenol oxydase* dan *glycosidase* dan menghentikan proses fermentasi. Kemudian daun teh digulung, dikeringkan dan dikemas. Pembuatan teh hitam lebih rumit, karena melalui fermentasi berulang dan kemudian dipanggang hingga berwarna coklat kehitaman. Teh oolong mengalami fermentasi lebih singkat daripada teh hitam. Proses oksidasi teh menghasilkan *tannins*. *Tannins* terdiri dari *fenolic acid*, *gallic acid*, *poluols*, dan polimer partikel *flavonoid* sederhana (Gramza *et al.*, 2005).

Selama fermentasi, *catechins* mengalami oksidasi oleh enzim *polyphenol oxidase*. Akibatnya *catechins* menjadi *quinones* dan mengalami polimerisasi menjadi struktur yang lebih kompleks, yaitu *theaflavins*, *thearubigens*, dan molekul dengan massa yang lebih besar. *Theaflavins* dan kandungan gallate-nya

terjadi karena kondensasi EC dan EGC. Fermentasi menurunkan kadar *catechins* dan meningkatkan kadar *gallic acid* (Gramza *et al.*, 2005).

Catechins diekstrak dengan menggunakan etil asetat (Yashin *et al.*, 2012). *Catechins* kualitas terbaik didapatkan dengan mengekstraksi pada suhu 77-80°C. Molekul EC dan EGC yang berukuran lebih kecil diekstraksi lebih cepat dibandingkan dengan EGCG dan ECG. Peningkatan pH juga dapat menurunkan kadar *catechins*, namun meningkatkan kadar *caffeine*. Peningkatan kadar *caffeine* disebabkan karena adanya degradasi *theaflavins* dari agregat *caffeine-theaflavin* (Gramza *et al.*, 2005).

2.4.2 Morfologi GTC

Camellia sinensis mengandung *catechins* sebesar 25-35% (Sutherland *et al.*, 2006). Klon GMB-4 *Camellia sinensis* memiliki kadar *catechins* 14-16% (Susanti *et al.*, 2015). Komponen lain pada teh adalah protein (15% berat kering), karbohidrat (5-7% berat kering), mineral (5% berat kering), serta sedikit komponen lemak, sterol, vitamin, *xanthic base* (cafein), pigmen, dan bahan volatil (Chacko *et al.*, 2010).

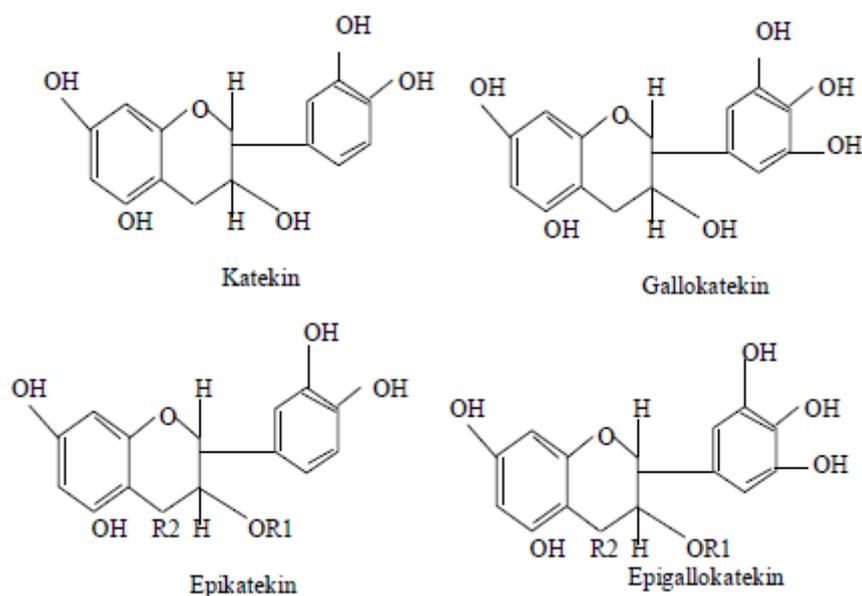
Catechins adalah derivat dari flavan dan ditandai dengan derajat oksidasi pada cincin heterosiklik tertinggi dan larut air. Bentuk terbanyak dari *catechins* adalah ester *gallic acid*, yaitu (-)-*epigallocatechin-3-gallate* (EGCG). Selain itu juga didapatkan (-)-*epigallocatechin* (EGC), (-)-*epicatechin* (EC), (+)-*catechin* (C), (-)-*gallocatechin* (GC), dan (-)-*epicatechin-3-gallate* (ECG) (Mandel dan Youdin, 2004). *Catechins* yang termetilasi antara lain (-)-*epigallocatechin-3-(3-O-methylgallate)* dan (-)-*epigallocatechin-3-(4-O-methylgallate)*. Teh merupakan satu-satunya tanaman yang mengandung EGCG (Gramza *et al.*, 2005; Sutherland *et al.*, 2006).

Kandungan EGCG dari minuman teh hijau kemasan bervariasi hingga 50%. Perbedaan kandungan EGCG dapat disebabkan karena perbedaan komposisi polifenol pada daun teh, maupun proses pembuatan minuman. Kandungan *catechins* didapatkan lebih tinggi pada daun teh yang lebih muda (Gramza *et al.*, 2005).

Ekstrak teh hijau ditargetkan untuk menjadi peluang dalam aktivitas kardiovaskuler, antikarsinogenik, dan anti inflamasi melalui mekanisme antioksidan dan aksi *iron-chelating*, serta dalam modulasi metabolisme endogen dan enzim antioksidan. Selain mekanisme di atas, *catechins* juga memiliki sifat neuroprotektif melalui mekanisme pleiotropik pada intraseluler. Antara lain, melalui regulasi homeostasis kalsium, aktivasi MAPK, enzim detoksifikasi antioksidan fase II, *serine/threonine protein kinase* AKT dan protein kinase C, serta memodulasi beberapa gen pertahanan sel atau siklus sel. EGCG juga membantu dalam memetabolisme protein prekursor amiloid melalui jalur α -secretase sehingga mengurangi pembentukan fibril β -amyloid (Mandel and Youdim, 2004). *Catechins* biasanya disebut juga asam catechoat dengan rumus kimia $C_{15}H_{14}O_6$, tidak berwarna, dan dalam keadaan murni sedikit tidak larut dalam air dingin tetapi sangat larut dalam air panas, larut dalam alkohol dan etil asetat, hampir tidak larut dalam kloroform, benzen dan eter. Selain itu, *Catechins* berbentuk kristal halus menyerupai jarum, larut dalam air mendidih dan alkohol dingin (Heroniaty, 2012)

Catechins dalam larutan asam asetat akan membentuk larutan yang bening, tetapi jika direaksikan dengan besi klorida ($FeCl_3$) akan membentuk cairan berwarna hijau. *Catechins* merupakan senyawa fenolik yang kompleks (polifenol). *Catechins* memiliki dua atom karbon yang simetris yang membuatnya memiliki 4 isomer, yaitu (+) *catechins*, (-) *catechins*, (+) *epicatechins* dan (-) *epicatechins*. (+) *catechins* dan (-) *epicatechins* paling banyak terdapat di alam.

Catechins dan *epicatechins* memiliki tiga jenis turunannya, yaitu *catechins* galat, *galocatechins*, *galocatechins* galat, *epicatechins* galat dan *epigalocatechins* galat. Struktur *catechins* dan turunannya, sebagai berikut, (Heroniaty, 2012)



Gambar 2.16 Struktur *Catechins* dan turunannya.

2.4.3 Sifat *Catechins*

Tabel 2.2 Sifat Fisika dan Sifat Kimia Senyawa *Catechins*

Sifat Fisika	Sifat Kimia
<ul style="list-style-type: none"> - Warna: putih - Melting point: 104-106 °C - Boiling point: 254 °C - Tekanan uap: 1 mm Hg pada 75 °C - Densitas uap: 3,8 g/m³ - Flash point: 137 °C - Eksplosi limit: 1,79 % 	<ul style="list-style-type: none"> - Sensitif terhadap oksigen - Sensitif terhadap cahaya (dapat mengalami perubahan warna apabila mengalami kontak langsung dengan udara terbuka) - Substansi yang dihindari: unsur oksidasi, asam klorida, asam anhidrida, basa, dan asam nitrit. - Larut dalam air hangat - Stabil dalam kondisi agak asam atau netral (pH optimum 4-8)

Sumber: Micheal dan Irene, 1997 dan Alamsyah, 2006.

2.4.4 Manfaat *Catechins*

Catechins teh hijau memiliki beberapa manfaat, diantaranya adalah berpotensi sebagai termogenesis sehingga mampu meningkatkan pembakaran kalori dan lemak dalam tubuh yang berkhasiat terhadap penurunan berat badan (Nagao *et al.*, 2005), menurunkan kadar kolesterol total, kolesterol LDL, trigliserida dan berat badan yang bermakna dibandingkan dengan control perlakuan pada tikus putih jantan (Dirghantara, 1994), menghambat terbentuknya tumor kelenjar mamma pada tahap promosi (Gunawijaya dkk., 1999), antiinflamasi dan antioksidan (Gu, 2006), antibakteri, antitumor, dan antivirus (Nakagawa, 2005).

2.4.5 *Catechins* sebagai Antiinflamasi dan Antioksidan

Arundina (2013), pernah meneliti tentang efek anti inflamasi *catechins* pada marmot dengan metode pembentukan oedema yang diinduksi suspensi karagenik menunjukkan hasil pada pemberian *catechins* dosis 100 dan 200 mg/kgBB mempunyai daya antiinflamasi tetapi efeknya lebih kecil dari aspirin. *Catechins* mampu berperan sebagai antiinflamasi dengan menghambat oksidasi asam arakhidonat menjadi endoperoksida dan menurunkan aktivitas enzim lipoksigenase. Dengan adanya hambatan pada oksidase asam arakhidonat, maka mediator proinflamasi tidak terbentuk pros

Potensi antioksidan senyawa *catechins* secara langsung berhubungan dengan kombinasi cincin aromatis dan kelompok hidroksil yang membangun struktur *catechins* dan sebagai hasilnya adalah mengikat dan menetralkan radikal bebas oleh grup hidroksil. Sebagai tambahan, polifenol teh hijau mendorong aktivitas detoksifikasi komponen xenobiotika, dan juga dapat mengikat (kelator) ion logam seperti besi yang mana dapat mengakibatkan radikal bebas oksigen (Imannul Khan, 2006).

2.4.6 *Cathecins* sebagai Neuroprotektan

Pada penelitian yang dilakukan oleh Zhang *et al.*, (2015) ditemukan bahwa EGCG pada CTG menunjukkan fungsi penghambatan yang bermakna pada pembentukan edema serebri pada cedera otak traumatik dan menurunkan permeabilitas vaskular. Inflamasi yang diinduksi oleh cedera otak traumatik juga terbukti dapat dihambat oleh pemberian EGCG. Terlebih lagi, pemberian EGCG dapat menghambat ekspresi AQP4, protein kanal air yang diekspresikan dengan kuat di otak, dominan di kaki astrosit di sekitar kapiler, dan GFAP, protein yang menginduksi astrogliosis, pada jaringan otak yang cedera. Sebagai antioksidan, EGCG mampu memperbaiki stress oksidatif pada cedera otak traumatika dengan menghambat translokasi p47 phox dari sitoplasma ke membran plasma.

Patofisiologi khusus pada cedera otak traumatika adalah disfungsi metabolik serebri, eksitotoksisitas, stres oksidatif, edema serebri, inflamasi dan kematian sel. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa EGCG dapat mengurangi kerusakan BBB dan stres akut pada otak. Terlebih lagi, EGCG telah terbukti mampu menembus BBB dan mencapai parenkim otak. Data penelitian menunjukkan bahwa pemberian EGCG sebanyak 100 mg/kgBB dapat menurunkan kandungan air intrakranial dan juga memperbaiki permeabilitas vaskular (Zhang *et al.*, 2015).

Selain itu, EGCG juga dilaporkan mampu melindungi neuron dengan meregulasi glutamat, mediator inflamasi. EGCG, juga terbukti memiliki aktivitas antioksidan dengan menghambat oskidasi NADPH, yang berperan pada cedera otak sekunder dengan memediasi stress oksidatif, dengan menghambat translokasi p47phox (Zhang *et al.*, 2015).

2.4.7 Farmakologi *Catechins*

2.4.7.1 Farmakokinetik *Catechins*

2.4.7.1.1 Absorpsi *Catechins*

Tidak semua polifenol diabsorpsi pada efisiensi yang sama. Flavonoid *aglycone* (tidak mengandung gula) dapat diabsorpsi pada usus kecil Tetapi, kebanyakan flavonoid berada dalam bentuk glikosida, ester dan polimer sehingga tidak dapat diabsorpsi langsung. Untuk dapat dicerna, flavonoid mengalami hidrolisis oleh enzim lambung atau flora dalam saluran cerna. Polifenol mengalami konjugasi pertama pada usus kecil dan konjugasi berikutnya terjadi di liver. Pada saat konjugasi terjadi metilasi, sulfasi, dan glukoronidasi (Yashin *et al.*, 2012). Galloylasi pada *catechins* menurunkan absorpsinya (Manach *et al.*, 2005).

Catechins yang tidak diserap pada usus kecil, mencapai usus besar. Pada usus besar, *catechins* didegradasi oleh enzim bakteri menjadi molekul yang lebih kecil, seperti asam oxiaromatik, sehingga dapat diabsorpsi. Metabolit dari mikroba antara lain 5-(3',4',5'-*trihydroxyphenyl*) *valerolactone*, 5-(3',4'-*dihydroxyphenyl*) *valerolactone*, dan 5-(3',5'-*dihydroxyphenyl*) *valerolactone* dalam bentuk terkonjugasi. Metabolit ini muncul lebih lambat pada plasma dan memiliki waktu paruh panjang, sehingga dapat meningkatkan durasi kerja *catechins* (Yashin *et al.*, 2012).

2.4.7.1.2 Distribusi *Catechins*

Catechins memiliki berat molekul yang cukup besar (antara 300-450 g/mol), sehingga memiliki bioavailabilitas yang rendah. Dari 100-200 mg *catechins* yang dikonsumsi, kadar yang berada pada plasma tidak melebihi 1 µM. Konsentrasi total *catechins*, baik yang bebas maupun terkonjugasi, tidak melebihi 2-3 µM. Pada manusia, hanya 0,2-2% *catechins* yang dikonsumsi yang

terdeteksi pada plasma dengan menggunakan HPLC. Pada penelitian lain, EGCG terdeteksi sebesar 6 mg di darah pada konsumsi sebanyak 82 mg (kadar kurang dari 7%) (Yashin *et al.*, 2012).

Karena mengalami biokonversi di usus, *catechins* pada plasma dan urine terdapat pada bentuk konjugat. Beberapa konjugat memiliki substituen hidroksil yang intak. Hidroksil tersebut dapat menangkap radikal bebas superoksida dan efisiensinya tetap tinggi. Oleh karena itu, meskipun bioavailabilitasnya rendah, *catechins* dapat memiliki efek yang luar biasa dalam banyak penyakit (Yashin *et al.*, 2012).

Jumlah EGCG yang diukur pada organ-organ penting berkisar sepersepuluh dari kadar EGCG pada darah, termasuk pada otak. Hal itu menunjukkan bahwa EGCG dapat menembus sawar darah otak (Smith, 2011). (+)-*catechin* ditemukan terakumulasi pada korteks serebri dan hipotalamus pada binatang coba tikus (Huang *et al.*, 2011).

2.4.7.1.2.1 Masuknya Catechins pada Sawar Darah Otak

Salah satu penentu bioavailabilitas flavonoid di otak adalah kemampuannya menembus sawar darah otak. *Catechins* dapat menembus blood brain barrier, terutama yang bersifat non polar dan lipofilik. Namun, terdapat pula *catechins* yang mengalami glukoronidasi dan polar yang dapat menembus sawar darah otak. Masuknya *catechins* ke dalam otak juga dapat dimodulasi oleh transporter efluks pada sawar darah otak, misalnya melalui *P-glycoprotein* (Farooqui, 2012).

Terdapat beberapa model sel *in vitro* untuk meneliti transfer flavonoid melalui sawar darah otak. Beberapa model tersebut antara lain ECV 304 (merepresentasikan sisi perifer sawar darah otak) yang di ko-kultur dengan sel glioma C6 (merepresentasikan sisi sistem saraf pusat), bEND5, dan RBE4.

Berdasarkan model ini flavanoid dapat menembus lapisan sel endotel. Flavanoid yang termetabolisir, yaitu mengalami glukoronidasi derivat O-metilasi, juga dapat menembus sel endotel. Tampaknya, sel-sel ini dapat mendekongugasi derivat glukoronidasi menjadi bentuk aglikon sehingga dapat memasuki sel glia dan akhirnya masuk otak. Isomer (+)-*catechin* dan (-)-*epicatechin* ditemukan dapat menembus sawar darah otak dengan perbedaan signifikan. Diduga terdapat proses stereo-selektif dalam masuknya flavanol ke dalam sawar darah otak karena perbedaan efluks dari sel. Ditemukan konjugasi asam glukoronat dari (+)-*catechin* dan (-)-*epicatechin* pada sisi basolateral, menunjukkan sel dapat memetabolisme zat tersebut. *hCMEC/D3 cell line*, yaitu endotel mikrovesel serebri imortal pada manusia, juga menunjukkan bahwa *flavan-3-ol* dapat menembus sawar darah otak dan memetabolisme glukoronidasi. *Flavan-3-ol* yang termetilasi juga dapat menembus sel ini dengan efisien. Karena bentuk *flavan-3-ol* dengan termetabolisir O-metilasi terdapat pada in vivo, maka bentuk ini dapat memasuki otak dan flavonoid dapat berefek pada otak. Bioavailabilitas *epicatechin* dalam bentuk metabolit O-metilasi dan glukoronidasi ditemukan pada otak tikus setelah diberikan peroral. EGCG juga ditemukan di dalam otak setelah pemberian intravena (Faria *et al.*, 2012). Flavonoid rata-rata didapatkan pada jaringan otak dengan kadar kurang dari 1 nmol/gram jaringan. Flavonoid didapatkan tersebar pada seluruh jaringan otak dan tidak terakumulasi pada area tertentu, sehingga flavonoid dapat menjadi kandidat neuroprotektif langsung di otak (Vauzour, 2012).

2.4.7.1.3 Metabolisme *Catechins*

Catechins dimetabolisme dengan glukoronidasi, metilasi, dan sulfonasi menjadi komponen yang lebih hidrofilik. Proses metabolisme tersebut melalui mekanisme enzimatik (Yashin *et al.*, 2012). Pada manusia, EGCG dimetilasi oleh

enzim liver catechol-O-methyltransferase (COMT) dan mengurangi aktivitas EGCG. EGCG dimetilasi menjadi 4',4"-di-O-methyl-EGCG, EGC dimetilasi menjadi 4'-O-methyl-EGC, sedangkan (+)-catechin dimetilasi pada posisi 3'. Analisis dari *catechins* kebanyakan dihitung dari *catechins* yang tidak berubah, sedangkan metabolit termetilasi tidak teranalisis (Manach *et al.*, 2005). Akan tetapi, EGCG lebih banyak ditemukan dalam bentuk bebas (77-90%). *Catechins* lainnya berada dalam bentuk konjugat dengan asam glukoronat dan sulfat (Manach *et al.*, 2005; Yashin *et al.*, 2012).

2.4.7.1.4 Eliminasi *Catechins*

Catechins mayoritas dieliminasi dari tubuh melalui urin dan sisanya melalui empedu. Pada urine terdeteksi metabolit *flavan-3-ol* dan bentuk asam gallat yang tidak termetabolisme. Urine mengandung 7,2% dari metabolit *flavan-3-ol* yang dikonsumsi dan 4,5% asam gallat. Metabolit yang tertinggi antara lain *epicatechins sulfate*, *methyl-epicatechins sulfate*, *epicatechin glucuronide*, *epigallocatechin glucuronide*, dan *methyl-epigallocatechin glucuronide* (Yashin *et al.*, 2012). Pada penelitian di tikus, EGCG dieksresikan melalui empedu (Manach *et al.*, 2005).

2.4.7.2 Waktu Paruh, Onset, Puncak, Durasi *Catechins*

Catechins terdeteksi pada plasma darah 1-2 jam setelah dikonsumsi. Waktu paruh rata-rata dari *catechins* adalah 2-3 jam (Yashin *et al.*, 2012). Waktu paruh *catechins* pada tikus lebih singkat, sedangkan waktu paruh pada mencit sama dengan pada manusia. Pada mencit, sepertiga dari EGCG yang dikonsumsi dieliminasi melalui feces dalam 24 jam pertama (Smith, 2011).

Metabolit *catechins* mulai terdeteksi pada urine 4 jam setelah konsumsi. Puncak konsentrasi metabolit *epicatechins sulfate* dan *methyl-epicatechins*

sulfate terdeteksi setelah 10 jam. Konsentrasi *epigallocatechins* terus meningkat hingga lebih dari 24 jam setelah dikonsumsi. Ekskresi EGCG lebih lambat (Yashin *et al.*, 2012).

2.4.7.3 Farmakodinamik *Catechins*

Catechins dapat mempengaruhi absorpsi zat besi, terutama pada pasien dengan risiko defisiensi besi. Efek *catechins* terhadap ion lainnya tidak diketahui. *Catechins* dapat mempengaruhi absorpsi dan metabolisme ion karena flavanoid berinteraksi dengan ion metal (Chacko *et al.*, 2010).

2.4.7.3.1 Toksisitas *Catechins*

Konsumsi teh hijau pada manusia dengan dosis tinggi tidak menunjukkan efek samping (Chacko *et al.*, 2010). Berdasarkan penelitian dari Hsu *et al.* (2011), pemberian ekstrak teh hijau hingga 2500 mg/kgBB per hari selama 28 hari tidak menyebabkan timbulnya efek samping pada mencit.

Disebutkan pada penelitian lain bahwa EGCG merupakan zat yang sitotoksik. Konsumsi EGCG dosis tinggi dapat bersifat sitotoksik pada hepatosit. EGCG dosis tinggi juga dapat merusak DNA pada pankreas dan liver hamster. Dosis tinggi ekstrak teh hijau juga dapat menyebabkan pembesaran kelenjar tiroid (goiter) pada tikus normal (Chacko *et al.*, 2010).

2.4.7.3.2 Aktivitas dan Manfaat *Catechins*

Efek utama dari polifenol di otak adalah (1) menghambat pelepasan sitokin pro inflamasi oleh glia teraktivasi, (2) menghambat induksi iNOS dan produksi NO akibat aktivasi glia, (3) menghambat aktivasi NADPH oksidase dan pembentukan ROS oleh glia teraktivasi, dan (4) menurunkan aktivitas faktor transkripsi proinflamasi seperti NFκB oleh glia dan kaskade *signaling pathway*

neuron seperti MAPK. Produksi NO berlebihan, terutama yang diproduksi oleh mikroglia dan astrosit, dapat menginduksi kematian neuron melalui kerusakan transpor elektron di mitokondria sehingga terjadi penurunan sintesis ATP dan peningkatan produksi ROS. Neurotoksisitas dari mikroglia mengaktifkan NADPH oksidase yang memediasi produksi superoksida dan pelepasan molekul pro inflamasi, seperti TNF α . NO dan superoksida tersebut dapat bereaksi membentuk radikal peroksinitrit. Peroksinitrit tersebut menghambat respirasi mitokondria, menginduksi apoptosis bergantung *caspase* dan menginduksi pelepasan glutamat. Akibatnya semakin terjadi eksitotoksitas dan menyebabkan kematian neuron. TNF α yang dihasilkan berikatan dengan TNFR1 dan menyebabkan apoptosis neuron melalui jalur ekstrinsik. Jalur lain yang penting dari efek biologis polifenol adalah penghambatan faktor transkripsi famili forkhead (FoxO) yang teraktivasi oleh stress oksidatif. Hambatan aktivasi famili FoxO dapat meregulasi apoptosis dengan mengaktifkan Bcl-2 anti apoptosis (Vauzour, 2012).

Catechins memiliki peran sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Bioavailabilitas *catechins* dapat ditentukan melalui beberapa metode, antara lain; peningkatan aktivitas antioksidan pada plasma darah setelah konsumsi, penghitungan langsung *catechins* pada cairan tubuh dan organ-organ tertentu 1-2 jam setelah konsumsi, dan menentukan efek dari *catechins* dengan menilai penanda penurunan stress oksidatif. Penanda yang digunakan antara lain 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OhdG), derivat tirosin, *malondialdehyde*, F₂-*isoprostane*, dan *phosphatidylcholine hydroperoxide* (PCOOH). Konsumsi *catechins* selama tujuh hari dapat menurunkan konsentrasi 8-OhdG dan *malondialdehyd* (MDA) pada urine, F₂-*isoprostane*, dan PCOOH pada plasma (Yashin *et al.*, 2012).

Aktivasi NF κ B memediasi protein mediator dalam proses inflamasi. *Catechins* diduga mampu menekan aktivasi NF κ B, sehingga sitokin sitokin proinflamasi, seperti TNF- α dan IL-1 β , tidak menunjukkan kenaikan ekspresi. Selain itu, juga terjadi penurunan produksi NO yang diinduksi iNOS, pada tikus model cedera medula spinalis traumatik yang diberikan ekstrak teh hijau dibandingkan kelompok yang tidak diberikan ekstrak teh hijau (Paterniti *et al.*, 2009).

PARP *Suicide Hypothesis* adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan jalur hubungan ROS merusak DNA, menginduksi mekanisme perbaikan DNA, mengaktifkan enzim nuklease PARP, yang menyebabkan deplesi substrat NAD⁺ dan menurunkan glikolisis. Karena NAD⁺ berfungsi sebagai kofaktor glikolisis dan TCA, deplesi NAD⁺ menyebabkan ATP intraseluler sangat menurun. Pemberian ekstrak teh hijau yang mengandung *catechins*, telah menunjukkan menghilangkan peningkatan aktivitas PARP (Paterniti *et al.*, 2009).

Anggota *flavan-3-ol*, memiliki efek berbeda pada otak. Epicatechin (EC) dan catechins (C) dapat menghambat pelepasan TNF α , tetapi tidak menurunkan ekspresi iNOS dan produksi NO pada sel glia. Epicatechin (EC) dan catechins (C) juga tidak dapat menghambat NADPH oksidase (Vauzour, 2012). Pemberian epicatechins sebelum induksi neurotoksik dapat menghambat produksi TNF dan NF κ B serta menurunkan aktivasi iNOS (Mohamed, Karam and Amer, 2011). EGCG dapat menghambat pelepasan TNF α , menghambat aktivasi iNOS, serta menurunkan aktivasi PARP (Khalatbary and Ahmadvand, 2011). EGCG juga diketahui dapat menurunkan ekspresi aquaporin 4 (kanal air pada sawar darah otak) sehingga dapat mengurangi edema otak. Selain itu EGCG juga dapat menurunkan ekspresi GFAP yang menunjukkan penurunan glia yang teraktivasi (Zhang *et al.*, 2015).

Hasil penelitian Kaul dan Khanduja menemukan bahwa polifenol menghambat produksi *superoxide anion radical* (SOR) yang diinduksi *benzoil peroxide* (BPO). Penghambatan *xantin oxidase* (XO) juga dapat dilakukan oleh EGCG. Efek antiinflamasi EGCG dan *catechins* ditunjukkan dengan hambatan pada jalur NF κ B dan AP-1 (Ekawati *et al.*, 2012). Pemberian EGCG pada cedera spinalis dapat menurunkan ekspresi Bax dan meningkatkan ekspresi Bcl-2 setelah trauma (Khalatbary, 2014).

EGCG memodulasi jalur apoptosis dengan melindungi dari stress oksidatif. Beberapa sekuens apoptosis yang dihambat oleh EGCG antara lain adalah *caspase-3*, pelepasan sitokrom C, *poly(ADP-ribose) polymerase cleavage*, jalur *glycogen kinase synthase kinase-3 pathway*, dan memodulasi sinyal sel melalui jalur *phosphatidyl inositol-3 kinase* (PI3K/Akt), sehingga sel tetap hidup. *Catechins* juga memodulasi apoptosis dengan mempengaruhi gen pro-apoptosis dan anti-apoptosis. EGCG menghambat ekspresi gen pro-apoptosis Bax, Bad, dan Mdm2 serta menginduksi ekspresi gen anti-apoptosis, yaitu Bcl-2, Bcl-w, dan Bcl-xl, sehingga melindungi sel dari apoptosis. EGCG juga mempromosi kehidupan sel dengan menjaga jalur *protein kinase c* dan *extracellular signal-related kinase 1/2 pathway* (Sutherland *et al.*, 2006).

Selain sebagai antioksidan dan antiinflamasi seperti tersebut diatas, *catechins* juga dapat menurunkan kadar kolesterol, LDL, dan trigliserida. Mekanisme penurunan tersebut adalah dengan cara meningkatkan aktivitas lipoprotein lipase, sehingga katabolisme lipoprotein kaya trigliserida seperti VLDL dan IDL meningkat. Kadar kolesterol HDL meningkat secara tidak langsung akibat menurunnya kadar trigliserida VLDL atau karena meningkatnya produksi apo AI dan apo AII. Efek penurunan kolesterol LDL diduga berhubungan dengan meningkatnya bersihan VLDL dan IDL dalam hati sehingga produksi LDL menurun (Ekawati *et al.*, 2012). Selain manfaat yang jelaskan di atas, *catechins*

juga dikenal dengan manfaat sebagai antibakteri, antidiabetes, antivirus, antimalaria, hepatoprotektan, neuroprotektan dan kardioprotektan (Chaturvedi and Mishra, 2012).

Konsumsi *catechins* jangka panjang dapat meningkatkan aktivitas UDP-*glucuronosyl transferase* pada tikus. Peningkatan aktivitas UDP-*glucuronosyl transferase* diduga berperan pada efek antikarsinogenik dari *catechins*. Terdapat interaksi antara *catechins* dengan 2-amino-3-methylimidazol (4,5-f) quinoline (IQ). IQ merupakan prekarsinogen yang awalnya ditemukan pada daging yang digoreng. Pada tikus, IQ dimetabolisme di sitokrom P450 diikuti dengan konjugasi. *Catechins* memodifikasi metabolisme IQ menjadi IQ *glucoronide* yang dapat diekskresikan melalui urine (Chacko *et al.*, 2010). Pemberian *catechins* yang bersamaan dengan *caffeine* dapat menurunkan sulfonasi dan glukoronidasi dari EGCG (Yashin *et al.*, 2012). Pemberian larutan EGCG pada kulit dapat menurunkan pembentukan *cyclobutane pyrimidine dimer* (CPD) akibat papatan radiasi ultraviolet yang bersifat karsinogenesis (Yashin *et al.*, 2012).

2.4.7.3.3 Efek Pemberian *Catechins* pada Cedera pada Sistem Saraf Pusat

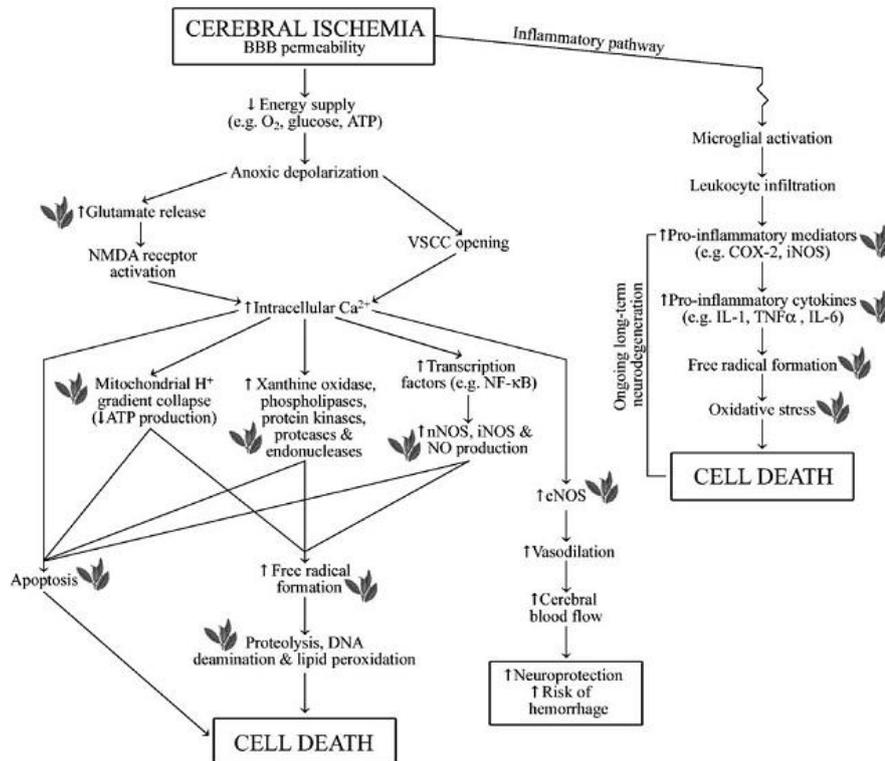
Nutrisi diteliti atas efektivitasnya terhadap terapi cedera otak dan cedera terkait cedera otak misalnya hipoksia, kejang, dan perdarahan sehingga merupakan terapi penunjang dalam penatalaksanaan cedera kepala. Nutrisi dipilih berdasarkan perannya dalam mengembalikan energi seluler, menurunkan stress oksidatif dan inflamasi, dan perbaikan serta kesembuhan dari cedera. Nutrisi yang teridentifikasi antara lain asetil KoA, antioksidan, asam amino rantai cabang, kolin, kreatin, diet ketogenik, magnesium, nikotinamid adenin dinukleotida, asam lemak n-3, polifenol, vitamin D dan zink (Erdman *et al.*, 2011).

Pada penelitian yang dilakukan Paterniti *et al.*, (2009) pada tikus model cedera spinal, *catechins* terbukti memberikan manfaat pada derajat kerusakan

medulla spinalis dan memperbaiki gangguan motoris. Cedera medula spinalis memicu kejadian yang mengarah pada kerusakan sel neuron sekunder, seperti halnya cedera otak yang juga melibatkan aktivitas oksidan ROS dan sebagainya. Sehingga pemberian *catechins* yang berfungsi sebagai *free radical scavenger*, dapat bekerja sebagai antioksidan dan memiliki efek neuroprotektan.

Masih dari penelitian yang sama, cedera medula spinalis traumatis, juga memicu terjadinya peroksidase lipid. Pada penelitian tersebut kadar *Malondialdehyde* (MDA) dievaluasi, dan pada kelompok yang diberikan ekstrak teh hijau juga ditemukan penurunan kadar MDA yang bermakna, pada kelompok Sham procedure, tidak ada peningkatan MDA sama sekali (Paterniti *et al.*, 2009).

Peran *catechins* pada iskemia otak, seperti pada cedera otak traumatik dijelaskan pada gambar 2.21. *Catechins* bersifat antioksidan melalui penghambatan pelepasan *61roteolys*, meningkatkan gradien H⁺ pada mitokondria, menurunkan produksi enzim-enzim xantin oksidase, fosfolipase, protein kinase, protease, dan endonuklease. Selain itu, *catechins* juga menghambat NOS baik iNOS, nNOS, maupun eNOS yang berlebihan, sehingga produksi NO tidak berlebihan. Peningkatan eNOS yang berlebihan selain bersifat protektif karena menyebabkan vasodilatasi di area iskemik, namun juga meningkatkan risiko perdarahan. *Catechins* dapat menurunkan apoptosis serta mengurangi proteolisis sehingga menurunkan kematian sel. *Catechins* juga menghambat kematian sel melalui hambatan pada mediator pro inflamasi, sehingga menurunkan pembentukan radikal bebas melalui jalur inflamasi (Sutherland *et al.*, 2006).



Gambar 2.17 Mekanisme kerja *catechins* pada kaskade iskemia pada penyakit neurodegeneratif dan neuroinflamasi. Tempat aksi *catechins* ditandai dengan logo daun, menunjukkan perannya dalam mencegah kematian sel. Selain itu *catechins* juga bersifat neuroprotektif dengan menginduksi produksi eNOS. Neuroinflamasi merupakan jalur yang tetap teraktivasi hingga berbulan-bulan, dan *catechins* juga berperan dalam berbagai mekanisme di dalamnya (Sutherland *et al.*, 2006).

2.4.8 Kelemahan *Catechins*

Kelemahan *catechins* yang paling signifikan adalah sifat reaktif dan tidak stabil dalam kondisi fisiologis dan eksperimen. *Catechins* merupakan *radical scavenger* untuk radikal anion superoksida (O_2^-) dan radikal hidroksil. Namun, *catechins* juga mudah dioksidasi oleh dioksigen sehingga dapat menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS), antara lain hidrogen peroksida (H_2O_2) dan O_2^- . Ion cuprum (Cu^{2+}) meningkatkan auto-oksidasi dan dapat membentuk produk samping *quinone* yang bersifat sitotoksik (Smith, 2011).

EGCG, sebagai komposisi terbesar dari *catechins* juga ditemukan cepat dimetabolisme *in vivo*. Karena kelarutannya tinggi, *catechins* sedikit diabsorpsi

pada pemberian peroral. Selain itu, mikroba pada usus juga dapat menyebabkan degradasi dari *catechins* (Smith, 2011).

2.4.9 Upaya untuk Meningkatkan Bioavailabilitas *Catechins*

Diduga, untuk menghindari auto-oksidasi dan modifikasi *catechins in vivo*, dapat dilakukan asetilasi dari alkohol *phenolic*. Contoh obat lain yang dimodifikasi dengan asetilasi adalah asam salisilat yang diasetilasi dengan *acetic anhydrate* untuk membentuk aspirin. Asetilasi ini menyebabkan bahan menjadi lebih hidrofobik dan menghambat biotransformasi fase II maupun degradasi oksidatif. Pada penelitian yang dilakukan oleh Lambert *et al.*, (2006) didapatkan bahwa EGCG terasetilasi akan mengalami deasetilasi setelah masuk ke dalam berbagai sel serta meningkatkan kadarnya hingga 4 kali lipat pada serum serta meningkatkan waktu paruh hingga 6 kali lipat (Smith, 2011).

Pada penelitian lain dilakukan pemberian *catechins* dalam bentuk termetabolisir. Dimerisasi EGCG pada medium alkali menghasilkan bahan baru, yaitu *theasinensins* A dan D, yang memiliki aktivitas antioksidan 2-3 kali lebih besar (Yashin *et al.*, 2012). Sedangkan berdasarkan penelitian Huang *et al.* (2011), pemberian liposom bersamaan dengan (+)-*catechin* per oral meningkatkan konsentrasinya pada jaringan otak (Faria *et al.*, 2012).

2.5 Metode-Metode Cedera Otak *In Vivo*

Berbagai metode digunakan untuk memodelkan dan menganalisis cedera otak traumatika pada manusia. Hal ini termasuk percobaan relawan dan mayat, boneka antropomorfik, model fisik, model komputasi, dan model matematis, namun diantara beberapa model yang tersedia, tanggapan patofisiologis terhadap dampak mekanis dari sistem saraf pusat manusia paling realistis

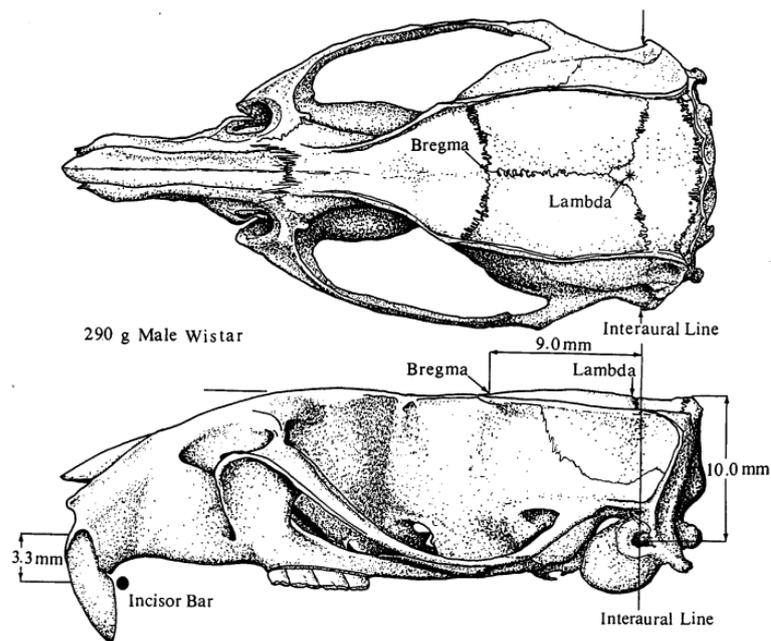
dianalisis dengan menggunakan model binatang, yang menyediakan pengganti terbaik untuk otak manusia (Gilchrist, 2004). Meskipun model hewan besar mungkin diperlukan untuk menyelidiki aspek tertentu dari trauma otak, binatang pengerat (mencit dan tikus) telah muncul sebagai spesies yang paling umum digunakan, karena mereka mudah tersedia untuk banyak peneliti, data normatif untuk berbagai variabel fisiologis dan perilaku pada hewan pengerat didokumentasikan dengan baik, serta teknologi transgenik memungkinkan generasi hewan pengerat dengan perubahan genetik tertentu (Albert-Weissenberger and Siren, 2010). Cernak (2005) juga menjelaskan bahwa model awal yang digunakan untuk menggambarkan trauma pada otak secara eksperimental yaitu model akselerasi dan model perkusi. Model-model inilah yang menjadi dasar pengembangan model selanjutnya, dengan beberapa perubahan pada variabel-variabel terkait, dapat menghasilkan cedera otak terfokus hingga cedera otak *diffuse*. Efek trauma yang dapat diamati secara makroskopis diantaranya terbentuknya hematoma, sedangkan pengamatan secara mikroskopis pada tingkat biomolekuler dan seluler dapat dilakukan dengan pendeteksian mediator-mediator kimia dan pengecatan imunisitokimia (Cernak, 2005).

Secara sederhana, model eksperimental trauma pada otak dapat dibagi menjadi model yang langsung mengenai otak dan model yang langsung mengenai kepala. Gilchrist (2004) menjelaskan bahwa model trauma yang langsung mengenai otak (*direct brain-impact model*) menghasilkan cedera terfokus pada korteks otak dengan menggunakan penjatuhan beban pada *duramater* otak yang terpapar; sedangkan model lain yaitu trauma yang langsung mengenai kepala (*direct head-impact model*) menggunakan hewan coba yang kepalanya tidak ditahan, hanya bertumpu pada lehernya saja, sehingga, pada

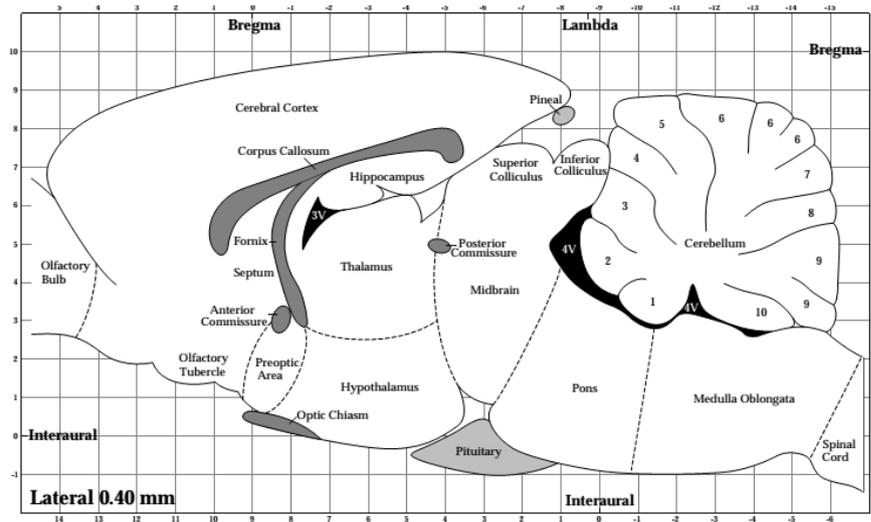
kenyataannya, trauma yang diberikan menghasilkan percepatan rotasi dan linier pada kepala (Gilchrist, 2004).

2.5.1 Anatomi Otak *Rattus norvegicus* galur Wistar

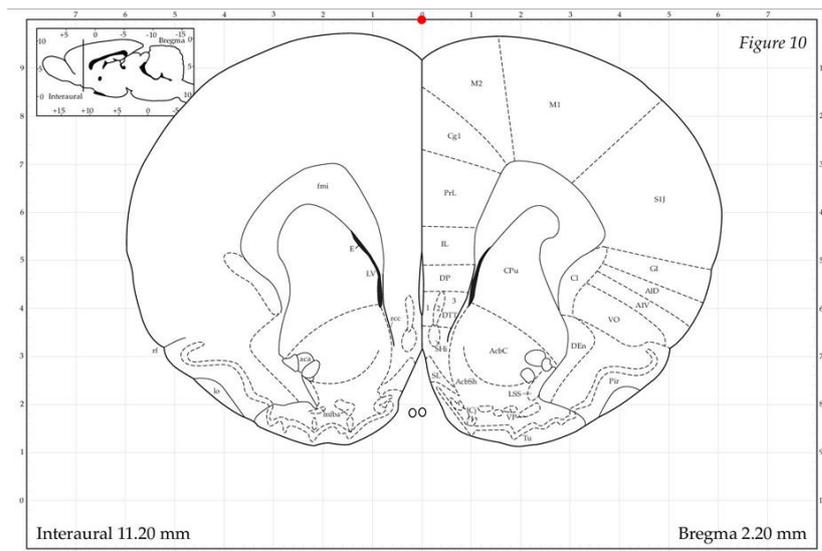
Bregma dan lambda merupakan bagian dari tikus yang penting untuk menentukan posisi otak pada tikus. Jarak lambda dan bregma pada tikus dengan berat sekitar 180 gram adalah 7 mm. Posisi mid coronal berada pada 3 mm di depan lambda. Korteks serebri berada pada bagian superior dari otak. (Paxinos and Watson, 2006). Pemetaan korteks sensorimotor berada pada bagian depan otak dengan diameter 7 mm dengan pusat 1 mm anterior dari bregma (Jung *et al.*, 2013). Korteks motorik primer (M1) tampak paling luas pada potongan koronal otak tikus 2,2 mm anterior dari bregma (Paxinos and Watson, 2006).



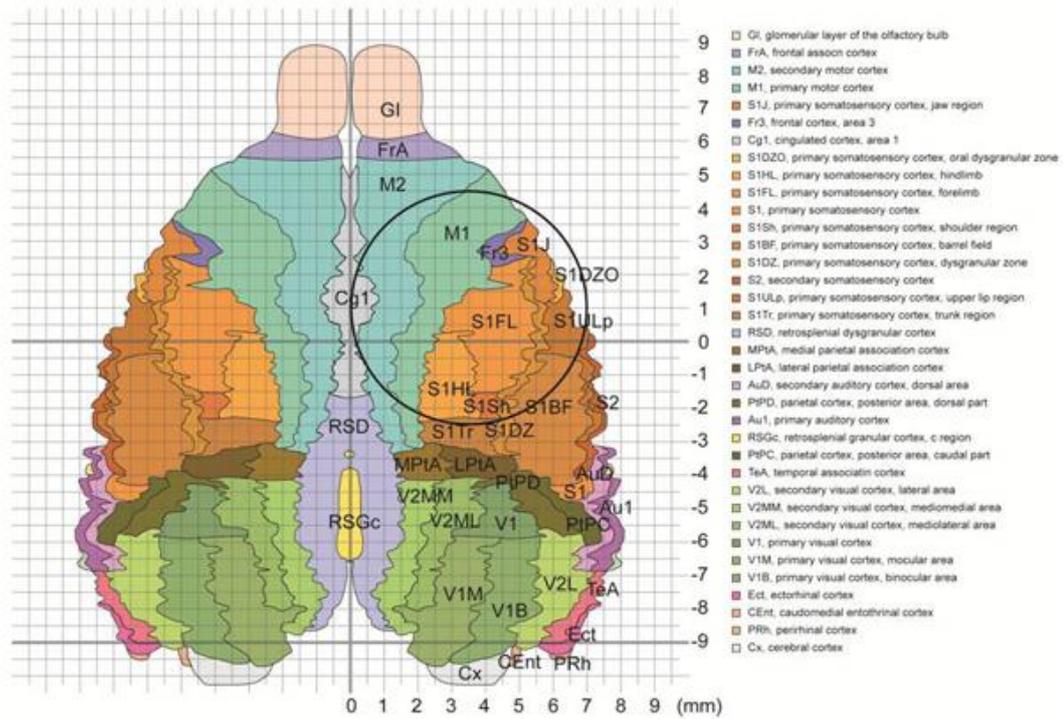
Gambar 2.18 Anatomi tulang kranium *Rattus norvegicus* galur wistar. Gambar di atas adalah penampang tulang kranium *Rattus norvegicus* galur wistar dengan berat 290 gram dari superior (atas) dan lateral (bawah). Bregma dan Lambda merupakan struktur penting dalam menentukan posisi otak (Paxinos and Watson, 1997).



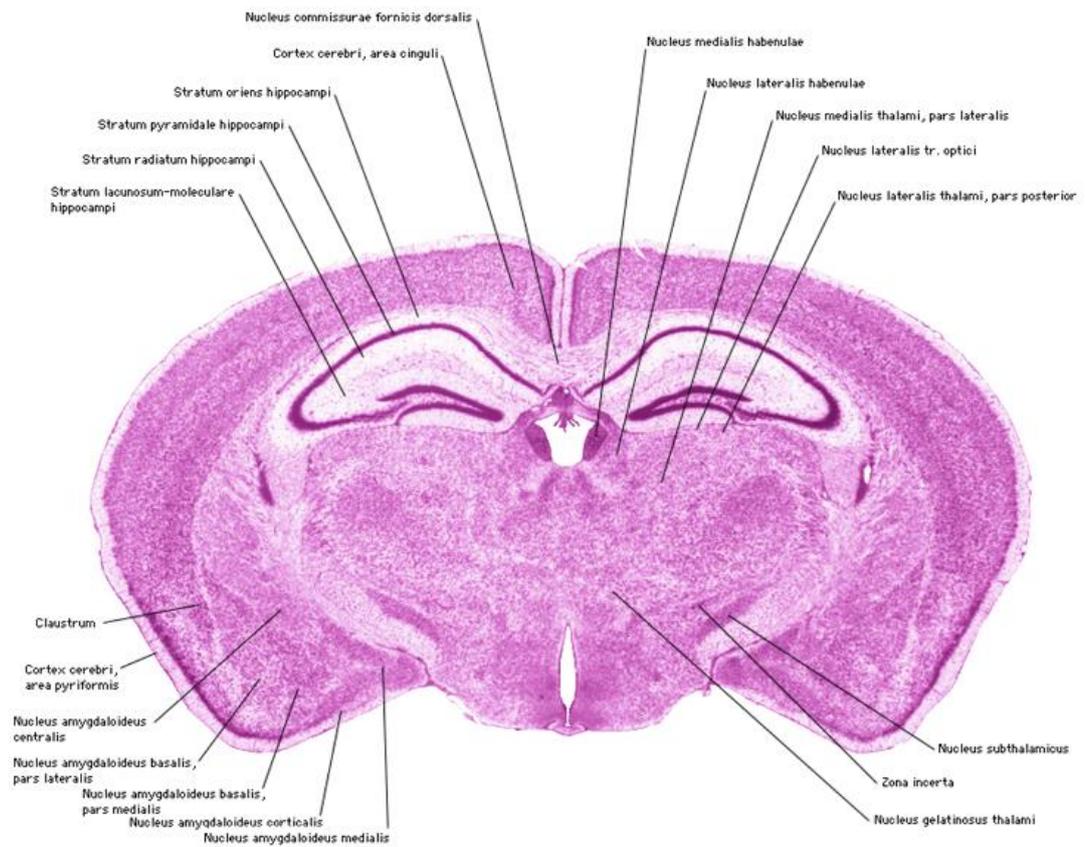
Gambar 2.19 Anatomi otak *Rattus norvegicus* galur wistar. Gambar di atas adalah penampang lateral otak *Rattus norvegicus* galur wistar dengan berat 290 gram. Cortex cerebri berada pada superior dari otak. Mid coronal berada pada 3 mm anterior dari Lambda (Paxinos and Watson, 2006).



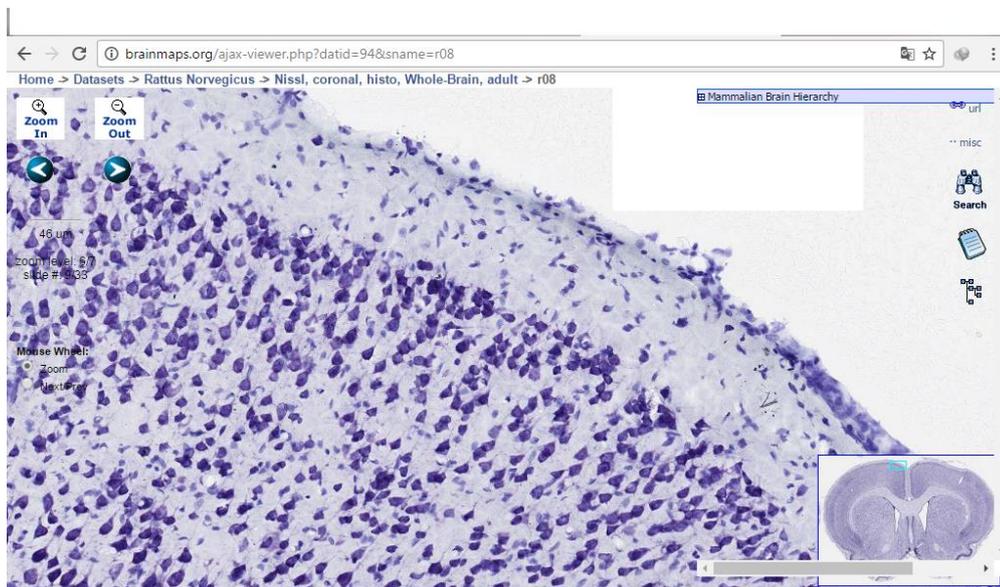
Gambar 2.20 Anatomi otak *Rattus norvegicus* galur wistar. Penampang koronal otak *Rattus norvegicus* galur wistar pada potongan 2,2 mm anterior dari bregma. M1 merupakan area motorik primer. (Paxinos dan Watson, 2006)



Gambar 2.21 Pemetaan struktur fungsional otak tikus dilihat dari vertex. Lingkaran dengan diameter 7 mm dengan pusat 1 mm anterior dari bregma dan 3,5 mm lateral kanan dari garis tengah merepresentasikan cortex sensorimotor. Titik 0 dari sumbu horizontal menunjukkan posisi bregma dan titik 0 pada sumbu vertikal menunjukkan posisi garis tengah (Jung *et al.*, 2013).



Gambar 2.22 Anatomi Otak Tikus (Sidman *et al.*, 2016)



Gambar 2.23 Anatomi Otak Tikus (Sidman *et al.*, 2016)

Sel pada sistem saraf pusat terdiri dari neuron dan glia. Neuron merupakan sel dengan ukuran yang terbesar dan dapat dibedakan melalui

kandungan badan Nissl pada sitoplasmanya. Badan Nissl adalah agregasi dari retikulum endoplasma kasar yang mengandung ribosom. Neuropil adalah area di sekitar neuron yang dibentuk oleh prosesus dari dendrit dan akson serta sinaps. Neuropil tidak tampak pada pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE). Sel glia terdiri dari oligodendrosit, astrosit dan mikroglia. Sel glia ini berjumlah hingga sepuluh kali lipat dari jumlah neuron. Pada pewarnaan HE, sel glia ini hanya tampak nukleusnya saja. Oligodendrosit memiliki inti kecil, bulat, dan hiperkromatin, serupa dengan limfosit. Prosesus dari oligodendrosit membentuk lapisan myelin. Lokasi oligodendrosit banyak terdapat pada subkorteks. Astrosit memiliki nukleus dengan bentuk bulat lonjong dengan ukuran yang lebih besar, lebih ireguler, dan lebih pucat dibandingkan dengan oligodendrosit. Prosesus astrosit mengisi ruang di neuropil, serta membentuk lapisan kontinyu pada superfisial piamater (*glial limiting membrane*). Mikroglia merupakan sel yang berukuran kecil, tipis, dengan sel yang elongasi tanpa sitoplasma yang tampak, pada korteks dan subkorteks. Mikroglia merupakan 15% dari sel glia. Korteks serebri memiliki vaskularisasi yang tinggi. Pembuluh darah pada korteks dan subkorteks terdiri dari sel endotel dengan tight junction yang dilapisi oleh membran basalis dan dikelilingi oleh perisit dan ujung dari prosesus astrosit. Struktur-struktur tersebut disebut dengan sawar darah otak (*blood-brain barrier*) (Valdevelde *et al.*, 2012).

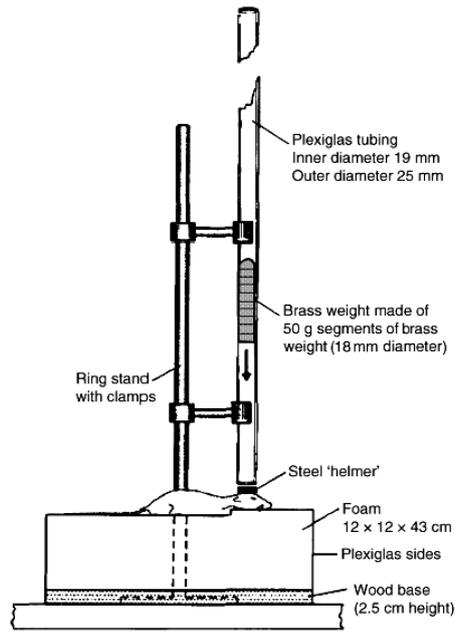
2.5.2 Model Penjatuhan Beban (*Weight-Drop*)

Model *weight-drop* menggunakan gaya gravitasi dari beban yang dijatuhkan untuk menghasilkan cedera *diffuse* dan utamanya cedera terfokus yang dapat dilakukan dengan menjatuhkan beban pada tengkorak yang terpapar atau pada duramater yang terpapar (Albert-Weissenberger *and* Siren, 2010). Bantalan yang lunak dan fleksibel dapat digunakan untuk memberikan efek “pantulan” sehingga beban yang dijatuhkan menimbulkan cedera *diffuse*,

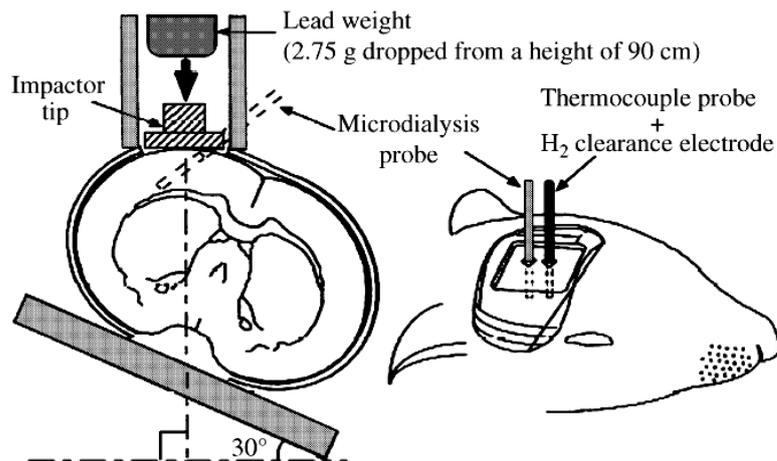
sedangkan bantalan keras digunakan untuk menghasilkan cedera terfokus (Gilchrist, 2004). Marmarou (2007) bersama rekan-rekannya pernah melakukan percobaan trauma otak eksperimental menggunakan sebatang logam yang dijatuhkan dalam *pleksiglass* dengan memanfaatkan gaya gravitasi pada tengkorak utuh (hanya kulit kepalanya yang dikelupas) menggunakan beban 450 gram dijatuhkan dari 2 meter, dan untuk menghindari dentuman ulang beban setelah penjatuhan, maka dilakukan pemindahan segera hewan coba dari tempat penjatuhan, ternyata tingkat mortalitasnya 44% dengan 12,5% retak tulang tengkorak, mortalitas terutama akibat depresi nafas, ditemukan peningkatan tekanan intrakranial dan penurunan aliran darah otak, serta defisit motor dan kognitif pasca-trauma (Marmarou *et al.*, 2007).

Gilchrist (2004) menjelaskan teknik lain pada model *weight-drop* ini berdasarkan kerja yang dilakukan oleh Koizumi dkk, menggunakan beban aluminium seberat 2,75 gram yang dijatuhkan dari ketinggian 90 cm pada bagian korteks *parietal* otak sebelah kanan dengan kemiringan 30° ditambah dengan mikrodialisis seperti pada gambar, dimana ketinggian beban yang dijatuhkan dapat bervariasi mulai dari 30, 60, dan 90 cm, namun berdasarkan penelitian pendahuluan mereka, diperoleh bahwa dengan beban seberat 2,75 gram ternyata memberikan efek paling optimal jika dijatuhkan dari ketinggian 90 cm (Gilchrist, 2004).

Percobaan cedera model *weight-drop* mampu menghasilkan cedera yang bervariasi tergantung berat beban dan tinggi penjatuhan. Ditambahkan, metode *weight-drop* ini ternyata mampu mengaktifkan mediator pro-inflamasi, calpain, dan *caspase*, sehingga menunjukkan adanya apoptosis dan nekrosis, serta mudah dan murah diterapkan (Cernak, 2005; Marmarou *et al.*, 2007).



Gambar 2.24 Marmarou's Weight-drop Model (Marmarou et al., 2007)



Gambar 2.25 Model Weight-Drop yang dipraktikkan oleh Koizumi (Gilchrist, 2004)

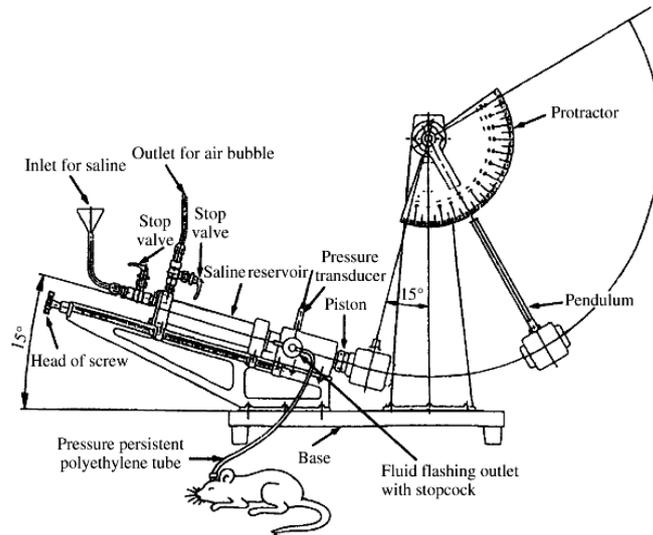
Model lainnya seperti metode perkusi fluida (*fluid percussion injury*) yang menghasilkan cedera otak dengan cara menyuntikkan sejumlah cairan dengan cepat pada permukaan *duramater* utuh yang dipapar melalui suatu *craniotomy*, dimana *craniotomy* sendiri dapat dilakukan baik secara terpusat, *sagital* atas antara *bregma* dan *lambda*, atau lateral di atas korteks parietalis (Albert-Weissenberger and Siren, 2010). Model *controlled cortical impact* memanfaatkan pistol pneumatik untuk merusak sisi lateral *duramater* yang terpapar dan

memberikan dampak yang dapat dikendalikan dan diukur berdasarkan parameter biomekanik yang diadaptasi untuk tikus pada tahun 1991 dan untuk mencit pada tahun 1995 serta mampu menghasilkan cedera otak yang bergradasi dan dapat direproduksi (Weissenberger dan Siren, 2010).

Masih ada model lain seperti model *cryogenic*, model barotrauma, dan model ledakan. Model *cryogenic* menggunakan sebuah batang dingin yang ditempelkan pada *duramater* yang terpapar pada tikus, misalnya pada korteks *parietal* otak menggunakan silinder tembaga diisi dengan campuran aseton dan es kering (-78° C) atau tengkorak terpapar pada mencit, misalnya pada korteks *parietal* otak menggunakan silinder tembaga diisi dengan nitrogen cair (-183° C) (Albert-Weissenberger, 2010). Keparahan cedera dapat divariasikan dengan merubah lamanya kontak dengan pelat dingin. Model-model yang sudah pernah dilakukan oleh para peneliti sebelumnya juga dapat dimodifikasi sesuai dengan tujuan yang diinginkan (Weissenberger dan Siren, 2010).

2.5.3 Metode Perkusi Fluida (*Fluid Percussion Injury*)

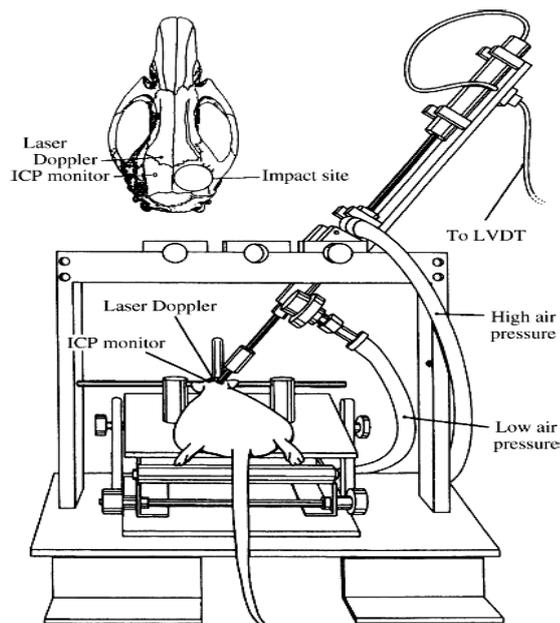
Model perkusi fluida (*fluid percussion injury*) menghasilkan cedera otak dengan cara menyuntikkan sejumlah cairan dengan cepat pada permukaan *duramater* utuh yang dipapar melalui suatu *craniotomy*, dimana *craniotomy* sendiri dapat dilakukan baik secara terpusat, *sagital* atas antara *bregma* dan *lambda*, atau lateral di atas korteks parietalis (Weissenberger, 2010).



Gambar 2.26 Model Perkusi Fluida (Gilchrist, 2004)

2.5.4 Model *Controlled Cortical Impact*

Model *controlled cortical impact* memanfaatkan pistol pneumatik untuk merusak sisi lateral *duramater* yang terpapar dan memberikan dampak yang dapat dikendalikan dan diukur berdasarkan parameter biomekanik yang diadaptasi untuk tikus pada tahun 1991 dan untuk mencit pada tahun 1995 serta mampu menghasilkan cedera otak yang bergradasi dan dapat direproduksi (Albert-Weissenberger, 2010).



Gambar 2.27 Model *Controlled Cortical Impact* (Gilchrist, 2004).

Tergantung pada beratnya cedera, *controlled cortical impact* menghasilkan cedera *ipsilateral* dengan memar pada korteks otak, perdarahan, dan gangguan sawar darah-otak, kematian dan degenerasi neuron, astrogliosis, aktivasi mikroglial, peradangan, kerusakan akson, defisit kognitif, dan eksitotoksitas dilaporkan terjadi (Albert-Weissenberger, 2010). Albert-Weissenberger (2010) juga menambahkan sehubungan dengan edema otak, *controlled cortical impact* merupakan model yang sesuai karena memiliki kemampuan untuk menyebabkan edema otak sitotoksik dan vasogenik, sehingga mencerminkan situasi klinis pembentukan edema otak pasca-trauma.

2.5.5. Model-Model Lain

Model-model lain yang dapat digunakan seperti model *cryogenic*, model barotrauma, dan model ledakan. Model *cryogenic* menggunakan sebuah batang dingin yang ditempelkan pada *duramater* yang terpapar pada tikus, misalnya pada korteks *parietal* otak menggunakan silinder tembaga diisi dengan campuran aseton dan es kering (-78° C) atau tengkorak terpapar pada mencit, misalnya pada korteks *parietal* otak menggunakan silinder tembaga diisi dengan nitrogen cair (-183° C) (Albert-Weissenberger, 2010). Keparahan cedera dapat divariasikan dengan merubah lamanya kontak dengan pelat dingin. Model-model yang sudah pernah dilakukan oleh para peneliti sebelumnya juga dapat dimodifikasi sesuai dengan tujuan yang diinginkan (Albert-Weissenberger, 2010).

Berdasarkan uraian tersebut, dapat disimpulkan bahwa masing-masing model trauma memiliki tujuan, kelebihan, dan kekurangannya masing-masing. Tidak ada satu model tunggal percobaan *in vivo* dari cedera otak traumatika yang menjadi rekomendasi bagi standar baku emas untuk penelitian neurotrauma, hal ini disebabkan karena tiap-tiap model memiliki keuntungan dan kerugian, sehingga pemilihan model harus disesuaikan dengan tujuan penelitian (Cernak, 2005).

2.6 Metode Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan proses untuk mendeteksi antigen (protein, karbohidrat, dsb) pada sel dari jaringan dengan prinsip reaksi antibody yang berikatan terhadap antigen pada jaringan. Nama imunohistokimia diambil dari nama "immune" yang menunjukkan bahwa prinsip dasar dalam proses ini ialah penggunaan antibody dan "histo" menunjukkan jaringan secara mikroskopis. Imunohistokimia seringkali digunakan untuk mengukur dan mengidentifikasi karakteristik dari even seluler seperti proses proliferasi sel, apoptosis sel. Imunohistokimia juga sering digunakan untuk penelitian dasar dalam rangka mengetahui distribusi dan lokasi biomarker ataupun protein tereksresi pada berbagai macam jaringan pada tubuh. (Ramos-Vara, 2005). Untuk memvisualisasikan hasil interaksi antara antigen dan antibody dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, dimana cara yang paling sering digunakan ialah dengan konjugasi antibody dengan enzim seperti peroksidase. Selain itu juga bias digunakan fluorophore seperti fluorescein atau rhodamin. Untuk mempelajari morfologi sel, sel dalam jaringan difiksasi kemudian dilokalisasi diantara sel dan divisualisasikan dengan mikroskop elektron atau mikroskop cahaya (Rantam, 2003)

Secara garis besar, untuk metode imunohistokimia, dapat dilakukan dengan metode direk maupun indirek. Dimana keduanya ditentukan oleh prinsip reaksi antibody yang digunakan, yaitu Metode Direct menggunakan antibody primer yang sudah terlabel dan berikatan langsung dengan antigen target secara langsung. Dan Metode Indirect menggunakan antibody primer yang tidak ada labelnya, namun digunakan juga antibody sekunder yang sudah memiliki label dan akan bereaksi dengan IgG dari antibody primer (Rantam, 2003)

Secara umum, proses pemeriksaan imunohistokimia terdiri dari beberapa tahapan, yaitu proses fiksasi dengan pembuatan paraffin block, deparafinisasi,

proses imunohistokimia yang sesuai dan pengamatan dibawah mikroskop
(Rantam, 2003)