

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ubi Jalar Ungu

Ubi jalar merupakan tanaman yang tumbuh lebih di 100 negara baik di negara tropis, subtropis maupun yang beriklim panas. Ubi jalar menduduki hasil pertanian terpenting ke-tujuh di dunia dengan perkiraan jumlah produksi mencapai 100 juta ton setiap tahun. Di beberapa negara seperti Asia, Afrika, Karibbean dan Amerika Selatan, ubi jalar dijadikan sebagai makanan pokok [2]. Di Indonesia, ubi jalar dapat tumbuh pada berbagai cuaca baik di daerah pantai maupun pegunungan sehingga tersebar di berbagai daerah seperti pulau Jawa, Bali, Nusa Tenggara maupun Sumatera [21]. Oleh karena itu, ubi jalar dikategorikan sebagai salah satu produk pertanian yang potensial di masa mendatang [22].



Gambar 2.1. Ubi Jalar Ungu

Varietas ubi jalar yang banyak diamati saat ini adalah ubi jalar ungu. Ubi jalar ungu atau yang dikenal dengan nama latin *Ipomoea batatas L.*, kaya akan nutrisi seperti kandungan karbohidrat, vitamin A, vitamin C, serat, besi, potassium, protein, dan senyawa fitokimia. Toksisitas yang rendah, warna yang unik serta kandungan nutrisi yang tinggi menjadikan ubi jalar ungu sebagai salah satu sumber pewarna makanan dan *healthy food* yang prospektif [23]. Dibandingkan dengan jenis ubi jalar yang lain, kandungan antosianin pada ubi jalar ungu paling tinggi yaitu mencapai 110,15 mg/ 100 gram bahan [24]. Selain itu, perbandingan kadar antosianin pada beberapa tanaman lain seperti strowberi, kubis merah dan kulit anggur, kandungan antosianin pada ubi jalar ungu lebih tinggi. Pada umumnya, senyawa antosianin inilah yang berfungsi sebagai sumber antioksidan yang dapat dimanfaatkan untuk mencegah maupun mengobati berbagai penyakit terutama yang diakibatkan oleh produksi radikal bebas yang berlebih.

2.2 Antosianin Dalam Ubi Jalar Ungu

2.2.1 Antosianin

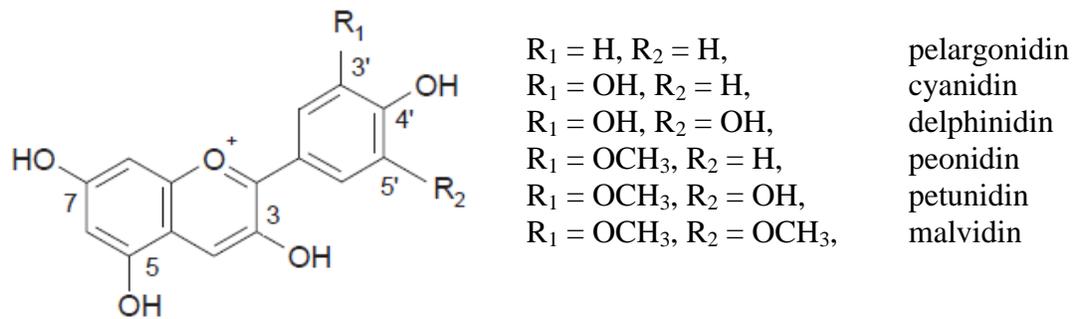
Antosianin merupakan turunan flavonoid yang bertanggung jawab terhadap pembentukan warna atau pigmen pada tanaman. Antosianin mengakibatkan terbentuknya warna merah, ungu atau biru pada buah, sereal dan sayuran [4] yang tersebar baik pada bunga, kulit, biji, buah dan daun tanaman [25]. Senyawa ini terletak pada vakuola tanaman dan bersifat larut dalam air. Perbedaan warna yang terbentuk dipengaruhi oleh pH lingkungan dan struktur molekul seperti jumlah dan

lokasi substituen glikosida (gugus asil, hidroksil, metoksil atau karbonil) pada antosianin. Antosianin merupakan molekul yang reaktif dan sensitif terhadap reaksi degradasi seperti proses ekstraksi, proses pemasakan dan penyimpanan [26]. Oleh karena itu, secara umum degradasi warna yang terjadi pada antosianin sangat dipengaruhi oleh suhu, enzim, radiasi UV, sulfur dioksida, asam askorbat dan kelat ion logam [25].

2.2.2 Struktur Antosianin

Antosianin memiliki dua cincin benzena yang terhubung oleh tiga atom karbon linier (C2-C4) yang direpresentasikan sebagai sistem C6-C3-C6. Struktur ini menjadikan antosianin sangat reaktif terhadap radikal bebas sehingga dapat dijadikan sebagai antioksidan alami yang efektif [27]. Antosianin mengandung inti struktur antosianidin yang terglisosilasi dengan glukosa atau gula yang lain, dan dapat teresterifikasi dengan asam alifatik atau senyawa aromatik. Turunan antosianin tersebut lebih dikenal dengan istilah terasilasi. Antosianin yang terasilasi lebih stabil dan lebih resisten terhadap hidrolisis dibandingkan dengan antosianin yang tidak terasilasi. Selain itu, kopigmentasi intermolekuler juga dapat menstabilkan antosianin melalui pembentukan multilayer dengan senyawa polifenol melalui interaksi hidrofobik. Hal ini mengakibatkan pembentukan struktur molekuler kompleks yang dapat meningkatkan resistensi terhadap deprotonasi sehingga mampu meningkatkan stabilitas antosianin [28].

Berikut merupakan struktur antosianin yang terdapat di alam:

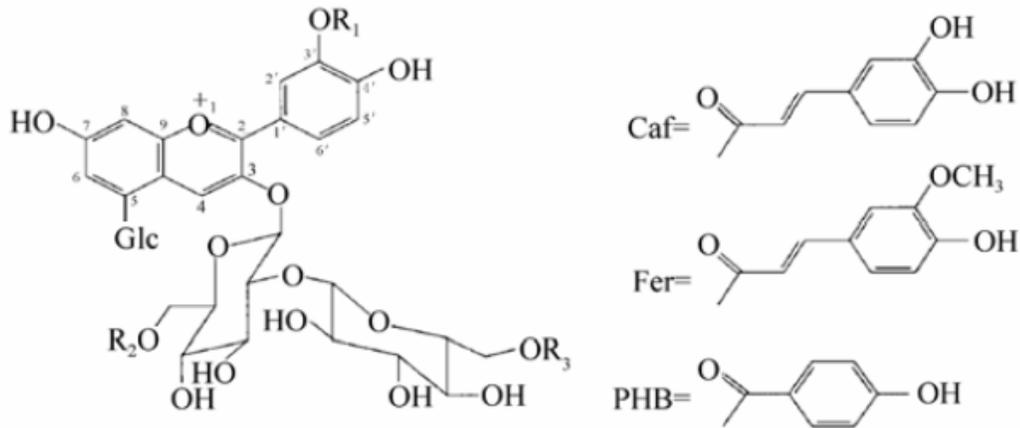


Gambar 2.2. Struktur umum kimia antosianin

Terdapat 23 jenis antosianidin dasar atau aglikon yang ada di alam dan jenis yang paling banyak ditemukan adalah pelargonidin, sianidin, peonidin, delphinidin, petunidin dan malvidin. Struktur antosianin ubi jalar ungu yang terasilasi dengan *p-hydroxybenzoic acid*, *caffeic acid* dan *ferulic acid* menghasilkan struktur turunan antosianin seperti *cyanidin 3-sophoroside-5-glucoside* dan *peonidin 3-sophoroside-5-glucoside*. Jenis antosianin yang teridentifikasi pada ubi jalar ungu tergantung pada spesies atau jenis ubi jalar ungu [6]. Riset yang dilakukan Montilla menunjukkan turunan sianidin dan peonidin adalah struktur utama pada ubi jalar ungu dimana keduanya terikat pada senyawa kafeolik [27]. Sementara itu, spesies ubi jalar ungu seperti Yamagawamurasaki juga memiliki struktur *cyanidin 3-caffeoyl sophoroside-5-glucoside* dan *peonidin 3-caffeoyl sophoroside-5-glucoside* [29]. Struktur antosianin lain yang berasal dari ubi jalar ungu yang berhasil diidentifikasi adalah peonidin

3-O-[6-O-(E)-caffeoyl-2-O-[6-O-(E)-p-hydroxybenzoyl-β-D-glucopyranoside]-β-D-glucopyranoside]-5-O-[β-D-glucopyranoside)] dan *peonidin*

3-O-{6-O-(E)-caffeyl-2-O-[6-O-(E)-ferlyl-β-D-glucopyranoside]-β-D-glucopyranoside}-5-O-[β-D-glucopyranoside)].



Gambar 2.3 Struktur peonidin *3-O-{6-O-(E)-caffeyl-2-O-[6-O-(E)-p-hydroxybenzoyl-β-D-glucopyranoside]-β-D-glucopyranoside}-5-O-[β-D-glucopyranoside)]* dan peonidin *3-O-{6-O-(E)-caffeyl-2-O-[6-O-(E)-ferlyl-β-D-glucopyranoside]-β-D-glucopyranoside}-5-O-[β-D-glucopyranoside)]* (Sumber: Lu Ying, 2011)

2.2.3 Aktivitas Antosianin Ubi Jalar Ungu

Berbagai penelitian mengungkapkan adanya pengaruh positif konsumsi buah dan sayuran yang tinggi antosianin. Adanya aktivitas antioksidan yang terkandung dalam antosianin dapat mempengaruhi sinyal sel, ekspresi gen, proteksi terhadap kanker dan pencegahan penyakit kardiovaskular [30]. Sebuah penelitian melaporkan bahwa antosianin dari ubi jalar ungu mampu menekan perkembangan luka aterosklerosis dan stres oksidatif pada tikus coba [31].

Antosianin ubi jalar ungu memiliki kelebihan dalam tampilan warna, komposisi nutrisi dan fungsinya dalam menunjang kesehatan. Antosianin yang terkandung dalam ubi jalar ungu lebih stabil dibandingkan dengan berbagai tanaman

berwarna lain seperti strawberi, kubis merah, kulit anggur dan *elderberry*. Selain itu, ubi jalar ungu memiliki efek farmakologis yang beragam sehingga mampu merangsang peningkatan antioksidan, antiinflamasi dan memiliki efek neuroprotektif [32]. Hal ini dikarenakan antosianin ubi jalar ungu mampu bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas, antimutagenesis, bersifat antikarsinogenik dan antihipertensi [4].

Pada umumnya antosianin dapat memodulasi sinyal sel dengan berinteraksi dengan molekul target sentral. Target sentral tersebut meliputi 1) aktivasi MAPKs, PKC, PKB/Akt dan *phase II antioxidant detoxifying enzymes*. 2) downregulasi enzim proinflamasi seperti COX-2 dan iNOS melalui aktivasi PPAR γ . 3) regulasi homeostasis kalsium, 4) inhibisi tirosin kinase, NF-kB, c-JUN [33].

Pemanfaatan ubi jalar ungu sebagai bahan obat telah diteliti baik secara in vivo maupun in vitro. Pada tikus yang mengalami inflamasi otak akibat induksi LPS menunjukkan terjadinya penurunan inflamasi setelah diterapi dengan antosianin dari ubi jalar ungu. Antosianin mampu menghambat produksi molekul proinflamasi melalui bloking jalur sinyal seperti ERK, JNK dan NF-kB [9]. Apoptosis yang disebabkan hiperkolesterolemia hepar menunjukkan penurunan pasca diet antosianin ubi jalar ungu [8]. Pada hati yang diinduksi D-galaktosa, ubi jalar ungu mampu menghentikan aktivasi kaspase 3 karena dapat merangsang jalur sinyal PI3K/Akt untuk mempertahankan sel dari kerusakan. Akt (serin/threonine kinase) merupakan mediator utama PI3K-initiated signaling. Melalui Jalur PI3K/Akt, sel akan melakukan regulasi terhadap pertahanan sel melalui fosforilasi *downstream* target seperti protein proapoptik, faktor transkripsi dan protein kinase lain [10]. Selain mampu menekan

apoptosis sel, antosianin dari ubi jalar ungu dapat meningkatkan proliferasi sel stellate pada fibrosis hati [4] serta dapat menekan kerusakan sel pada penyakit ginjal [7]. Penelitian secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak ubi jalar ungu dapat dimanfaatkan sebagai anti-aging dan anti tumor [23] [5].

2.2.4 Antosianin Sebagai *Scavenger* Radikal Bebas

Pada umumnya, setiap proses biologis dalam tubuh menghasilkan radikal bebas sebagai produk samping. Produksi radikal bebas yang berlebihan dapat memicu timbulnya berbagai penyakit. Antosianin sebagai antioksidan mampu menekan efek buruk yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Antioksidan akan menjebak radikal bebas dengan mengikat hidrogen sehingga menghasilkan radikal bebas yang relatif stabil dengan potensial reduksi yang rendah (kurang dari 0.05 V). Kemampuan ini disebabkan oleh resonansi delokalisasi struktur yang mengandung cincin fenolik atau penghalang sterik dari sisi aktif substituen [34].

Polifenol merupakan antioksidan primer yang dapat menginaktifkan radikal bebas melalui transfer atom hidrogen dan transfer elektron tunggal. Pada mekanisme transfer atom hidrogen, antioksidan ArOH berikatan dengan radikal bebas R^* sebagai hasil transfer atom hidrogen karena disosiasi ikatan O-H. Produk akhir yang terbentuk adalah senyawa dengan rumus RH yang lebih stabil. Sementara itu, mekanisme melalui transfer elektron tunggal, elektron ditransfer ke radikal bebas atau dari radikal ke akseptor membentuk senyawa yang relatif stabil [34].

2.3 Otak Kecil (Cerebellum)

Otak kecil merupakan bagian otak yang paling besar di bagian otak belakang. Organ ini terdiri dari dua bagian yaitu hemisfer kiri dan hemisfer kanan dimana keduanya dihubungkan oleh vermis. Posisi cerebellum berada di atas ventriculus quartus, medulla oblongata dan pons. Berdasarkan anatomi, otak kecil dibagi menjadi tiga bagian yaitu lobus anterior, medius dan flocculonodularis. Selanjutnya antar satu lobus dengan lobus yang lain dipisahkan kembali oleh sebuah fisura seperti lobus anterior dengan lobus medius dipisahkan oleh fisura prima [35].

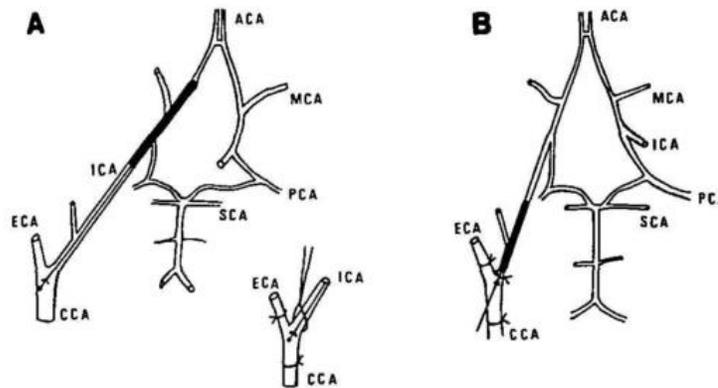
Korteks serebri otak kecil berbentuk seperti lembaran dimana setiap lipatannya terdiri dari substantia alba dan substantia grisea. Substantia alba berada di bagian dalam yang kemudian bagian luarnya ditutupi oleh substantia grisea. Substantia otak kecil tersusun dari tiga lapisan. Lapisan pertama terdiri lapisan luar dan lapisan molekuler. Lapisan kedua tersusun dari lapisan tengah dan lapisan sel Purkinje. Lapisan ketiga disusun oleh lapisan dalam dan lapisan granular. Otak kecil berfungsi sebagai pusat refleks yang akan mempengaruhi seluruh koordinasi dan kontraksi yang bekerja dengan mempertahankan keseimbangan badan [35].

2.3.1 Sistem Perdarahan Pada Otak

Darah yang menuju otak dialiri oleh dua sumber utama yaitu arteri vertebralis dan arteri karotis interna yang percabangan keduanya akan beranastomosis membentuk *Circle of Willis*. Arteri vertebralis membentuk sistem perdarahan pada sirkulasi anterior yang meliputi bagian wajah, tiroid, hidung, faring, dan lidah. Arteri yang termasuk dalam sirkulasi anterior adalah *internal carotid artery (ICA)*, *middle*

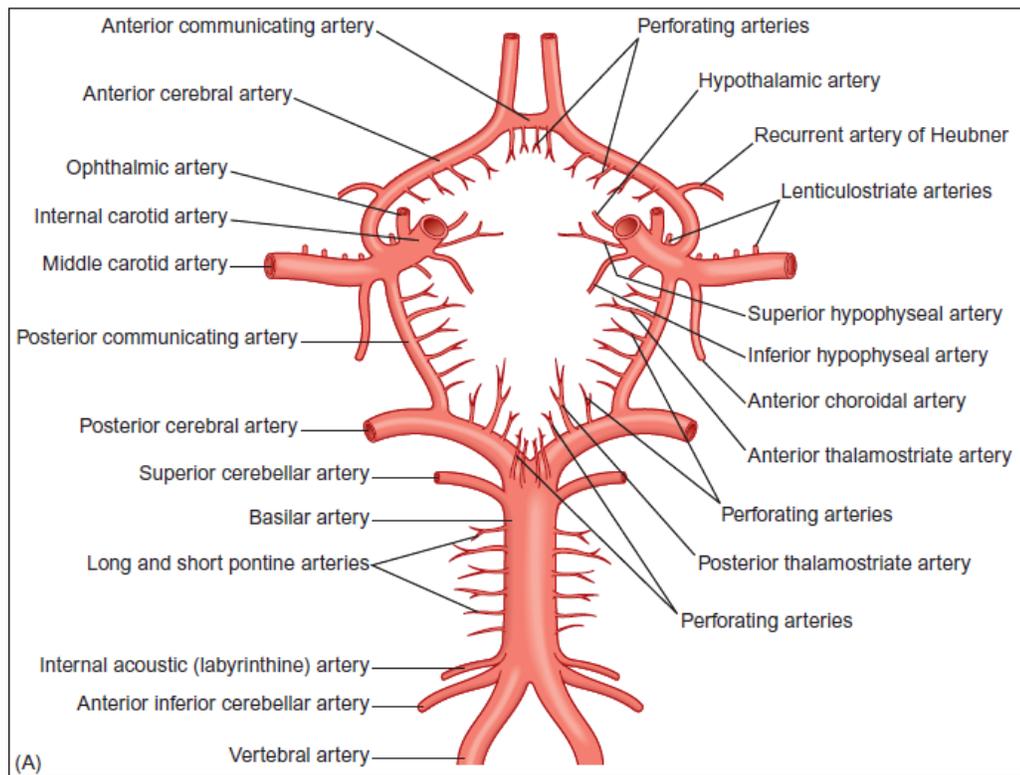
cerebrals artery (MCA) dan *anterior cerebrals artery* (ACA). Sebesar 80 % aliran darah masuk melalui sistem carotid. Sementara sebesar 20% aliran darah akan disalurkan melalui arteri vertebralis pada sirkulasi posterior. Sirkulasi posterior bertanggung jawab terhadap suplai darah ke *brainstem*, otak kecil dan lobus temporal dan *occipital*. Arteri yang termasuk dalam sirkulasi posterior adalah vertebral, basilar dan *posterior cerebrals artery* (PCA) [12].

Sirkuit kolateral yang berada diantara sirkulasi ekstrakranial dan intrakranial dapat berpotensi sebagai sumber aliran darah menuju ECA ketika ICA mengalami stenosis atau oklusi. Lebih lanjut lagi proksimal menghubungkan kolateral dari percabangan ECA ke bagian otak melalui optahalamic dan arteri superfisial temporal ke pembuluh intrakranial. Anastomosis distal terbentuk pada tingkat servikal antara vertebral arteri dengan percabangan muskular ECA dan antara spinal arteri dan percabangan pada PIA [36].



Gambar 2.5. Posisi yang menggambarkan skema oklusi pembuluh darah ke otak pada MCA (A) dan sesudah resirkulasi (B) [37].

Sumber utama jalur kolateral intrakranial pada otak manusia adalah *Circle of Willis*. Selain berfungsi mengalirkan darah ke percabangan utama ICA, Circle of Willis juga menyediakan koneksi kolateral percabangan seluruh arteri. Misalnya, *anterior communicating artery* (ACoMA) menghubungkan dua *anterior cerebral arteries* (ACA) dengan dua hemisfer sedangkan *posterior communicating artery* (PCoMA) menghubungkan sirkulasi anterior dan posterior melalui ICA dan *posterior cerebral artery* (PCA). Aliran darah yang menurun pada proksimal anterior cerebral arteri menunjang bagian anterior *Circle of Willis* sementara arteri posterior proksimal cerebral mengimbangi aliran darah antara hemisfer pada bagian posterior *Circle of Willis* [36]. Oklusi pada daerah basilar arteri merupakan lokasi yang paling berpengaruh pada sirkulasi posterior. Oklusi pada daerah ini menyumbangkan laju kematian sebesar 50 - 80 % angka mortalitas pada berbagai kasus [12].



Gambar 2.4 Etiologi umum stroke iskemik akut [12]

2.4 Stroke

Stroke merupakan penyebab kematian kedua di dunia dan mengakibatkan disabilitas pada orang dewasa di berbagai negara. Di seluruh dunia, sebanyak 15 juta jiwa menderita stroke setiap tahunnya. Sebanyak 5 juta meninggal dan sebanyak 5 juta jiwa yang mengalami disabilitas permanen [12]. Diperkirakan pada tahun 2020, mortalitas stroke meningkat dua kali lipat. Data yang dikeluarkan WHO pada tahun 2013 menunjukkan terjadinya peningkatan jumlah onset dari 237 juta jiwa menjadi 560 juta jiwa setiap tahun. Berdasarkan informasi yang dikeluarkan RISKESDAS tahun 2013 jumlah kematian akibat stroke iskemik sebesar 51% dan mengalami

peningkatan dari 8,3 menjadi 12,1 per 1000 orang [13]. Data tersebut diperkuat oleh hasil riset statistik tenaga kesehatan (Info Datin) yang menginformasikan bahwa jumlah penderita stroke di Indonesia sebanyak 1.236.875 [14]. Oleh karena itu, penyakit stroke harus mendapatkan perhatian yang lebih maksimal guna mencegah, mengobati maupun untuk meningkatkan status kesehatan masyarakat Indonesia secara keseluruhan.

2.4.1 Stroke Iskemik

Stroke disebabkan oleh berkurangnya aliran darah menuju otak baik akibat oklusi atau pecahnya pembuluh darah di area otak. Stroke dibagi menjadi dua yaitu stroke iskemik dan stroke hemoragik. Stroke iskemik merupakan jenis stroke yang paling banyak terjadi. Kejadian stroke iskemik mencapai 80 - 85 % kasus di seluruh dunia. Jenis stroke ini disebabkan oleh oklusi arteri pada leher atau otak sehingga mengurangi asupan nutrisi, glukosa dan oksigen. Oklusi arteri paling banyak disebabkan oleh trombus yang bergerak menuju otak yang berasal dari lokasi proksimal dalam tubuh seperti jantung atau dari plak yang berada pada dinding proksimal arteri, misalnya aorta atau ICA. Trombus juga bisa berkembang pada area oklusi dalam arteri intrakranial besar seperti *middle cerebral artery* atau basilar atau pada pembuluh kecil halus (*small penetrating vessel*) [12].

2.5 Mekanisme Kerusakan Iskemik Otak

2.5.1 Hipotesis Iskemik Reperfusi Akibat MCAO

Teknik MCAO merupakan teknik yang dilakukan untuk membuat hewan model stroke iskemik baik untuk model stroke permanen maupun transien. Metode ini dilakukan dengan memasukkan filament ke dalam ECA dan menyisipkannya ke dalam ICA sampai menutupi seluruh aliran MCA. Jika jahitan dilepaskan setelah interval waktu tertentu misalnya 30 menit, 1 atau 2 jam, kondisi ini disebut reperfusi. Reperfusi dalam jangka waktu ini mengakibatkan stroke transiet atau disebut *transient* MCAO, sementara itu, jika sumbatan filament dibiarkan pada tempat tersebut selama 24 jam akan mengakibatkan stroke permanen [38].

Teknik MCAO yang dilakukan akan mengakibatkan cedera iskemik reperfusi. Iskemik reperfusi dapat memicu cedera reversible dan irreversible pada jaringan yang mengalaminya. Kerusakan akibat iskemik reperfusi dibagi menjadi tiga tahapan penting. Selama iskemia (fase pertama cedera), terhentinya suplai aliran darah pada organ mengakibatkan berkurangnya oksigen dan nutrisi yang didistribusikan pada jaringan. Kondisi ini dapat mengganggu atau mengacaukan pembentukan ATP melalui fosforilasi oksidatif sehingga mengakibatkan sel mengalami perubahan metabolisme dan mengganggu fungsi seluler sel yang membutuhkan energi. Berkurangnya limit persediaan ATP untuk pompa ion pada membran sel mengakibatkan penumpukan kalsium dalam sel, merusak struktur sel, apoptosis dan nekrosis. Selain itu, iskemik dapat merangsang perubahan konformasi enzim seperti xanthin oksidase yang akan memicu pelepasan mediator proinflamasi dan peningkatan ekspresi molekul adhesi yang dapat meningkatkan interaksi leukosit atau

sel endothelial. Proses ini tidak mengakibatkan kerusakan langsung selama fase iskemik namun pada tahap kedua (karena reperfusi), keadaan tersebut diperburuk yaitu ketika suplai oksigen dibangun kembali. Secara paradoks, berkurangnya oksigen selama iskemik dan bertambahnya oksigen akibat reperfusi berkontribusi terhadap cedera terus menerus pada jaringan yang mengalami iskemik reperfusi. *Outcome klinis* juga ditentukan oleh fase ketiga yaitu produksi ROS yang terjadi selama perbaikan post-reperfusi yang dikarakterisasi oleh pembentukan ulang dan adaptasi jaringan [39].

2.5.2 Eksitotoksisitas dan Ketidakseimbangan Ion

Stroke iskemik merupakan kegagalan metabolisme dan produksi energi seperti soduium-potassium ATPase. Kehilangan cadangan energi mengakibatkan ketidakseimbangan ion, pelepasan neurotransmitter dan inhibisi *reuptake* neurotransmitter eksitatori seperti glutamat. Glutamat berikatan dengan reseptor ionotropik NMDA dan AMPA yang mengakibatkan influks kalsium berlebihan sehingga memicu aktivitas fosfolipase dan protease yang akan mendegradasi membran dan protein penting lain yang berfungsi untuk menjaga integritas seluler.

ROS diproduksi secara alami oleh mitokondria selama proses transport elektron, dan sesudah iskemia, tingginya kadar Ca^{2+} , Na^+ dan ADP dalam intraseluler memicu produksi ROS secara berlebihan. Jenis ROS yang berperan pada cedera otak adalah radikal anion superoksida, radikal hidroksil dan nitit oksida (NO). Sumber utama produksi ROS selama stroke iskemik terjadi adalah mitokondria. Superoksida diproduksi pada metabolisme asam arakidonik melalui jalur siklooksigenase dan

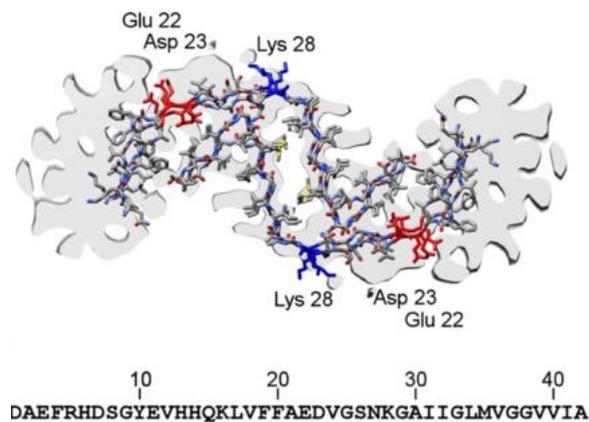
lipooksigenase. ROS juga dapat dihasilkan oleh aktivasi mikroglia oleh infiltrasi leukosit peripheral melalui sistem NADPH oksidase setelah jaringan mengalami iskemik reperfusi. Sementara itu, produksi NO dihasilkan dari L-arginin melalui *nitric oxide synthase* (NOS) seperti iNOS dan eNOS. NO akan bereaksi dengan superoksida membentuk peroksinitrit (ONOO⁻) dimana kedua jenis turunan radikal bebas tersebut dapat mengaktivasi apoptosis dan inflamasi. Selain itu, NO juga dapat mengaktivasi reseptor NMDA yang dapat merangsang eksitotoksisitas jaringan otak [40].

Produksi ROS yang tinggi dapat mengakibatkan kerusakan otak karena antioksidan enzimais endogen seperti SOD, katalase, glutathion dan antioksidan vitamin seperti alfa tokoferol dan asam askorbat secara umum tidak banyak dan tidak sebanding dengan pembentukan radikal bebas. Setelah reperfusi iskemik, jumlah ROS yang berlebihan mengakibatkan fungsi scavengers antioksidan endogen tidak berfungsi sehingga ROS dapat merusak lipid, protein, asam nukleat dan karbohidrat secara langsung. Selain itu, radikal oksigen dan stres oksidatif akibat reperfusi iskemik mengakibatkan hilangnya kemampuan pembentukan MTP (Mitochondrial Transition Pore) yang dibutuhkan untuk fosforilasi oksidatif dan pembentukan ATP. Sebagai hasilnya, mitokondria akan melepaskan protein yang menginduksi apoptosis dan berbagai konstituen atau substansi yang berada di dalam maupun luar membran mitokondria. Setelah reperfusi, oksigenasi jaringan diperbaharui kembali, disfungsi mitokondria mengakibatkan stres oksidatif dan pembentukan MTP. Radikal oksigen juga diproduksi selama konversi enzimatik seperti konversi *cyclooxygenase-dependent arachidonic* menjadi prostanoid dan degradasi hipoksantin. Radikal bebas

juga diproduksi selama respon inflamasi berlangsung setelah iskemik. Oleh karena itu, stres oksidatif, kegagalan energi dan ketidakseimbangan ion berkontribusi terhadap kematian sel pasca iskemik [41].

2.6 Beta Amyloid (A β)

Amyloid- β Precursor Protein (APP) merupakan protein transmembran tipe I dengan berat molekul 110 - 130 kDa seperti *APP-like protein (APLP)* 1 dan 2. APP terekspresi di seluruh sistem saraf pusat dan berkorelasi dengan berbagai fungsi seperti proliferasi dan diferensiasi seluler, spesifikasi sel dan perkembangan neurit (*neurite outgrowth*). APP berperan penting sebagai regulator produksi dan pematangan neuron pada sistem saraf pusat orang dewasa [42].



Gambar 2.6 Model struktur dan sekuens beta amyloid (A β_{1-42}) [43]

APP dapat membentuk beta amyloid melalui reaksi proteolitik oleh β dan γ -secretase. APP yang dipisahkan melalui jalur non-amyloidogenik oleh α -secretase

yang diikuti oleh γ -secretase menghasilkan fragmen beta amyloid yang tidak toksik, sementara itu, APP yang dipotong oleh BACE1 (β -Site APP Cleaving Enzyme) yang diikuti oleh γ -secretase akan menghasilkan peptide dengan panjang yang berbeda seperti $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$. Pada umumnya, di dalam otak, peptide-peptida tersebut yang memiliki residu 1 - 42 rentan mengalami agregasi yang berubah menjadi dimer atau multimer lainnya yang diyakini bersifat neurotoksik, membentuk oligomer fibril dan akhirnya membentuk plak amyloid [44].

Beta amyloid dapat menyebabkan degenerasi perforasi pembesaran pembuluh arteri dan kapiler cerebral, yang keduanya berimbas pada perfusi otak dan sawar darah otak. Lebih lanjut lagi, peptide beta amyloid menghambat angiogenesis baik pada studi in vivo maupun in vitro melalui interaksi langsung dengan reseptor VEGF-2 dan deregulasi faktor angiogenesis yang berkontribusi pada timbulnya berbagai gangguan neurologis termasuk neurodegenerasi [19].

Studi terbaru menginformasikan bahwa iskemik dan hiperperfusi dapat memicu akumulasi dan pemutusan APP menjadi beta amyloid dan deposisi APP tersebut dapat berakumulasi di dalam otak. Ekspresi APP yang tinggi ditemukan pada pembuluh endothelium *neofarming* dimana APP ini akan diputus enzim β dan γ -secretase. Hasil pemutusan APP berupa beta amyloid ini dapat berdampak buruk karena dapat menghambat proses angiogenesis dan pertumbuhan tumor [19].

Secara normal, beta amyloid akan dibersihkan dari otak oleh enzim dimana enzim tersebut akan memutus peptida atau protein lain yang mambantu transportasi beta amyloid keluar dari otak yang berfungsi untuk mencegah penumpulan beta amyloid. Namun, berbagai kondisi patologis seperti stres oksidatif, kerusakan

membran, disfungsi mitokondria dan berbagai gangguan seluler yang lain dapat mengakibatkan toksisitas beta amyloid [44].

2.7 Angiogenesis dan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

2.7.1 Angiogenesis

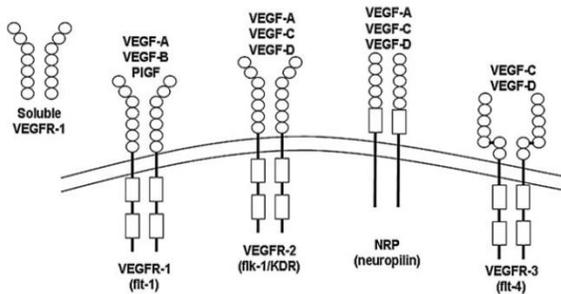
Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh kapiler baru sebagai bentuk adaptasi yang ditimbulkan oleh respon fisiologis dan patologis [17]. Iskemik mengakibatkan perubahan pstofisiologis pada otak seperti cedera dan regenerasi neuron. Perubahan ini akan meningkatkan pembentukan faktor angiogenesis dan sel progenitor yang berdampak pada peningkatan respon mikrovaskular otak terhadap iskemik [45]. Setelah iskemik terjadi, sel endotelial mikrovaskular berproliferasi dan akan tumbuh sebagai upaya adaptasi terhadap stimulasi sinyal yang diberikan. Angiogenesis dapat dipicu oleh beragam *inducer* inflamasi sebagai contohnya pada awal angiogenesis mula-mula diperantarai oleh CCL2. Selanjutnya, monosit atau makrofag mengekspresikan munculnya IL-8, VEGF, TGF- β , prostaglandin dan MMP-9, yang keseluruhnya meningkatkan proses angiogenesis. Proses angiogenesis ini berkaitan erat dengan jalur MAPK yang secara langsung mempengaruhi proliferasi endotelial melalui *transcription factor-c fos*.

2.7.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF adalah protein homodimerik terglisosilasi dengan berat 34.000 sampai 45.000 Da dan secara alami teridentifikasi sebagai faktor permeabilitas vaskular yang poten. VEGF dapat disekresi oleh berbagai jenis sel secara in vivo dan diregulasi oleh

berbagai sitokin seperti IL-1 β , TGF- β , PDGF dan lainnya dan berperan juga pada aktivitas proliferasi, migrasi dan pembedakan kapiler sel endothelial. Gen VEGF manusia yang telah dipetakan berada pada kromosom 6p21.3 dengan lima jenis sub tipe yaitu VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189, dan VEGF206. Di dalam otak, VEGF165 terdapat dalam jumlah yang banyak dengan aktivitas biologis yang poten [45]. Sebagai respon pada molekular, angiogenesis dimulai dengan perbesaran atau peningkatan permeabilitas vaskular kemudian diikuti oleh degradasi *basement* membran dan matriks ekstraseluler (ECM/ *extracellular matrix*). Sel endothelial akan merangsang migrasi secara baru deposit ECM *tract* dan membentuk pembuluh baru. Akhirnya, lumen yang mengandung pembuluh terbentuk dan terintegrasi menuju sirkulasi [45].

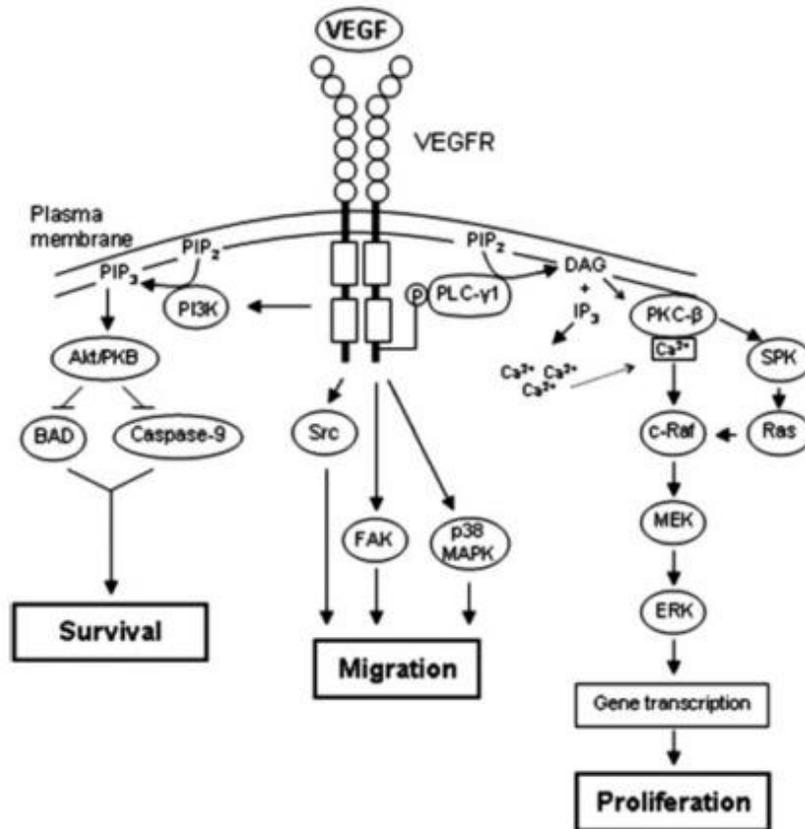
Pada mamalia, ada lima jenis ligand VEGF yang terdapat pada variasi *splice* yang berbeda dan proses pembentukan yang berbeda. Ligan-ligan tersebut berikatan secara tumpang tindih pada tiga reseptor tirosine kinase (RTKs) yang disebut sebagai reseptor VEGF-1, VEGF-2 dan VEGF-3. Kekurangan VEGF yang terikat pada molekular akan merangsang sel untuk mengaktifkan fungsi katalitik seperti *heparin sulphate proteoglycans* (HSPGs) dan *neuropilins*. Berikut merupakan gambaran VEGF dengan reseptornya.



Gambar 2.7 Ikatan VEGF–VEGFR

VEGF berbagi tugas dengan jenis RTKs yang lain seperti *platelet-derived growth factor receptors* (PDGFRs) dan *epidermal growth-factor receptors* (EGFRs). Mekansime tersebut meliputi dimerisasi reseptor dan aktivasi tirosin kinase seperti pembentukan sisi doking untuk transduksi sinyal. VEGF adalah promotor klasik angiogenesis pasca stroke yang akan mengaktifkan jalur PI3K/ Akt dan MAPK untuk memediasi pertahanan, proliferasi, migrasi, pembentukan dan pertahanan sel mikrovaskular sel-sel endothelial [17] [46]. VEGF juga dapat memediasi neuroproteksi dan permeabilitas seluler melalui jalur VEGF/VEGFR2/Flk1 [47].

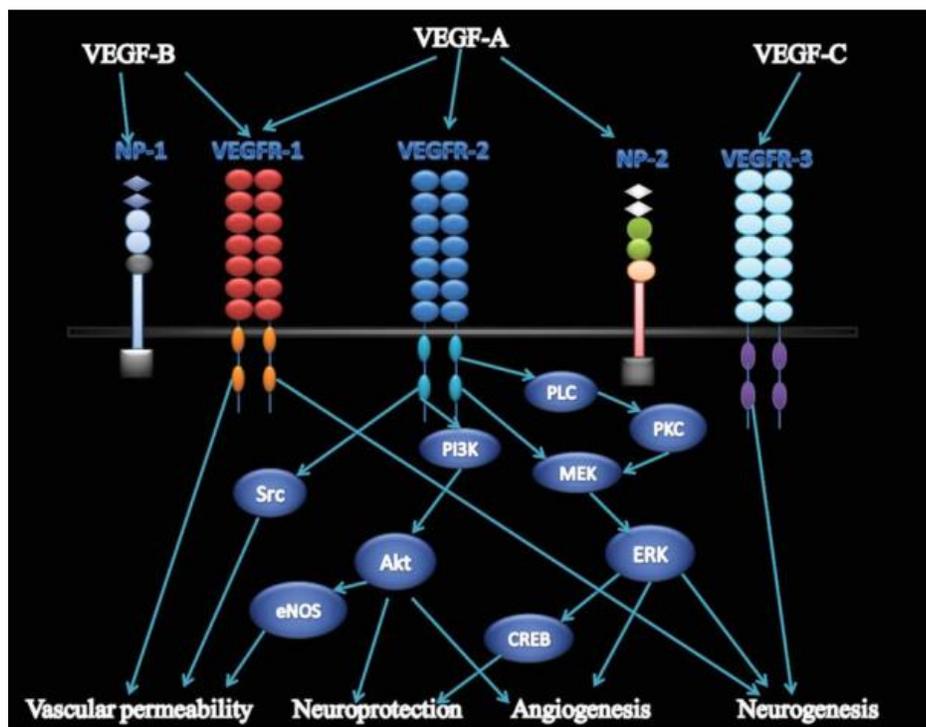
Ikatan VEGF-VEGFR menyebabkan dimerisasi dan autofosforilasi VEGFR. Fosforilasi VEGFR akan memicu aktivasi PI3K dan fosforilasi Akt. Akt yang aktif menghambat molekul proapoptotik BAD dan caspase-9, yang mengakibatkan kelangsungan hidup sel. Sinyal VEGFR juga dapat mengaktifkan beberapa kinase yang memediasi migrasi sel termasuk Src, FAK, dan p38 MAPK. Aktivasi beberapa jalur setelah fosforilasi VEGFR menyebabkan pensinyalan MAPK (fosforilasi MEK/ ERK), yang merangsang proliferasi seluler [48].



Gambar 2.8 Aktivasi Sinyal VEGFR

Eksresi VEGF diupregulasi pada otak pasca iskemik serebral dan protein ini diregulasi oleh protein HIF-1 dan HIF-2. Hipoksia adalah regulator kunci VEGF dan peningkatan ekspresinya, bahkan peningkatan VEGF akan semakin tinggi antara 6 dan 24 jam pasca oklusi. Peningkatan ekspresi VEGF tidak hanya meningkat pada bagian infark dan periinfark tapi juga pada bagian kortikal. Pasca iskemik serebral, VEGF terekspresi pada otak seperti pada bagian sel epitel pada choroid plexus, otak kecil, hipokampus dan *dentate gyrus*. Reseptor VEGFR-1 dan VEGFR-2 terupregulasi pada 48 jam pada border dan core iskemik [49]. VEGFR-2 merupakan

mediator utama untuk downstream mekanisme sinyal VEGF-A dimana VEGF-A dapat menstimulasi aktivasi jalur sinyal PI3K/Akt, PLC/PKC, Src dan MEK/ERK pada berbagai jenis sel neuron. Aktivasi jalur sinyal tersebut memiliki fungsi yang berbeda seperti angiogenesis, permeabilitas vascular, neuroproteksi dan neurogenesis [49].



Gambar 2.9 Ilustrasi diagram spesifisitas ikatan reseptor-VEGF dan mekanisme downstream sinyal [49]

2.8 Brain Derived Growth Factor (BDNF)

2.8.1 Regulasi BDNF

Pada mamalia dewasa yang mengalami cedera, sirkuit neuron dapat terbentuk kembali oleh proses pertumbuhan neuron, membentuk sinaps baru untuk

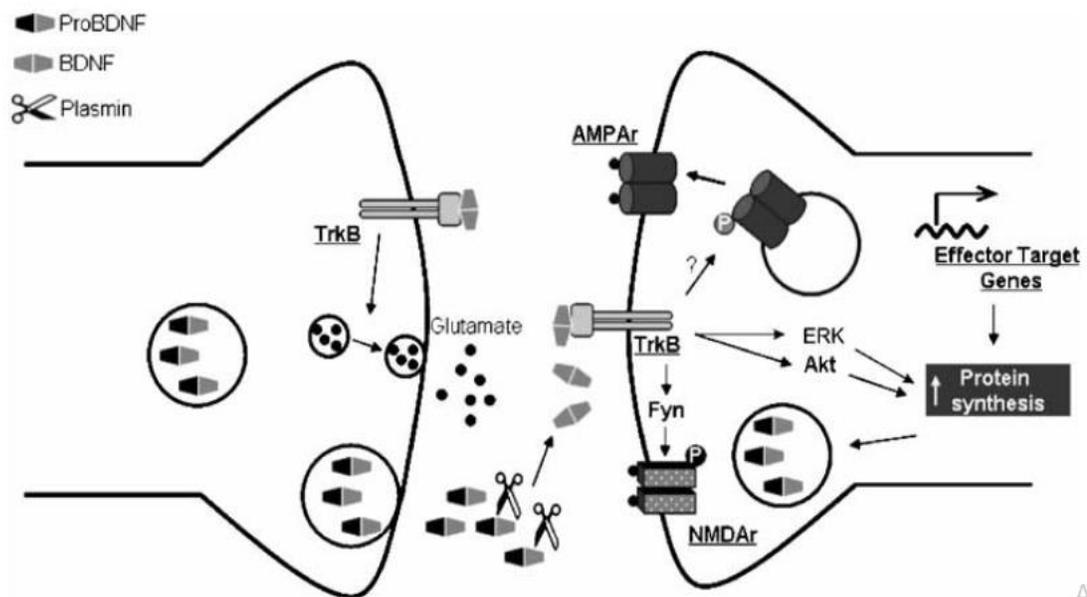
menggantikan sinaps yang hilang sebelumnya. Plastisitas dan pembentukan kembali neuron yang mati dikontrol oleh beberapa faktor pertumbuhan yang diproduksi baik oleh neuron maupun dari sel glial atau yang lebih dikenal sebagai neurotropin [50].

BDNF merupakan salah satu jenis neurotropin yang penting pada perkembangan otak. Neurotropin merupakan molekul yang berperan pada pertahanan dan diferensiasi neuron dan dikenal sebagai modulator berbagai sinaps. Neurotropin dapat meregulasi ekspresi protein dan pematangan komponen sinaptik dengan meningkatkan pelepasan transmitter presinaptik. Regulasi oleh neurotropin berkaitan dengan aktivasi reseptor Trk, PI-3 kinase, MAPK kinase dan peningkatan Ca^{2+} sitoplasma. Adanya downregulasi akibat sinyal yang disampaikan oleh sitoplasma akan menginisiasi peningkatan fosforilasi vesikel sinaptik yang berdisosiasi dengan protein menyebabkan *loading* transmitter, mobilisasi vesikel, atau sekresi pada sinaps eksitatori [18].

BDNF sebagai faktor neurotropik berperan pada proses proliferasi, neurogenesis, diferensiasi dan degenerasi neuron. BDNF yang teraktifkan akan dilepaskan dari vesikel presinaptik. BDNF akan teraktifkan ketika molekul ini berikatan dengan reseptor TrkB atau suatu protein tirosin kinase. BDNF akan teraktivasi oleh aktifnya TrkB dimana TrkB akan meningkatkan potensial fungsi glutamat dengan meningkatkan pelepasan glutamat atau dengan meningkatkan probabilitas pembukaan reseptor NMDA. Pada umumnya, BDNF akan ditranskripsi secara signifikan oleh aktivasi Ca^{2+} [51].

2.8.2 Transportasi dan Pelepasan BDNF

Neurotropin termasuk BDNF disintesis sebagai prekursor neurotropin yang mengalami modifikasi posttranslasi sebelum dibentuk menjadi protein homodimerik yang matang. ProBDNF terdapat pada sistem saraf pusat seperti hipokampus, serebral korteks, otak kecil, substantia nigra, amigdala dan sumsum tulang belakang. Ekspresi gen BDNF secara ketat diatur oleh aktivitas neuron melalui mekanisme Ca^{2+} *dependent*. Proneurotropin yang dibentuk di dalam retikulum endoplasma ditransfer ke badan Golgi dan akan terakumulasi di dalam trans-Golgi. ProBDNF terikat pada sortilin di Golgi yang membantu pembentukan lipatan yang benar. Pada konformasi yang sesuai, domain matang dari BDNF terikat pada karboksipeptidase E sehingga dipilih neurotropin sesuai dengan jalur sekresi yang telah diatur. BDNF yang diproduksi di dalam sel tubuh dipindahkan ke postsinaptik dendrit dalam granula sekretori. Selanjutnya, neurotropin yang terdapat dalam vesikel akan dikirim ke terminal akson presinaptik melalui transportasi anterograde. Pelepasan BDNF dari terminal sinaptik pada neuron granula serebral dimediasi oleh protein Ca^{2+} -*dependent activator* untuk sekresi, tipe 2 yang merupakan sebuah protein yang berinteraksi dengan sekretori granula yang mengandung neurotropin. Kelompok vesikel BDNF baik yang terdapat pada pre atau postsinaptik ditemukan berada dekat dengan sinapsis aktif dimana isinya akan dilepaskan sebagai respon terhadap stimulasi sinaptik [52].



Gambar 2.10 Mekanisme BDNF memodulasi sinaps glutamatergic melalui pre dan postsinaptik target [52].

ProBDNF dengan berat molekul 32 kDa merupakan bentuk utama neurotropin yang disekresi oleh kultur neuron yang diindikasikan merupakan bentuk matang dari pemutusan ekstraseluler proBDNF oleh protease ekstraseluler. Protease ekstraseluler pada pemutusan neurotropin termasuk BDNF adalah plasmin. Plasmin merupakan jenis serin protease yang terekspresi sebagai zymogen yang tidak aktif, plasminogen yang teraktivasi oleh *tissue plasminogen activator*. BDNF juga ditemukan pada neuron yang kurang memiliki transkrip mRNA BDNF yang tidak mampu mensintesis neurotropin. Hal ini mengindikasikan bahwa BDNF ekstraseluler dapat diambil oleh neuron pre atau postsinaptik [52].

Reseptor TrkB diaktivasi oleh BDNF, Neurotropin berikatan dengan TrkB sebagai dimer yang selanjutnya membentuk dimerisasi reseptor dan transfosforilasi pada residu spesifik tirosin yang terletak pada domain intraseluler. Fosforilasi residu

dua tirosin terletak diluar domain aktivasi kinase reseptor TrkB yang memediasi interaksi dengan Shc (protein *Src homology 2-containing*) dan fosfolipase C γ . Pengikatan Shc pada sisi aktif reseptor TrkB diikuti oleh fosforilasi protein adaptor yang mengakibatkan aktivasi jalur sinyal Ras/ERK melalui penerimaan Grb2 dan SOS [52].

Ikatan Shc dengan reseptor Trk dapat mengaktivasi jalur PI3K atau melalui interaksi langsung Ras dengan PI3K. Aktivasi dapat juga terbentuk melalui pengikatan protein adaptor Gab1. Aktivasi PI3K mengubah komposisi inositol fosfolipid pada inner plasma membran mengakibatkan translokasi PKB atau yang dikenal sebagai Akt pada membran plasma dimana aktivasi tersebut melalui fosforilasi oleh *upstream* kinase. Akt dapat juga mengubah aktivitas transkripsi tetapi juga dapat merangsang perubahan lokal yang cepat pada proteome dengan meregulasi translasi. Jalur sinyal ini memainkan peran penting pada proses pertahanan sel [52].