

**EFEK TERAPI ASAM FOLINAT TERHADAP KADAR
SERUM HOMOSISTEIN (HCY), TUMOR NECROSIS
FACTOR-A(TNF-A), INTERLEUKIN-10 (IL-10), DAN
EXPRESI GEN HIGH MOBILITY GROUP BOX-1 (HMGB1)
PADA MODEL CEDERA KEPALA**

***EFFECT OF FOLINIC ACID ON SERUM HOMOCYSTEINE
(HCY), TUMOR NECROSIS FACTOR-A (TNF-A),
INTERLEUKIN-10 (IL-10), AND HIGH MOBILITY GROUP
BOX-1 (HMGB1) GENE EXPRESSION IN HEAD INJURY
MODEL***

THOMAS TOMMY

C013182015



PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2021

EFEK TERAPI ASAM FOLINAT TERHADAP KADAR
SERUM HOMOSISTEIN (HCY), TUMOR NECROSIS
FACTOR-A (TNF-A), INTERLEUKIN-10 (IL-10), DAN
EXPRESI GEN HIGH MOBILITY GROUP BOX-1 (HMGB1)
PADA MODEL CEDERA KEPALA

*EFFECT OF FOLINIC ACID ON SERUM HOMOCYSTEINE
(HCY), TUMOR NECROSIS FACTOR-A (TNF-A),
INTERLEUKIN-10 (IL-10), AND HIGH MOBILITY GROUP
BOX-1 (HMGB1) GENE EXPRESSION IN HEAD INJURY
MODEL*

THOMAS TOMMY

C013182015

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2021

DISERTASI

**EFEK TERAPI ASAM FOLINAT TERHADAP KADAR SERUM HOMOSISTEIN (HCY),
TUMOR NECROSIS FACTOR-A (TNF-A), INTERLEUKIN-10 (IL-10), DAN
EXPRESI GEN HIGH MOBILITY GROUP BOX-1 (HMGB1)
PADA MODEL CEDERA KEPALA**

Disusun dan diajukan oleh

**THOMAS TOMMY
C013182015**

*Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal, 24 Juni 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

Menyetujui
Promotor,

Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS-FICS
Nip. 19551019198203 1 001

Co. Promotor

Co. Promotor

Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
Nip. 19570416198503 1 001

dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K)
Nip. 19700821199903 1 001

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,

dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K)
Nip. 19700821 199903 1 001

Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed
Nip. 19661213 199503 1 009





KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET
DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Thomas Tommy
NIM : C013182015
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

EFEK TERAPI ASAM FOLINAT TERHADAP KADAR SERUM HOMOSISTEIN (HCY), TUMOR NECROSIS FACTOR-A (TNF-A), INTERLEUKIN-10 (IL-10), DAN EXPRESI GEN HIGH MOBILITY GROUP BOX-1 (HMGB1) PADA MODEL CEDERA KEPALA

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 24 Juni 2021

Yang menyatakan,



Thomas Tommy

TIM PEMBIMBING DAN PENGUJI

Promotor : Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS(K)

Ko-Promotor : Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
: dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K)

Penilai : Dr. dr. Setyo Widi Nugroho, Sp.BS(K)
: Prof. Dr. dr. Eka Julianta Wahjoepramono, Sp.BS(K)
: Dr. dr. Nasrullah, Sp.BS(K)
: dr. Aminuddin, M.Nut & Diet, Ph.D
: Dr. dr. Willy Adimarta, Sp.BS
: Dr. dr. Andi Alfian Zainuddin, MKM

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Pengasih, karena berkat anugerah dan kasih karuniaNya penulis dapat menyelesaikan karya akhir disertasi ini.

Perkenankan pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Rektor Universitas Hasanuddin. Prof.Dr.Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA. Dekan FK UNHAS: Prof.dr.Budu,Ph.D,SpM (K),M.MedEd. D. Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, dr. Agussalim Bukhari, M.Med, PhD, SpGK(K). yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Doctor Ilmu Kedokteran di Universitas Hasanuddin, Makassar.

Terima kasih kami yang sebesar-besarnya juga kami haturkan kepada Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS-FICS sebagai promotor, yang selalu membimbing penulis dengan penuh kesabaran sejak awal hingga selesai pendidikan.

Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K) sebagai ko-promotor memberikan bimbingan serta masukan dalam menyelesaikan pendidik ini.

dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, SP.GK(K), sebagai ko-promotor dalam kesibukan yang padat membimbing dan mendorong penulis dalam menyelesaikan pendidik ini.

Dr. Dr. Setyo Widi Nugroho, Sp.BS(K) sebagai penguji eksternal yang selalu memberikan masukan dalam penulisan disertasi ini.

Dr. dr. Andi Alfian Zainuddin, MKM sebagai penguji dengan sabar dan penuh kesungguhan memberikan nasihat dan masukan yang sangat berarti dalam penelitian.

Prof. Dr. Dr. Eka Julianta Wahjoepramono, Sp.BS(K) yang selalu memberikan kesempatan penulis memberikan masukan yang sangat bermanfaat dalam penulisan disertasi.

Dr. dr. Nasrullah, Sp.BS(K) sebagai penguji dan sejawat dalam keilmuan yang banyak memberikan masukan dan saran dalam melakukan penulisan disertasi.

Dr. Aminuddin, M.Nut & Diet, Ph.D sebagai penguji yang memberikan pandangan dan masukan yang bermanfaat dalam menyelesaikan penulisan disertasi.

Dr. dr. Willy Adimarta, Sp.BS(K) sebagai penguji memberikan masukan yang

berguna dalam penulisan disertasi.

Staf Program Studi Doktor (S3) Ilmu Kedokteran yakni Pak.Akmal, S Sos, MA. Pak Abdul Muin La Tanribali, Pak Rahmad serta, yang sejak awal pendidikan membantu dalam menyelesaikan administrasi dalam Pendidikan doktor.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada istri, anak-anak dan keluarga yang mendampingi saya menyelesaikan disertasi ini.

Penulis menyadari terdapat keterbatasan dan kekurangan dalam melakukan penelitian serta penyusunan disertasi ini, oleh karena itu dengan kerendahan hati penulis menyampaikan maaf yang sebesar-besarnya. Kiranya hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi kepentingan pelayanan klinis dan ilmu pengetahuan. Semoga Tuhan Yang Maha Esa berkenan memberikan berkat dan rahmatNya bagi semua pihak yang telah membantu hingga selesainya penulisan disertasi ini.

Makassar, 24 Juni 2021

Thomas Tommy

ABSTRAK

THOMAS TOMY. *Efek Asam Folinat terhadap Serum Homosistein, TNF α , IL-10, dan Ekspresi Gen HMGB-1 pada Model Cedera Kepala* (dibimbing oleh Andi Asadul Islam, Mochammad Hatta, dan Agussalim Bukhari).

Tujuan penelitian ini adalah meneliti ada tidaknya efek asam folinat yang dapat memperbaiki cedera pada model cedera kepala.

Penelitian ini dilakukan dengan model cedera kepala tikus menggunakan metode *marmarou weight drop* yang telah dimodifikasi. Lima belas tikus telah dilakukan randomisasi dan dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yakni Kelompok A: asam folinat (+), cedera kepala (-); Kelompok B: asam folinat (-), cedera kepala (+); dan Kelompok C: asam folinat (+), cedera kepala (+). Asam folinat diberikan secara intraperitoneal dengan dosis sebesar 60 mg/m². Sampel darah diambil segera setelah cedera kepala (H0), 12 jam (H12); dan 24 jam (H24) setelah cedera kepala dari vena lateral ekor. Kadar homosistein, TNF α , dan IL-10 serum diukur dengan metode ELISA, dan ekspresi gen HMGB-1 diukur dengan menggunakan metode *real time RT-PCR*

Hasil penelitian menemukan kadar homosistein, TNF α , IL-10 serum, dan ekspresi gen HMGB-1 secara bermakna mengalami peningkatan pada semua waktu pengambilan sampel setelah cedera kepala. Terdapat kadar homosistein, TNF α , IL-10 serum, dan ekspresi gen HMGB-1 yang lebih rendah secara signifikan pada jam 24 Kelompok C dibandingkan dengan Kelompok B. Asam folinat mungkin memiliki efek antiinflamasi pada keadaan cedera kepala dengan mengurangi kadar homosistein, TNF α , IL-10 serum, dan ekspresi gen HMGB-1.

Kata kunci: HMGB-1, homosistein, IL-10 serum, neuroinflamasi, neuroprotection, TNF α



ABSTRACT

THOMAS TOMMY. *Effect of Folinic Acid on Serum Homocysteine, TNF α , IL-10, and HMGB1 Gene Expression in Head Injury Model* (supervised by **Andy Asadul Islam, Mochammad Hatta, and Agussalim Bukhari**)

The aim of this study is to investigate whether folinic acid improves the effect on head injury model. Head injury or traumatic brain injury is the leading cause of morbidity. Many modalities of neuroprotection have been developed in brain injury but there is no much information regarding the effect of folinic acid on neuroinflammation associated with homocysteine, TNF α , IL-10, and HMGB1.

This study was conducted in the rats' head injury model using modified Marmarou weight drop model. Fifteen rats were randomized and divided into three groups, namely, group A: folinic acid (+), head injury (-), group B: folinic acid (-), head injury (+), and group C: folinic acid (+), head injury (+). Folinic acid was administered intraperitoneally with a dose of 60 mg/m². Blood samples were taken immediately after head injury (H0), 12 hours (H12), and 24 hours (H24) after head injury from the lateral vein of tail. Serum level of homocysteine, TNF α , and IL-10 were measured using ELISA, and HMGB1 gene expression was measured with Real-Time RT-PCR.

The results of this study indicate that serum level of homocysteine, TNF α , IL-10, and HMGB1 gene expression significantly increase at all time points after head injury. The levels of serum homocysteine, TNF α , IL-10, and HMGB1 gene expression are significantly lower after 24 hours with folinic acid in group C compared to those in group B. Thus, folinic acid may have anti-inflammatory properties in traumatic brain injury by inhibition of serum level of homocysteine, TNF α , IL-10, and HMGB1 gene expression.

Keywords: HMGB1, homocysteine, IL-10, Neuroinflammation, Neuroprotection, TNF α



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	
HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	
DAFTAR TIM PEMBIMBING DAN PENGUJI	
KATA PENGANTAR	
ABTRAK	
ABSTRACT	
DAFTAR ISI	
DAFTAR SINGKATAN	
DAFTAR GAMBAR DAN TABEL	

BAB I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang.....	1
2. Rumusan masalah.....	2
3. Tujuan penelitian.....	3
4. Manfaat penelitian.....	3

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

1. Cedera kepala.....	4
1.1. Epidemiologi.....	4
1.2. Patofisiologi cedera kepala.....	5
1.3. Inflamasi pada cedera kepala.....	6
2. High Mobility Group Box 1 (HMGB1).....	8
3. Folat.....	13
3.1. Metabolisme Folat.....	16
3.2. Dosis Folat.....	16
3.3. Interaksi Obat.....	16

4.	Asam Folinat atau Leucovorin.....	17
5.	Homocysteine	18
6.	Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)	20
7.	Interleukin 10 (IL-10).....	22
8.	Model cedera kepala pada hewan	23

BAB III. KERANGKA TEORI DAN KONSEP

1.	Kerangka teori.....	26
2.	Kerangka konsep	27
3.	Hipotesis	27
4.	Definisi operasional.....	28

BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN

1.	Desain Penelitian	29
2.	Tempat dan Waktu Penelitian	29
3.	Kriteria Inklusi	29
4.	Kriteria Eksklusi	29
5.	Kriteria Drop-out.....	29
6.	Jumlah Sampel	30
7.	Cara kerja	30
7. 1.	Aklimatisasi.....	30
7. 2.	Penentuan kelompok perlakuan.....	31
7. 3.	Pemberian perlakuan	31
7. 3. 1.	Persiapan alat dan bahan penelitian	31
7. 3. 2.	Perlakuan pemberian asam folinat dan trauma kepala.....	32
7. 4.	Terminasi hewan coba	32
7. 5.	Analisis ekspresi HMBG1 dengan mengukur mRNA	33
7. 5. 1.	Isolasi DNA dengan metode BOOM.....	33

7. 5. 2.	Realtime PCR untuk menentukan profil ekspresi mRNA HMGB1.	34
7. 5. 3.	Perhitungan kurva kalibrasi dengan CT (Cycle Threshold)	35
7. 6.	Mengukur kadar homocysteine, TNF α , dan IL-10	36
8.	Analisis Data	36
9.	Alur penelitian	37

BAB V. HASIL PENELITIAN

1.	Deskripsi Umum	38
2.	Ekspresi mRNA HMGB1	40
3.	Kadar serum homosistein	41
4.	Kadar serum TNF- α	42
5.	Kadar serum IL-10	43
6.	Analisis kelompok A	44
7.	Analisis kelompok B	44
8.	Analisis kelompok C	45

BAB VI. PEMBAHASAN

Pembahasan	49
------------	----

BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN

1.	Kesimpulan	54
2.	Saran	54

DAFTAR PUSTAKA	55
-----------------------	----

LAMPIRAN	59
-----------------	----

DAFTAR SINGKATAN

Hcy	: Homocysteine
mRNA	: messenger Ribose Nucleic Acid
HMGB1	: High Mobility Group Box 1
TNF α	: Tumor Necrosis Factor α
IL	: Interleukin
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
WHO	: World Health Organization
ATP	: Adenosine Triphosphate
NMDA	: N-Methyl-d-Aspartate
DNA	: Deoxyribose Nucleic Acid
ICAM	: Intercellular Adhesion Molecule
VCAM	: Vascular Cell Adhesion Molecule
NO	: Nitrogen monoksida (Nitric Oxide)
CXCL	: Chemokine (C-X-C motif) Ligand
CXCR	: Chemokine (C-X-C motif) Receptor
RAGE	: Receptor for Advance Glycation Endproducts
TLR	: Toll Like Receptor
DAMP	: Damage Associated Molecular Pattern
CD	: Cluster Differentiation
Ang	: Angiopoietin
VwF	: Von Willebrand Factor
AQP	: Aquaporin
PABA	: Para-aminobenzoid Acid
THF	: Tetrahidrofolat
DHF	: Dihidrofolat
GMP	: Guanine Mono Phosphate
AMP	: Adenine Mono Phosphate
dTMP	: deoxythymidine Phosphate
dUMP	: deoxyuridine Phosphate

MTHFR	: Metylenetetrahydrofolate reductase
RF	: Reduced Folate Carrier
C	: Neural Tube Defects
NT	
D	
5-FU	: 5 – Fluoro Uracil
PO	: Per Oral
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
FPI	: Fluid Percussion Injury
CCI	: Cortical Impact Injury
ROS	: Reactive Oxygen Species
RT-PCR	: Real Time Polimerase Chain Reaction
GAPDH	: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
TBSA	: Total Body Surface Area
EDTA	: Etylen Diamine Tetra Acetat
CT	: Cycle Threshold

DAFTAR GAMBAR DAN TABEL

- Gambar 1. : Insiden cedera kepala (kasus per 100.000 penduduk) berdasarkan pembagian daerah WHO (kiri). Grafik batang (kanan atas) mengidikasikan perkiraan cedera kepala tahunan. Peta (kanan bawah) adalah insiden cedera kepala sekunder (kasus per 100.000 penduduk) akibat kecelakaan lalu lintas.
- Gambar 2. : Bentuk 3D dari HMGB1.
- Gambar 3. : Struktur HMGB1 dengan residu Cysteine 23, 45, dan 106. Gambar 4. : Protein HMGB1 dan reseptornya.
- Gambar 5. : Skema mekanisme ekspresi gen HMGB1. Gambar 6. A.: Struktur kimia asam folat.
- Gambar 6. B. : Proses reaksi kimia asam folat menjadi bentuk aktif, Tetrahidrofolat (THF).
- Gambar 7. : Peran folat dalam sintesis dTMP.
- Gambar 8. : Hubungan antara metabolisme folat (B9) dan cobalamin (B12) dalam metabolisme homosisteine.
- Gambar 9. : Contoh sediaan Leucovorin atau asam folinat.
- Gambar 10. : Jaras metabolisme methionine menjadi homosistein.
- Gambar 11. : Ilustrasi ikatan TNF α dengan reseptornya serta jaras signal.
a. TNF α berikatan dengan TNFR1. b. TNF α berikatan dengan TNFR2.
- Gambar 12. : Model jatuh beban Marmarou.
- Tabel 1. : Struktur protein HMGB1
- Tabel 2. : Referensi beban yang digunakan pada model trauma kepala. Tabel 3. : Data hasil penelitian.
- Tabel 4. : Rangkuman uji ANOVA kelompok B.
- Tabel 5. : Rangkuman uji ANOVA kelompok C.
- Tabel 6. : Rangkuman analisis perubahan nilai antar kelompok.

- Grafik 1. : Grafik boxplot data ekspresi gen HMGB-1 (dalam satuan *fold change*).
- Grafik 2. : Grafik boxplot kadar serum homosistein (nmol/ml). Grafik 3. : Grafik boxplot kadar serum TNF α (pg/ml).
- Grafik 4. : Grafik boxplot kadar serum IL-10 (pg/ml).
- Grafik 5 : Grafik boxplot setiap variabel berdasarkan waktu.

BAB I

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Cedera kepala atau cedera otak traumatik adalah penyebab utama kematian dan kecacatan. Di dunia, telah diperkirakan sekitar enam puluh sembilan juta jiwa mengalami cedera kepala setiap tahunnya, dimana 81% dari mereka akan mengalami cedera kepala ringan, dan 11 persen cedera kepala sedang. Informasi atau data epidemiologi mengenai perkiraan kejadian cedera kepala dari negara dengan pendapatan rendah dan sedang sulit didapat, sehingga masih diperlukan usaha untuk mengidentifikasi insiden dan kejadian kecacatan atau kematian akibat cedera kepala pada negara-negara berkembang (Dewan et al., 2018). Di Indonesia, hasil riset kesehatan dasar tahun 2013, penyebab cedera (umum) tertinggi adalah karena jatuh dan kecelakaan sepeda motor. Kejadian cedera di jalan raya juga merupakan tempat yang banyak terjadi pada kelompok umur produktif dengan frekuensi tertinggi pada usia 15-24 tahun. Cedera kepala dengan gegar otak menjadi penyebab utama perawatan rumah sakit lebih dari 7 hari (Riyadina et al., 2013). Karena kejadian terbanyak cedera kepala adalah pada umur produktif, maka hal ini dapat menjadi beban terhadap keluarga yang merawat maupun terhadap negara. Saat ini telah banyak diperhatikan mengenai proses inflamasi yang terjadi pasca cedera kepala (neuroinflamasi), dimana keseimbangan antara neuroinflamasi dan efek neuroproteksi akan memengaruhi hasil akhir dari suatu usaha pelayanan kesehatan.

Asam folinat adalah turunan asam folat, dapat juga disebut sebagai analog asam folat, dimana metabolismenya akan memengaruhi kadar homocysteine, dan telah terdapat bukti bahwa kadar homocysteine berperan dalam mekanisme inflamasi. Saat ini, peran asam folinat dalam inflamasi dan hubungannya dengan gen HMGB1 sebagai biomarker inflamasi belum diketahui, khususnya pada kasus cedera kepala.

2. Rumusan masalah

Berdasarkan uraian dari latar belakang yang telah dipaparkan, yaitu belum diketahuinya efek pemberian asam folinat pada proses inflamasi yang terjadi pada cedera kepala, maka masalah penelitian dirumuskan dalam pertanyaan penelitian sebagai berikut:

Apakah terdapat perbedaan ekspresi gen HMGB1 pada model cedera kepala hewan coba?

Apakah terdapat hubungan antara pemberian asam folinat terhadap ekspresi gen HMGB1?

Apakah terdapat hubungan antara pemberian asam folinat terhadap kadar serum homocysteine?

Apakah terdapat hubungan antara pemberian asam folinat terhadap kadar serum TNF α ?

Apakah terdapat hubungan antara pemberian asam folinat terhadap kadar serum IL- 10?

3. Tujuan penelitian

Tujuan Umum

Untuk mengetahui perubahan konsentrasi agen inflamasi pada pemberian asam folinat.

Tujuan Khusus

1. Membuktikan terjadi peningkatan regulasi mRNA HMGB1 pada kasus cedera kepala.
2. Membuktikan terapi asam folinat dapat menurunkan regulasi mRNA HMGB1.
3. Membuktikan terdapat perbedaan konsentrasi mRNA HMGB1 antara 12 jam pasca cedera dengan 24 jam pasca cedera.
4. Membuktikan terapi asam folinat dapat memengaruhi konsentrasi homocysteine.
5. Membuktikan terapi asam folinat dapat memengaruhi marker inflamasi TNF α dan IL-10.

4. Manfaat penelitian

Teoritis

Mampu menjadi dasar acuan teoritis terapi asam folinat pada penatalaksanaan cedera kepala.

Praktis

1. Hasil penelitian dapat memberikan informasi tambahan mengenai peran asam folinat pada penatalaksanaan cedera kepala.
2. Hasil penelitian dapat menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya yang memungkinkan aplikasi pada manusia.
3. Hasil penelitian dapat digunakan sebagai informasi dan pembelajaran bagi institusi untuk pengembangan keilmuan dimasa yang akan datang.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

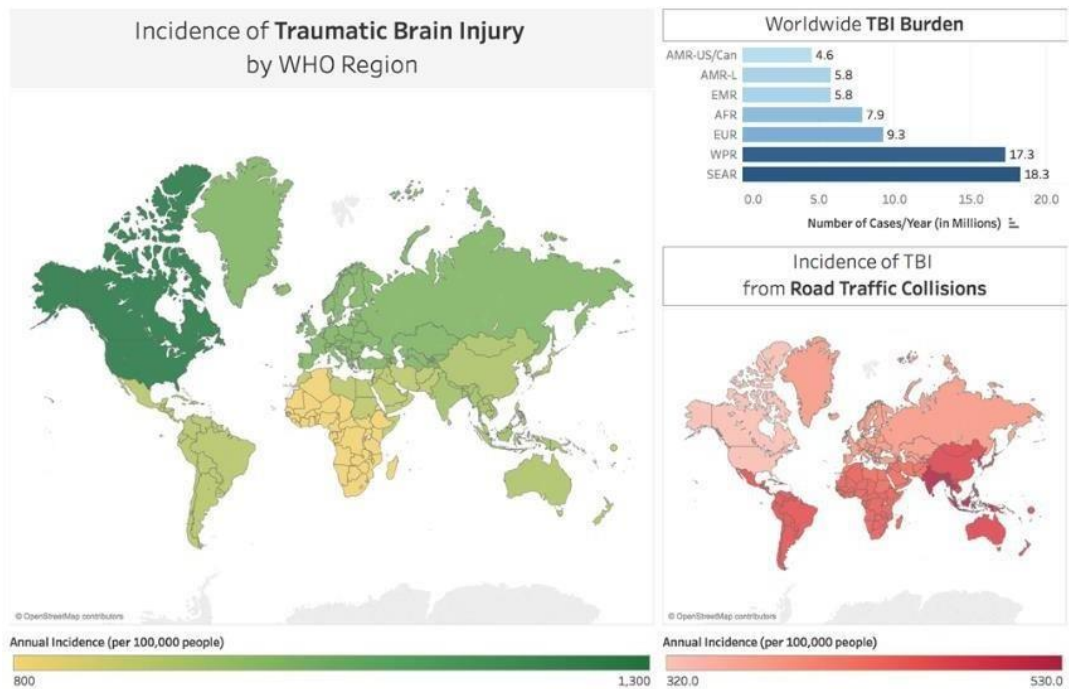
1. Cedera kepala

1.1. Epidemiologi

Cedera kepala atau cedera otak adalah penyebab utama kematian dan kecacatan. Di dunia, telah diperkirakan sekitar enam puluh juta jiwa mengalami cedera kepala setiap tahunnya, dimana 81% dari mereka akan mengalami cedera kepala ringan, dan 11 persen cedera kepala sedang. Kejadian cedera kepala per kapita tertinggi teramati di Amerika Serikat / Canada dan Eropa sebesar 1299 dan 1012 kasus per 100.000 penduduk (Dewan et al., 2018).

Menurut CDC diperkirakan sekitar 1,7 juta kejadian cedera kepala setiap tahunnya di Amerika Serikat (Faul et al., 2010). Kejadian cedera kepala tertinggi berdasarkan regional adalah di daerah Asia Tenggara (18,3 juta) dan daerah Pasifik Barat (17,3 juta) (Dewan et al., 2018). Secara umum, kejadian cedera kepala semakin meningkat, terutama di negara-negara berkembang (Maas et al., 2008). Informasi atau data epidemiologi mengenai perkiraan kejadian cedera kepala dari negara dengan pendapatan rendah dan sedang sulit didapat, sehingga masih diperlukan usaha untuk mengidentifikasi insiden dan kejadian kecacatan atau kematian akibat cedera kepala pada negara-negara berkembang (Dewan et al., 2018). Di Indonesia, hasil riset kesehatan dasar tahun 2013, penyebab cedera (umum) tertinggi adalah karena jatuh dan kecelakaan sepeda motor. Berdasarkan lokasi cedera, berurutan diawali dari lokasi tersering, adalah di jalan raya, rumah, area pertanian, sekolah, tempat umum, dan industri. Kejadian cedera di jalan raya juga merupakan tempat yang banyak terjadi pada kelompok umur produktif dengan frekuensi tertinggi pada usia 15-24 tahun. Cedera kepala dengan gegar otak menjadi penyebab utama perawatan rumah sakit lebih dari 7 hari (Riyadina et al., 2013). Karena kejadian terbanyak cedera kepala

adalah pada umur produktif, maka hal ini dapat menjadi beban terhadap keluarga yang merawat maupun terhadap negara.



Gambar 1. Insiden cedera kepala (kasus per 100.000 penduduk) berdasarkan pembagian daerah WHO (kiri). Grafik batang (kanan atas) mengidikasikan perkiraan cedera kepala tahunan. Peta (kanan bawah) adalah insiden cedera kepala sekunder (kasus per 100.000 penduduk) akibat kecelakaan lalu lintas. Gambar ini menunjukkan bahwa kejadian kecelakaan lalu lintas lebih banyak terjadi pada negara-negara berpendapatan rendah dan padat penduduk. Gambar diambil dari Dewan et al., 2018.

1. 2. Patofisiologi cedera kepala

Cedera kepala adalah sebuah gangguan progresif dan berdasarkan mekanismenya dibedakan menjadi kerusakan fokal dan kerusakan difus. Kerusakan fokal adalah kerusakan yang diakibatkan karena cedera kontak yang menyebabkan kontusio, laseratio, dan perdarahan otak. Kerusakan otak difus adalah kerusakan yang diakibatkan oleh kekuatan akselerasi-deselerasi menyebabkan cedera aksonal difus atau edema serebri (Marshall, 2000).

Berdasarkan dari mekanisme kerusakannya, cedera kepala dibedakan menjadi cedera primer (primary insult atau kerusakan primer) dan cedera sekunder (secondary insult). Cedera primer terjadi pada saat terjadinya benturan. Cedera sekunder meliputi proses patologis lanjutan yang dimulai sejak terjadinya cedera, terjadinya perubahan

biokimia dan metabolik yang menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan dan kematian sel. Contoh dari cedera sekunder adalah iskemia serebral dan hipertensi intrakranial.

Cedera kepala menyebabkan kerusakan jaringan dan gangguan peredaran darah dan metabolisme otak. Hal ini menyebabkan gangguan oksigenisasi jaringan, terjadi metabolisme anaerobik menghasilkan akumulasi asam laktat, peningkatan permeabilitas membran, dan akhirnya terjadi edema serebri. Metabolisme dalam bentuk glikolisis anaerob akan menghasilkan energi, dalam bentuk ATP, yang lebih rendah daripada glikolisis aerob. Kekurangan ATP akan menyebabkan kegagalan fungsi pompa ion sehingga terjadi depolarisasi membran sel, menyebabkan dilepaskannya neurotransmitter eksitatorik, aktivasi NMDA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionate, dan kanal kalsium dan natrium. Terbukanya kanal kalsium dan natrium menyebabkan aliran masuk kalsium mengaktivasi lipid peroksidase, protease, dan fosfolipase yang akan menyebabkan peningkatan asam lemak bebas dan radikal bebas di dalam sel. Aktivasi caspase, translocase, dan endonuclease menyebabkan kerusakan struktur membrane sel dan DNA secara progresif. Pada akhirnya akan terjadi nekrosis atau apoptosis sel (Werner and Engelhard, 2007).

1. 3. Inflamasi pada cedera kepala

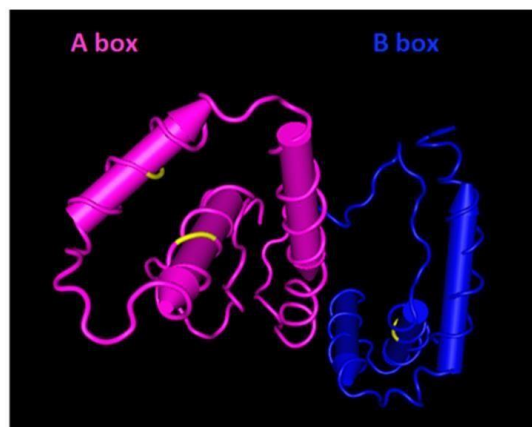
Setelah terjadi cedera kepala, seperti pada jaringan normal, akan terjadi respons inflamasi jaringan. Cedera primer dan sekunder akan mengaktivasi pelepasan mediator proinflamasi (cytokines, chemokines, prostaglandin, radikal bebas, complemen, cell adhesion molecules (ICAM1 dan VCAM1)). Mediator proinflamasi akan menarik leukosit, makrofag, limfosit, menginfiltrasi daerah cedera. Enzim-enzim proinflamasi (TNF, IL1 β , IL6) akan mengalami upregulation dalam hitungan jam. Kerusakan jaringan lebih lanjut akan menyebabkan pelepasan mediator neurotoxic secara langsung atau NO dan sitokin secara tidak langsung. Pelepasan vasokonstriktor (prostaglandin, leukotrien), kerusakan pembuluh darah mikro akibat perlekatan leukosit dan trombosit, kerusakan sawar-darah-otak, dan edema akan menyebabkan penurunan perfusi jaringan yang pada akhirnya memperberat terjadinya cedera otak sekunder (Werner and Engelhard, 2007).

Inflamasi pada cedera kepala terjadi dalam keseimbangan antara agen-agen proinflamasi dan anti-inflamasi. Interleukin 10 (IL-10) pada umumnya dikenal sebagai sitokin anti-inflamasi yang dapat memengaruhi fungsi-fungsi imunomodulasi dan sitokin ini memiliki peran penting dalam fase resolusi atau fase meredanya inflamasi. IL-10 telah dideskripsikan sebagai *cytokine synthesis inhibitory factor*, membatasi proses inflamasi dengan cara mengurangi ekspresi reseptor dan menghambat aktivasi reseptor, dan berkebalikan dengan itu, juga memiliki efek sebagai pendorong sintesis sitokin proinflamasi. IL-10 juga dapat mengurangi aktivasi dan fungsi efektor sel T, monosit, dan makrofag, sehingga dapat mengurangi hingga menghentikan proses inflamasi (Garcia et al., 2017). Pada model hewan coba dengan perlakuan trauma kepala, ekspresi mRNA IL-10 otak meningkat seketika setelah kejadian trauma dan protein IL-10 ditemukan mengalami peningkatan setelah 2 jam hingga 24 jam (Kamm et al., 2006).

Cedera kepala juga dapat memengaruhi proses metilasi DNA dan histon juga menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Kadar methionine plasma dan metabolitnya mengalami penurunan pasca cedera kepala. Berkurangnya ketersediaan methionine, S-adenosyl Methionine dan glutathione akibat cedera kepala dapat memengaruhi beberapa proses seluler, seperti: sintesis protein, regulasi epigenetik ekspresi gen, sitoproteksi, dan transport seluler asam amino (Dash et al., 2016).

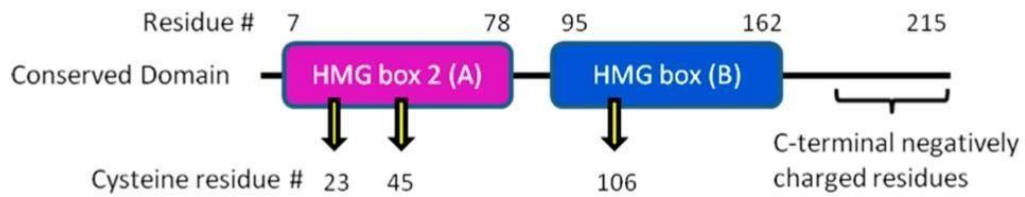
2. High Mobility Group Box 1 (HMGB1)

HMGB1 adalah sebuah protein inti sel, yang tidak berhubungan dengan keberadaan histon dan dapat berikatan langsung dengan DNA, memiliki peran penting dalam jalur hidup/mati sebuah sel setelah mengalami kerusakan atau stress. (VanPatten and Al-Abed, 2018) Pada tahun 1999, protein ini pertamakali dideskripsikan memiliki peran ekstraselular dalam proses inflamasi. (Wang et al., 1999) Protein HMGB1 memiliki dua domain yang dapat berikatan dengan DNA, dinamakan Box-A dan Box-B, dimana masing-masing memiliki tiga heliks α yang melipat membentuk struktur L atau V. Protein ini juga memiliki ujung negatif yang akan mempengaruhi bentuk 3D dan ikatan dengan DNA. (Yang et al., 2015)



Gambar 2. Bentuk 3D dari HMGB1. Gen HMGB1 terbentuk dari dua struktur box (domain), yaitu box A dan box B dimana masing-masing memiliki tiga helix α . (VanPatten and Al-Abed, 2018)

HMGB1 memiliki tiga residu Cysteine (C23, C45, C106). Perbedaan struktur dari residu Cysteine ini, dinamakan isoform redoks, akan membedakan efek HMGB1. Pada bentuk all-thiol, akan merangsang autophagy dan aktifitas kemotaktik seperti chemokine melalui CXCL12, CXCR4, dan RAGE; Dalam bentuk ikatan disulfida C23-C45, akan menyebabkan proinflamasi ekstraselular dan aktifitas induksi Cytokine melalui RAGE ekstraselular atau TLR4; Dalam bentuk teroksidasi (all-oxdydized), akan merangsang apoptosis.(VanPatten and Al-Abed, 2018)



Gambar 3. Struktur HMGB1 dengan residu Cysteine 23, 45, dan 106. Residu sistein 23 dan 45 berada pada Box A dan residu sistein 106 berada pada Box B. (VanPatten and Al-Abed, 2018)

Tabel 1. Struktur protein HMGB1 dengan bentuk thiol, disulfida, dan oxidized-sulfonated dan aktivitas biologisnya.

Redox State	Structure	Serum Half-Life	Biological Activity
1) Reduced - All Thiol	$ \begin{array}{ccccc} \text{SH} & \text{SH} & & \text{SH} & \\ & & & & \\ \text{C} & \text{---} & \text{C} & \text{-----} & \text{C} \\ 23 & & 45 & & 106 \end{array} $	17 mins ⁽¹¹⁵⁾	RAGE-Dependent Inflammatory Pathway Chemoattractant
2) Disulfide	$ \begin{array}{ccccc} \text{S} & \text{---} & \text{S} & & \text{SH} \\ & & & & \\ \text{C} & \text{---} & \text{C} & \text{-----} & \text{C} \\ 23 & & 45 & & 106 \end{array} $	642 mins ⁽¹¹⁵⁾	TLR4-Dependent Disulfide bond increases stability Activates leukocytes
3) Oxidized - Sulfonated	$ \begin{array}{ccccc} \text{HSO}_3 & \text{HSO}_3 & & \text{HSO}_3 & \\ & & & & \\ \text{C} & \text{---} & \text{C} & \text{-----} & \text{C} \\ 23 & & 45 & & 106 \end{array} $	Inactive	Present once inflammation is subsiding

Angka 23, 45, dan 106 adalah urutan carbon yang memiliki residu sistein. Pada keadaan tereduksi HMGB1 akan memiliki aktivitas melalui RAGE, pada keadaan ikatan disulfida HMGB1 akan memiliki aktivitas melalui TLR4, dan pada keadaan teroksidasi HMGB1 akan menjadi inaktif.

Weber, D.J., Allette, Y.M., Wilkes, D.S., White, F.A., 2015. The HMGB1-RAGE Inflammatory Pathway: Implications for Brain Injury-Induced Pulmonary Dysfunction. *Antioxid. Redox Signal.* 23,

1316–1328.

<https://doi.org/10.1089/ars.2015.6299>

HMGB1 memiliki berbagai peran di inti sel, sitoplasma, maupun ekstraselular. Pada inti sel, protein ini memiliki peran sebagai transcription factor, transcription enhancer, nucleosome sliding, perbaikan DNA, V(D)J recombination, homeostasis telomere. Pada sitoplasma protein ini memiliki peran autofagi dan viral sensing. Pada ekstraselular protein ini memiliki peran sebagai DAMPs. (VanPatten and Al-Abed, 2018)

Ketika sel mengalami kerusakan akibat trauma atau iskemia, HMGB1 akan disekresikan. (Au et al., 2012) HMGB 1 juga disekresikan oleh jaringan hematopoietik melalui jaras yang dimediasi lisosom. Protein ini bekerja pada beberapa sel imun, mungkin juga microglia (Kim et al., 2008), untuk mencetuskan respons inflamasi yang dinamakan *Damage Associated Molecular Pattern* (DAMP).

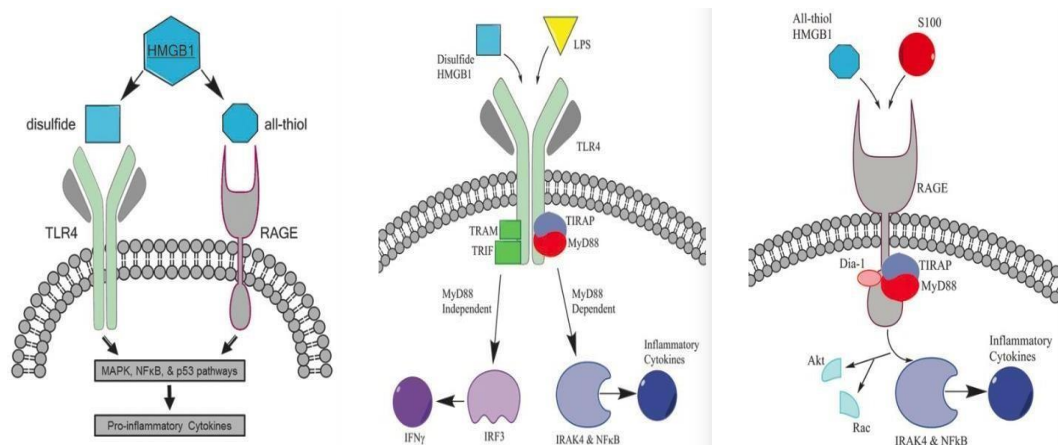
Reseptor HMGB1 yang telah diketahui adalah Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR 4, dan Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE).

HMGB1 dapat menginduksi maturasi sel dendritik melalui up-regulasi CD80, CD83, dan CD11c, menginduksi sitokin pro-inflamasi sel-sel myeloid (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8), dan Angiopoietin-2 (Ang-2), antigen von Willebrand Factor (Vwf) (Cohen et al., 2009) juga up-regulasi ekspresi Cell Adhesion Molecules (ICAM-1, VCAM-1) pada sel endotel.

HMGB1 akan ditemukan dalam konsentrasi rendah pada jaringan sekitar lesi. Penelitian oleh Zhang dkk. Menyimpulkan bahwa HMGB1 neuronal dilepaskan ke ruang ekstraselular kemudian berdifusi ke jaringan sekitar dan memasuki peredaran darah. (Zhang et al., 2011) Penelitian oleh Peltz dkk. Menyimpulkan bahwa terjadi peningkatan kadar plasma HMGB1 sebesar tiga puluh kali lipat dibandingkan dengan kontrol sehat pada 45 menit (Cohen et al., 2009)(Richard et al., 2017) hingga 1 jam setelah cedera yang kemudian akan stabil pada 2-6 jam setelah cedera (Peltz et al., 2009) dan mencapai konsentrasi puncak dalam 16 jam dibandingkan dengan *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) dan interleukin 1 beta (IL-1 β) yang dilepaskan segera (setelah paparan terhadap lipopolisakarida). (Yang et al., 2006)

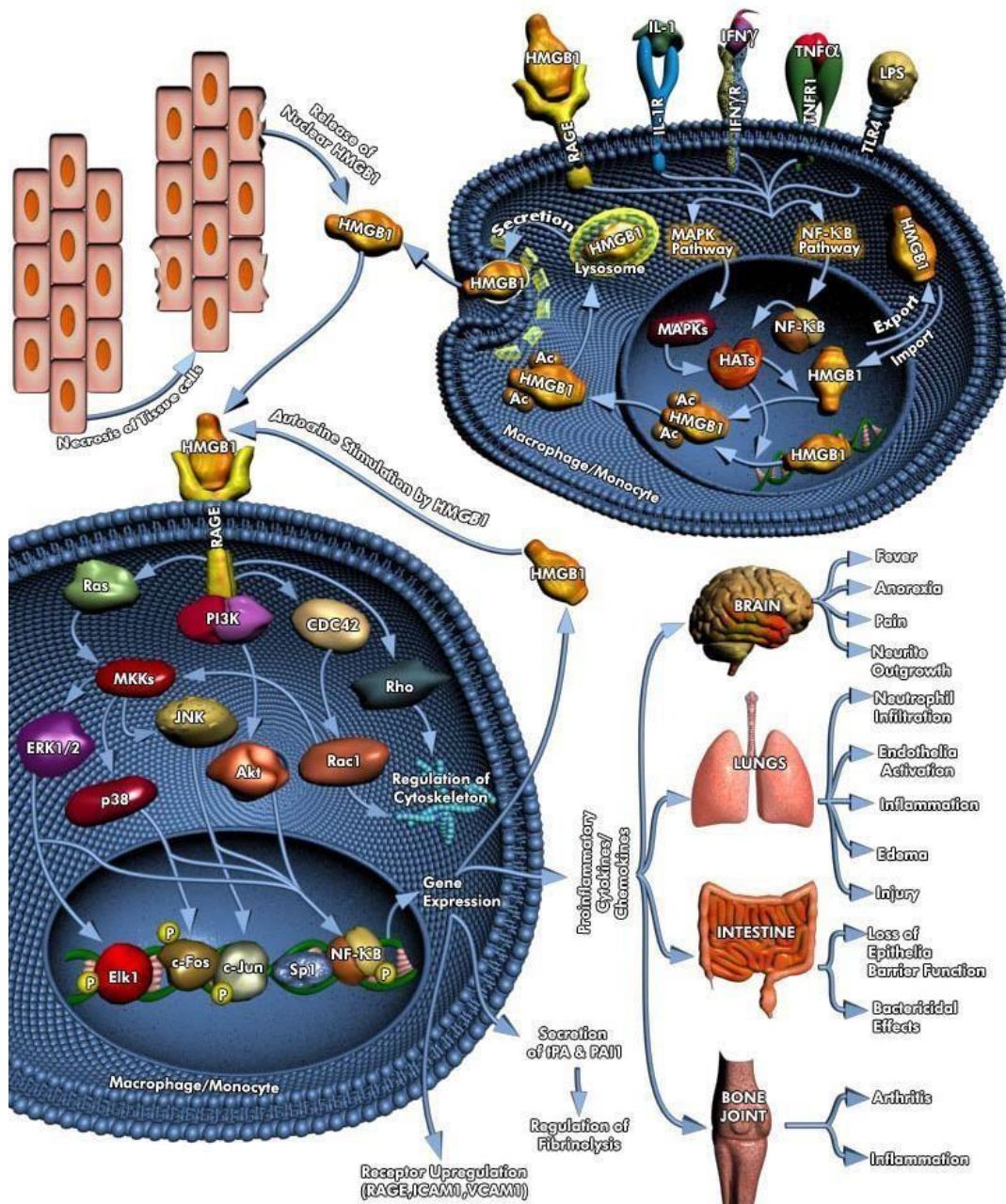
HMGB1 telah terbukti memiliki peran dalam kerusakan sawar-darah-otak dan inflamasi otak sehingga secara tidak langsung memiliki peran dalam cedera otak sekunder. (Shlosberg et al., 2010)(Okuma et al., 2012)

Interaksi HMGB1-TLR4 meregulasi Aquaporin 4 (AQP4) yang berhubungan dengan kejadian edema serebri (Laird et al., 2014) sedangkan anti-HMGB1mAb mengurangi edema otak pasca-trauma melalui pelestarian sawar-darah-otak dan supresi respons inflamasi (Richard et al., 2017).



Gambar 4. Protein HMGB1 dan reseptornya. Ketika protein HMGB1 dalam beberapa isoform redoks berikatan dengan reseptornya (TLR4 dan RAGE), akan terjadi kaskade signal transmembran yang melibatkan NFκB menyebabkan peningkatan sitokin proinflamasi.

Weber, D.J., Allette, Y.M., Wilkes, D.S., White, F.A., 2015. The HMGB1-RAGE Inflammatory Pathway: Implications for Brain Injury-Induced Pulmonary Dysfunction. *Antioxid. Redox Signal.* 23, 1316–1328. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6299>



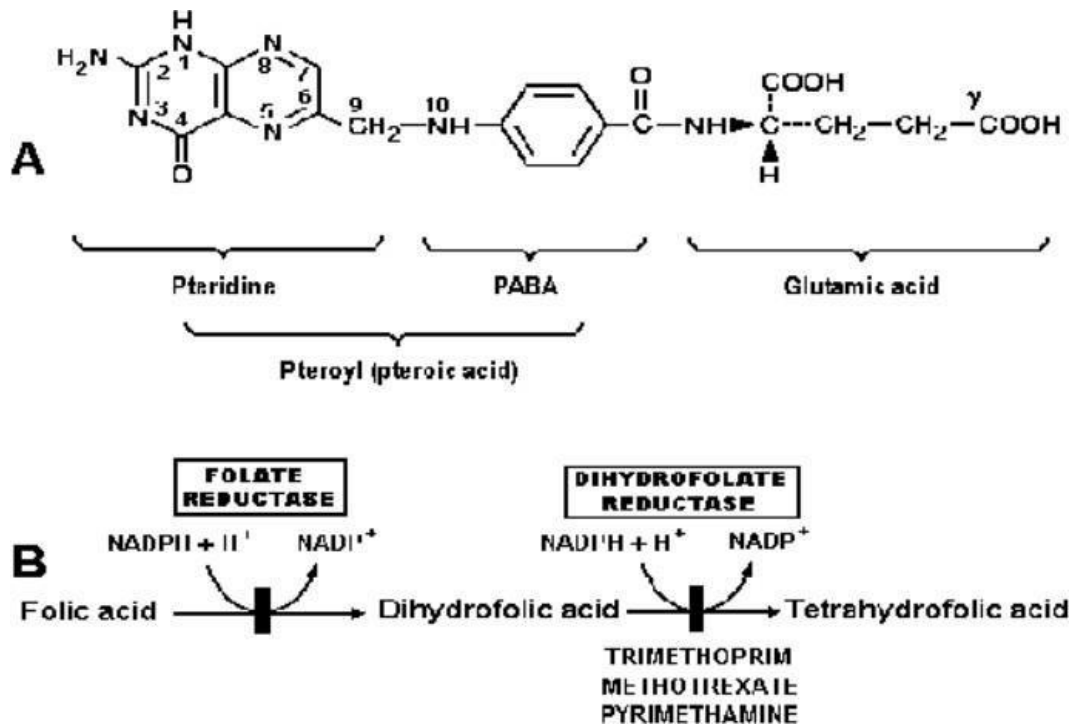
Gambar 5. Skema mekanisme ekspresi gen HMGB1. Protein HMGB1 dibentuk oleh gen HMGB1, protein ini berada di dalam inti sel. Setelah sel mengalami perangsangan atau kerusakan, protein HMGB1 akan dilepaskan ke matriks ekstraselular. Protein HMGB1 yang bebas akan berikatan dengan reseptor RAGE secara autokrin. Stimulasi reseptor RAGE akan menimbulkan kaskade signal yang menghasilkan regulasi ekspresi gen melalui regulasi NF-κB. Peningkatan NF-κB akan menyebabkan upregulasi reseptor, sekresi ezim, dan pelepasan sitokin proinflamasi.

3. Folat

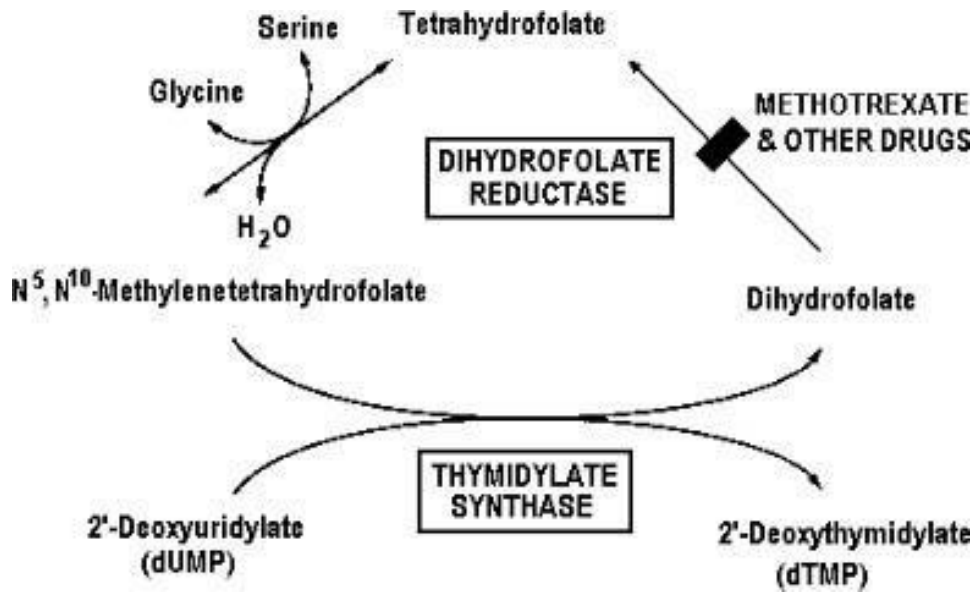
Folat adalah salah satu dari keluarga vitamin B, dikenal sebagai asam folat, folacin, dan vitamin B9. Asam folat ditemukan antara tahun 1931 dan 1943 (Mitchell et al., 1941). Obat ini masuk ke dalam World Health Organization's List of Essential Medicines, suatu daftar obat-obatan yang efektif dan aman yang diperlukan dalam suatu sistem kesehatan. Asam folat dapat digunakan per oral atau sebagai obat intravena. Sebagai suplemen, rekomendasi asupan harian adalah 400 mikrogram per hari. Sampai saat ini belum diketahui efek samping dari penggunaan asam folat.

Asam folat memiliki gugus dasar pteridine yang berikatan dengan para-aminobenzoic acid (PABA) dan glutamic acid. Nama kimia lengkap dari asam folat adalah N-[4-[2-amino-1,4-dihydro-4-oxo-6-pteridiny-methyl)amino]benzoyl]-L- glutamic acid ($C_{19}H_{19}N_7O_6$ dengan berat molekul 441,41). Dalam bentuk murni berwarna kuning hingga oranye-coklat, tidak berbau, berbentuk bubuk kristal, larut dalam air, dan tidak larut dalam pelarut organik. Dalam bentuk larutan dapat di-inaktivasi oleh cahaya ultraviolet dan oksidasi (Hazra and Tripathi, 2001). Asam folat memiliki peran melalui terbentuknya tetrahidrofolat (FH4 atau THF). Asam folat tereduksi menjadi dihidrofolat (FH2 atau DHF) dan kemudian tereduksi kembali oleh dihidrofolat reduktase di organ hati menjadi THF.

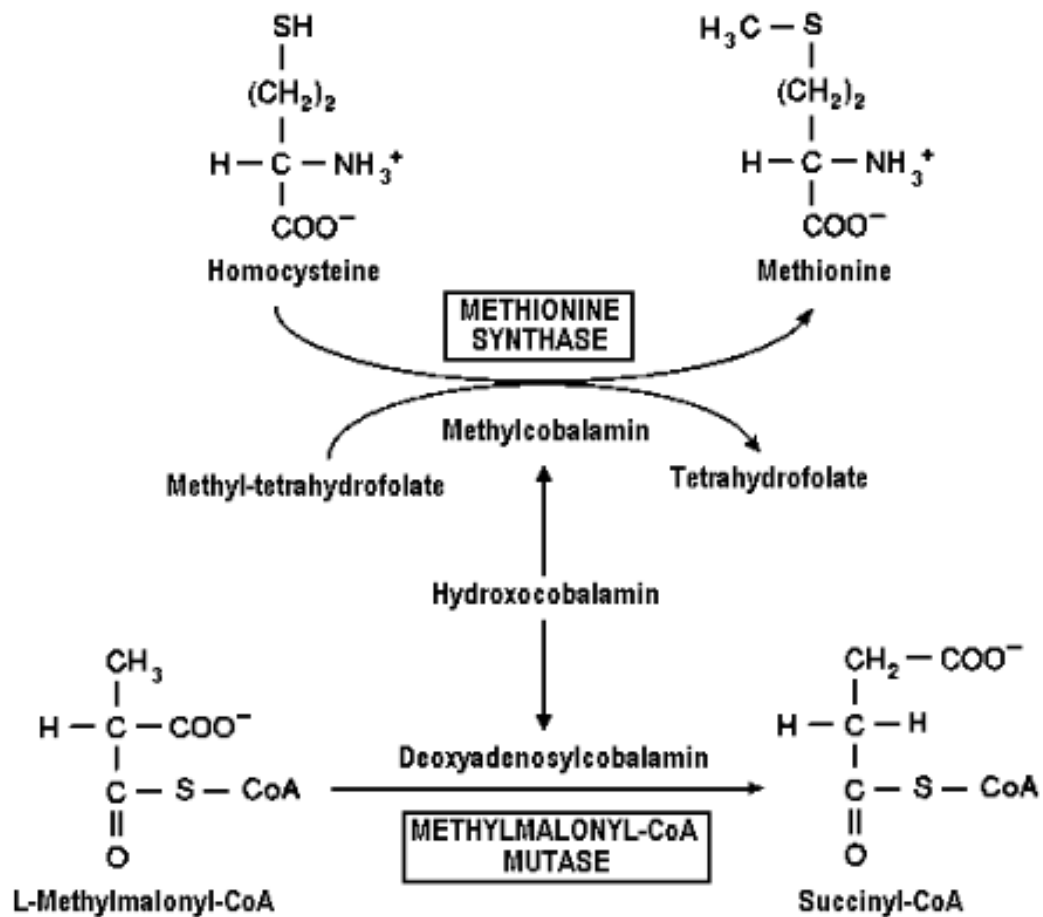
Asam folat diperlukan dalam pembentukan DNA, RNA, dan metabolisme asam amino. Turunan folat berperan dalam biosintesa purin dan pirimidin, yang membutuhkan formil format dalam biosintesis inosine monophosphate. Inosine monophosphate adalah prekursor GMP dan AMP. Methylene-tetra-hydrofolate menyumbangkan C1 dalam biosintesis dTMP (2'-deoxythymidine-5'-phosphate) dari dUMP (2'-deoxyuridine-5'-phosphate), yang dikatalis oleh thymidylate synthase. Dalam pembentukan asam amino, Methyl-THF mengubah vitamin B12 menjadi methylcobalamin. Methylcobalamin mengubah homosisteine dengan katalis homosisteine methyltransferase menjadi methionin. Asam folat juga memiliki peran dalam metabolisme glycine, methionine, dan histidine.



Gambar 6. A. Struktur kimia asam folat. B. Proses reaksi kimia asam folat menjadi bentuk aktif, Tertrahidrofolat (THF) (Hazra and Tripathi, 2001).



Gambar 7. Peran folat dalam sintesis dTMP (Hazra and Tripathi, 2001).



Gambar 8. Hubungan antara metabolisme folat (B9) dan cobalamin (B12) dalam metabolisme homosisteine.

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) memiliki peran penting dalam siklus folat dan hubungannya dengan metabolisme homosisteine. Enzim ini mereduksi N⁵,N¹⁰-methylene-H₄Folate menjadi N⁵-methyl-H₄Folate, menghasilkan bentuk folat aktif yang dibutuhkan untuk remethylasi homosisteine (Refsum and Ueland, 1990) menjadi methionine (Hazra and Tripathi, 2001). Suplementasi asam folat dapat mengurangi risiko kejadian stroke sebesar 10% akibat perannya dalam meregulasi konsentrasi homosisteine (Li et al., 2016), karena terdapat bukti bahwa kadar homosisteine berhubungan dengan thrombogenesis dan atherogenesis (Refsum and Ueland, 1990).

3. 1. Metabolisme Folat

Asam folat akan memasuki sel melalui endositosis dengan bantuan reseptor folat atau dengan bantuan protein pembawa (*carrier protein*), *reduced folate carrier* (RFC) (Hazra and Tripathi, 2001).

Asam folat dikonversi, dengan keberadaan vitamin C, di hati dan plasma menjadi THF oleh dihydrofolate reductase. Eliminasi folat sebagian besar terjadi pada ginjal dalam bentuk metabolit. Sekitar 4 sampai 5 mcg diekskresikan melalui urin setiap harinya (Hazra and Tripathi, 2001).

3. 2. Dosis Folat

Dosis yang dianjurkan adalah 200 hingga 500 mcg per hari untuk profilaksis anemia megaloblastik. Untuk wanita yang memiliki risiko tinggi terjadinya *neural tube defects* (NTD), dosis yang dianjurkan adalah 4 hingga 5 mg per hari dimulai sebelum masa kehamilan hingga trimester pertama. Untuk profilaksis defisiensi folat pada anak, dosis yang lebih rendah dapat diberikan secara proporsional. Untuk keadaan malabsorpsi dapat diberikan hingga 15 mg per hari (Hazra and Tripathi, 2001).

3. 3. Interaksi Obat

Asam folat memiliki interaksi obat dengan antasida, antibiotika, cholestiramine, estrogen, zinc. Dengan antasida, asam folat akan mengalami gangguan absorpsi; Dengan antibiotika, pengukuran kadar serum dapat

mengalami kekeliruan; Dengan

cholestiramine, asam folat akan mengalami gangguan absorpsi; Dengan estrogen, kebutuhan asam folat perlu ditingkatkan; Dengan suplemen zinc, folat akan menyebabkan penurunan absorpsi zinc (Hazra and Tripathi, 2001).

4. Asam Folinat atau Leucovorin

Asam folinat telah dipakai dalam kombinasi dengan 5-FU sejak tahun 1982 untuk mengobati kanker kolorektal. Kombinasi obat ini diperkirakan mengakibatkan terjadinya stabilisasi ikatan antara enzim target thymidylate synthetase dengan 5- fluoro-dUMP dengan kadar folat selular yang tinggi (Geisler et al., 1998). Asam folat dan asam folinat dapat menurunkan kadar homocysteine dan tidak ada perbedaan efek bermakna diantara keduanya (Soleimani et al., 2011). Dengan dosis asam folinat sebesar 60 mg/m², terjadi peningkatan kadar asam folat dan penurunan kadar homocysteine sebesar 0,08 µmol/liter/jam dengan paruh waktu asam folinate diperkirakan selama 9 jam (Geisler et al., 1998). Namun, bertentangan dengan penelitian sebelumnya, pemberian folinic acid pada neonatus dengan dosis 70 µg/kg/hari selama 2 minggu tidak menyebabkan penurunan kadar homocysteine, hal ini diperkirakan akibat adanya perbedaan dalam metabolisme karbon tunggal pada neonatus dibandingkan dengan manusia dewasa (Hogeveen et al., 2010).



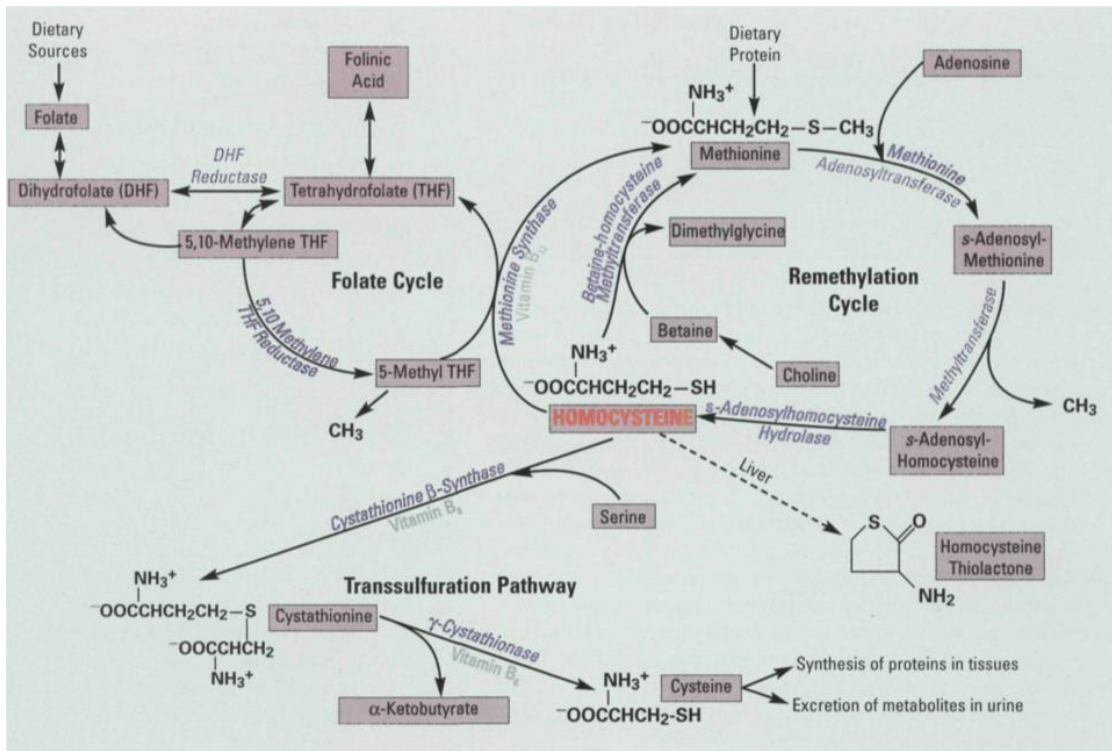
Gambar 9. Contoh sediaan Leucovorin atau asam folinat.

Asam folinat tersedia dalam sediaan tablet (5 mg, 10 mg, 15 mg, 25 mg), bubuk injeksi (50 mg, 100 mg, 200 mg, 350 mg, 500 mg), dan cairan injeksi (10 mg/ml). Sebagai terapi, asam folinat diberikan dalam berbagai dosis. Sebagai terapi terhadap overdosis methotrexate diberikan dalam perbandingan 1:1 dalam 1 jam, diberikan hingga kadar methotrexate berada di bawah 0.05 micromolar. Untuk obat tambahan pada terapi methotrexate, asam folinat diberikan 10 mg/m² IV setiap 24 jam setelah pemberian methotrexate. Pada koadministrasi dengan 5FU, direkomendasikan dosis 20 mg/m². Pada kasus keracunan methanol, diberikan 1 mg/Kg IV setiap 4-6 jam. Pada kasus keracunan trimethoprim dosisnya adalah 10 mg/m² PO setiap 6 jam.

5. Homocysteine

Pada tahun 1932, ahli biokimia Amerika Serikat bernama Vincent DuVigneaud menemukan sebuah asam amino setelah mereaksikan methionine dengan asam sulfat, asam amino tersebut adalah homocysteine. Homocysteine memiliki nama IUPAC 2-amino-4-sulfanylbutoic acid, adalah asam amino alami, non- proteoinogenic, yang memiliki ikatan sulfur, yang terbentuk dalam metabolisme methionine, suatu asam amino esensial yang berasal dari makanan. Methionine diketahui sebagai satu-satunya sumber homocysteine. Dalam keadaan normal, homocysteine segera dimetabolisme oleh tubuh melalui transulfurasi dan remetilasi.

Methionine sebagai sumber dari homocysteine berasal dari metabolisme melalui jalur transmethylasi yang akan menghasilkan S-adenosylmethionine (SAM) yang berguna sebagai donor metil untuk DNA dan histone methyltransferase (MTs) untuk regulasi perubahan epigenetik. Dalam kondisi stress oksidatif, homosisteine (hasil metabolisme dari SAM) mengalami transulfurasi menjadi glutathione. Suatu penelitian yang mempelajari hubungan cedera kepala dengan kadar methionine memberikan kesimpulan bahwa pada kasus cedera kepala terjadi ketidakseimbangan nitrogen yang secara tidak langsung akan menyebabkan penurunan kadar methionine setelah cedera kepala dimana hal ini berhubungan dengan derajat cedera (Dash et al., 2016).



Gambar 10. Jaras metabolisme Methionine menjadi Homocysteine.

Methionine diubah menjadi s-adenosyl methionine oleh methionine adenosyltransferase kemudian diubah menjadi s-adenosyl homosisteine oleh methyltransferase dengan melepaskan satu gugus methyl. Homosisteine akan diubah kembali menjadi methionine oleh methionine synthase yang berhubungan dengan siklus asam folat.

Williams, R.H., Maggiore, J.A., 1999. Hyperhomocysteinemia: Pathogenesis, Clinical Significance, Laboratory Assessment, and Treatment. *Lab. Med.* 30, 468–475. <https://doi.org/10.1093/labmed/30.7.468>

Homocysteine akan memasuki proses transulfurasi pada kondisi methionine berlebihan atau suatu kondisi dimana methionine diperlukan. Reaksi ini dikatalisasi oleh enzim cystathionine β-synthase, reaksi yang membutuhkan vitamin B₆ sebagai katalis. Pada keadaan defisiensi methionine, homosisteine akan dimetabolisme melalui proses remetilasi melalui siklus folat dengan menggunakan enzim N⁵,N¹⁰-methylene-tetrahydrofolate reductase dan methionine synthase. Folat termetilasi akan menjadi donor metil. Jalur metabolisme alternative terjadi di organ hati dengan bantuan enzim betaine-homocysteine methyl transferase.

Homocysteine beredar dalam tubuh dalam bentuk tereduksi atau bentuk sulfhydryl dan teroksidasi yang terdiri dari homocysteine dan disulfida campuran, pada umumnya residu homocysteine-cysteine atau protein-protein yang memiliki kelompok cysteine reaktif, sehingga membentuk ikatan homocysteine-protein. Manusia sehat memiliki kadar serum homocysteine bebas sekitar 2-3 $\mu\text{mol/L}$ (20-30% dari total homocysteine).

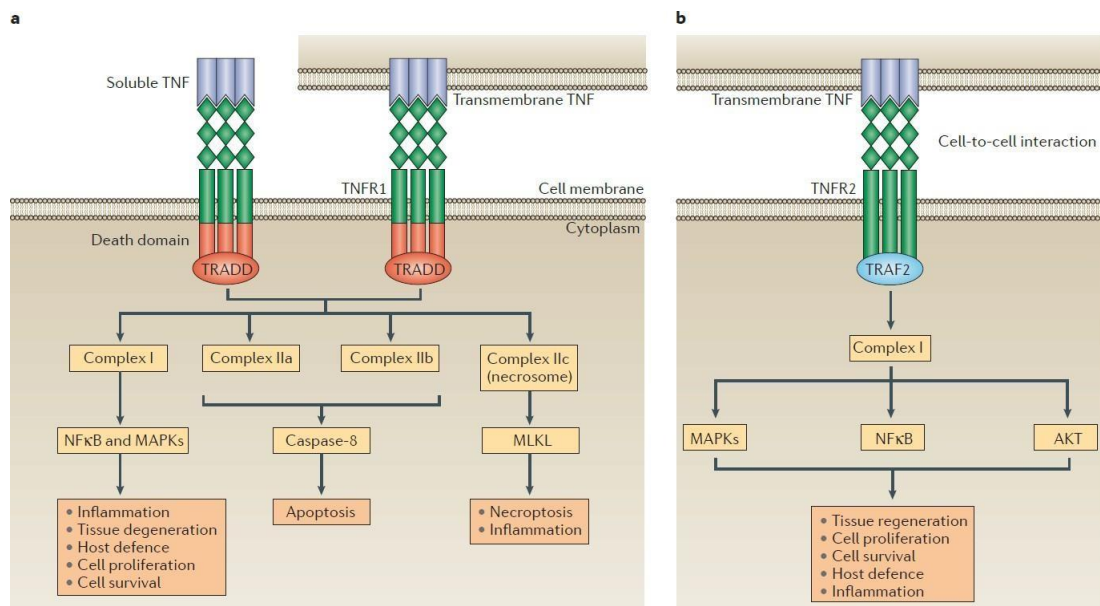
Homocysteine diabsorpsi kembali di sel tubulus renalis. Laju ekskresinya sekitar 1% dari kreatinin. Karena sel tubulus renalis dapat memetabolisme homocysteine, gangguan fungsi ginjal dapat menekan katabolisme homocysteine intraseluler, sehingga meningkatkan kadar homocysteine plasma.

Dalam proses inflamasi, homocysteine adalah merupakan salah satu faktor risiko terhadap perkembangan terjadinya penyakit kardiovaskular, serebrovaskular, dan pembuluh darah (Williams and Maggiore, 1999). Dalam kasus cedera kepala, kadar homosistein plasma merupakan faktor risiko independen terhadap hasil akhir yang lebih buruk secara signifikan (Dhandapani et al., 2018).

6. Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)

TNF- α adalah suatu protein yang diproduksi oleh makrofag dan monosit. Sel mast serta limfosit B dan T dapat juga menstimulasi ekspresi TNF- α . Protein ini memiliki fungsi potensiasi sel dan juga menyebabkan kematian sel. TNF- α bekerja dengan berikatan dengan TNF receptor (TNFR), dimana system signal TNFR dapat terjadi melalui kompleks I dan kompleks IIa, IIb, IIc. TNFR1 teraktivasi setelah berikatan dengan TNF terlarut maupun TNF transmembran. TNFR1 memiliki domain yang berikatan dengan TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*). Ikatan dengan TNF terlarut maupun TNF transmembran pada awalnya akan menyebabkan terbentuknya kompleks I, yang akan mengaktivasi NF κ B dan MAPKs. Signal TNFR1- kompleks1 menyebabkan inflamasi, degenerasi jaringan, proliferasi dan *cell survival*, dan mengatur sistim imun untuk menghadapi pathogen. Modalitas signal alternatif yang berhubungan dengan kematian sel dapat juga teraktivasi melalui jaras TNFR1. Terbentuknya kompleks IIa dan IIb (juga dikenal sebagai riptosome) menyebabkan terjadinya apoptosis, sedangkan kompleks IIc

(necrosome) menginduksi necroptosis dan inflamasi. TNFR2 dapat teraktivasi terutama oleh TNF transmembran dalam interaksi sel dengan sel. TNFR2 akan berikatan dengan TRAF2 menyebabkan pembentukan kompleks I kemudian aktivasi NFκB, MAPs, dan AKT. TNFR2 memediasi aktivitas homeostatic termasuk regenerasi dan proliferasi sel serta *cell survival*. Jaras ini juga dapat menginisiasi efek inflamasi (Kallioli and Ivashkiv, 2016).



Gambar 11. Ilustrasi ikatan TNF α dengan reseptornya serta jalur sinyal. a. TNF α berikatan dengan TNFR1. b. TNF α berikatan dengan TNFR2. (Kalinina et al., 2004)

Pada kasus cerea kepala telah ditemukan rasio TNF- α cairan serebrospinal dengan serum yang lebih tinggi berhubungan dengan derajat beratnya disfungsi sawar darah otak. Penyuntikan IL-10 setelah cedera kepala dapat menurunkan kadar TNF- α dan meningkatkan hasil akhir pada model tikus yang menggambarkan efek merusak TNF- α . Namun, pada penelitian oleh Kamm et al, yang meneliti hubungan TNF- α dengan IL-10, tidak terdapat perbedaan signifikan konsentrasi TNF α dibandingkan dengan kontrol cedera kepala tikus (Kamm et al., 2006).

7. Interleukin 10 (IL-10)

Interleukin-10 secara umum dikenal sebagai sitokin anti-inflamasi yang memiliki berbagai fungsi imunomodulator pada respons inflamasi khususnya fase resolusi. IL-10 pada awalnya dideskripsikan sebagai faktor inhibisi sintesis sitokin yang dapat memengaruhi sintesis sitokin proinflamasi. IL-10 juga dapat mengurangi ekspresi reseptor sitokin dan menghambat aktivasi reseptor. IL-10 dapat mengurangi aktivasi sel T, monosit, dan makrofag (Garcia et al., 2017); Sehingga menyebabkan inhibisi produksi sitokin proinflamasi, presentasi antigen, dan proliferasi sel (Saxena et al., 2015).

Aktivitas IL-10 terjadi setelah berikatan dengan reseptornya. Terdapat dua reseptor IL-10, yaitu IL-10R1 dan IL-10R2. IL-10R2 akan berikatan dengan IL-10 hanya setelah IL-10 berikatan dengan IL-10R1, dimana ekspresi IL-10R1 hanya terdapat terutama pada sel imunitas, khususnya monosit dan makrofag. Ikatan IL-10 dengan IL-10R1 akan menyebabkan perubahan konformasi IL-10 sehingga dapat berikatan dengan IL-10R2 dan menyebabkan terjadinya kompleks IL-10/IL-10R yang dapat menekan respon imun melalui beberapa mekanisme, namun mekanisme utamanya adalah inhibisi translokasi NF- κ B dari inti sel. IL-10 menghambat produksi mediator proinflamasi yang berhubungan dengan TLR melalui inhibisi translasi dan ubiquitinasi MyD88. IL-10 juga menghambat transkripsi gen yang terinduksi oleh IFN- α dan - γ dan fosforilasi STAT1. IL-10 menghambat ekspresi MHC class II dan menghambat aktivasi dan proliferasi sel T melalui supresi produksi IL-2 dan CD28.

Seluruh aktivitas IL-10 yang telah dibahas di paragraf sebelumnya adalah aktivitas anti-inflamasi, akan tetapi, efek IL-10 dalam respon imun humoral adalah stimulasi. IL-10 meningkatkan diferensiasi, proliferasi, *survival* dan produksi antibody dari sel B. IL-10 juga dapat meningkatkan proliferasi sel mast dan timosit (Saxena et al., 2015).

Penelitian pada tikus, IL-10 akan mengalami peningkatan konsentrasi pada otak dalam 24 jam pertama setelah cedera kepala. IL-10 akan mulai mengalami peningkatan 2 jam setelah cedera, kemudian memasuki kadar *plateau* dalam 2 jam berikutnya, dan terus meningkat sampai jam ke 24 seiring dengan penurunan kadar IL-1 β (Kamm et al., 2006).

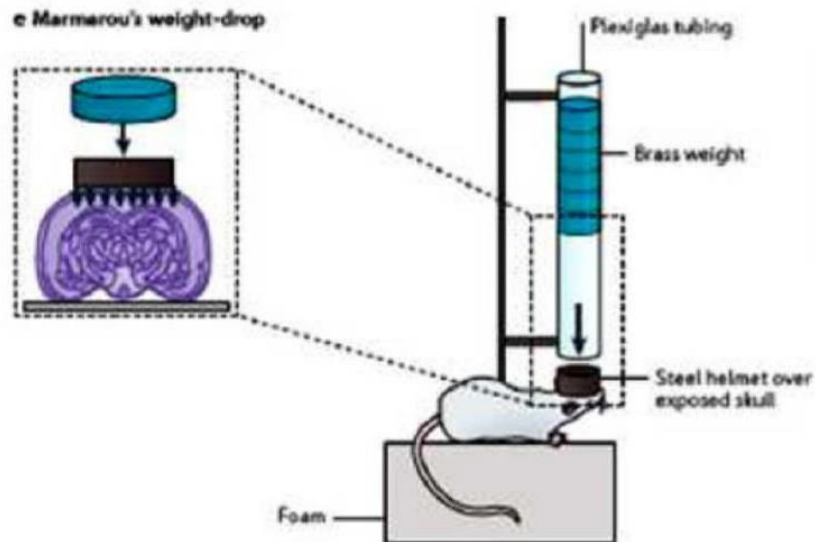
8. Model cedera kepala pada hewan

Berbagai hewan telah digunakan sebagai model cedera kepala. Walaupun hewan berukuran besar akan lebih menyerupai dari segi ukuran dan proses fisiologinya terhadap manusia, penelitian terhadap cedera kepala lebih banyak menggunakan binatang pengerat seperti tikus, mencit, atau marmut. Terdapat empat model cedera kepala yang secara luas digunakan, yaitu: *fluid percussion injury* (FPI), *cortical impact injury* (CCI), *weight-drop impact acceleration injury*, dan *blast injury* (Xiong et al., 2013).

Pada penelitian ini akan digunakan *weight-drop impact acceleration injury* atau model cedera benturan akibat percepatan beban yang dijatuhkan (model jatuh beban). Pada model ini, kepala hewan coba akan mengalami benturan dari beban yang dijatuhkan secara bebas. Derajat cedera pada model ini dapat diubah dengan meningkatkan atau menurunkan beban dari benda yang dijatuhkan dan meninggikan dan merendahkan ketinggian pelepasan beban (Xiong et al., 2013).

Terdapat beberapa modifikasi dari model jatuh beban. Modifikasi oleh Feeney, beban dijatuhkan pada selaput otak setelah dilakukan kraniotomi sehingga menyebabkan kontusio korteks (Feeney et al., 1981). Modifikasi oleh Shohami, beban dijatuhkan pada satu sisi kepala hewan coba dengan kepala diletakkan pada permukaan yang keras, untuk memberikan simulasi cedera otak tertutup (Shapira et al., 1988). Percobaan ini menyebabkan gangguan neurologis dan kerusakan sawar-darah-otak. Marmarou dkk., mengembangkan model cedera aksonal difus dengan menjatuhkan beban melalui tabung sehingga beban akan membentur kepala hewan coba secara tidak langsung, karena pada kepala hewan coba telah dilekatkan sebuah bantalan logam untuk mencegah terjadinya keretakan tulang tengkorak. Pada saat percobaan, hewan coba diletakkan pada dasar yang lembut untuk mencerminkan kejadian cedera kepala difus. Pada percobaan ini, dilakukan penjatuhan beban sebesar 450 gram dengan ketinggian 2 meter dengan hasil laju kematian sebesar 44% dengan 12,5% fraktur tengkorak (Marmarou et al., 1994). Pada penjatuhan beban sebesar 450 gram setinggi 1 m dan respirasi spontan tanpa intubasi, didapatkan 0% mortalitas dan 0% diskontinuitas tulang tengkorak. Modifikasi lainnya adalah model Maryland, dimana pada model ini, cedera yang terjadi memiliki gaya anteroposterior dengan

akselerasi rotasi sagital karena beban dijatuhkan pada landasan yang mengubah gaya vertikal menjadi horizontal (Kilbourne et al., 2009).



Gambar 12. Model jatuh beban Marmarou.

Penelitian menggunakan hewan coba tentu memiliki keterbatasan. Walaupun secara dasar memiliki kemiripan fisiologi dengan otak manusia, otak hewan coba tentu memiliki perbedaan dalam fungsi dan strukturnya (bentuk, sudut sumbu, bentuk girus, dan rasio *white-grey matter*). Perilaku dan respons jaringan terhadap cedera juga terdapat perbedaan bila dinilai antara galur tikus atau mencit, juga jenis kelamin yang berbeda (Xiong et al., 2013).

Impact	Anesthesia*	Respiration	No. of Rats	Mortality Rate	Skull Fracture Rate
500 gm-2 m	IP inj	non-intubated spontaneous	16	69.0%	31.0%
450 gm-2 m	IP inj	non-intubated spontaneous	16	44.0%	12.5%
450 gm-1 m	IP inj	non-intubated spontaneous	22	0%	0%
450 gm-2 m	inhalation	non-intubated spontaneous	58	58.6%	8.6%
450 gm-2 m	inhalation	intubated spontaneous	26	50.0%	3.8%
450 gm-2 m	inhalation	intubated mechanically assisted	23	8.7%	0%

* IP inj = intraperitoneal injection of alpha-chloralose; inhalation = inhalation of isoflurane.

Tabel 2. Referensi beban yang digunakan pada model trauma kepala (Marmarou and Demetriadou, 1994).

Pesawat model weight-drop Marmarou telah dimodifikasi agar lebih sesuai dengan keadaan negara berkembang. Hal ini telah dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dan telah digunakan untuk berbagai penelitian mengenai model cedera kepala (Nasution et al., 2020). Pada model ini dilakukan insisi linear pada tengah kepala dan dilakukan kraniotomy untuk memaparkan permukaan selaput otak. Beban jatuhan ditentukan seberat 20 gram pada ketinggian 20 cm, dimana beban ini seberat 6-10% dari berat badan tikus. Penarikan data analog menunjukkan sesuai dengan beban 3-5 kg pada manusia. Beban yang dijatuhkan akan menghasilkan energi sebesar 0,04 Joule.