

# DISERTASI

**PENGHAMBATAN PROSES KEMATIAN SEL NEURON  
MENGUNAKAN *Camillia sinensis* DENGAN BAHAN AKTIF  
EGCG PADA *Rattus norvegicus*  
MODEL STROKE ISKEMIK AKUT**



**ABDULLOH MACHIN**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2020**

# **DISERTASI**

## **PENGHAMBATAN PROSES KEMATIAN SEL NEURON MENGUNAKAN *Camillia sinensis* DENGAN BAHAN AKTIF EGCG PADA *Rattus norvegicus* MODEL STROKE ISKEMIK AKUT**

**ABDULLOH MACHIN**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2020**

**PENGHAMBATAN PROSES KEMATIAN SEL NEURON  
MENGUNAKAN *Camillia sinensis* DENGAN BAHAN AKTIF  
EGCG PADA *Rattus norvegicus*  
MODEL STROKE ISKEMIK AKUT**

Untuk Memperoleh Gelar Doktor  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor  
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan  
Dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Akhir  
Tahap 2 (Terbuka)

Hari : Kamis  
Tanggal : 2 Maret 2020  
Pukul : 10..00 WIB

Oleh:  
**ABDULLOH MACHIN**  
**011317017329**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2020**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**DISERTASI**

**PENGHAMBATAN PROSES KEMATIAN SEL NEURON  
MENGUNAKAN *Camillia sinensis* DENGAN BAHAN AKTIF  
EGCG PADA *Rattus norvegicus* MODEL STROKE ISKEMIK  
AKUT**

**TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL 13 APRIL 2020**

Oleh:  
Promotor



**Prof. Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD., K-PTI., FINASIM  
NIP 19561103 198403 1 001**

Kopromotor



**Dr. Paulus Sugianto, dr., Sp.S(K),  
NIP 19640129 199003 1 004**

**Disertasi ini telah diuji dan dinilai  
oleh panitia penguji Ujian Tahap I (Tertutup)  
pada tanggal 24 januari 2020**

**Panitia Penguji :**

- Ketua : 1. Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt, Msi.,  
Anggota : 2. Prof. Dr. Nasronuddin, dr, Sp.PD, KPTI, FINASIM.,  
3. Dr. Paulus Sugianto, dr, Sp.S(K),.  
4. Prof. Dr. Aulianiam, DVM., DES  
5. Dr. Afif Nurul Hidayati, dr, SpKK(K),.  
6. Dr. Budi Utomo, dr, Mkes.,  
7. Dr. Imam Susilo, dr, Sp.PA(K),.  
8. Dr. Imam Subadi, dr, Sp.KFR(K),.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga  
Tentang Panitia Penguji Disertasi  
Nomor: 41/UN3.1.1/HK.04/2020  
Tanggal: 26 Januari 2020

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah kami ucapkan puji dan syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmad, hidayah dan inayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi “Mekanisme Neuroproteksi *Camelia Sinensis* Dengan Bahan Aktif EGCG Dalam Menghambat Proses Kematian Sel Neuron Pada Model *Rattus Norvegicus* Yang Dilakukan *Middle Cerebral Artery Oclussion* (MCAO)”. Disertasi ini kami harapkan dapat menjadi sebuah dasar bagi pengembangan dan pendekatan terapi *adjuvant* stroke iskemik akut.

Teh hijau adalah minuman yang relatif murah dan mudah untuk dikonsumsi sehari-hari. Teh sendiri adalah minuman yang paling populer di dunia. Pada survey yang dilakukan di Jepang didapatkan bahwa orang yang mengkonsumsi teh hijau lebih kecil kemungkinan terkena stroke iskemik akut dan apabila terkena serangan stroke, maka memiliki disabilitas yang lebih baik. Pada penelitian ini, kami melakukan pendekatan teh hijau sebagai terapi tambahan stroke iskemik akut dengan melihat marker-marker kematian sel melalui proses apoptosis dan nekroptosis. Kami juga melihat marker yang diproduksi sebagai reaksi stres oksidatif yang terjadi oleh kondisi iskemia.

Penelitian ini dapat terlaksana tentu bukan oleh kekuatan penulis, namun oleh karena pertolongan banyak pihak yang telah membantu penulis baik secara langsung maupun tidak langsung membantu penulis dari sejak mulai melaksanakan pendidikan, mendapatkan inspirasi tema penelitian, memberikan masukan konsep-konsep yang diperlukan dalam penelitian ini, membantu dalam membuat konsep metode yang akan dilaksanakan, saat melaksanakan penelitian, saat mengkompilasi hasil penelitian dan saat membuat laporan disertasi ini, sehingga dengan kerendahan hati kami mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan petunjuk dan kemudahan dalam melaksanakan penelitian ini.

2. Prof. Dr. H. Fasichul Lisan., Apt selaku rektor Universitas Airlangga periode 2010-2015
3. Prof. Dr. Moh. Nasich., SE, Ak., CMA., Selaku rektor Universitas Airlangga periode 2015 – sekarang
4. Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes., Sp.PD., KEMD., FINASIM selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2010-2015
5. Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U(K),. Selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2015-sekarang
6. Dodo Anondo, dr, MPH,. selaku direktur RSUD Dr. Soetomo periode 2011-2016
7. Harsono, dr,. selaku direktur RSUD Dr. Soetomo periode 2016-2018
8. Dr. Joni Wahyuhadi, dr, Sp.BS(K),. selaku direktur RSUD Dr. Soetomo periode 2018-sekarang
9. Prof. Dr. Teddy Ontoseno, dr, Sp.A(K),. Selaku KPS S-3 Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2010-2015
10. Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., Sp.PD-KR., Selaku KPS S-3 Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2015-2020
11. Wijoto, dr., Sp.S(K),. Selaku ketua departemen Ilmu Penyakit saraf Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2010-2015
12. Dr. M. Hamdan, dr., Sp.S(K),. Selaku ketua departemen Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2015-sekarang
13. Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, M.Sc., dr., Sp. Park(K),. selaku penasehat akademik kami yang dengan sabar telah memberikan ilmunya dan memberi petunjuk kami dalam membuat konsep-konsep dasar penelitian kami
14. Prof. Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD., K-PTI.FINASIM selaku promotor kami yang telah dengan sabar membimbing kami dalam melaksanakan penelitian kami

15. Dr. Paulus Sugianto, dr., Sp.S(K)., selaku kopromotor kami yang telah dengan sabar membimbing kami dalam melaksanakan penelitian kami
16. Tim penguji kami baik saat ujian kualifikasi, ujian proposal, ujian kelayakan, ujian tertutup sampai dengan ujian terbuka yang telah memberikan masukan yang berharga untuk perbaikan penelitian kami Prof. Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD., K-PTI.FINASIM, Dr. Paulus Sugianto, dr., Sp.S(K)., . Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt, Msi., Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, M.Sc., dr., Sp. Park(K)., Prof. Dr. Aulianiam, DVM., DES , Dr. Afif Nurul Hidayati, dr, SpKK(K)., , Dr. Budi Utomo, dr, Mkes., , Dr. Imam Susilo, dr, Sp.PA(K)., , Dr. Imam Subadi, dr, Sp.KFR(K)., , M. Miftahussurur, dr, M.Kes., Sp.PD., FINASIM,. Ph.D.,
17. Dosen-dosen program S-3 Ilmu Kedokteran Dasar Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang dengan sabar membimbing kami
18. Ibu kami tercinta Hj. Rosyidah yang mencurahkan cintanya kepada kami dan mendidik kami dengan sabar dan mengarahkan kami sehingga dapat menjadi dokter spesialis saraf
19. Saudara-saudara saya Tho'atin Nasichah, Maria Ulfa, Halimah Sa'diyah, Faruq Abdul Mu'id, Intan Khodijatul Kubra, M. Faiz Aminullah, dan Ayu Umi Salamah yang menyemangati kami untuk menyelesaikan disertasi ini.
20. Mertua kami HM. Ali Imron Rosyadi dan Hj. Nur Abidah yang dengan sabar memberikan semangat kepada kami untuk menyelesaikan Pendidikan ini
21. Istri saya Queen Khoirunnisa Mairo, SST., M.Keb., yang dengan sabar memberikan semangat kepada kami untuk menyelesaikan Pendidikan ini
22. Anak-anak kami Sayyidah Marwah As'adinnisa, Syarifah Shofa Akrominnisa, RM Muhammad Lukman Hakim Wicaksono yang memberikan semangat pada kami



23. Rekan-rekan S-3 Ilmu Kedokteran Dasar Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga angkatan 2013 yang kompak dan saling mensupport
24. Rekan-rekan Staff Departemen Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang selalu menyemangati kami dalam menyelesaikan Pendidikan ini
25. Ayah kami tercinta Alm. HM. Chotib Achsan yang telah mendidik kami dengan sabar dan mengarahkan kami sehingga dapat menjadi dokter spesialis saraf
26. Prof. Junaidi Chotib., Apt., Ph.D., Dr. Imam Susilo, dr, Sp.PA(K),, Chrismawan., Apt., Ph.D., serta semua pihak yang mendukung kami dalam melaksanakan penelitian ini
27. Semua mahasiswa Pendidikan spesialis neurologi Fakultas kedokteran Universitas Airlangga yang telah banyak membantu kami baik secara langsung maupun tidak langsung sehingga disertasi ini dapat kami selesaikan.

Surabaya, 01 Januari 2013

Penulis

## RINGKASAN

**Penghambatan Proses Kematian Sel Neuron Menggunakan *Camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG pada *Rattus norvegicus* Model Stroke Iskemik Akut**

Stroke merupakan penyebab kematian kedua di dunia dan menyebabkan kematian 5,7 juta jiwa pada tahun 2005. Kebanyakan pasien stroke akan memiliki disabilitas sisa, walaupun sekitar 50-70% kembali *independence* secara fungsional. Terapi standar stroke iskemik akut saat ini adalah trombolisis, namun hanya sekitar 2-8.5% pasien stroke yang dapat dilakukan trombolisis di Amerika dan di dunia yang dilakukan trombolisis masih kurang dari 2%. Selama periode 1995-2015 telah terdapat 430 kandidat terapi stroke yang terbagi atas dua kategori yaitu agen trombolisis dan neuroprotektan.

Stroke akut akan terjadi penurunan aliran darah sehingga menyebabkan penurunan jumlah *Adenosine triphosphate* (ATP) yang diproduksi, hal ini akan menyebabkan terjadinya asidosis laktat dan akan menyebabkan hilangnya homeostasis ion pada sel neuron. Gangguan homeostasis ion ini akan menyebabkan kalsium dan *Adenosine diphosphate* (ADP) yang tinggi di dalam sel yang akan menstimulasi *Reactive oxygen species* (ROS) mitokondria dan sumber radikal bebas lain.

Protein HO-1 adalah *Heme oxygenase* yang dapat diinduksi oleh berbagai macam stimulus antara lain infeksi, logam berat, radiasi, demam, sitokin pro-inflamasi dan ox-LDL. *High mobility group protein-1* (HMGB-1) adalah faktor nuklear dan protein yang terikat protein, yang merupakan penanda stres pada sel. Beberapa studi menunjukkan bahwa HMGB-1 memiliki kapabilitas sebagai komponen pro-inflamasi yang merangsang produksi faktor inflamasi dan memiliki peran utama pada sepsis dan inflamasi yang disebabkan oleh Iskemia. TNFR1 adalah reseptor utama untuk transduksi signal dari TNF- $\alpha$  yang akan menyebabkan terjadinya nekrosis sel. Nekroptosis adalah mekanisme kematian sel yang dapat merangsang mekanisme inflamasi pada sistem imun. Inti dari proses nekroptosis memerlukan aktivasi dari *Receptor interacting serine/threonine kinase* (RIP3) dan juga aktivasi *pseudokinase mixed lineage kinase-like* (MLKL). RIP3 dapat diaktifkan oleh berbagai macam rangsangan terutama oleh TNF- $\alpha$  yang akan menginduksi terjadinya nekroptosis. Proses kematian sel akibat iskemia juga dapat melalui proses apoptosis dengan *Caspase-3* sebagai mediator kunci. Protein BCL-2 adalah regulator utama permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul proapoptosis.

Teh hijau (*Camellia sinensis*) adalah minuman yang paling banyak dikonsumsi di dunia dan merupakan sumber *polyphenol* yang dikenal sebagai *catechin* termasuk diantaranya adalah *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) yang merupakan 63% dari total *catechin*. Sebuah meta-analisis menunjukkan bahwa individu yang mengkonsumsi  $\geq 3$  cangkir sehari memiliki risiko 21% lebih rendah

untuk mendapatkan serangan stroke dibandingkan yang mengonsumsi < 1 cangkir teh sehari. Didapatkan banyak penelitian pada model binatang yang menunjukkan bahwa pemberian EGCG pada jaringan otak yang mengalami iskemia-reperfusion akan menurunkan perluasan iskemia. EGCG juga merupakan *scavenger* radikal bebas yang kuat dan dapat menjaga sel neuron dari kerusakan oksidatif yang diinduksi oleh prooksidan. Pada beberapa model binatang, EGCG akan meningkatkan fungsi mitokondria dan menurunkan stres oksidatif pada perlemakan hati atau obesitas yang diinduksi oleh diet.

Jenis penelitian ini adalah *pre- post test design true experimental* yang dilakukan dengan menggunakan *Rattus norvegicus* jantan usia 4 bulan dengan berat badan 200-275 gram yang dilakukan oklusi MCA dan diberikan intervensi menggunakan EGCG dan ekstrak teh hijau. Sebelum dibuat model, subjek diperiksa klinisnya dengan pemeriksaan *Ladder Rung* dan *Y-Maze*. Model *Middle Cerebral Arteri Occlusion* (MCAO) dilakukan dengan cara dilakukan klem pada arteri karotis interna kanan menggunakan klem bulldog selama 180 menit. Setelah dibuat model MCAO selanjutnya secara random subjek dibagi menjadi 5 (lima) kelompok yaitu kelompok kontrol, EGCG 10 mg/kgBB, EGCG 20 mg/KgBB, EGCG 30 mg/kgBB dan ekstrak teh hijau dengan label *Medittea*. Intervensi diberikan selama 7 hari dan sebelum subjek dikorbankan, dilakukan pemeriksaan *Ladder Rung* dan *Y-Maze*. Subjek kemudian diambil darahnya untuk pemeriksaan HMGB1 dan dikorbankan serta diambil sediaan jaringan otaknya untuk pemeriksaan imunohistokimia (IHC).

Hasil pemeriksaan pada subjek didapatkan penurunan ekspresi HO-1 pada kelompok intervensi, tidak didapatkan pengaruh intervensi terhadap kadar HMGB1, penurunan ekspresi TNFR1 dan RIP3, peningkatan ekspresi BCL-2, serta penurunan ekspresi *Caspase-3*. Tidak didapatkan pengaruh intervensi pada pemeriksaan *Ladder-Rung* hari ke-7 dan didapatkan pengaruh terhadap skor *Y-Maze* pada kelompok yang mendapatkan ekstrak teh hijau.

## SUMMARY

**Inhibition of Neuronal death using *Camellia sinensis* with it active compound EGCG in *Rattus norvegicus* Acute Ischemic stroke Model**

Stroke is the second leading death in the world dan cause of 5,7 Million death at 2005. Most of stroke patiens have residual disability, even 50-70% of stroke patiens will regain to functionally dependent. Standart acute stroke treatment is thrombolysis, but only 2-8,5% acute stroke patient receive this treatment in US and less than 2% in the world. There are 430 candidate for stroke treatment around 1995-2015 and divide to two category thrombolysis and neuroprotectant.

During acute ischemic stroke there is decrease in cerebral perfusion that will decrease Adenosine triphosphate (ATP) product. This will cause lactic acidosis and lost of ion homeostasis in neuronal cells. Ion homeostasis disfunction will cause high of Adenosine diphosphate (ADP) level in the cells and stimulate production of mitochondrial Reactive oxygen species (ROS) and other free radicals.

Heme oxygenase-1 (HO-1) is heme oxygenase induced by many kind of stimuli like infection, heavy metals, radiation, fever, pro inflammatory cytokine and ox-LDL. High mobility group protein-1 (HMGB1) is nuclear factors and binding protein as stress marker in the cells. Some study shows that HMGB1 have capability as pro inflammatory component ang trigger inflammatory product and have important role in sepsis and inflammation caused by ischemia. TNFR1 is main receptors for signal transduction from TNF- $\alpha$  that will trigger cellular necrotic. Necroptosis is cell death mechanism that will trigger inflammation and immune system. The principle of necroptosis need activation of Receptor interacting serine/threonine kinase (RIP3) and pseudokinase mixed lineage kinase-like (MLKL). RIP3 can be activated with many trigger especially TNF- $\alpha$  that will induce necroptosis. Mechanism of cellular death after ischemia can also be through apoptosis with Caspase-3 as key mediator. BCL-2 is main regulator of mitochondrial and proapoptosis molekules.

Green tea *Camellia sinensis*) is main consumed beverage in the world and main source of polyphenol knows as catechin including *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) that consist of 63% total catechin. A metaanalysis shows that people who consume more than 3 cups of tea every day have 21% lower risk of ischemic stroke compared to people who consume less than a cup of tea every day. There are many study in animal models shows that intervention using EGCG in the brain tissue after ischemic reperfusion insult will decrease ischemic brain tissue. EGCG also a strong scavenger of free radicals that will protect neuron from oxidative damage induced by pro-oxidant. Studi using animal models shows that EGCG will improve mitochondrial function and decrease oxidative stress in fatty liver or diet induced obesity.

This study is pre- post test true experimental design in male *Rattus norvegicus* 4 month old with body weight 200-275 gram perform *Middle Cerebral Arteri Occlusion* (MCAO) and intervention using EGCG and green tea extract. Subject examine ladder rung and Y-Maze before performing MCAO models. MCAO model using bulldog klem in internal carotic artery for 180 minutes and after models was establish subject will randomly allocated in to five groups, control,

EGCG 10 mg/kgBw, EGCG 20 mg/KgBW, EGCG 30 mg/KgBw and green tea extract with label *Medita*. Intervention is perform for 7 days and before subject were sacrifice, ladder rung and Y-Maze is examined for all subject. Subject then take its blood for HMGB1 examination and sacrifice then take its brain tissue for immunohistochemistry (IHC) examination.

There are decrease in HO-1 expression in intervention groups, no effect on HMGB1 in intervention groups, decrease in TNFR1 and RIP3 expression, increase of BCL-2 expression and decrease in Caspase-3 expression. There is no effect in ladder rung on 7<sup>th</sup> day examination and there is improvement in Y-Maze score in extract green tea groups.