

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Stroke merupakan penyebab kematian kedua di dunia dan menyebabkan kematian 5,7 juta jiwa pada tahun 2005 (Jauch *et al.*, 2013; Ropper *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2017). Pada tahun 2010 didapatkan 16.9 juta kasus stroke di seluruh dunia (Willey, 2012). Sekitar 69% kasus stroke terjadi pada negara dengan *income* rendah dan menengah yaitu sekitar 71% dari 5.9 juta kasus stroke (Howard & Howard, 2016; Willey, 2012). Kebanyakan pasien stroke akan memiliki disabilitas sisa, walaupun sekitar 50-70% kembali *independence* secara fungsional (Willey, 2012). Berdasarkan hal tersebut, maka diperlukan pemahaman patogenesis sehingga dapat dilakukan pendekatan terapi stroke iskemik akut (Deb *et al.*, 2010).

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% (Jauch *et al.*, 2013; Kleindorfer *et al.*, 2008; Willey, 2012). Penulis melakukan penelitian di RSUD Dr. Soetomo terhadap 107 pasien stroke yang datang di IGD didapatkan waktu yang diperlukan dari onset sampai dengan datang di IGD adalah 712.3 ± 1324.6 menit (Machin & Hamdan, 2018). Selama periode 1995-2015 telah terdapat 430 kandidat terapi stroke yang terbagi atas dua kategori yaitu agen trombolisis dan neuroprotektan (Chen & Wang, 2016). Salah satu neuroprotektan yang populer di gunakan sebagai terapi stroke adalah Citicholin, namun dalam studi-studi terakhir menunjukkan bahwa Citicholin kurang efektif sebagai terapi stroke, sehingga perlu di kembangkan pendekatan baru terapi protektan untuk pasien stroke

iskemik (Alvarez-Sabin & Roman, 2013; Clark *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 1999; Secades *et al.*, 2016).

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 (Hossmann & Heiss, 2014; Levine, 2004; Zhang *et al.*, 2016). 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 (Heiss, 2016; Millogo *et al.*, 2000).

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 (Berezki *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2018; Kaiser *et al.*, 2019; Kishimoto *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2015). Studi awal pada tikus transgenik model *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO) menunjukkan bahwa ekspresi berlebihan HO-1 secara signifikan akan menurunkan volume infark (Berezki *et al.*, 2018).

High mobility group protein-1 (HMGB-1) adalah faktor nuklear dan protein yang terikat protein, yang merupakan penanda stres pada sel (Zhang *et al.*, 2013). 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 (Muhammad *et al.*, 2008). *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) adalah mediator penting dan memiliki korelasi terhadap keparahan stroke (Yue *et al.*, 2009). TNFR1 adalah reseptor utama untuk transduksi signal dari TNF- α yang akan menyebabkan terjadinya nekrosis sel (Mardookhi *et al.*, 2016; Pan & Kastin, 2007; Parameswaran & Patial, 2010).

Nekroptosis adalah mekanisme kematian sel yang dapat merangsang mekanisme inflamasi pada sistem imun (Linkermann *et al.*, 2013; Linkermann & Green, 2014). 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- α yang akan menginduksi terjadinya nekroptosis (Linkermann *et al.*, 2013; Nogusa *et al.*, 2016). Newton K, dkk melakukan penelitian dengan menggunakan tikus untuk melihat peran RIP3 dan MLKL menemukan bahwa pada tikus yang memiliki defisiensi RIK3 memiliki *outcome* yang lebih baik saat terjadinya cedera dibandingkan dengan defisiensi MLKL (Newton *et al.*, 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Wu XN, dkk juga menunjukkan bahwa RIP3 adalah protein penting dalam mengeksekusi proses necroptosis (Chen *et al.*, 2017b).

Proses kematian sel akibat iskemia juga dapat melalui proses apoptosis dengan *Caspase-3* sebagai mediator kunci. Asahi, dkk menunjukkan adanya upregulasi mRNA *Caspase-3* pada jaringan otak tikus dalam waktu 1 jam setelah terjadinya onset iskemia. Namura, dkk juga mendeteksi adanya *Caspase-3* dan produknya pada jaringan otak tikus saat reperfusi dini dalam 2 jam setelah oklusi MCA (BayIr & Kagan, 2008; Elmore, 2007; Ran *et al.*, 2007; Saikumar & Venkatachalam, 2009; Zhang *et al.*, 2005).

Protein BCL-2 adalah regulator utama permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul proapoptosis. BCL-2 bersama dengan Bcl-xL adalah protein antiapoptosis yang terletak pada mitokondria dan retikulum endoplasma. Pada mitokondria BCL-2 berfungsi untuk menjaga integritas mitokondria dan mencegah pelepasan molekul apoptogenik (Cai *et al.*, 1998; Gogvadze *et al.*, 2006; Sinkovics, 1991; Wang & Youle, 2009).

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* (Singh *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Sebuah meta-analisis menunjukkan bahwa individu yang mengkonsumsi ≥ 3 cangkir sehari memiliki risiko 21% lebih rendah

untuk mendapatkan serangan stroke dibandingkan yang mengkonsumsi < 1 cangkir teh sehari (Kim *et al.*, 2014). Didapatkan banyak penelitian pada model binatang yang menunjukkan bahwa pemberian EGCG pada jaringan otak yang mengalami iskemia-reperfusi akan menurunkan perluasan iskemia (Lim *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017).

Efek neuroprotektif EGCG melalui peningkatan ekspresi nNOS dan eNOS serta menurunkan iNOS, penghambatan MMP-9, memperbaiki transmisi sinaps serta stimulasi 67LR, peningkatan ROS melalui NADPH oksidase dan melalui aktivasi PKC. Gao Z, dkk melakukan penelitian dengan menggunakan model tikus untuk melihat efek EGCG terhadap stres oksidatif yang menyebabkan terjadinya *Contrass Induced Nephropathy*, didapatkan hasil bahwa pemberian EGCG dapat mengurangi stres oksidatif dan inflamasi (Ellis *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2010; Sen *et al.*, 2009). EGCG juga merupakan *scavenger* radikal bebas yang kuat dan dapat menjaga sel neuron dari kerusakan oksidatif yang di induksi oleh prooksidan (Zhao *et al.*, 2014). Pada beberapa model binatang, EGCG akan meningkatkan fungsi mitokondria dan menurunkan stres oksidatif pada perlemakan hati atau obesitas yang di induksi oleh diet (Ran *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2008). Pemberian EGCG dengan dosis 30 mg/kgBB akan mencegah kerusakan mitokondria yang disebabkan oleh isoproterenol (zat yang menyebabkan kerusakan jantung) pada tikus Wistar (Kim *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2008).

Berdasarkan informasi di atas menunjukkan peranan teh hijau dengan bahan aktif EGCG dalam mencegah proses kematian sel neuron pada kondisi iskemia melalui penghambatan stres oksidatif dan perbaikan fungsi mitokondria (Kim *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2008). Kematian sel neuron pada kondisi Iskemia dapat melalui jalur Nekrosis, Apoptosis maupun melalui jalur nekroptosis (Feoktistova & Leverkus, 2015; Fink & Cookson, 2005; Galluzzi *et al.*, 2014; Linkermann & Green, 2014). Penelitian mengenai efek *Camelia sinensis* dengan salah satu bahan aktifnya adalah EGCG dalam mencegah

proses kematian sel neuron melalui mekanisme nekrosis, apoptosis dan nekroptosis perlu dilakukan sehingga kita dapat mengetahui efek neuroprotektan *Camellia sinensis* pada kondisi Iskemia.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah *camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG memengaruhi penghambatan proses kematian sel neuron melalui ekspresi HO-1, kadar HMGB1, ekspresi TNFR1, ekspresi RIP 3, ekspresi BCL-2, ekspresi caspase-3, skor *Ladder rung*, dan skor *Y-Maze* pada *rattus norvegicus* model *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Membuktikan mekanisme penghambatan *Camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG terhadap kematian sel neuron melalui ekspresi HO-1, kadar HMGB1, ekspresi TNFR1, ekspresi RIP 3, ekspresi BCL-2, ekspresi caspase-3, skor *Ladder rung*, dan skor *Y-maze* pada *rattus norvegicus* model *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO).

1.3.2 Tujuan khusus

1. Mengetahui pengaruh *Camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG terhadap peningkatan ekspresi HO-1 pada *Rattus norvegicus* model *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)
2. Mengetahui pengaruh *Camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG terhadap penghambatan pelepasan HMGB1 pada *Rattus norvegicus* model *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)

3. Mengetahui pengaruh *Camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG terhadap peningkatan ekspresi TNFR1 pada *Rattus norvegicus* model *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)
4. Mengetahui pengaruh *Camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG terhadap peningkatan ekspresi RIP3 pada *Rattus norvegicus* model *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)
5. Mengetahui pengaruh *Camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG terhadap peningkatan ekspresi BCL-2 pada *Rattus norvegicus* model *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)
6. Mengetahui pengaruh *Camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG terhadap penghambatan ekspresi *caspase-3* pada *Rattus norvegicus* model *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)
7. Mengetahui pengaruh *Camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG terhadap perbaikan fungsi kognitif yang di ukur dengan menggunakan Y-Maze pada *Rattus norvegicus* model *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)
8. Mengetahui pengaruh *Camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG terhadap perbaikan fungsi motorik yang di ukur dengan menggunakan *Ladder rung* pada model *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)
9. Membuktikan mekanisme penghambatan kematian sel neuron melalui menggunakan *Camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG pada *Rattus norvegicus* model *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

1. Penelitian ini akan memberi pemahaman baru tentang mekanisme penghambatan kematian sel paska *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)
2. Penelitian ini akan memberi pemahaman baru tentang manfaat terapi *Camillia sinensis* dengan bahan aktif EGCG dalam menghambat proses kematian sel neuron pada *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)
3. Penelitian ini akan memberi pemahaman baru tentang mekanisme terapi *Camillia sinensis* dengan bahan aktif EGCG dalam terhadap perbaikan klinis pada *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO)

1.4.2 Manfaat praktis

1. Penelitian ini akan memberikan informasi terkait manfaat teh hijau sebagai alternatif terapi ajuvan stroke infark akut.
2. Penelitian ini apabila terbukti dapat menjadi pendekatan baru terapi pasien stroke iskemik akut.
3. Penelitian ini apabila terbukti akan dapat memberikan harapan untuk mengurangi kecacatan akibat stroke.