

Pengaruh Pemberian Propofol Intravena terhadap Ekspresi Kaspase 3 Hipokampus pada Mencit Balb/C dengan Cedera Kepala

Yusriyani, Ardana Tri, MH Sudjito

Departemen Anestesiologi dan Terapi Intensif Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret-
Rumah Sakit Umum Daerah Moewardi Surakarta

Abstrak

Latar Belakang dan Tujuan: Cedera kepala masih menjadi penyebab utama kecacatan dan kematian. Dalam cedera kepala terjadi proses biomolekuler dan biokimiawi patologik yang dapat menyebabkan nekrosis maupun apoptosis melalui aktivasi kaspase 3. Propofol obat anestesi intravena mempunyai mekanisme neuroproteksi dengan pengaturan pada kaspase 3. Tujuan penelitian ini adalah meneliti keefektifan pemberian propofol 10 mg/kgbb, 25 mg/kgbb dan 50 mg/kgbb terhadap ekspresi kaspase 3 pada mencit balb/c dengan cedera kepala.

Subjek dan Metode: Penelitian eksperimental laboratorik dengan desain *randomized controlled trial* group pada 32 ekor mencit Balb/c yang disuntik propofol intravena. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok secara random, yaitu kelompok K1 sebagai kontrol. Semua kelompok diberi perlakuan cedera kepala dengan metode *weight drop* dan kemudian diberi propofol 10 mg; 25 mg; 50 mg/kgBB intravena untuk kelompok K2, K3, K4. Pemeriksaan aktivasi kaspase 3 menggunakan pengecatan khusus immunohistokimia setelah 6 jam pemberian propofol. Hasil dinilai dengan SPSS 19 dengan derajat kemaknaan $p < 0,05$.

Hasil: Rata-rata persentase ekspresi kaspase 3: K1=4,08, K2= 2,95, K3= 2,52, K4=1,77. Perhitungan statistik dari semua kelompok menunjukkan signifikan ($P=0,000$). Perbandingan antar kelompok menunjukkan: K1-K2 ($p=0,000$), K1-K3 ($p=0,000$), K1-K4 ($p=0,000$), K2-K4 ($p=0,000$), K3-K4 ($p=0,000$), sedangkan antara K2-K3 tidak ada perbedaan signifikan ($P=0,232$).

Simpulan: Pemberian propofol 10,25,50 mg/kgbb menunjukkan hasil yang signifikan menghambat ekspresi kaspase 3 aktif dibandingkan dengan kontrol pada mencit yang diberi cedera kepala. Dari penelitian ini dapat ditarik simpulan bahwa pemberian propofol dosis 50 mg/kgbb merupakan dosis yang efektif untuk menurunkan ekspresi kaspase 3 aktif pada mencit dengan cedera kepala.

Kata Kunci: Cedera kepala, ekspresi kaspase 3, propofol

JNI 2013; 2 (2):81-88

The Effect of Propofol Intravena to Expression of Caspase 3 in Hipocampus Mice Balb/C with Brain Injury

Abstract

Background and Objective: Head injury is a leading cause of disability and death. In head injury occurs biomolecular and biochemical processes that can lead to pathologic necrosis or apoptosis through the expression of caspase 3. Propofol an intravenous anesthetic drug has neuroprotective mechanism by setting the caspase 3. The objective of the research is to identify effect of propofol 10 mg/kg, 25 mg/kg, and 50 mg/kg dose toward activation caspase 3 in Balb/c mice hippocampus with brain injury.

Subject and Methods: This is a laboratory setting experiment with randomized post test only controlled group design. Thirty two balb/c mice makes head injury by given of weight drop and intravenous propofol. The mice were given the same procedure weight drop and intravenous propofol 10,25,50 mg/kg 6 hours after injury for the K2, K3, K4 group respectively. Activation of caspase 3 was studied by immunohistochemistry method 6 hours after intravenous propofol administration. Data was analyzed using Kruskal Wallis Test, cross-tabulation chi square, one way ANOVA and processed by SPSS program.

Result: Means expression of caspase 3: K1= 4.08; K2 = 2.95; K3 =2.52; K4 = 1.77. The statistic result test among all groups show significant differences ($p=0.000$). The comparison of groups that have significant

outcome are: K1-K2 (p=0.00), K1-K3 (p=0.000), K1-K4 (p=0.000), K2-K4 (p=0.000), K3-K4 (p=0.000). There is no significant difference between K2-K3 (p=0.232).

Conclusion: Administration of propofol 10, 25, 50 mg/kg intravenous after traumatic head injury show significant difference in hippocampus caspase 3 activation compared to control, group. From this research, we can also conclude that administering propofol in 50 mg is the effective dose to lowering expression of caspase 3 to mice, with given brain injury.

Keywords: Brain injury, expression of caspase 3, propofol

JNI 2013; 2 (2):81-88

I. Pendahuluan

Trauma kepala masih menjadi penyebab utama kecacatan dan kematian pada masyarakat dewasa muda. Seperempat sampai sepertiga kematian oleh karena trauma disebabkan oleh cedera kepala, demikian pula kecacatan seumur hidup sebagian besar disebabkan oleh trauma kepala.^{1,2} Di Amerika Serikat, 40% dari kematian oleh karena cedera akut disebabkan oleh karena cedera kepala. Sekitar 52.000 penduduk meninggal setiap tahun akibat cedera kepala. Mortalitas akibat cedera kepala di Amerika Serikat diperkirakan 17 per 100.000 penduduk.³

Dalam cedera otak terjadi proses biomolekuler dan biokimiawi patologik yang dapat menyebabkan kerusakan sel, yakni berupa nekrosis maupun apoptosis. Kerusakan molekuler inilah yang mengakibatkan adanya gejala disabilitas berkepanjangan, seperti gangguan kognisi berupa penurunan fungsi atensi, konsentrasi, dan memori. Semakin berat cedera yang dialami seseorang, semakin besar kerusakan baik sel neuron maupun sel glia sebagai jaringan penyangga. Akibatnya sekuele yang ditimbulkan semakin berkepanjangan, bahkan mudah terjadi kematian.⁴

Kerusakan sekunder terhadap otak disebabkan oleh siklus pembengkakan dan iskemia otak yang menyebabkan timbulnya efek kaskade, yang efeknya merusak otak. Cedera sekunder terjadi dari beberapa menit hingga beberapa jam setelah cedera awal.⁵ Setiap kali jaringan saraf mengalami cedera, jaringan ini berespons dalam pola tertentu yang dapat diperkirakan, menyebabkan berubahnya kompartemen intrasel dan ekstrasel. Beberapa perubahan ini adalah dilepaskannya glutamin secara berlebihan, kelainan aliran kalsium, produksi laktat, dan perubahan pompa natrium pada dinding sel yang berperan dalam terjadinya kerusakan tambahan dan pembengkakan jaringan otak.¹

Terjadinya apoptosis dalam trauma kepala dapat terjadi dalam waktu beberapa jam sampai hari, tetapi banyak penelitian yang menyebutkan bahwa proses apoptosis memiliki peranan penting dalam menentukan kesembuhan pada penderita trauma

kepala.⁶ Apoptosis merupakan suatu jenis kematian sel yang terprogram. Perubahan yang terjadi pada sel yang mengalami kematian menunjukkan adanya suatu proses biokimiawi yang kompleks, yang dilakukan oleh suatu famili dari sistein protease yang disebut kaspase.⁷

Kaspase yang berperan sebagai protein eksekutor, yang memutuskan sel untuk apoptosis pada apoptosis. Kaspase atau *cysteine aspartate specific* protease, kaspase belum aktif merupakan prokaspase. Agar berfungsi maka kaspase harus mengalami aktivasi dengan pemotongan sisi karboksil dan pemotongan sisi terminal amino (jumlah amino) sehingga sisinya menempel sedemikian rupa sehingga menjadi bentuk kaspase aktif. Ada stimulus tertentu yang merubah prokaspase menjadi kaspase, molekul kaspase dapat mengaktifkan molekul kaspase yang lainnya (*snowball effect*). Hasil kaspase-nya berbeda-beda yang memiliki fungsi masing-masing.

Aktifnya kaspase maka selanjutnya ada pembentukan vesikel, dan degradasi DNA. Sel mengalami apoptosis (DNA intake), kemudian mulai terlihat *leader* (DNA dipotong) dengan urutan tertentu sehingga punya pola tertentu.^{8,9}

Di saat reseptor TNF famili, seperti Fas, terikat pada ligannya, seperti FasL akan menyebabkan trimerisasi dan membentuk formasi *death-induced signaling complex* (DISC), melibatkan suatu molekul adaptor yang juga mengandung *death* domain yaitu FADD, yang mengikat *death* domain yang teraktivasi tersebut dan juga mengikat prokaspase 8 melalui *death effector domain* untuk membentuk DISC.

Death signal kemudian ditransmisikan dari DISC menjadi kaskade kaspase arus rendah. Di saat prokaspase 8 terpecah dan teraktivasi menjadi kaspase 8 aktif, dapat memecah dan mengaktifkan kaspase efektor arus rendah, seperti kaspase 3, yang memecah inhibitor *caspase-activated DNase* dan memecah DNA di dalam nukleus, dan terjadilah apoptosis. Jalur apoptotik dapat disupresi oleh inhibitor seperti FLIP, IAP-2, Crm A, dan p35.^{9,10}

Jalur sel tipe II bekerja melalui mitokondria yang melepaskan molekul destruksi sel, dan sejumlah kecil DISC yang terbentuk lain dengan jalur kematian receptor ekstrinsik, awal dari kerja jalur intrinsik belum banyak diketahui.

Jalur ini diaktivasi oleh hilangnya *growth factor* seperti IL-2, IL-4, atau *granulocyte macrophage-colonystimulating factor*, penambahan sitokin seperti IL-1 dan IL-6, atau stressor eksogenik seperti steroid, *reactive oxygen intermediates* (ROIs), peroksinitrit, atau NO, yang akan mengaktifasi anggota pro- atau antiapoptotik dari *bcl-2 family*, seperti t-bid atau bax yang diduga mengalami translokasi dari sitosol, yang secara normal ada pada keadaan diam, menuju ke membran mitokondria, di mana akan mengalami penurunan $\Delta\Omega_m$, kemudian mitokondria melepaskan sitokrom c, Smac/Diablo, dan apaf-1, yang melalui formasi apoptosom, mengaktifasi kaspase arus rendah seperti kaspase 9. Kaspase arus rendah ini menyebabkan kematian sel. Jika anggota *bcl-2* dalam keadaan seimbang, maka sel dapat bertahan hidup.^{10,11}

Studi terkini tentang penelitian kematian sel neuron mengidentifikasi adanya peran kunci kaspase 3 memperlihatkan penurunan struktur otak berat pada region yang predominan terjadi apoptosis. Perubahan yang terjadi antara lain peningkatan massa otak, disorganisasi penyebaran sel, dan duplikasi struktur otak. Selain itu regulasi ke atas dan aktivasi kaspase 3 telah terbukti menjadi mediator kunci kematian neuron setelah trauma kepala yang diikuti iskemi pada otak.⁶

Kira-kira sampai 5 tahun yang lalu, peneliti apoptosis sedikit memperhatikan mitokondria. Mitokondria memengaruhi aktivitas kaspase 3 tidak hanya melalui produksi energi, tetapi juga melalui sitokrom c yang dilepaskan oleh mitokondria.¹²

Propofol atau 2,6 diisopropylphenol adalah merupakan obat anestesi intravena sering digunakan karena cepat induksi dan pulih sadar, selain itu propofol sering digunakan untuk perawatan pasien di *intensive care unit*. Hasil penelitian secara *in vivo* dan *in vitro* belum bisa menjelaskan secara pasti mekanisme propofol sebagai neuroprotektif, terutama kerja propofol pada molekul apoptosis, dan pengaturan propofol pada jalur *Bcl-2/Bax/Caspase-3*.¹³

Pada penelitian ini kami akan menganalisis pengaruh pemberian propofol pada ekspresi kaspase 3 pada cedera kepala. Diharapkan pemberian propofol dapat menghambat ekspresi kaspase 3 sebagai penyebab apoptosis pada cedera

kepala, sehingga dapat dijadikan dasar pengobatan yang lebih efektif.

II. Subjek dan Metode

Penelitian ini termasuk eksperimental laboratorik dengan desain *randomized controlled trial* yang dengan tujuan mencari pengaruh pemberian propofol intravena pada mencit Balb/c dengan cedera kepala terhadap ekspresi kaspase 3 hipokampus sebagai indeks apoptosis.

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 6 bulan. Perlakuan pada mencit dilakukan di laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Setelah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta, dilakukan penakaran mencit dari galur Balb/c. Sampel yang dipakai pada penelitian ini adalah mencit Balb/c yang diberi perlakuan cedera kepala yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Pada penelitian ini memakai besar sampel minimal sebanyak 32 mencit. Kriteria Inklusi yaitu Mencit Balb/c jantan, umur dua sampai dua setengah bulan, berat badan 30-40 gram. Kriteria eksklusi yaitu mencit Balb/c sakit selama masa adaptasi 7 hari (gerakan tidak aktif).

Randomisasi dilakukan dengan membagi kelompok dibagi menjadi 4 yaitu kelompok kontrol (K1), perlakuan 1 (K2), perlakuan 2 (K3) dan perlakuan 3 (K4). Pembagian kelompok perlakuan: K1: kelompok kontrol; mencit Balb/c yang diberi perlakuan cedera kepala mendapat NaCl 0,9%. K2: kelompok perlakuan 1, mencit Balb/c yang diberi perlakuan cedera kepala mendapat propofol 10 mg/kgBB. K3: kelompok perlakuan 2, mencit Balb/c yang diberi perlakuan cedera kepala mendapat propofol 25 mg/kgBB. K4: kelompok perlakuan 3, mencit Balb/c yang diberi perlakuan cedera kepala mendapat propofol 50 mg/kgBB. Sesuai dengan penelitian sebelumnya, dosis obat yang diberikan disetarakan dengan dosis pada manusia dengan berat badan 70 kg, dikalikan dengan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026. Jadi dosis obat propofol yang diberikan pada masing-masing kelompok adalah propofol 1,8 mg (10 mg/kg x 0,0026); 4,5 mg (25 mg/kg x 0,0026); dan 9,1 mg (50 mg/kg x 0,0026).

Cara kerja prosedur pembuatan preparat histopatologi secara umum meliputi: fiksasi yaitu potongan jaringan organ dimasukkan ke dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium fosfat samapi mencapai pH 7,0). Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan ahuadest selama 1 jam untuk proses

penghilangan larutan fiksasi, dehidrasi potongan jaringan dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alcohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2x2 jam, Impregnasi jaringan dimasukkan dalam parafin cair selama 2x2 jam, embeding jaringan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56–58 C, ditunggu sampai parafin padat. Jaringan dalam parafin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca objek yang sebelumnya telah diolesi polisilin sebagai perekat. Jaringan pada kaca objek dipanaskan dalam inkubator suhu 56–58 C sampai parafin mencair.

Pewarnaan ganda kaspase-3 dilakukan dengan irisan beku otak tikus difiksasi dalam cairan *paraformaldehid* 4%. Setelah dicuci dalam PBS, irisan jaringan ditekan dengan H₂O₂ 3% dalam metanol pada temperatur ruangan. Kemudian irisan dicuci lagi dan diberi *blocking agent* (70µl; DAKO, Hamburg, Jerman). Selanjutnya, Irisan jaringan diinkubasi dengan antibodi pertama yang dilarutkan dalam *blocking agent (purified rabbit antiactive caspase-3 monoclonal antibody, Clone C92-605; BD Phramingen, San Jose, CA)*.

Setelah beberapa kali pencucian lagi dalam PBS, irisan diinkubasi selama 30 menit dengan antibodi kedua (Universal-LSAB TM Kit). Setelah dicuci dalam PBS, irisan otak dengan *Streptavidin-conjugated horseradish peroxidase* (Universal-LSAB TM kit) kemudian dicuci lagi dalam PBS. Irisan kemudian diwarnai dengan satu tetes *substrat chromogen* (DAKO) dan dibilas dengan air distilasi. Irisan dicuci dan kemudian diinkubasi dengan *mouse anti-neuronal nuclei monoclonal antibody NeuN*; (Chemicon International, Temecula, CA). Irisan dicuci sebelum diberi antibodi kedua (*biotinylated horse anti-mouse antibody*; Vector laboratoies, Burlingame, CA).

Kemudian irisan diinkubasi dengan *streptavidin conjugated alkaline* dan kemudian dicuci kembali. *Vector red alkaline phosphatase kit* (vector Laboratories) digunakan untuk mewarnai neuron merah. Terakhir, irisan dicounterstain dengan *Mayer Hematoxylin* dan didehidrasi dalam konsentrasi alkohol yang dinaikkan dan dipasangkan dengan *Roti Histokit* (roth, Kalsruhe, Jerman). Menggunakan mikroskop cahaya, sel-sel yang positif ganda yang mengaktifasi kaspase-3 dan NeuN dihitung di dalam *hippocampus*. Jumlahnya dibandingkan dengan jumlah total sel *hippocampus*.

Cara pengumpulan data masing-masing kelompok dilakukan pemeriksaan ekspresi kaspase 3 sebagai indeks apoptosis. Setelah data terkumpul dilakukan *data cleaning, coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dalam bentuk rerata, SD, median dan grafik dan uji hipotesis. Pada variabel bebas didapatkan skala pengukuran nominal yaitu diberi propofol dan tidak diberi propofol. Sedang pada variabel terikat untuk ekspresi kaspase 3 didapatkan skala pengukuran rasio. Data yang didapat, diuji normalitas. Pada distribusi normal, diuji beda dengan metode ANOVA, jika hasilnya ada perbedaan dilanjutkan *post hoc test*.

III. Hasil Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium histologi FK UNS dan patologi anatomi selama periode Desember 2012–Januari 2013. Penelitian ini merupakan uji klinis dengan *double blind randomized controlled trial* yang menggunakan mencit balb/c yang diberi perlakuan cedera kepala, kemudian dirandomisasi untuk kelompok kontrol (penambahan NaCl 0,9%) atau kelompok perlakuan (penambahan propofol 10 mg/kgbb, 25 mg/kgbb dan 50 mg/kgbb). Mencit balb/c yang akan diberi perlakuan cedera kepala dikarantina selama satu minggu dan diberi perawatan sama sampai berat mencapai lebih kurang 30–40 gram.

Enam jam sebelum perlakuan cedera kepala mencit balb/c dipuaskan. Mencit diberi perlakuan sama cedera kepala dengan model *weight drop* dimana beban 30 gram dijatuhkan dari ketinggian 80 cm, kemudian dikelompokkan menjadi empat kelompok, diberikan obat propofol dengan dosis yang berbeda serta kontrol dengan NaCl 0,9%, kemudian ditunggu 6 jam untuk reaksi biomolekuler.

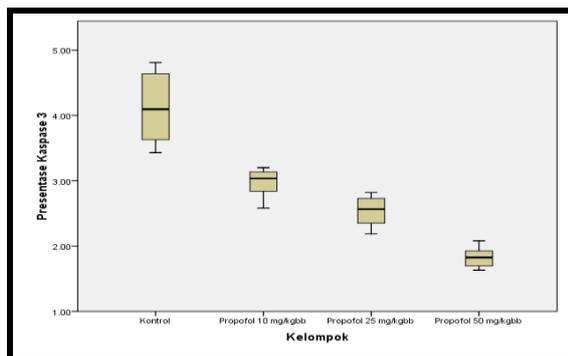
Setelah itu dilakukan euthanasia pada mencit dengan cara dekortikasi tulang belakang, kemudian dilakukan pembedahan dan organ hipokampus dimasukkan ke dalam larutan bufer. Penelitian dilanjutkan ke bagian patologi anatomi untuk pembuatan preparat dengan menggunakan pemeriksaan khusus immunohistokimia untuk melihat aktivasi ekspresi kaspase 3.

Ekspresi kaspase 3 dari tiap kelompok perlakuan dihitung dengan menggunakan metode modifikasi Gries dari Green et al dan Ding et al (2006). Pengecatan khusus dengan menggunakan ihc dan antibodi kaspase 3. Hasil reaksinya dibaca dengan alat mikroskop, kemudian dilakukan pemeriksaan ekspresi kaspase 3 hipokampus untuk tiap kelompok dihitung menggunakan persamaan regresi linier.

Tabel 1 Nilai Prsentase Ekspresi Kaspase 3 pada Hipokampus Mencit

Sampel	Kontrol	Propofol 10 mg/kgbb	Propofol 25 mg/kgbb	Propofol 50 mg/kgbb
1	4,81	2,58	2,19	1,87
2	3,43	3,03	2,82	1,63
3	4,65	2,90	2,52	1,96
4	4,15	3,09	2,61	1,76
5	3,54	3,18	2,38	1,89
6	3,72	3,04	2,79	1,63
7	4,04	2,78	2,67	1,78
8	4,63	3,20	2,32	2,08
Rerata	4,08	2,95	2,52	1,77

Hasil pengamatan rerata persentase ekspresi kaspase 3 hipokampus pada keempat kelompok menunjukkan persentase ekspresi kaspase 3 yang berbeda yaitu pada kelompok perlakuan 3 (K4) menunjukkan penurunan persentase ekspresi kaspase 3 yang paling banyak dibandingkan kelompok kontrol (K1).



Gambar 2 Grafik box lot rata persentase ekspresi kaspase 3

Dari grafik box-plot terlihat bahwa rerata persentase ekspresi kaspase 3 hipokampus kelompok K2 (Propofol 10 mg/kgBB), kelompok K3 (Propofol 25 mg/kgBB) dan kelompok K4 (Propofol 50 mg/kgBB) lebih rendah dibandingkan kelompok K1(kontrol).

Data yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan program SPSS versi 19 dalam sistem operasi windows XP. Untuk data kontinyu dianalisis menggunakan *One way Anova* untuk mendapatkan nilai mean dan standar deviasi serta nilai F dan nilai p.

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data parameter klinis atau laboratoris terdistribusi normal. Uji normalitas persentase kaspase 3 hipokampus dilakukan dengan tehnik Shapiro Wilk. Hasil uji normalitas persentase ekspresi kaspase 3 hipokampus ini terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2 Hasil Uji Normalitas Shapiro Wilk Persentase Ekspresi Kaspase 3

Kelompok	p	Interpretasi
Kontrol	0.417	normal
Propofol 10 mg/kgbb	0.324	normal
Propofol 25 mg/kgbb	0.515	normal
Propofol 50 mg/kgbb	0.428	normal

Persentase ekspresi kaspase 3 pada kelompok kontrol (K1), kelompok perlakuan 1 (K2), kelompok perlakuan 2 (K3) dan kelompok perlakuan 3 (K4) dengan teknik Shapiro Wilk menunjukkan distribusi data normal tabel 2. Analisa deskriptif menunjukkan bahwa rerata dan median aktivasi kaspase 3 pada ketiga kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol.

Uji beda mean dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan rata-rata yang bermakna persentase ekspresi kaspase 3 pada kelompok kontrol (K1), perlakuan 1 (K2) perlakuan 2 (K3), dan perlakuan 3 (K4). Uji beda ini dilakukan dengan menggunakan ANOVA dan kelompok perlakuan Shapiro Wilk dilanjutkan dengan uji hipotesis.

Tabel 3 Hasil Uji F (One way Anova) pada Mean Persentase Ekspresi Kaspase 3 pada 4 Kelompok Pemeriksaan

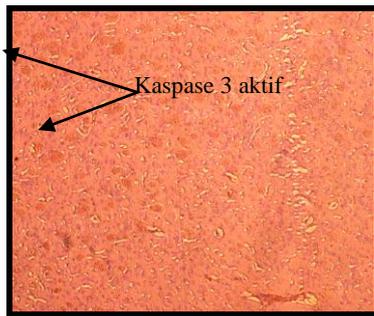
Kelompok	n	Mean	SD	F	p
Kontrol	8	4.08	0.53	60.95	<0.001
Propofol 10 mg/kgbb	8	2.95	0.24		
Propofol 25 mg/kgbb	8	2.61	0.33		
Propofol 50 mg/kgbb	8	1.77	0.14		

Uji homogenitas didapatkan data homogen dengan $p>0,05$ sehingga uji ANOVA yang didapatkan adalah valid. Uji ANOVA menunjukkan hasil signifikan ($p<0,001$) dengan interpretasi bahwa paling tidak, akan didapatkan perbedaan bermakna dari dua kelompok penelitian, uji statistik kemudian dilanjutkan uji *Post Hoc* dengan Tuckey (Tabel 3).

Tabel 4 Hasil Post Hoc test Tuckey tentang beda mean persentase ekspresi kaspase 3 hipokampus antar pasangan

Kelompok 1	Kelompok 2	Beda Mean	p
Kontrol	Propofol 10 mg/kgbb	1.14	<0.001
Kontrol	Propofol 25 mg/kgbb	1.47	<0.001
Kontrol	Propofol 50 mg/kgbb	2.31	<0.001
Propofol 10 mg/kgbb	Propofol 25 mg/kgbb	0.33	0.233
Propofol 10 mg/kgbb	Propofol 50 mg/kgbb	1.17	<0.001
Propofol 25 mg/kgbb	Propofol 50 mg/kgbb	0.84	<0.001

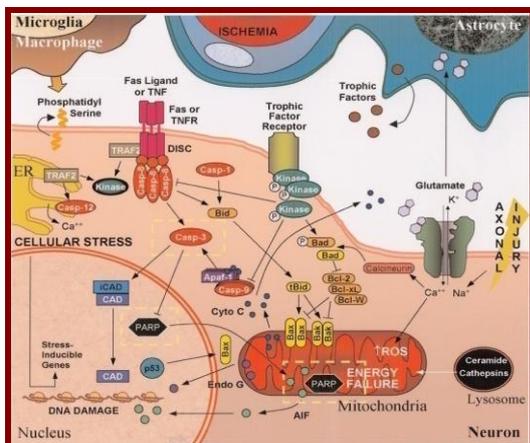
Persentase ekspresi kaspase 3 pada kelompok K1 (kontrol) dibanding dengan masing-masing kelompok perlakuan (K2, K3, K4) terdapat perbedaan bermakna dengan nilai tabel 4. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara persentase ekspresi kaspase 3 hipokampus pada kelompok perlakuan K2 dibandingkan perlakuan K3 ($p = 0,232$). Terdapat perbedaan bermakna persentase ekspresi kaspase 3 hipokampus antara kelompok perlakuan K2 dibandingkan kelompok perlakuan K4, dan pada kelompok perlakuan K3 dibandingkan perlakuan K4 dengan nilai $p < 0,001$.



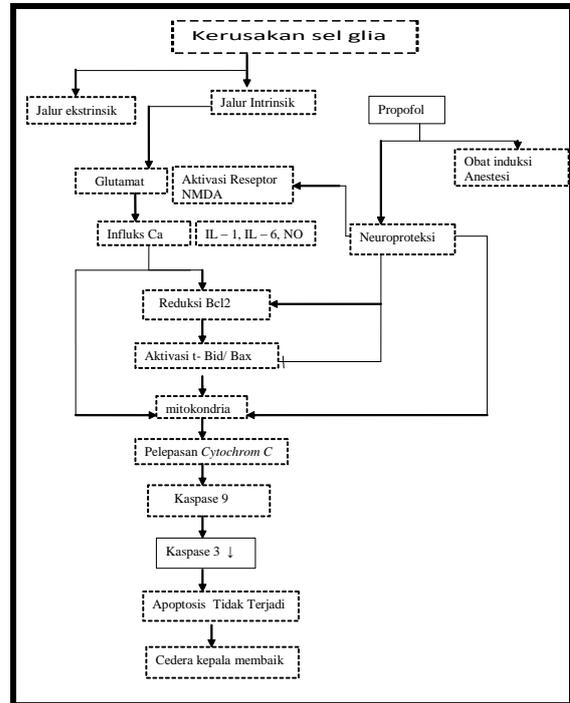
Gambar 3 Kaspase 3 dengan Pengecatan IHC

IV. Pembahasan

Dalam cedera otak terjadi proses biomolekuler dan biokimawi patologik yang dapat menyebabkan kerusakan sel, yakni berupa nekrosis maupun apoptosis. Kerusakan molekuler inilah yang mengakibatkan gejala disabilitas berkepanjangan, seperti gangguan kognisi berupa penurunan fungsi atensi, konsentrasi, dan memori. Semakin berat cedera yang dialami seseorang, semakin besar kerusakan baik sel neuron maupun sel glia sebagai jaringan penyangga. Akibatnya sekuele yang ditimbulkan semakin berkepanjangan, bahkan mudah terjadi kematian.



Gambar 1 Mekanisme kerusakan sel pada trauma kepala (Sumber: Haiyan, 2011)



Gambar 2 Mekanisme Kerusakan Sel pada Trauma Kepala

Apoptosis merupakan komponen dari rangkaian peristiwa setelah terjadi jejas trauma serebral dan salah satu jalur utama yang mendorong ke arah kematian sel. Beberapa studi menunjukkan bahwa apoptosis berkontribusi membentuk infark serebri dengan fragmentasi DNA melalui jalur mitokondria. Kelompok protein bcl-2 terlibat dalam jalur ini.¹²

Studi saat ini menunjukkan bahwa gen bcl-2 dapat mencegah apoptosis berbagai jenis sel yang diinduksi oleh berbagai jenis stimuli. Akan tetapi, bax menghasilkan sinyal kematian sel baik secara langsung maupun tidak langsung, dengan bcl-2 sebagai inhibitor bax paling dominan. Membran luar mitokondria menjadi permeabel seiring trauma serebral *induced* apoptosis dan mengawali perubahan level bax dan bcl-2. Melalui sebuah reaksi kaskade serial, terjadi aktivasi *cystein dependent aspartat* yang memerintahkan protease 3 (kaspase 3) dan menghasilkan terjadinya fragmentasi DNA.⁶ Pusat pada apoptosis yaitu kaspase yang berperan sebagai protein eksekutor, yang memutuskan sel untuk apoptosis.

Dari hasil penelitian didapatkan adanya persentase ekspresi kaspase 3 hipokampus lebih rendah pada ketiga kelompok perlakuan dibandingkan dengan

kelompok kontrol. Persentase ekspresi kaspase 3 pada kelompok K1 (kontrol) dibanding dengan masing-masing kelompok perlakuan (K2,K3,K4) terdapat perbedaan bermakna dengan nilai $p < 0,001$. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara persentase ekspresi kaspase 3 hipokampus pada kelompok perlakuan K2 dibandingkan kelompok perlakuan K3 ($p = 0,232$). Terdapat perbedaan bermakna persentase ekspresi kaspase 3 hipokampus antara kelompok perlakuan K2 dibandingkan kelompok perlakuan K4, dan pada kelompok perlakuan K3 dibandingkan kelompok perlakuan K4 dengan nilai $p < 0,001$. Pengaruh propofol terhadap persentase ekspresi kaspase 3 tergantung dari besar dosis.

Hasil tersebut sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya yaitu penelitian oleh Haiyan dkk melakukan penelitian efek propofol pada apoptosis korteks otak setelah fokal iskemik serebral dan reperfusi, studi ini menemukan bahwa propofol meningkatkan ekspresi gen anti-apoptosis *Bcl-2* dan menghambat gen proapoptosis *Bax* yang memicu aktivitas *caspase-3*. Hasil ini mengindikasikan bahwa jalur *Bcl-2/Bax/caspase-3* merupakan target penting propofol. Singkatnya, penemuan ini mengungkapkan bahwa propofol dapat menurunkan peroksidasi lipid dan apoptosis pada jejas fokal I/R serebral. Efek neuroproteksi ini mungkin berhubungan dengan inhibisi jalur *Bcl-2/Bax/ Caspase-3*.¹³

Propofol telah diajukan untuk mengurangi mekanisme *glutamate- mediated excitotoxic* dengan menurunkan aktivasi reseptor NMDA, mengurangi pelepasan glutamat, atau mengembalikan fungsi transporter yang bertanggungjawab terhadap uptake glutamat ke dalam sel neuron dan sel glia. Propofol menghambat pelepasan glutamat dengan menghalangi arus melalui kanal Na atau dengan mengaktivasi reseptor GABA. Akumulasi glutamat yang berlebihan di ekstraseluler yang disebabkan oleh hipoksia dalam sistem saraf pusat merupakan permulaan terjadinya kaskade apoptosis.

Mengikuti cedera kepala akut stres oksidatif dapat menyebabkan kematian sel neuron dengan memicu sejumlah respon detrimental seluler, termasuk hilangnya permeabilitas selektif ion dalam mitokondria, yang muncul sebagai salah satu regulator kaskade apoptosis. Propofol muncul untuk mencegah nekrosis daripada kematian sel apoptosis dalam eksperimen iskemik serebral. Propofol mempunyai mekanisme aksi seperti peningkatan *Bax* dan reduksi *Bcl 2* dicegah oleh propofol pada berbagai titik waktu. Di samping itu propofol juga dapat mencegah pembengkakan

mitokondria yang disebabkan oleh overload akut Ca^{+} pada mitokondria otak dalam potongan organotipik hipokampal.⁶

Di saat reseptor TNF famili, seperti Fas, terikat pada ligannya, seperti FasL akan menyebabkan trimerisasi dan membentuk formasi *death-induced signaling complex* (DISC), melibatkan suatu molekul adaptor yang juga mengandung death domain yaitu FADD, yang mengikat death domain yang teraktivasi tersebut dan juga mengikat prokaspase 8 melalui *death* efektor domain untuk membentuk DISC. *Death signal* kemudian ditransduksi dari DISC menjadi kaskade kaspase arus rendah. Di saat prokaspase 8 terpecah dan teraktivasi menjadi kaspase 8 aktif, dapat memecah dan mengaktifkan kaspase efektor arus rendah, seperti kaspase 3, yang memecah inhibitor *caspase-activated DNase* dan memecah DNA di dalam nukleus, dan terjadilah apoptosis.

Telah dilaporkan bahwa kematian sel saraf di parenkim terjadi pada mencit, mekanismenya dihubungkan dengan aktivasi kaspase 3. Dalam penelitian ini kaspase 3 diaktifkan oleh cedera kepala. Aktivasi kaspase 3 terhambat pada tiga kelompok perlakuan, propofol tergantung besar dosis. Hal ini menunjukkan bahwa propofol menurunkan kematian sel saraf yang disebabkan oleh cedera kepala. Dilaporkan pada dosis 30 mg/kgbb dan 100 mg/kgbb propofol dapat mengurangi edema otak dan memperbaiki *defisit neurologi*.

Persentase ekspresi kaspase 3 pada hipokampus yang lebih rendah tidak bermakna terlihat pada kelompok K2 (propofol 10 mg/kg) dan K3 (propofol 25 mg/kg). Kemungkinan propofol pada dosis tersebut telah menyebabkan reoksigenasi dan pengembalian pasokan oksigen yang lebih banyak daripada dosis 50 mg/kg.

Pada mencit yang telah mengalami cedera kepala kemungkinan telah terjadi keadaan hipoksia. Pemberian propofol 10 dan 25 mg/kg terjadi depresi napas sehingga proses hipoksia akan bertambah. Bila proses hipoksia terus berlanjut akan mengakibatkan iskemik jaringan. Efek iskemia adalah reversibel jika iskemia terjadi dalam waktu singkat, dimana sel dapat kembali menjadi normal setelah adanya reoksigenasi. Jika iskemia berlangsung lama, maka sel akan mengalami iskemia yang ireversibel dan terjadi nekrosis dan apoptosis walaupun telah terjadi reperfusi kembali melalui peningkatan pembentukan *reactive oxygen Species* (ROS). Selain itu, pada sel yang mengalami iskemia reperfusi terjadi penurunan perlindungan antioksidan dalam sel.¹²

Reperfusion injury mempunyai arti kerusakan jaringan yang disebabkan saat kembalinya aliran darah ke jaringan setelah periode iskemia. Tidak adanya oksigen dan nutrisi dari darah menciptakan kondisi dimana pemulihan sirkulasi menghasilkan kerusakan inflamasi dan oksidatif melalui induksi dari *oxydative stress* daripada pemulihan fungsi yang normal. Bila jaringan berada pada suatu kondisi iskemia, beberapa kejadian kimia akan dimulai sampai terjadinya disfungsi seluler dan nekrosis. Bila iskemia berakhir dengan pemulihan aliran darah, akan terjadi peristiwa lainnya yang menyebabkan *injury* tambahan. Maka, dimana terjadi penurunan atau gangguan aliran darah yang menyebabkan *injury*, disitu ada dua komponen yaitu *direct injury* yang terjadi selama periode iskemik dan *indirect* atau *reperfusion injury* yang mengikutinya.¹⁴

Keterbatasan Penelitian

Dalam melakukan penelitian ini, penulis memiliki beberapa keterbatasan yaitu: 1. dalam melakukan prosedur penelitian terkendala biaya, sehingga setiap sampel hanya dibuat satu slide. 2. fasilitas dan kondisi untuk penatalaksanaan jalan nafas pada hewan coba yang belum tersedia, sehingga penelitian hanya dapat dilakukan untuk satu kali pengamatan, 3. tidak diukurnya tingkat kesadaran pada hewan coba.

V. Simpulan

Penelitian ini menarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Terdapat pengaruh pemberian propofol terhadap persentase ekspresi kaspase 3 hipokampus.
2. Pemberian propofol dosis 10 mg, 25 mg dan 50 mg/kgbb intravena menunjukkan perbedaan bermakna pada persentase ekspresi kaspase 3 hipokampus dibanding kontrol pada mencit yang diberi cedera kepala.
3. Pemberian propofol dosis 50 mg/kgbb intravena merupakan dosis yang efektif untuk menurunkan persentase ekspresi kaspase 3 hipokampus pada mencit yang mengalami cedera kepala.

VI. Saran

Agar dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis propofol pada manusia terhadap penurunan persentase ekspresi kaspase 3 pada kondisi cedera kepala, sehingga diharapkan akan didapat hasil penelitian yang lebih baik dan bermanfaat dalam pengelolaan cedera kepala.

Daftar Pustaka

1. Dawodu ST. Definition, epidemiology, pathophysiology. Traumatic brain injury. Available from: URL: Dalam: Yadav RR, Talavera F, penyunting. 2005; diakses 15 Juli 2011.
2. McGarry LJ. Outcomes and costs of acute treatment of traumatic brain injury. Journal of traumatology critical care 2002; 45:1152-1159.
3. Salinas P. Closed head trauma. Traumatic brain injury. Available from: URL: Dalam: Penar PL, Talavera F, penyunting. 2006; Diakses 10 Oktober 2011.
4. Zauner A, Muizelaar JP. Brain metabolism and cerebral blood flow. Head injury. London: Chapman and Hall Medical; 2004, 229-36.
5. Pelinka LE, Kroepfl A. Glial fibrillary acidic protein in serum after traumatic brain injury. Dalam: Biochemical markers for brain damage. Available from: URL: <http://www.ijccm.org/article.asp?issn=0972-5229.2003>.
6. Abbas AK. Cellular and molecular immunology. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Company; 2006, 143-56
7. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Dalam: Cell 2004; 36:205-19.
8. Peter ME, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ 2003; 10:26-35.
9. Kresno SB. Imunologi: diagnosis dan prosedur laboratorium. 3th ed, Jakarta: Universitas Indonesia; 2003.
10. Moe GW, Marin J. In vivo TNF- α inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. AJP- Heart Circulatory Physiology 2004; 35: 90-95.
11. Lou A. Inhibition of caspase mediated apoptosis by peroxynitrite in traumatic brain injury. The Journal of neuroscience 2006; 45:95-98.
12. Chainlee Y. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. International Anesthesia Research. 2008; 36: 143-50.
13. Xu H, Zang C, Chunxiao Z. Effect of propofol pretreatment on apoptosis in rat brain cortex after focal cerebral ischemia and reperfusion. Neural Regeneration Research 2011; 6:90-97.
14. Jill W. Apoptosis and traumatic brain injury. Neurocritical care. Singapore: Departement of Neurosurgery; 2009.