



**PEMANFAATAN *ALPHA LIPOIC ACID* SEBAGAI INHIBITOR
DEGENERASI PROTEIN TAU DALAM UPAYA PREVENSI
*CHRONIC TRAUMATIC ENSEFALOPATHY***

SKRIPSI

Oleh

**Rudy Gunawan
NIM 142010101023**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**PEMANFAATAN *ALPHA LIPOIC ACID* SEBAGAI INHIBITOR
DEGENERASI PROTEIN TAU DALAM UPAYA PREVENSI
*CHRONIC TRAUMATIC ENSEFALOPATHY***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

Rudy Gunawan
NIM 142010101023

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas rahmat, hidayah, anugerah, dan kesempatan yang diberikan kepada saya;
2. Nabi Muhammad SAW sebagai junjungan dan tauladan;
3. Orang tua saya tercinta, Ayah Soleh dan Ibu Niswatin yang selalu memberikan bimbingan, kasih sayang, dan do'a tiada henti, serta pengorbanan yang dilakukan setiap waktu;
4. Kakak saya Mega Silvana dan Ratna Herlina serta Adik saya Ronaldo Maulana yang selalu memberikan saya semangat yang memotivasi saya;
5. Para guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadikan manusia yang berilmu dan bertakwa;
6. Keluarga besar angkatan 2014 Elixir Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
7. Keluarga besar *Student Research Center Revolution* Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
8. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu
dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.

(terjemahan Surat Al-Mujadalah ayat 11)*)



*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Surabaya: CV Pustaka Agung Harapan.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Rudy Gunawan

NIM : 142010101023

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Pemanfaatan *Alpha Lipoic Acid* sebagai Inhibitor Degenerasi Protein Tau dalam Upaya Prevensi *Chronic Traumatic Ensefalopathy*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 30 November 2017

Yang menyatakan,

Rudy Gunawan

NIM 142010101023

SKRIPSI

**PEMANFAATAN *ALPHA LIPOIC ACID* SEBAGAI INHIBITOR
DEGENERASI PROTEIN TAU DALAM UPAYA PREVENSI
*CHRONIC TRAUMATIC ENSEFALOPATHY***

Oleh

Rudy Gunawan
NIM 142010101023

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Bagus Hermasnyah, M.Biomed.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "Pemanfaatan *Alpha Lipoic Acid* sebagai Inhibitor Degenerasi Protein Tau dalam Upaya Prevensi *Chronic Traumatic Ensefalopathy*" karya Rudy Gunawan telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr. Hairrudin, M.Kes.
NIP 197510112003121008

dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed.
NIP 198212112008122002

Anggota II,

Anggota III,

dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D.
NIP 196909011999031003

dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed.
NIP 198304052008121001

Mengesahkan
Dekan,

dr. Enny Suswati, M.Kes.
NIP 197002141999032001

RINGKASAN

Pemanfaatan *Alpha Lipoic Acid* sebagai Inhibitor Degenerasi Protein Tau dalam Upaya Prevensi *Chronic Traumatic Ensefalopathy*; Rudy Gunawan, 142010101023; 2017: 56 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Chronic traumatic ensefalopathy (CTE) adalah sindrom neurodegeneratif progresif disebabkan oleh cedera berulang benda tumpul yang mengenai kepala. Berdasarkan studi epidemiologi dari 51 kasus neuropatologi sebanyak 46 kasus positif CTE yaitu 39 petinju, 5 pemain rugby, 1 pegulat, dan 1 pemain sepak bola. Tau adalah protein yang dapat membantu menstabilkan dan mendukung struktur tertentu dalam sel-sel otak, termasuk sel-sel dari sistem transportasi interna pada otak. Cedera kepala berulang dapat menyebabkan degenerasi protein tau. Degenerasi tersebut melalui dua jalur yaitu: (1) krisis energi seluler mengakibatkan peningkatan kebutuhan glukosa pada otak namun pasokan glukosa otak tidak mencukupi; (2) imunotoksisitas mengaktifkan sinyal-sinyal pro-inflamasi yang menyebabkan neurotoksisitas menyerang neuron. *Alpha lipoic acid* (ALA) adalah salah satu senyawa antioksidan yang mampu mengikat radikal bebas dan meregenerasi antioksidan vitamin C, vitamin E, dan koenzim Q 10.

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) secara *in vivo* dengan rancangan *post test only randomized control group design*. Sampel penelitian ini ialah tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*). Jumlah sampel penelitian sebanyak 28 ekor yang dibagi menjadi tujuh kelompok. Kelompok pertama merupakan kelompok normal tanpa perlakuan, kelompok kedua merupakan kontrol negatif diberi perlakuan cedera kepala berulang dan NaCl 1,5 ml, kelompok ketiga merupakan kontrol positif diberi perlakuan cedera kepala berulang dan terapi standar *citicoline* 6,75 mg, dan kelompok A sampai D diberikan perlakuan cedera kepala berulang dan *alpha lipoic acid* dengan dosis berturut-turut 1,0125 mg, 2,025 mg, 4,05 mg, dan 8,1 mg.

Data yang diambil berupa skor degenerasi protein tau. Hasil rata-rata degenerasi protein tau yang didapatkan pada kontrol normal sebesar $53,25 \pm 43,39$, kontrol negatif sebesar $165 \pm 49,82$, dan kontrol positif sebesar $124 \pm 39,01$. Hasil rata-rata degenerasi protein tau yang didapatkan pada kelompok perlakuan dengan dosis 1,0125 mg sebesar $190,25 \pm 26,89$, dosis 2,025 mg sebesar $148,5 \pm 57,56$, dosis 4,05 mg sebesar $133,5 \pm 34,14$, dan dosis 8,1 mg sebesar $63 \pm 14,58$.

Data hasil rata-rata degenerasi protein tau dianalisis persebaran data dan homogenitasnya menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan *Levene's test*. Hasil kedua analisis tersebut menunjukkan bahwa $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan data terdistribusi normal dan memiliki varian yang sama. Hasil rata-rata degenerasi protein tau dianalisis dengan *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar kelompok dan didapatkan nilai signifikansi $p = 0,001$. Uji lanjutan LSD digunakan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, dari hasil uji LSD didapatkan sebagian besar kelompok berbeda signifikan terhadap kelompok normal kecuali kelompok D.

Cedera kepala pada penelitian ini menyebabkan terjadinya degenerasi protein tau. Kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif tidak menunjukkan perbedaan signifikan. Hal ini menunjukkan kelompok kontrol positif dengan dosis *citicoline* 6,75 mg tidak mampu menghambat progresivitas degenerasi protein tau. Kelompok A, B, dan C tidak menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan kelompok A, B, dan C dengan dosis ALA sebesar 1,0125 mg, 2,025 mg, dan 4,05 mg tidak mampu menghambat progresivitas degenerasi protein tau. Kelompok D menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok kontrol negatif dan positif, tetapi tidak menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok normal. Hal ini menunjukkan kelompok D dengan dosis ALA 8,1 mg mampu menghambat progresivitas degenerasi protein tau karena memiliki hasil rata-rata skor degenerasi protein tau hampir mendekati kelompok normal, dan dosis ALA 8,1 mg lebih baik dari dosis *citicoline* 6,75 mg. Kelompok D menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok A. Hal ini menunjukkan semakin besar dosis yang diberikan semakin rendah hasil rata-rata skor degenerasi protein tau.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Pemanfaatan *Alpha Lipoic Acid* sebagai Inhibitor Degenerasi Protein Tau dalam Upaya Prevensi *Chronic Traumatic Ensefalopathy*". Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga dalam proses penyusunan skripsi ini;
3. dr. Hairrudin, M.Kes. selaku penguji I dan dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed. selaku penguji II yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga dalam proses penyusunan skripsi ini;
4. dr. Rosita Dewi dan dr. Sheila Rahmania selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
5. Orang tua saya tercinta, Ayah Soleh dan Ibu Niswatin yang selalu memberikan bimbingan, kasih sayang, dan do'a tiada henti, serta pengorbanan yang dilakukan setiap waktu;
6. Kakak saya Mega Silvana dan Ratna Herlina serta Adik saya Ronaldo Maulana yang selalu memberikan saya semangat yang memotivasi saya;
7. Sahabat-sahabatku Dutya Intan Larasati, Rifqi Rahadian, Kesy Sasta Handani, Ferry Fitriya Ayu Andika, Herlin Karismaningtyas, Nastiti Bakti Utami, Gusfita Trisna Ayu Putri, Nadia Jean Romadhon, dan Khanif Muflikhatun yang telah memberikan dukungan dan motivasi dalam penyelesaian skripsi ini;

8. Analisis Laboratorium Farmakologi dan Fisiologi Sumadi, Amd., Lilik Maslian, Amd. dan Analisis Laboratorium Patologi Anatomi Liliek Susilowati, Amd.;
9. Keluarga besar angkatan 2014 Elixir Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
10. Keluarga besar *Student Research Center Revolution* Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
11. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 30 November 2017

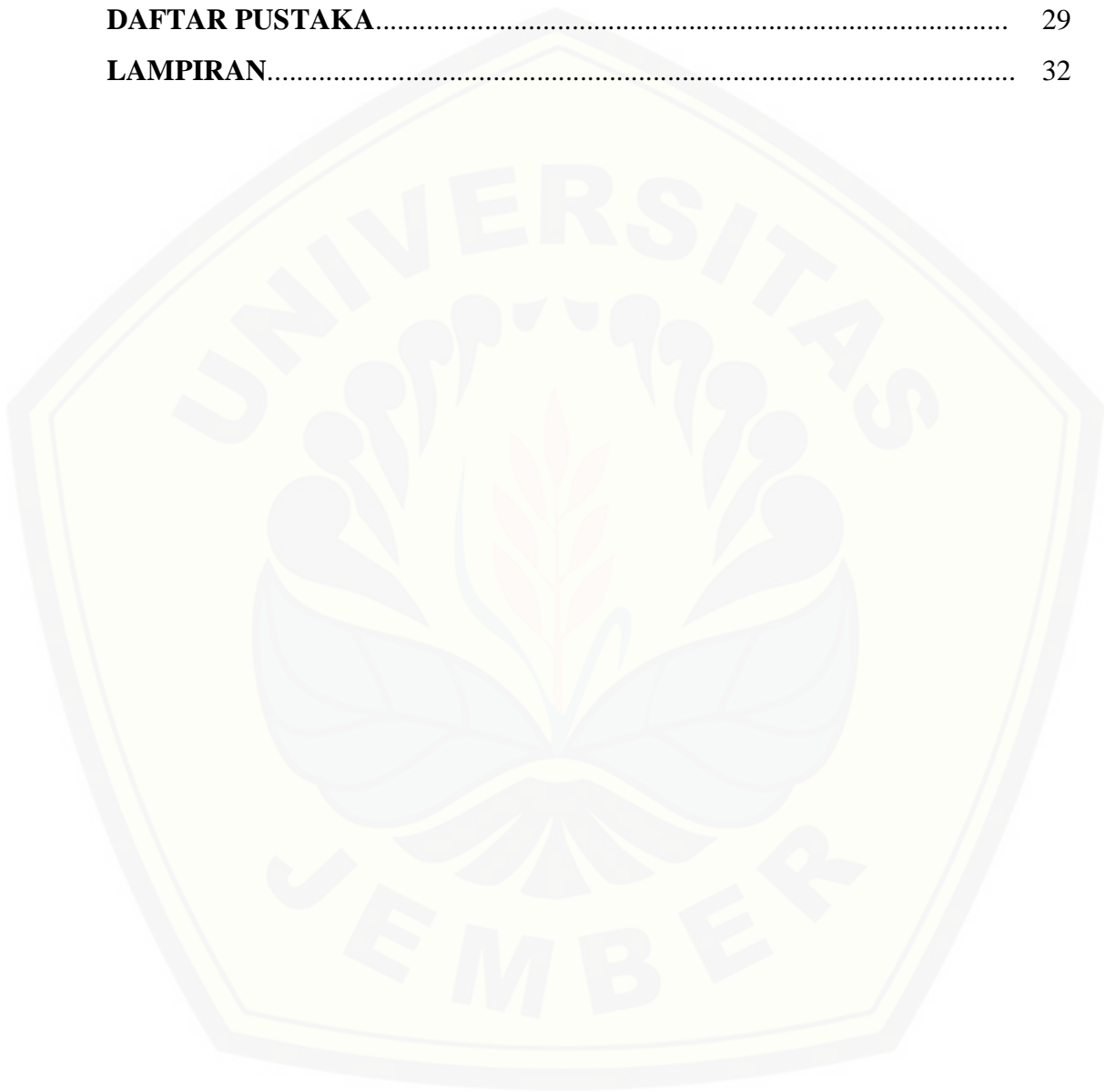
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMBUT.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTTO.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN BIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Chronic Traumatic Ensefalopathy</i>.....	4
2.1.1 Definisi <i>Chronic Traumatic Ensefalopathy</i>	4
2.1.2 Epidemiologi <i>Chronic Traumatic Ensefalopathy</i>	4
2.1.3 Etiologi <i>Chronic Traumatic Ensefalopathy</i>	5
2.1.4 Patogenesis <i>Chronic Traumatic Ensefalopathy</i>	5
2.1.5 Manifestasi Klinik <i>Chronic Traumatic Ensefalopathy</i>	6
2.1.6 Diagnosis <i>Chronic Traumatic Ensefalopathy</i>	6
2.1.7 Pengobatan <i>Chronic Traumatic Ensefalopathy</i>	7
2.2 <i>Alpha Lipoic Acid</i>.....	7
2.2.1 Klasifikasi <i>Alpha Lipoic Acid</i>	7

2.2.2 Mekanisme Kerja <i>Alpha Lipoic Acid</i>	8
2.3 Kerangka Konsep Penelitian	10
2.4 Hipotesis	11
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Jenis Penelitian	12
3.2 Rancangan Penelitian	12
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.4 Sampel Penelitian	13
3.5 Variabel Penelitian	14
3.5.1 Variabel Bebas.....	14
3.5.2 Variabel Terikat.....	14
3.5.3 Variabel Luar.....	14
3.6 Definisi Operasional	15
3.6.1 <i>Chronic Traumatic Ensefalopathy</i>	15
3.6.2 Dosis <i>Alpha Lipoic Acid</i>	15
3.6.3 Dosis <i>Citicoline</i>	15
3.6.4 Degenerasi Protein Tau.....	15
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	16
3.8 Prosedur Penelitian	16
3.8.1 <i>Ethical Clearance</i>	16
3.8.2 Adaptasi dan Perawatan Hewan Coba.....	16
3.8.3 Perlakuan Cedera Kepala Berulang pada Hewan Coba.....	17
3.8.4 Pemberian <i>Alpha Lipoic Acid</i> dan <i>Citicoline</i> pada Hewan Coba.....	17
3.8.5 Pembuatan Preparat Imunohistokimia.....	18
3.8.6 Pengamatan Imunohistokimia.....	19
3.9 Analisis Data	19
3.10 Alur Penelitian	20
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil	21

4.2 Pembahasan.....	25
BAB 5. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	28
5.2 Saran.....	28
DAFTAR PUSTAKA.....	29
LAMPIRAN.....	32

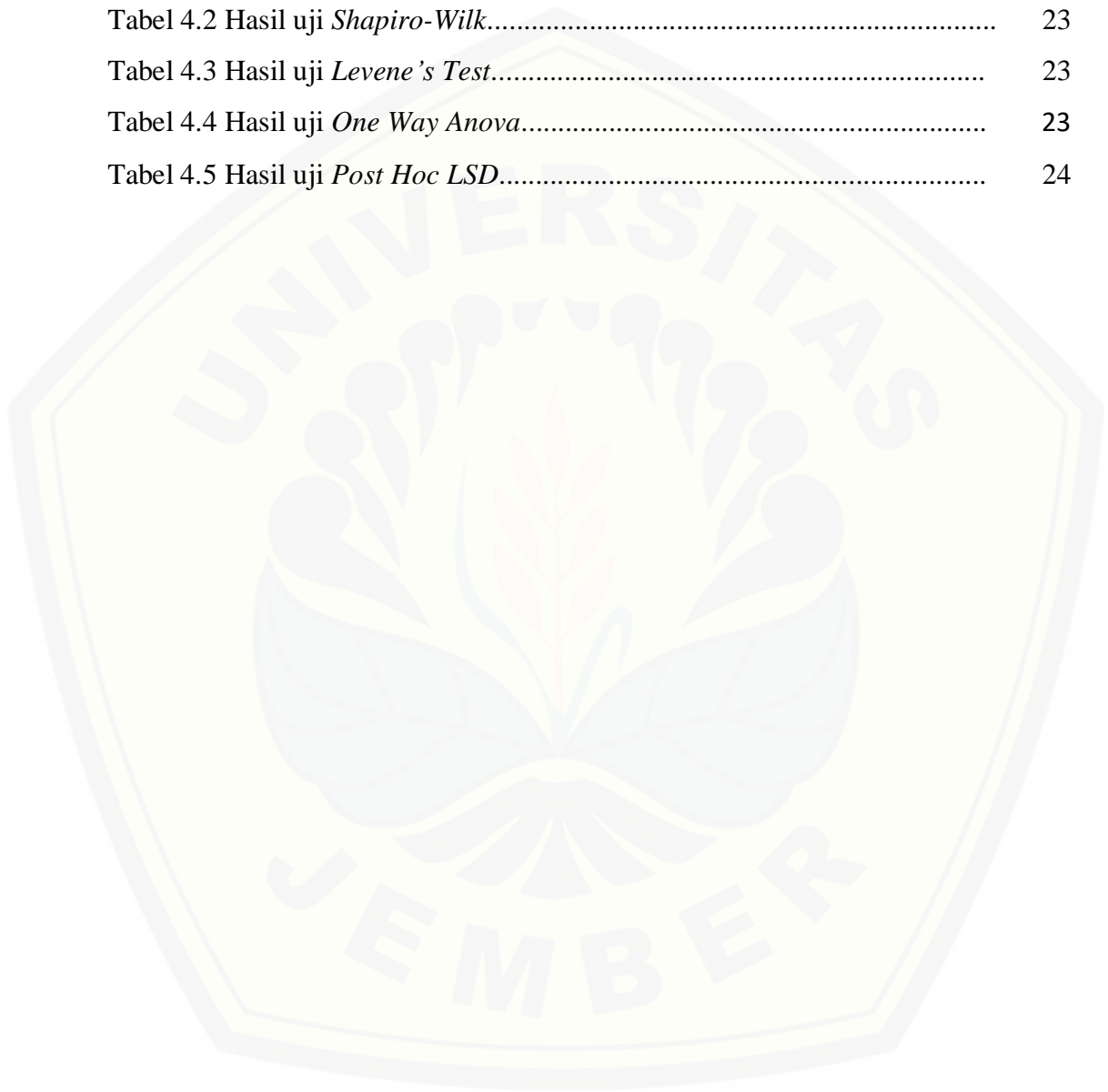


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur kimia <i>alpha lipoic acid</i>	8
Gambar 2.2 Mekanisme kerja <i>alpha lipoic acid</i>	9
Gambar 2.3 Kerangka konsep penelitian.....	10
Gambar 3.1 Rancangan penelitian.....	12
Gambar 3.2 Alat cedera kepala.....	17
Gambar 3.3 Alur penelitian.....	20
Gambar 4.1 Gambaran degenerasi protein tau jaringan otak.....	21
Gambar 4.2 Rata-rata skor degenerasi protein tau tiap kelompok	24

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Rata-rata dan standar deviasi skor degenerasi protein tau tiap kelompok.....	22
Tabel 4.2 Hasil uji <i>Shapiro-Wilk</i>	23
Tabel 4.3 Hasil uji <i>Levene's Test</i>	23
Tabel 4.4 Hasil uji <i>One Way Anova</i>	23
Tabel 4.5 Hasil uji <i>Post Hoc LSD</i>	24



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Lembar Persetujuan Etik.....	32
Lampiran A.1a Halaman Pertama Lembar Persetujuan Etik.....	32
Lampiran A.1b Halaman Kedua Lembar Persetujuan Etik.....	33
Lampiran B. Perhitungan Dosis Hewan Coba.....	34
Lampiran C. Dokumentasi Penelitian.....	35
Lampiran D. Data Penelitian.....	36
Lampiran E. Analisis Data.....	37
Lampiran E.1 Uji Normalitas dan Homogenitas.....	37
Lampiran E.2 Uji <i>One Way Anova</i>	37
Lampiran E.3 Uji <i>Post Hoc LSD</i>	38

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Chronic traumatic encephalopathy (CTE) adalah sindrom neurodegeneratif progresif yang disebabkan oleh cedera benda tumpul yang mengenai kepala secara tunggal, episodik, atau berulang dan transfer kekuatan akselerasi perlambatan ke otak (Omalu *et al.*, 2011). Penyakit tersebut ditandai dengan atrofi belahan otak, lobus temporal medial, talamus, badan mamilari, batang otak, dengan dilatasi ventrikel dan fenestrasi *cavum septum pellucidum*. Berdasarkan studi epidemiologi dari 51 kasus neuropatologi sebanyak 46 kasus positif CTE yaitu 39 petinju, 5 pemain rugby, 1 pegulat, dan 1 pemain sepak bola (McKee *et al.*, 2009). Atrofi sebagian otak mengakibatkan disfungsi kognitif dengan kehilangan memori episodik dan fungsi eksekutif, selanjutnya akan mengakibatkan penyakit pada anggota gerak, berbicara, dan kelainan okular seiring dengan semakin buruknya tingkah laku (Gavett *et al.*, 2011).

Tau adalah suatu protein penting di otak. Protein ini berfungsi mengikat dan menstabilkan mikrotubul, organel yang mendukung transportasi sepanjang akson, glikoprotein, neurotransmitter, dan segala yang berhubungan dengan sistem transportasi interna sel (Kumar *et al.*, 2010). Cedera kepala berulang dapat menyebabkan degenerasi protein tau. Degenerasi tersebut melalui dua jalur yaitu: (1) krisis energi seluler mengakibatkan peningkatan kebutuhan glukosa pada otak namun pasokan glukosa otak tidak mencukupi; (2) imunotoksisitas mengaktifkan sinyal-sinyal pro-inflamasi yang menyebabkan neurotoksisitas menyerang neuron (Cyrus *et al.*, 2016; William *et al.*, 2015). Degenerasi protein tau menyebabkan protein tau gagal melipat sehingga protein tau terlepas ke dalam sel kemudian mengaktifkan reaksi berantai radikal bebas yang menyebabkan kematian neuron menyebar ke sel-sel di dekatnya semakin progresif (McKee *et al.*, 2013). Degenerasi protein tau dapat dilihat dari gambaran imunohistokimia otak (Loeffler *et al.*, 2015).

Pencegahan CTE selama ini hanya memakai helm sebagai alat pelindung diri pada benturan kepala seperti pada permainan rugby atau hoki, tetapi pemakaian alat pelindung kepala belum efektif dan tidak bisa meminimalisir terjadinya CTE. Hal ini terjadi karena benturan yang mampu dikompensasi manusia sebesar 60 *Gforce*, sedangkan benturan yang dialami para atlet lebih dari 60 *Gforce* bahkan sampai 100 *Gforce* (Cussimano *et al.*, 2010).

Penatalaksanaan dari cedera kepala selama ini juga menggunakan *citicoline* sebagai neuroprotektor yang mampu memberikan efek perbaikan saraf, perbaikan kognitif, dan mengikat radikal bebas pasca cedera kepala, namun *citicoline* tidak bisa menghambat hiperfosforilasi protein tau sehingga perlu mekanisme lain untuk menghambat jalur tersebut (Firooz *et al.*, 2015; Julio, 2014; Ali *et al.*, 2017).

Alpha lipoic acid (ALA) adalah molekul disulfida alami dengan sifat antioksidan dan antiinflamasi, sebelum menjadi antioksidan poten ALA direduksi oleh enzim tertentu untuk menjadi *dihidro alpha lipoic acid* (DHLA) yakni bentuk aktif antioksidan yang bermanfaat bagi tubuh. Zat tersebut berfungsi untuk menghambat stres oksidatif dengan cara mengurangi aktivitas *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase* (NOX), *phox stands 22 for phagocytic oxidase* (p22phox) dan hiperfosforilasi protein tau penyebab radikal bebas. Zat tersebut tidak melewati membran mitokondria sehingga menargetkan aktivitas *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) membran plasma. Meskipun mekanisme ini tidak sepenuhnya diketahui, ALA dapat mengurangi radikal bebas yang menjadi racun bagi tubuh dan mengurangi aktivitas hiperfosforilasi yang mengakibatkan degenerasi protein tau. Berdasarkan hal tersebut ALA berpotensi mencegah terjadinya CTE di masa depan (Lucke *et al.*, 2015). Penelitian tentang pemanfaatan ALA sebagai inhibitor degenerasi protein tau pada CTE masih terbatas. Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk meneliti “Pemanfaatan *Alpha Lipoic Acid* sebagai Inhibitor Degenerasi Protein Tau dalam Upaya Prevensi *Chronic Traumatic Ensefalopathy*”.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian *alpha lipoic acid* mampu menghambat progresivitas degenerasi protein tau pada gambaran imunohistokimia otak hewan coba?

1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui efektivitas pemberian *alpha lipoic acid* dalam menghambat progresivitas degenerasi protein tau pada gambaran imunohistokimia otak hewan coba.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Dapat dijadikan landasan teori dan sebagai dasar pengembangan penelitian selanjutnya khususnya dalam bidang kesehatan.
2. Membantu masyarakat dan pemerintah dalam mencari solusi untuk menurunkan prevalensi *chronic traumatic encephalopathy* di Indonesia.
3. Memberikan masukan kepada pemerintah (Kementerian Kesehatan) agar dapat melakukan pengembangan dalam skala besar terhadap pemanfaatan *alpha lipoic acid* sebagai antioksidan untuk mencegah *chronic traumatic encephalopathy*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Chronic Traumatic Ensefalopathy*

2.1.1 Definisi *Chronic Traumatic Ensefalopathy*

Chronic traumatic ensefalopathy (CTE) adalah sindrom neurodegeneratif progresif yang disebabkan oleh cedera benda tumpul yang mengenai kepala secara tunggal, episodik, atau berulang dan transfer kekuatan akselerasi perlambatan ke otak (Omalu *et al.*, 2011). Penyakit tersebut sering ditemukan pada kasus olahraga yang mengalami benturan kepala berulang seperti tinju, rugby, hoki, gulat, dan sepak bola yang membuat perubahan neurodegeneratif. Penyakit tersebut ditandai dengan atrofi belahan otak, lobus temporal medial, talamus, badan mamilari, batang otak, dengan dilatasi ventrikel dan fenestrasi *cavum septum pellucidum* (Omalu *et al.*, 2011). Perubahan patologi pada otak ternyata berdampak pada perubahan disfungsi kognitif dengan kehilangan memori episodik dan fungsi eksekutif, selanjutnya akan mengakibatkan penyakit pada anggota gerak, berbicara, dan kelainan okular seiring dengan semakin buruknya tingkah laku (Gavett *et al.*, 2011).

2.1.2 Epidemiologi *Chronic Traumatic Ensefalopathy*

Kasus CTE merupakan suatu fenomena gunung es karena diagnosis CTE baru bisa ditegakkan dengan *post mortem*. Diagnosis CTE ditegakkan dengan cara melihat potongan histopatologi otak yang mengalami degenerasi protein tau. Kasus CTE selama ini sering salah didiagnosis dengan alzheimer (McKee *et al.*, 2009). Kasus CTE diperkirakan mencapai 1,6 juta sampai 3,8 juta terjadi di dunia olahraga setiap tahunnya (Cyrus *et al.*, 2016). Hal ini terjadi pada olahraga yang mengalami benturan kepala secara berulang. Berdasarkan studi epidemiologi dari 51 kasus neuropatologi sebanyak 46 kasus positif CTE yaitu 39 petinju, 5 pemain rugby, 1 pegulat, dan 1 pemain sepak bola (McKee *et al.*, 2009).

2.1.3 Etiologi *Chronic Traumatic Ensefalopathy*

Chronic Traumatic Ensefalopathy adalah sindrom neurodegeneratif progresif yang disebabkan cedera benda tumpul yang mengenai kepala secara tunggal, episodik, atau berulang dan transfer kekuatan akselerasi perlambatan ke otak (Omalu *et al.*, 2011). Pencegahan CTE selama ini hanya memakai helm sebagai alat pelindung diri pada benturan kepala seperti pada permainan rugby atau hoki, tetapi pemakaian alat pelindung kepala belum efektif dan tidak bisa meminimalisir terjadinya CTE. Hal ini terjadi karena benturan yang mampu dikompensasi manusia sebesar 60 *Gforce*, sedangkan benturan yang dialami para atlet lebih dari 60 *Gforce* bahkan sampai 100 *Gforce* (Cussimano *et al.*, 2010).

2.1.4 Patogenesis *Chronic Traumatic Ensefalopathy*

Cedera kepala berulang terbukti menimbulkan degenerasi protein tau. Degenerasi tersebut melalui dua jalur yaitu krisis energi seluler dan imunotoksisitas. Selain degenerasi protein tau juga terbentuk radikal bebas *reactive oxygen species* (ROS) akibat cedera kepala berulang (Lucke *et al.*, 2015).

Cedera kepala berulang dapat menyebabkan pergeseran akson sehingga akson mengalami peningkatan pengeluaran ion kalium dan peningkatan masuknya ion kalsium. Peningkatan masuknya kalsium membuat depolarisasi neuron dan perubahan fisiologi fungsional. Perubahan fungsional tersebut membuat tubuh mengukur ulang potensi neuron, pompa $\text{Na}^+ \text{K}^-$ terlalu aktif, dan lebih banyak mengonsumsi *adenosine triphosphat* (ATP), karena jumlah ATP yang lebih tinggi dibutuhkan, area otak yang terkena dampak meningkatkan permintaan glukosa lebih banyak yang bisa jauh lebih tinggi daripada pasokan glukosa yang ada. Perbedaan antara kebutuhan dan pasokan glukosa di tubuh membuat krisis energi seluler yang dapat memperburuk efek pukulan ke kepala di masa depan dengan menghambat respons pemulihan yang kurang memadai. Peningkatan masuknya kalsium telah terbukti berkorelasi dengan pelepasan *caspase-7* dan *caspase-12*. Kedua jalur tersebut dapat memainkan peran dalam apoptosis yang tergantung pada kalsium dan juga bisa memacu hiperfosforilasi protein tau (Cyrus *et al.*, 2016; William *et al.*, 2015).

Imunotoksitas adalah mekanisme sentral yang mendorong CTE. Mekanisme tersebut disebabkan oleh aktivasi mikroglia dari cedera kepala berulang. Mikroglia yang diaktivasi meningkatkan pelepasan sitokin pro-inflamasi, kemokin dan tiga eksitotoksin glutamat, aspartat, dan asam kuinolinat. Sinyal pro-inflamasi lebih banyak terjadi secara langsung mengikuti cedera kepala berulang, sementara sinyal anti-inflamasi dilepaskan kemudian. Adanya sinyal pro-inflamasi bisa menjadi gangguan jika cedera kepala terus terjadi karena mikroglia tetap dalam keadaan teraktivasi. Selama keadaan aktif ini, mikroglia terus mengeluarkan eksitotoksin saat merekrut astrosit sebagai reservoir utama glutamat dan aspartat. Eksitotoksin dilepaskan dari astrosit dan mikroglia selanjutnya merangsang neuron yang menyebabkan konsentrasi neurotoksik, kerentanan yang lebih besar terhadap cedera neuron, dan kecenderungan yang lebih besar untuk meningkatkan hiperfosforilasi protein tau (Cyrus *et al.*, 2016; William *et al.*, 2015). Degenerasi protein tau tidak hanya menyebabkan CTE, tetapi bisa menyebabkan penyakit lain seperti alzheimer (Kumar *et al.*, 2010)

2.1.5 Manifestasi Klinik *Chronic Traumatic Ensefalopathy*

Chronic traumatic ensefalopathy pada pemeriksaan makros patologi otak ditandai dengan atrofi belahan otak, lobus temporal medial, talamus, badan mamilari, batang otak, dengan dilatasi ventrikel dan fenestrasi *cavum septum pellucidum*. Atrofi dari sebagian otak mengakibatkan disfungsi kognitif dengan kehilangan memori episodik dan fungsi eksekutif, selanjutnya akan mengakibatkan penyakit pada anggota gerak, berbicara, dan kelainan okular seiring dengan semakin buruknya tingkah laku (Gavett *et al.*, 2011).

2.1.6 Diagnosis *Chronic Traumatic Ensefalopathy*

Diagnosis CTE ditegakkan berdasarkan pemeriksaan *post mortem* dengan dua metode yaitu: (1) pemeriksaan makroskopis akan ditemukan atrofi belahan otak, lobus temporal medial, talamus, badan mamilari, batang otak, dengan dilatasi ventrikel dan fenestrasi *cavum septum pellucidum* (McKee *et al.*, 2009; Gavett *et al.*, 2011); (2) pemeriksaan mikroskopis akan ditemukan degenerasi

protein tau. Pada pemeriksaan mikroskopis terdapat empat skor yaitu: (1) skor 1 titik-titik degenerasi protein tau terakumulasi di area kortek otak; (2) skor 2 beberapa titik-titik degenerasi protein tau muncul di sulkus kortikal dan protein tau mulai bermigrasi; (3) skor 3 titik-titik degenerasi protein tau mulai membaaur satu sama lain, muncul lebih difus, sepanjang kortek otak, dan tau mulai terakumulasi di hipokampus; (4) skor 4 degenerasi protein tau mulai menyebar sampai ke medula spinalis (McKee *et al.*, 2009; Gavett *et al.*, 2011)

2.1.7 Pengobatan *Chronic Traumatic Ensefalopathy*

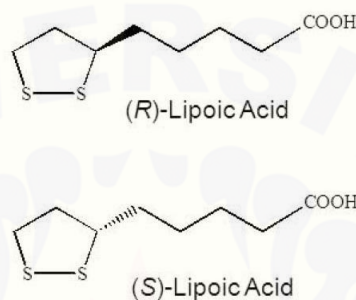
Pengobatan saat ini sebatas pencegahan untuk menghindari beberapa benturan kepala pada olahraga yang meningkatkan faktor risiko CTE (McKee *et al.*, 2009; Gavett *et al.*, 2011). Pengobatan untuk mengatasi perubahan tingkah laku yang diakibatkan oleh CTE ialah *lithium* untuk memperbaiki tingkah laku dan membuat pasien CTE tenang (Omalu *et al.*, 2005).

2.2 *Alpha Lipoic Acid*

2.2.1 Klasifikasi *Alpha Lipoic Acid*

Alpha lipoic acid juga dikenal sebagai *1,2-dithiolane-3-pentanoic acid* atau asam *thioctic*, memiliki satu pusat kiral di kedua struktur enansiomer R dan S (Gambar 2.1), namun hanya R-LA terkonjugasi yang meresidu lisin dalam hubungan amida, sehingga membuat isoform ini penting sebagai kofaktor dalam sistem biologi (Shay *et al.*, 2009). *Alpha lipoic acid* berfungsi sebagai E2 subunit kofaktor dari piruvat dehidrogenase kompleks dan α -ketoglutarat dehidrogenase dan merupakan pengikat ampuh radikal hidroksil, radikal superoksida, radikal peroksil, oksigen tunggal, dan nitrat oksida. *Alpha lipoic acid* juga meregenerasi antioksidan endogen seperti koenzim Q10, vitamin C, vitamin E, glutation, *chelating* logam ion dan perbaikan protein teroksidasi. *Alpha lipoic acid* direduksi oleh enzim sitosol GSH-reduktase, thioredoxin reduktase, dan E3 mitokondria enzim dihidrolipoil dehidrogenase. Enzim E3 mitokondria mereduksi ALA menjadi DHLA dengan mengorbankan NADPH. *Alpha lipoic acid* merupakan substrat untuk enzim NADPH-dependent GSH-reduktase (Kim *et al.*, 2011).

Alpha lipoic acid umumnya ditemukan dalam komponen makanan seperti bayam, brokoli, tomat dan daging. *Alpha lipoic acid* disintesis melalui reaksi enzimatik pada tanaman dan mitokondria hewan dari asam oktanoat dan sistein. Sebagai zat yang mengandung sulfur, ALA disebut juga senyawa tiol. Sel mamalia dapat mensintesis ALA melalui aksi mitokondria asam lipoat sintase yang dapat turun dalam kondisi klinis yang berbeda (Gomes dan Negrato, 2014).

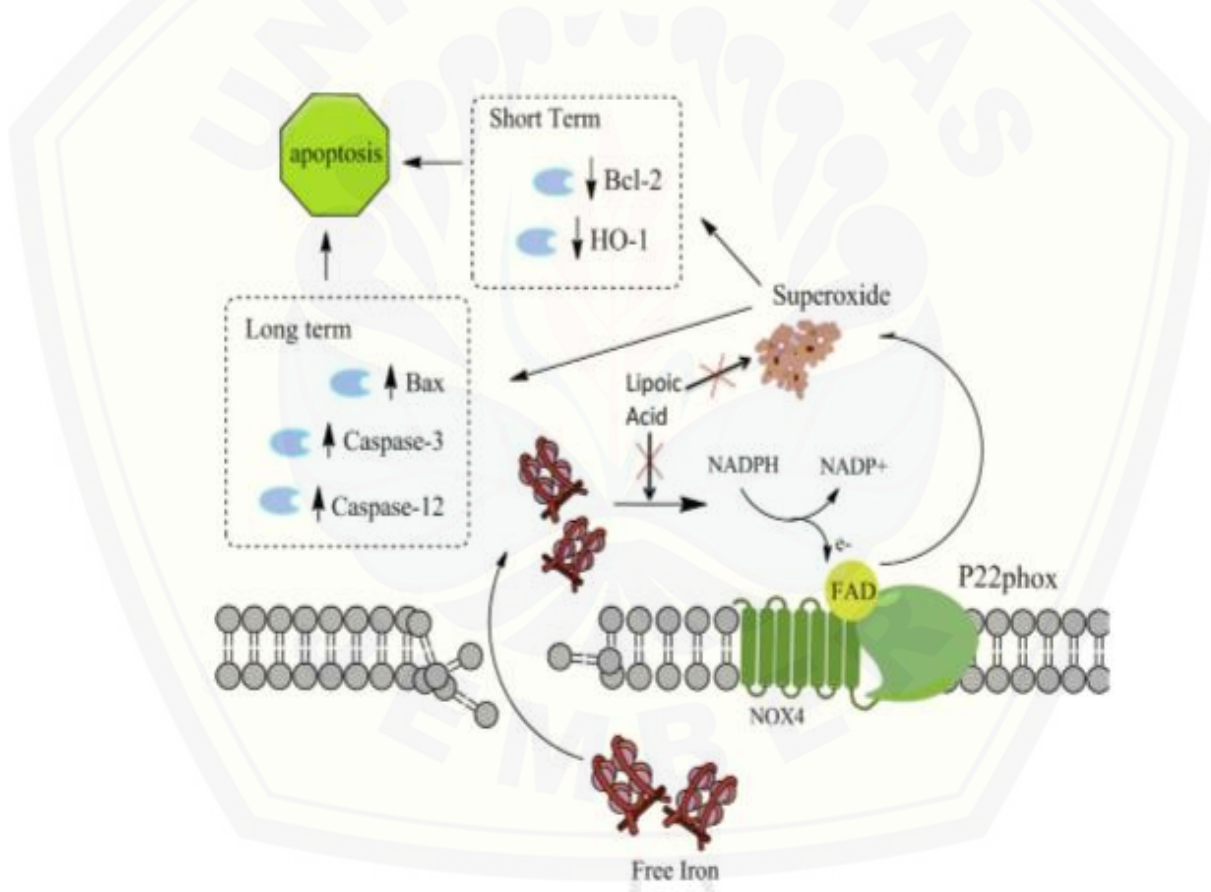


Gambar 2.1 Struktur kimia *alpha lipoic acid* (Shay *et al.*, 2009)

2.2.2 Mekanisme Kerja *Alpha Lipoic Acid*

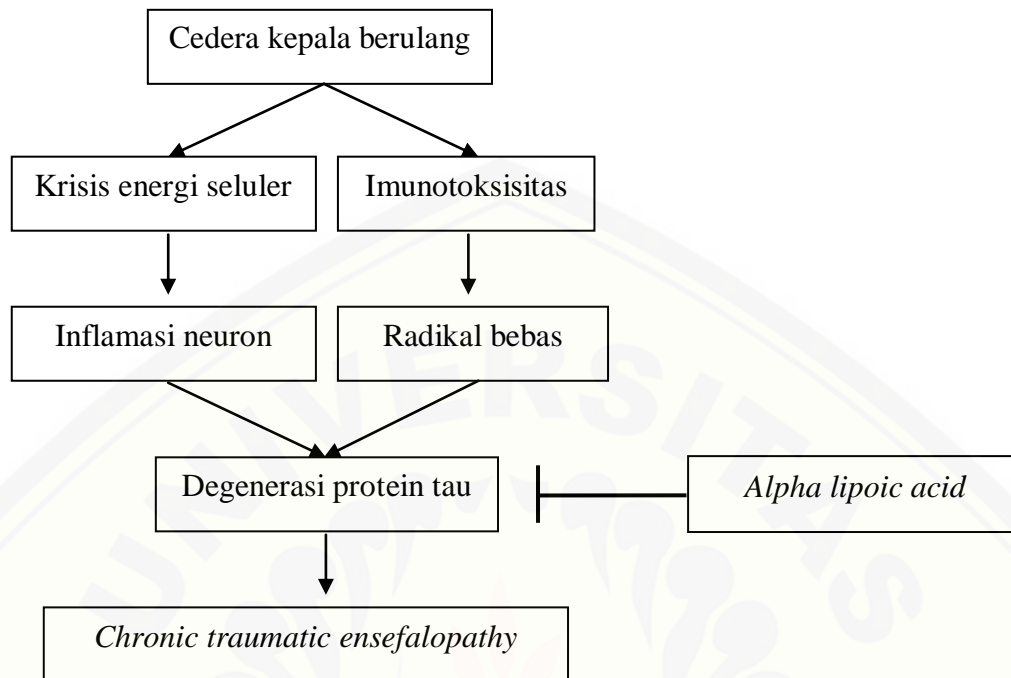
Cedera kepala berulang memiliki 3 efek utama yakni transportasi gelombang melalui jaringan, percepatan/perlambatan menyebabkan pergeseran akson, dan gangguan sawar darah otak. Kerusakan utama CTE diikuti oleh cedera sekunder yang dapat berkembang di kemudian hari. Cedera awal dapat menyebabkan kerusakan otak besar dan kehilangan kemampuan fungsional. Cedera sekunder memicu kaskade peristiwa biokimia yang mengarah ke peradangan neuron, edema otak, kematian sel neuron, dan neurodegenerasi. Banyak jalur berkontribusi dalam aktivasi apoptosis sel, tetapi salah satu metode utama ialah pengembangan dan penyebaran ROS. Penciptaan ROS telah dikaitkan dengan aktivasi NADPH oksidase nikotinamid. NOX dalam keadaan tidak cedera berpartisipasi dalam pertahanan selular melalui sinyal sitokin, regulasi ekspresi gen, pasca translasi pengolahan protein, respons stres retikulum endoplasma, dan homeostasis jaringan. Setelah cedera atau infeksi jalur NOX berkontribusi untuk pembentukan ROS (Lucke *et al.*, 2015). *Alpha lipoic acid* mampu mengurangi aktivitas NOX, p22phox, dan hiperfosforilasi protein tau penyebab radikal bebas

yang ditunjukkan mekanismenya pada Gambar 2.2. Oleh karena mekanisme tersebut, ALA melewati sawar darah otak dan bertindak sebagai pasangan redoks dengan potensial reduksi yang sangat rendah, karena sifat ini ALA meregenerasi antioksidan penting lainnya seperti glutathion, vitamin C, dan vitamin E. *Alpha lipoic acid* memiliki kekhususan untuk pendinginan radikal bebas, *chelating* logam, dan meregenerasi antioksidan seluler lainnya yang melindungi tubuh dari kerusakan oksidatif. *Alpha lipoic acid* mencegah kerusakan oksidatif dengan berinteraksi dengan ROS. *Alpha lipoic acid* mampu mengikat radikal bebas seperti oksigen tunggal dan radikal hidroksil. *Alpha lipoic acid* berfungsi sebagai *chelating* ion logam yang terlibat dalam pembentukan ROS (Perera *et al.*, 2011).



Gambar 2.2 Mekanisme kerja *alpha lipoic acid* (Lucke *et al.*, 2015)

2.3 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.3. Kerangka konsep penelitian

Cedera kepala berulang dapat menyebabkan degenerasi protein tau. Degenerasi tersebut melalui dua jalur yaitu: (1) krisis energi seluler mengakibatkan peningkatan kebutuhan glukosa pada otak namun pasokan glukosa otak tidak mencukupi; (2) imunotoksisitas mengaktifkan sinyal-sinyal pro-inflamasi yang menyebabkan neurotoksisitas menyerang neuron. *Alpha lipoic acid* mempunyai dua pusat kiral yakni R dan S, namun hanya R-LA terkonjugasi yang meresidu lisin dalam hubungan amida, sehingga membuat isoform ini penting sebagai kofaktor dalam sistem biologi. Sebelum menjadi antioksidan kuat, ALA direduksi oleh enzim E3 dengan mengorbankan NADPH menjadi DHLA. *Alpha lipoic acid* mampu mengurangi aktivitas NOX, p22phox, dan hiperfosforilasi protein tau penyebab radikal bebas karena ALA melewati sawar darah otak dan bertindak sebagai pasangan redoks dengan potensial reduksi yang sangat rendah. Karena sifat ini ALA meregenerasi antioksidan penting lainnya seperti glutathion, vitamin C, dan vitamin E.

2.4 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini ialah pemberian *alpha lipoic acid* mampu menghambat progresivitas degenerasi protein tau pada gambaran imunohistokimia otak hewan coba.



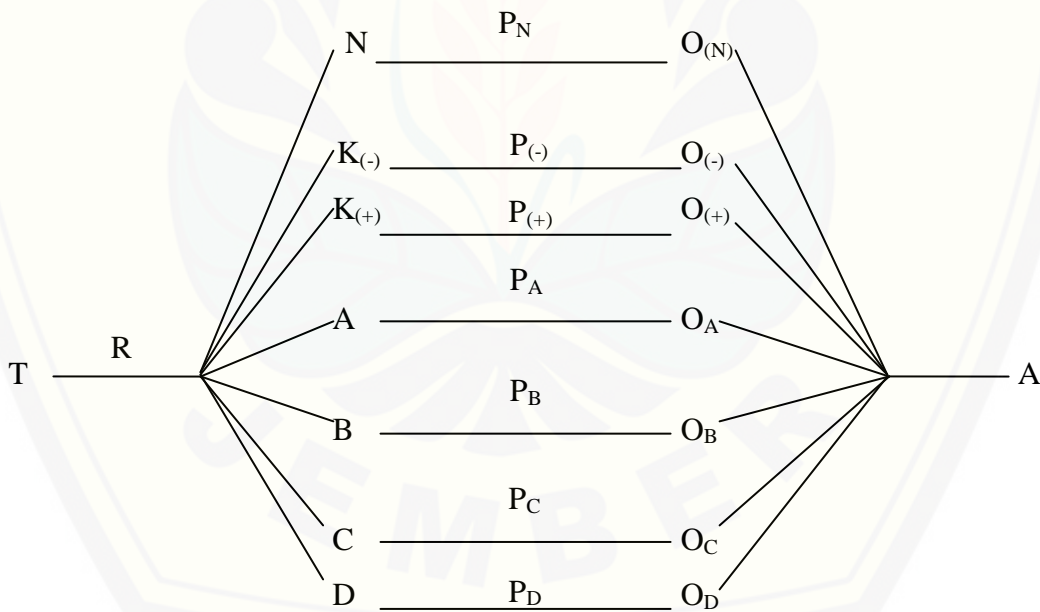
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) secara *in vivo* dengan rancangan *post test only randomized control group design*. Desain penelitian ini terdapat tujuh kelompok yang dipilih secara random. Satu kelompok normal, dua kelompok kontrol dan empat kelompok lainnya diberi perlakuan disebut kelompok eksperimen.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini ialah rancangan eksperimental *post test only randomized control group design* dengan satu kelompok normal, dua kelompok kontrol, dan empat kelompok perlakuan.



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

Keterangan:

- T = tikus
- R = randomisasi
- N = kelompok normal

K ₍₋₎	= kelompok kontrol negatif
K ₍₊₎	= kelompok kontrol positif
A, B, C, D	= kelompok perlakuan
P _(N)	= perlakuan kontrol normal
P ₍₋₎	= perlakuan kontrol negatif (NaCl 0,9% 1,5 ml)
P ₍₊₎	= perlakuan kontrol positif (<i>citicoline</i> 6,75 mg + NaCl 0,9% 1,5 ml)
P _A	= perlakuan A (ALA 1,0125 mg + NaCl 0,9% 1,5 ml)
P _B	= perlakuan B (ALA 2,025 mg + NaCl 0,9% 1,5 ml)
P _C	= perlakuan C (ALA 4,05 mg + NaCl 0,9% 1,5 ml)
P _D	= perlakuan D (ALA 8,1 mg + NaCl 0,9% 1,5 ml)
O _(N)	= observasi kelompok normal
O ₍₋₎	= observasi kelompok kontrol negatif
O ₍₊₎	= observasi kelompok kontrol positif
O _{A,B,C,D}	= observasi kelompok perlakuan A, B, C, dan D
A	= analisis data

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba, perlakuan hewan coba, dan pengambilan sampel otak dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pemeriksaan skor degenerasi protein tau dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pembuatan preparat imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Penelitian ini dilakukan Bulan Mei 2017.

3.4 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ialah tikus putih jantan *Rattus norvegicus* galur wistar. Hewan coba diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan kriteria inklusi tikus yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram, bergerak aktif, sehat, dan normal. Kriteria eksklusi meliputi hewan coba yang tidak mau makan dan mati selama penelitian berlangsung. Jumlah perlakuan pada penelitian ini ialah sebanyak satu kelompok normal, dua kelompok kontrol, dan empat kelompok perlakuan berdasarkan dosis pemberian ALA. Pengulangan dilakukan pada tiap kelompok untuk mencegah adanya bias. Penghitungan besarnya pengulangan menggunakan rumus sebagai berikut.

Besar sampel :

$$(n-1)(p-1) \geq 15 \text{ (p: jumlah perlakuan, n: jumlah ulangan, p: 7), sehingga}$$

$$(n-1)(7-1) \geq 15$$

$n-1 \geq 2,5$

$n \geq 3,5$ dibulatkan ke atas menjadi minimal 4 pengulangan.

Berdasarkan hal tersebut, tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan sebanyak 28 ekor.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini ialah pemberian dosis ALA dan *citicoline*. Pemberian dosis *citicoline* sebesar 6,75 mg dan pemberian dosis ALA dibedakan menjadi empat dosis, yaitu 1,0125mg, 2,025 mg, 4,05 mg, dan 8,1 mg.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini ialah hasil gambaran otak yang menunjukkan degenerasi protein tau setelah diberikan perlakuan cedera kapala berulang.

3.5.3 Variabel Luar

Variabel luar dalam penelitian ini dibedakan menjadi variabel yang dapat dikendalikan dan variabel yang tidak dapat dikendalikan.

a. Variabel luar dapat dikendalikan

Variabel luar yang dapat dikendalikan dalam penelitian ini meliputi umur, berat badan, jenis kelamin, galur, pemeliharaan, lama perlakuan, dan jenis perlakuan hewan coba.

b. Variabel luar yang tidak terkendali

Variabel luar yang tidak dapat dikendalikan ialah stres psikologis akibat perlakuan yang diberikan dan imun hewan coba, karena setiap hewan coba memiliki ambang batas stres psikologis dan imun yang berbeda.

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 *Chronic Traumatic Ensefalopathy*

Perlakuan CTE dengan menjatuhkan beban seberat 245 gram dengan ketinggian 35 cm pada sudut 90° yang menghasilkan kekuatan hantaman sebesar 0,84 J. Beban dijatuhkan tepat di kepala hewan coba satu kali setiap hari selama 30 hari.

3.6.2 Dosis *Alpha Lipoic Acid*

Takaran dosis ALA berdasarkan rata-rata berat badan seluruh hewan coba kemudian dikonversi ke dosis per 150 gBB. Hasil konversi didapatkan dosis sebesar 1,0125 mg, 4,05 mg, 2,025 mg, dan 8,1 mg. Dosis ALA dalam bentuk bubuk ditimbang menggunakan neraca analitik digital, kemudian dilarutkan dengan NaCl 0,9% 1,5 ml dan diinjeksikan secara intraperitoneal 5 menit sebelum perlakuan. *Alpha lipoic acid* didapat dari *Tokyo Chemical Industry* sebanyak 5 gram.

3.6.3 Dosis *Citicoline*

Takaran dosis *citicoline* berdasarkan berat badan seluruh hewan coba kemudian dikonversi ke dosis per 150 gBB. Hasil konversi didapatkan dosis sebesar 6,75 mg. Dosis *citicoline* dalam bentuk ampul kemudian diencerkan dengan NaCl 0,9% 1,5 ml dan diinjeksikan secara intraperitoneal 5 menit sebelum perlakuan. *Citicoline* ampul 250 mg/ 2 ml generik didapat dari Dexa Medica.

3.6.4 Degenerasi Protein Tau

Pengamatan dilakukan pada bagian otak hewan coba dengan pewarnaan imunohistokimia untuk mengetahui degenerasi protein tau. Gambaran protein tau diamati secara kuantitatif menggunakan mikroskop Olympus CX31 dengan perbesaran 400x. Degenerasi protein tau pada penelitian ini ditunjukkan dengan adanya warna coklat kehitaman yang terdapat pada otak hewan coba.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah *alpha lipoic acid* yang diperoleh dari Tokyo Chemical Industry sebanyak 5 gram, antibodi protein tau yang diperoleh dari Santacruz Biotechnology sebanyak 100 µl, *citicoline* ampul 250 mg/ 2 ml generik yang diperoleh dari Dexa Medica, antibodi sekunder protein tau, midazolam ampul 5 mg/ 5 ml diperoleh dari Novell Pharmaceutical Laboratories untuk anestesi, pethidin ampul generik 100 mg/ 2 ml diperoleh dari Kimia Farma untuk analgesik, tikus putih *Rattus norvegicus* galur wistar dengan kriteria berumur 2-4 bulan, berat badan 150-200 gram, sehat dan tidak ada kelainan anatomis, NaCl 0,9%, formalin 10%, pewarna HE, pewarna imunohistokimia dan aqua destilata. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat cedera kepala berulang, kandang tikus, neraca ohaus (pioneer), neraca analitik digital, *object glass*, *cover glass*, corong pisah, seperangkat alat gelas (pyrex), cawan porselen, *volumetric flask*, labu erlenmeyer, *lab spoon*, *batang pengaduk kaca*, mikroskop Olympus CX31 LED dengan gelas objek, spuit 3 cc, spuit 5 cc, spuit 1 cc, *dissecting set*, pot organ, dan kotak es.

3.8 Prosedur Penelitian

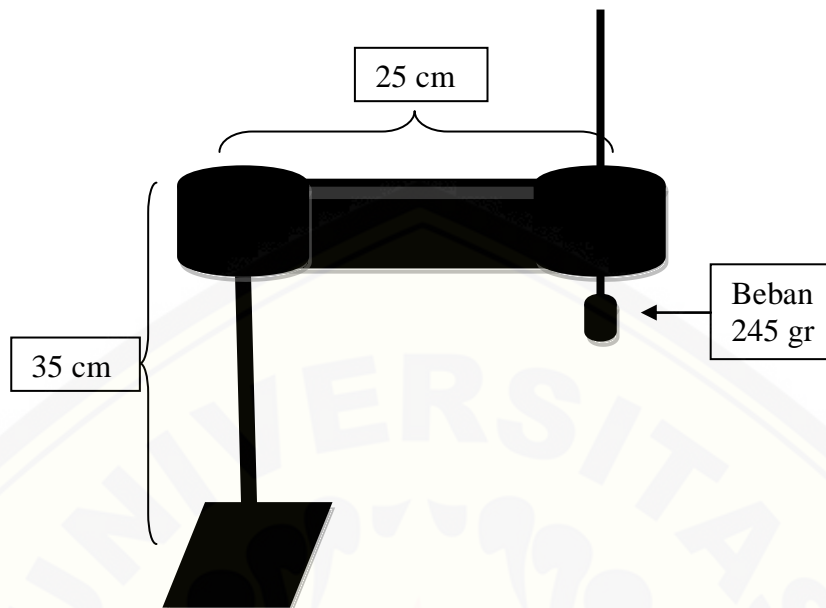
3.8.1 Ethical Clearence

Sebelum dilakukan penelitian, hewan coba dan prosedur penelitian akan dilakukan pengurusan *ethical clearence* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian ini dilakukan sesuai etik nomor: 1.128/H25.1.11/KE/2017

3.8.2 Adaptasi dan Perawatan Hewan Coba

Hewan coba diadaptasikan dalam kandang selama satu minggu untuk menghindari stres. Alas kandang, tempat pakan, tempat minum, sisa pakan, dan kotoran tikus dibersihkan setiap hari untuk menghindari timbulnya penyakit.

3.8.3 Perlakuan Cedera Kepala Berulang pada Hewan Coba



Gambar 3.2 Alat cedera kepala

Alat cedera kepala dibuat sendiri dengan memodifikasi sebuah model yang dikembangkan untuk membuat cedera kepala pada tikus dengan menggunakan pendulum untuk menyerang garis tengah kepala pada sudut dan kekuatan tertentu. Alat ini mempunyai ketinggian 35 cm dengan sudut 90° dan memiliki beban 245 gram. Hantaman yang dihasilkan sebesar 0,84 J. Cedera kepala dapat dihasilkan dengan menjatuhkan beban di garis tengah kepala hewan coba. Keparahan cedera kepala ditentukan oleh berat dan tinggi dari beban yang dijatuhkan (Cernak *et al.*, 2004; Ye Xiong *et al.*, 2013). Sebelum perlakuan cedera kepala, agar tikus tidak merasa kesakitan diberikan pethidin 0,45 mg dan midazolam 0,75 mg untuk anestesi (UBC, 2016; UNC, 2016).

3.8.4 Pemberian *Alpha Lipoic Acid* dan *Citicoline* pada Hewan Coba

Alpha lipoic acid dan *citicoline* diberikan setiap hari secara intraperitoneal selama 30 hari, pemberian obat tersebut 5 menit sebelum perlakuan cedera kepala. Dosis ALA dan *citicoline* untuk tikus didapatkan dari dosis efektif ALA 600 mg (Shay *et al.*, 2009) dan dosis efektif *citicoline* 250 mg (Rose *et al.*, 2009; Pawel, 2014) kemudian dikonversi ke dosis tikus per 150

gBB menjadi dosis ALA sebesar 8,1 mg dan dosis *citicoline* sebesar 6,75 mg (Anroop dan Shery, 2016). Penurunan dosis mengikuti pedoman dari farmakope Indonesia 2014 dan jumlah tikus setiap kelompok mengikuti pembagian rumus federer. Perolehan ALA didapat dari Tokyo *Chemical Industry* sebanyak 5 gram dan *citicoline* didapat dari Dexa Medica sebanyak 250 mg / 2 ml.

3.8.5 Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Pewarnaan imunohistokimia dilakukan sesuai dengan prosedur tetap Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga (2015) sebagai berikut.

- a. Dilakukan deparafinisasi selama 5 menit.
- b. Direhidrasi alkohol 96% selama 4 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit.
- c. Dilakukan *blocking* endogen peroksidase 0,5% selama 30 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit.
- d. Dilakukan *decloaking chamber* 110° selama 30 menit dengan larutan diva kemudian didinginkan selama 30 menit dan dicuci dalam *phosphat buffer saline* (PBS) pH 7,4 selama 3 menit.
- e. Dilakukan *blocking* dengan *normal horse serum* 5% selama 30 menit.
- f. Ditambahkan antibodi primer protein tau 1:200 selama 60 menit kemudian dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 menit.
- g. Ditambahkan *universal link* selama 30 menit dan dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 menit.
- h. Ditambahkan tekravidin HRP label selama 30 menit kemudian dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 menit.
- i. Ditambahkan diamono benzidin (DAB) dan substrat *buffer* selama 2-5 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit.
- j. Dilakukan *counterstain* dengan hematoxilin eosin selama 5-10 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan direhidrasi dengan alkohol 96% selama 5 menit
- k. Dilakukan *clearing* selama 5 menit dan dibuat *mounting* dengan *cover glass*.

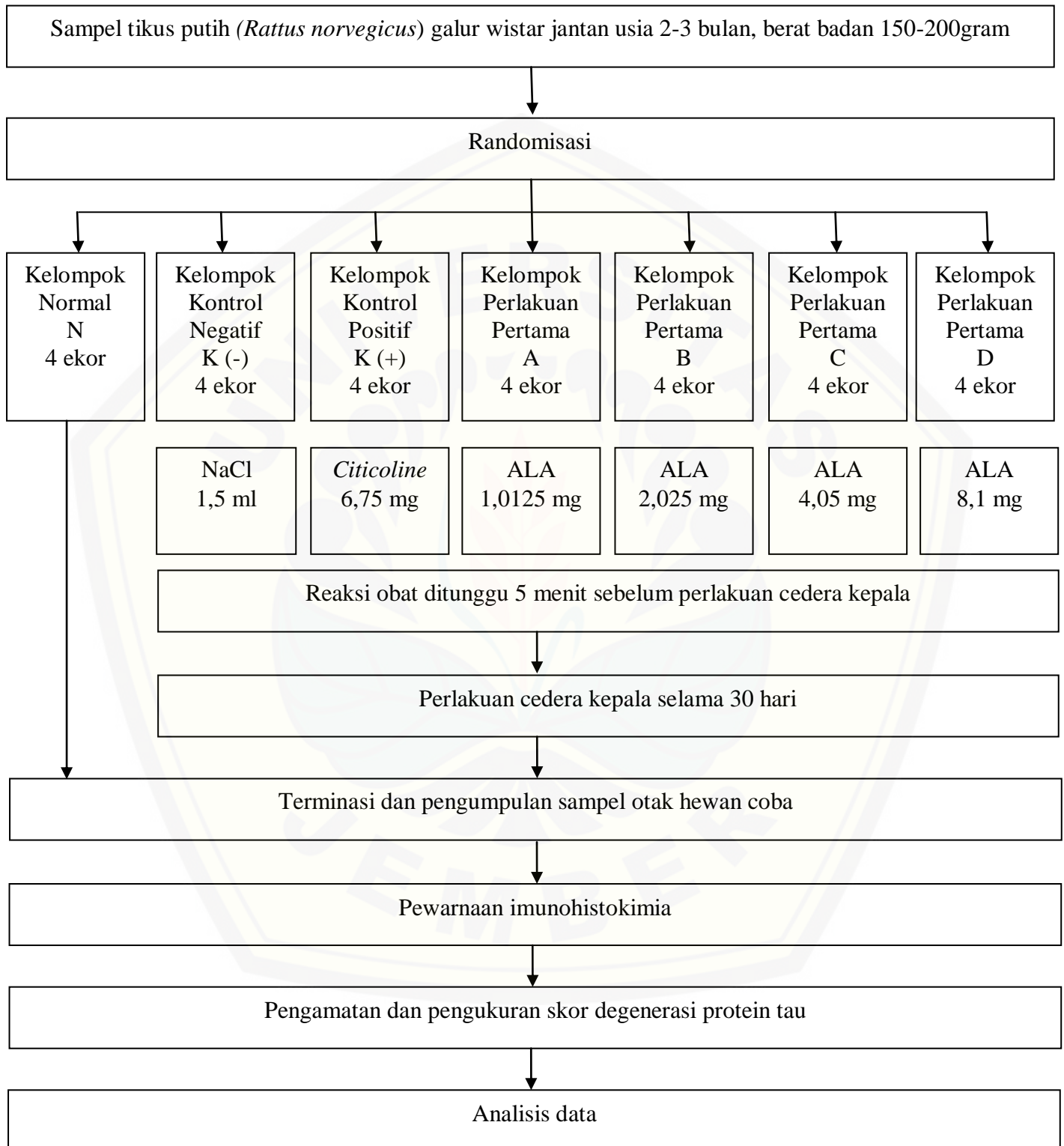
3.8.6 Pengamatan Imunohistokimia

Pemeriksaan degenerasi protein tau dengan mikroskop Olympus CX31 LED pembesaran 400x dengan 6 lapang pandang pada tiap objek glas dengan metode *blinding* dan minimal 2 orang pengamat. Pengukuran skor degenerasi protein tau dapat dilakukan sebagai berikut. Skor= (Intensitas Kuat x Persentase Kuat) + (Intensitas Sedang x Persentase Sedang) + (Intensitas Lemah x Persentase Lemah) + (Intensitas Normal x Persentase Normal). Persentase didapat dari jumlah sel degenerasi protein tau per seluruh jumlah sel protein tau normal dikali 100% (Charafe *et al.*, 2004; Loeffler *et al.*, 2015; Majd *et al.*, 2016).

3.9 Analisis Data

Data yang dianalisis ialah gambaran imunohistokimia jaringan otak. Analisis data yang digunakan ialah uji normalitas dan uji varian. Apabila diperoleh sebaran data normal ($p > 0,05$) digunakan analisis data *One Way Anova* kemudian untuk menilai perbedaan yang signifikan pada tiap kelompok digunakan uji *Post Hoc LSD*. Jika sebaran data tidak normal ($p < 0,05$) digunakan analisis data *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan pada tiap kelompok. Perbedaan kelompok signifikan jika nilai $p < 0,05$.

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Alur penelitian

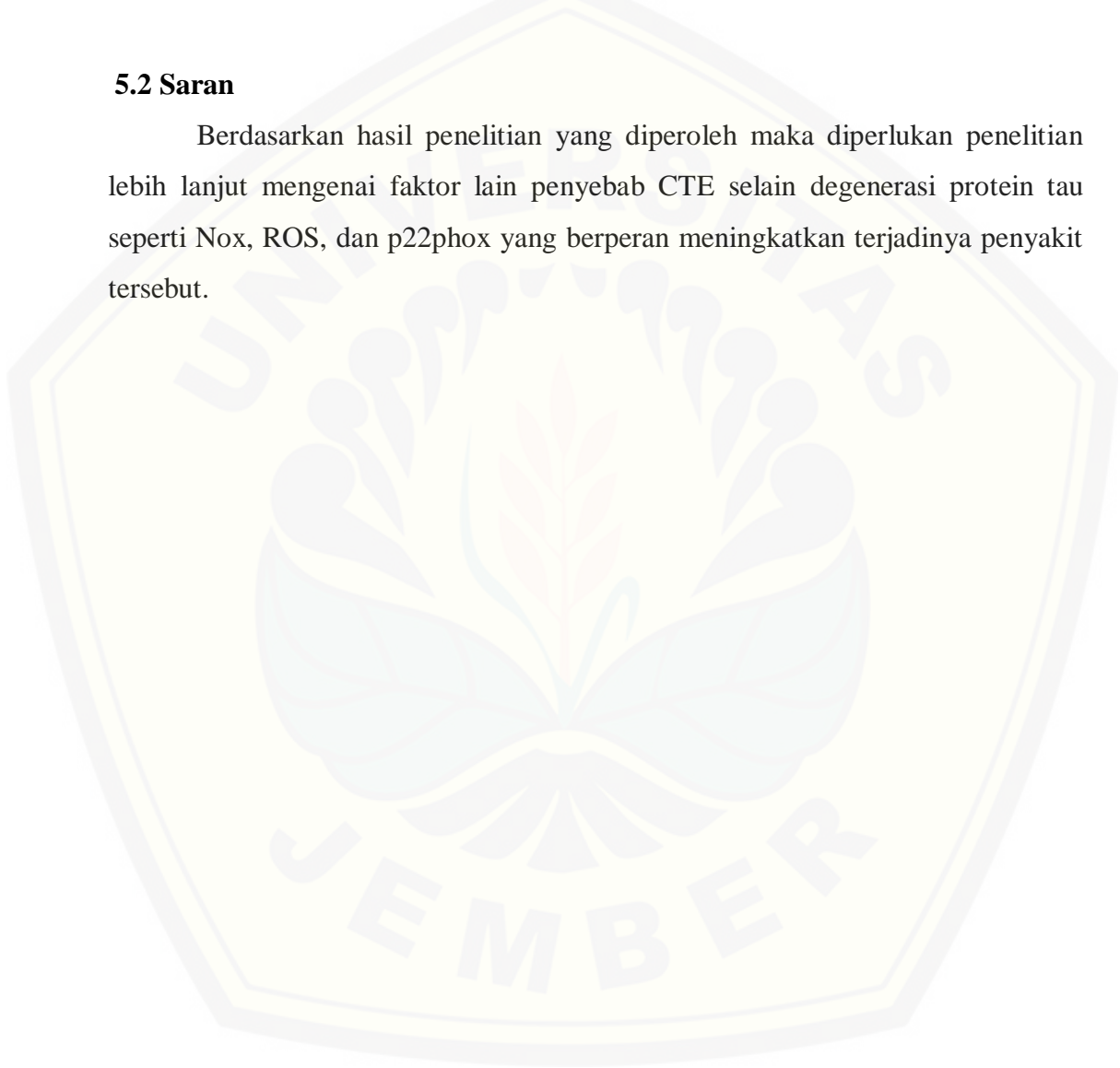
BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Pemberian *alpha lipoic acid* mampu menghambat progresivitas degenerasi protein tau pada gambaran imunohistokimia otak hewan coba.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh maka diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai faktor lain penyebab CTE selain degenerasi protein tau seperti Nox, ROS, dan p22phox yang berperan meningkatkan terjadinya penyakit tersebut.



DAFTAR PUSTAKA

- Ali, M., M. Mohammad, dan S.B. Hodayoun. 2017. Citicoline for Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Meta Analysis. *Injury and Violence*. 9(1):41-50.
- Anroop, BN., dan J. Shery. 2016. A Simple Practic Guide for Dose Conversion Between Animals and Human. *Basic and Clinical Pharmacy*. 7:27-31.
- Cernak, I., R. Vink, D.N. Zapple, M.I. Cruz, F. Ahmed, T. Chang, S.T. Fricke, dan A.I. Faden. 2004. The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. *Neurobiology Disease*. 17:29-43.
- Charafe, J.E., C. Tarpin, V.J. Bardou, F. Bertucci, C. Ginestier, A.C Braud, B. Puig, J. Genix, J. Hassoun, D. Birnbaun, J. Jacquemier, dan P. Viens. 2004. Immunophenotypic Analysis of Inflammatory Breast Cancers: Identification of An Inflammatory Signature. *Pathology*. 202(3):265-73.
- Cusimano, MD., F. Nassiri, dan Y. Chang. 2010. The Effectiveness of Interventions to Reduce Neurological Injuries in Rugby Union: A Systematic Rreview. *Neurosurgery*. 67(5):1404-18.
- Cyrus, S., M.B. Eric, B.H. Clark, S. Karen, A. Naila, I.S. Jose, dan A.A. Divani. 2016. Chronic Traumatic Ensefalopathy in Athlete Involved with High Impact Sports. *Vascular and Interventional Neurology*. 9(2): 34-48.
- Firooz, S., A. Javad, M. Farhad, dan M. Atta. 2015. Citicoline in Patient with Traumatic Brain Injury. *Ecronicon Neurology*. 87-93.
- Gavett, B.E., A. Robert, A.C. Stern, dan A.C. McKee. 2011. Chronic Traumatic Encephalopathy: A Potential Late Effect of Sport Related Concussive and Subconcussive Head Trauma. *Clinics in Sports Medicine*. 30(1):709-90.
- Gomes, M.B., dan C.A. Negrato. 2014. Alpha Lipoic Acid as A Pleiotropic Compound with Potential Therapeutic Use in Diabetes and Other Chronic Diseases. *Diabetol Metabolic Syndrom*. 6(1):80.
- Julio, J.S. 2014. Citicoline for the Treatment of Head Injury: A Systematic Review and Meta Analysis of Controlled Clinical Trials. *Trauma and Treatment*. 4: 227.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2014. *Farmakope Indonesia*. Edisi V. Jakarta: Direktur Jenderal Pengawas Obat dan Makanan.

- Kim, M.Y., E.J. Kim, Y.N. Kim, C. Choi, dan B.H. Lee. 2011. Effects of α -lipoic Acid and L-carnosine Supplementation on Antioxidant Activities and Lipid Profiles in Rats. *Nutritional Research and Practice*. 5(5):421–8.
- Kumar, V., K. Abbas, N. Fausto, dan J.C. Aster. *Robbin and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th Edition. 2010. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Loeffler, D.A., L.M. Smith, A.C. Klaver, dan S. Martić. 2015. Effect of Antibodies to Phosphorylated and Non Phosphorylated Tau on In Vivo Tau Phosphorylation At Serine-199: Preliminary Report. *Experimental Gerontology*. 67:15-8.
- Lucke, W.B.P., Z.J. Naser, A.F. Longsdon, R.C. Turner, K.E. Smith, M.J. Robbison, J.E. Bailes, J.M. Lee, C.L. Rosen, dan J.D. Huber. 2015. Amelioration of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Mediated Stress Reduces Cell Death after Blast Induced Traumatic Brain Injury. *Translational Research*. 166(6):509-28.
- Majd, S., J.H. Power, S.A. Koblar, dan H.J. Grantham. 2016. Early Glicogen Synthase Kinase-3 β and Protein Phosphatase 2A Independent Tau Dephosphorylation During Global Brain Ischemia and Reperfusion Following Cardiac Arrest and The Role of The Adenosine Monophosphate Kinase Pathway. *Europe Journal Neuroscience*. 44(3):1987-97.
- McKee, A.C., R.C. Cantu, C.J Nowinski, W.E.T. Hedley, B.E. Gavett, A.E. Budson, E. Veronica, Santini, H.S. Lee, C.A. Kubilus, dan R.A Stern. 2009. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *Neuropathology and Experimental Neurology*. 68(7):709–35.
- McKee, A.C., T.D. Stein, C.J. Nowinski, R.A. Stern, D.H. Daneshvar, V.E. Alvarez, D.H. Daneshvar, H.S. Lee, S.M. Wojtowicz, G. Hall, C.M. Baugh, D.O. Riley, C.A. Kubilus, M.A. Jacobs, B.R. Martin, T. Ikezu, R.R. Reichard, B.L. Wolozin, A.E. Budson, L.E. Goldstein, N.W. Kowall, dan R.C. Cantu. 2013. The Spectrum of Disease in Chronic Traumatic Encephalopathy. *Brain*. 136(1):43-64.
- Omalu, B., S.T. Dekosky, R.L. Minster, M.I Kamboh, R.L. Hamilton, dan C.H. Wech. 2005. Chronic Traumatic Ensefalopathy in A National Football League Player. *Neurosurgery*. 57(1):128-134.
- Omalu, B., J.L. Hammers, Bailes, R.L. Hamilton, M.I. Kamboh, G. Webster, dan P.F. Robert. 2011. Chronic traumatic encephalopathy in an Iraqi war veteran with posttraumatic stress disorder who committed suicide. *Neurosurgery Focus*. 31(5):E3.

- Pawel, G. 2014. Neuroprotective Properties of Citicoline: Facts, Doubts, and Unresolved Issues. *Central Nervous System Drug*. 28(3):185-93.
- Perera, J., J.H. Tan, S. Jeevathayaparan, S. Chakravarthi, dan N. Haleagrahara. 2011. Neuroprotective Effects of Alpha Lipoic Acid on Haloperidol Induced Oxidative Stress in the Rat Brain. *Cell and Bioscience*. 1(1):12.
- Rose, Z., T.F. William, M.L. Shing, L. Bruce, D.A. Ramon, A. Beth, H. Eisenberg, S.D. Timmons, N. Temkin, T. Novack, J. Ricker, R. Merchant, dan J. Jallo. 2009. The Citicoline Brain Injury Treatment (COBRIT) Trial: Design and Methods. *Neurotrauma*. 26(12):2207-16.
- Shay, KP., R.F. Moreau, E. Smith, A.R. Smith, dan T.M. Hagen . 2009. Alpha Lipoic Acid as A Dietary Supplement: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Biochim Biophys Acta*. 1790(10):1149–60.
- Universitas Airlangga. 2014. *Prosedur tetap imunohistokimia*. Surabaya: Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- University of British Columbia. Animal Care Guideline. 2016. *Rat and Mouse Anesthesia and Analgesia Formulary and General Drug Information*. Canada: UBC Press.
- University of North Carolina. 2016. *Research Rat: Analgesia and Anesthesia Formulary*. USA: UNC Press.
- William, M., M. Rebekhan, Z. Ross, dan P.L. Alvaro. 2015. Chronic Traumatic Encefalopathy and Athlete. *Neurology*. 85: 1504-1511.
- Ye, X., M. Asim, dan C. Michael. 2013. Animal Models of Traumatic Brain Injury. *Neuroscience*. 14: 128-142.

LAMPIRAN

LAMPIRAN A. ETHICAL CLEARANCE

A.1a Halaman Pertama Lembar Persetujuan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK*ETHICAL APPROVA*

Nomor : 1.120/H25.1.11/KE/2017

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

“ALADIN” : PEMANFAATAN *Alpha Lipoic Acid* SEBAGAI INHIBITOR DEGENERASI TAU PROTEIN DALAM UPAYA PREVENSI *Chonic Traumatic Ensefalopat*y

Nama Peneliti Utama : Rudy Gunawan (NIM.142010101023)

Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.

And approved the above mentioned proposal.

Jember, 6 April 2017
Ketua Komisi Etik Penelitian

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

A.1b Halaman Kedua Lembar Persetujuan Etik

Tanggapan Anggota Komisi Etik

Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lain.

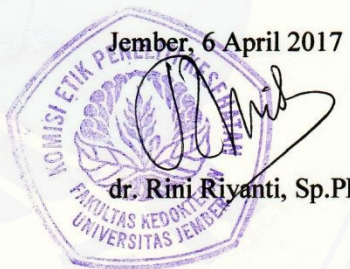
Saran Komisi Etik :

- Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada Pedoman Etik Penelitian Kesehatan.
- Perlakuan chonic traumatic encephalopathy dilakukan oleh seseorang yang terampil (agar tidak melukai hewan coba, hewan coba harus bebas nyeri selama perlakuan), standarisasi perlakuan chonic traumatic encephalopathy oleh peneliti (agar dituliskan pada proposal penelitian)
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan sediaan histopatologis agar didapatkan sediaan yang memenuhi syarat pembacaan
- Pembacaan sediaan Histopatologis dilakukan oleh seseorang yang kompeten, menggunakan metode blinding dan minimal oleh 2 orang
- Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan.

Jember, 6 April 2017



dr. Rini Riyanti, Sp.PK



LAMPIRAN B. PERHITUNGAN DOSIS HEWAN COBA1. Pemberian dosis *alpha lipoic acid*

Dosis manusia = 600 mg

Konversi dosis tikus BB 200 g = $600 \times 0,018$

= 10,8 mg

Konversi dosis tikus BB 150 g = $150 \text{ g} \times 10,8 \text{ mg}$

Dosis A = 1,0125 mg (Kenaikan dosis 2x)

Dosis B = 2,025 mg (Kenaikan dosis 2x)

Dosis C = 4,05 mg (Kenaikan dosis 2x)

Dosis D = 8,1 mg

2. Pemberian dosis *citicoline*

Dosis manusia = 500 mg

Konversi dosis tikus BB 200 g = $500 \times 0,018$

= 9 mg

Konversi dosis tikus BB 150 g = $150 \text{ g} \times 9 \text{ mg}$

= 6,75 mg

3. Pemberian dosis pethidin

Dosis tikus = 3 mg/KgBB

Konversi dosis tikus BB 150 g = $3 \text{ mg}/150 \text{ g} \times 1000$

= 0,45 mg

4. Pemberian dosis midazolam

Dosis tikus = 5 mg/KgBB

Konversi dosis tikus BB 150 g = $5 \text{ mg}/150 \text{ g} \times 1000$

= 0,75 mg

LAMPIRAN C. DOKUMENTASI PENELITIAN



B.1 Adaptasi tikus



B.2 Alat cedera kepala



B.3 Pemberian *alpha lipoic acid*



B.4 Perlakuan cedera kepala



B.5 Pembedahan tikus



B.6 Pewarnaan imunohistokimia

LAMPIRAN D. DATA PENELITIAN

No.	Nama Kelompok	Jumlah Degenerasi Protein Tau			
		Skor O/N	Skor 1/L	Skor 2/S	Skor 3/K
1.	N1	126	5	2	0
2.	N2	28	21	24	14
3.	N3	90	11	6	4
4.	N4	58	13	9	9
5.	K(-) 1	112	0	0	51
6.	K(-) 2	8	37	18	18
7.	K(-) 3	24	37	21	21
8.	K(-) 4	10	10	18	64
9.	K(+) 1	26	19	7	27
10.	K(+) 2	18	7	49	17
11.	K(+) 3	9	17	14	36
12.	K(+) 4	45	4	0	23
13.	A1	18	7	30	33
14.	A2	11	22	43	38
15.	A3	23	32	24	30
16.	A4	24	35	54	20
17.	B1	13	4	42	32
18.	B2	48	14	18	24
19.	B3	14	29	32	38
20.	B4	30	19	10	14
21.	C1	99	11	17	15
22.	C2	80	77	16	20
23.	C3	52	31	31	19
24.	C4	14	17	27	18
25.	D1	68	22	11	8
26.	D2	46	24	9	2
27.	D3	18	42	5	1
28.	D4	39	20	11	13

LAMPIRAN E. ANALISIS DATA**E.1 Uji Normalitas dan Homogenitas****Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Skor Protein	,093	28	,200*	,981	28	,879

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Skor Protein

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,517	6	21	,221

E.2 Uji One Way Anova**ANOVA**

Skor Protein

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	61896,929	6	10316,155	6,390	,001
Within Groups	33905,500	21	1614,548		
Total	95802,429	27			

E.3 Uji *Post Hoc* LSD**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Skor Protein

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok Normal	Kelompok Kontrol Negatif	-111,75000*	28,41256	,001	-170,8372	-52,6628
	Kelompok Kontrol Positif	-70,75000*	28,41256	,021	-129,8372	-11,6628
	Kelompok A	-137,00000*	28,41256	,000	-196,0872	-77,9128
	Kelompok B	-95,25000*	28,41256	,003	-154,3372	-36,1628
	Kelompok C	-80,25000*	28,41256	,010	-139,3372	-21,1628
	Kelompok D	-9,75000	28,41256	,735	-68,8372	49,3372
Kelompok Kontrol Negatif	Kelompok Normal	111,75000*	28,41256	,001	52,6628	170,8372
	Kelompok Kontrol Positif	41,00000	28,41256	,164	-18,0872	100,0872
	Kelompok A	-25,25000	28,41256	,384	-84,3372	33,8372
	Kelompok B	16,50000	28,41256	,568	-42,5872	75,5872
	Kelompok C	31,50000	28,41256	,280	-27,5872	90,5872
	Kelompok D	102,00000*	28,41256	,002	42,9128	161,0872
Kelompok Kontrol Positif	Kelompok Normal	70,75000*	28,41256	,021	11,6628	129,8372
	Kelompok Kontrol Negatif	-41,00000	28,41256	,164	-100,0872	18,0872
	Kelompok A	-66,25000*	28,41256	,030	-125,3372	-7,1628
	Kelompok B	-24,50000	28,41256	,398	-83,5872	34,5872
	Kelompok C	-9,50000	28,41256	,741	-68,5872	49,5872
	Kelompok D	61,00000*	28,41256	,044	1,9128	120,0872
Kelompok A	Kelompok Normal	137,00000*	28,41256	,000	77,9128	196,0872
	Kelompok Kontrol Negatif	25,25000	28,41256	,384	-33,8372	84,3372

	Kelompok Kontrol Positif	66,25000*	28,41256	,030	7,1628	125,3372
	Kelompok B	41,75000	28,41256	,157	-17,3372	100,8372
	Kelompok C	56,75000	28,41256	,059	-2,3372	115,8372
	Kelompok D	127,25000*	28,41256	,000	68,1628	186,3372
Kelompok B	Kelompok Normal	95,25000*	28,41256	,003	36,1628	154,3372
	Kelompok Kontrol Negatif	-16,50000	28,41256	,568	-75,5872	42,5872
	Kelompok Kontrol Positif	24,50000	28,41256	,398	-34,5872	83,5872
	Kelompok A	-41,75000	28,41256	,157	-100,8372	17,3372
	Kelompok C	15,00000	28,41256	,603	-44,0872	74,0872
	Kelompok D	85,50000*	28,41256	,007	26,4128	144,5872
	Kelompok C	Kelompok Normal	80,25000*	28,41256	,010	21,1628
Kelompok Kontrol Negatif		-31,50000	28,41256	,280	-90,5872	27,5872
Kelompok Kontrol Positif		9,50000	28,41256	,741	-49,5872	68,5872
Kelompok A		-56,75000	28,41256	,059	-115,8372	2,3372
Kelompok B		-15,00000	28,41256	,603	-74,0872	44,0872
Kelompok D		70,50000*	28,41256	,022	11,4128	129,5872
Kelompok D		Kelompok Normal	9,75000	28,41256	,735	-49,3372
	Kelompok Kontrol Negatif	-102,00000*	28,41256	,002	-161,0872	-42,9128
	Kelompok Kontrol Positif	-61,00000*	28,41256	,044	-120,0872	-1,9128
	Kelompok A	-127,25000*	28,41256	,000	-186,3372	-68,1628
	Kelompok B	-85,50000*	28,41256	,007	-144,5872	-26,4128
	Kelompok C	-70,50000*	28,41256	,022	-129,5872	-11,4128