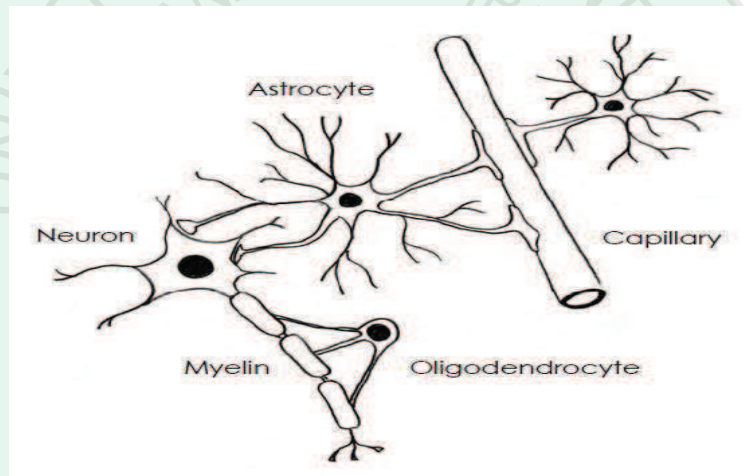


BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Sel Otak

Sel otak merupakan bagian dari jaringan saraf yang dapat mengalami spesialisasi untuk menerima stimulus dan menghantarkan implus ke seluruh bagian tubuh (Sloane, 1994). Jaringan saraf tersusun atas sel saraf (neuron dan sel-sel neuroglia).



Gambar 2.1. Neuron dan Neuroglia (Astrosit dan Oligodendrosit)
(Berglund, 2005)

Sel neuron berfungsi untuk menghantarkan impuls dari sel saraf ke sel saraf lainnya. Neuron merupakan unit fungsional pada sistem saraf yang pada keadaan dewasa tidak bisa membelah lagi, sehingga proliferasi dan pergantian sel tidak terjadi (Kahle dan Frotscher, 1994). Sel neuron terbagi menjadi 2 yaitu perikarion dan proses. Perikarion berfungsi menerima implus stimulus (rangsangan), menerjemahkan, menganalisisnya atau memproses dan menyampaikan implus reaksi terhadap stimulus. Prosesus ialah tonjolan atau

serabut saraf. Prosesus ini bertugas meneruskan implus rangsangan. Dendrit menerima implus dari sel indra, lalu meneruskannya kedalam perikarion. Akson menerima implus dari perikarion lalu meneruskannya ke sel lain (Nugroho, 2004).

Menurut Soewolo (2000) dan Yatim (1996), neuron dibagi menjadi 2 yaitu 1) melihat banyaknya prosesus yang terdiri dari unipolar, pseudonipolar, bipolar dan multipolar. Neuron unipolar adalah neuron yang hanya memiliki satu tonjolan keluar dari badan sel, yang dianggap akson. Neuron bipolar adalah neuron yang memiliki dua tonjolan keluar dari badan sel, satu sebagai dendrit dan yang satunya sebagai akson.

Neuron multipolar adalah neuron yang memiliki banyak tonjolan yang keluar dari badan sel. Beberapa tonjolan sebagai dendrit dan hanya satu tonjolan sebagai akson. 2) Melihat kepada fungsi neuron dibagi atas 3 macam yaitu, neuron motoris, neuron sensoris dan neuron asosiasi. Neuron motoris, menyampaikan implus dari saraf pusat ke alat efektor, yakni otot atau kelenjar. Neuron sensoris menyampaikan implus stimulus dari indera yang menerima stimulus dari lingkungan kesaraf pusat. Neuron asosiasi, berada diantara neuron motoris dan neuron sensoris yang saling menghubungkan. Ia menyampaikan implus dari neuron sensoris ke neuron motoris. Neuron asosiasi berada dalam saraf pusat yaitu otak dan sumsum punggung.

Sel neuroglia merupakan sel penunjang tambahan pada system saraf pusat (SSP) yang berfungsi sebagai pemberi nutrisi kepada neuron, pelindung dan menunjang neuron. Sel neuroglia terdiri dari sel astrosit, oligodendrosit, dan mikroglia (Slone, 1994). Astrosit adalah sel berbentuk bintang yang memiliki

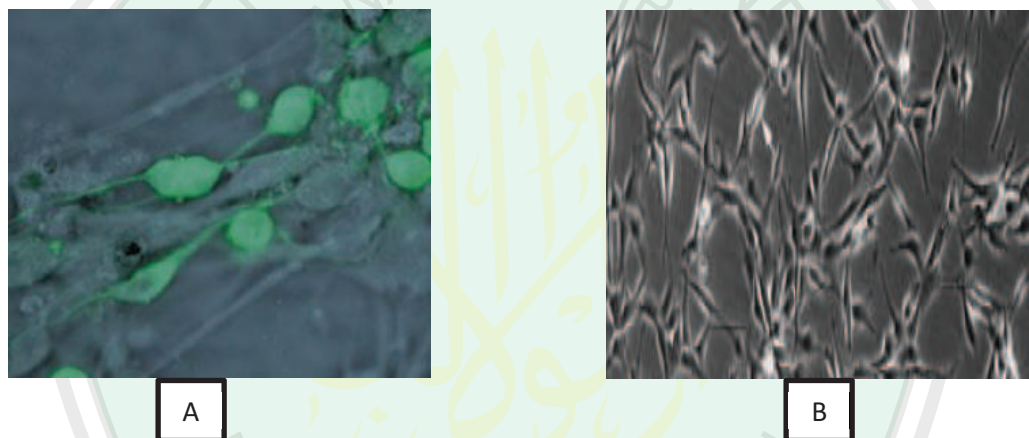
sejumlah prosesus panjang, sebagian besar melekat pada dinding kapilar darah melalui pedikel atau "kaki vascular". Sel ini memberikan penompang stuktural dan mengatur transport materi di antara darah dan neuron. Kaki vaskular dipercaya berkontribusi terhadap barier darah otak atau tingkat kesulitan makromolekul tertentu pada plasma darah untuk masuk ke jaringan otak, sedangkan astrosit fibrosa terletak disubstansi putih otak dan medulla spinalis dan astrosit protoplasma (Slone, 1994).

Oligodendroglia (*oligodendrosit*) menyerupai astrosit, tetapi badan selnya kecil dan jumlah prosesusnya lebih sedikit dan lebih pendek, oligodendrosit dalam system saraf pusat (SSP) analog dengan sel Schwann pada saraf perifer. Bagian ini akan membentuk lapisan myelin untuk melapisi akson dalam system saraf pusat (Slone, 1994). Sel Schawan membentuk myelin maupun neurloema saraf tepi. Tidak semua neuron susunan saraf tepi myelin. Neurolema merupakan membran sitoplasma halus yang dihasilkan sel schwan yang membungkus semua neuron SST (bermyelin maupun tidak bermyelin), neurolema merupakan jaringan penyokong dan pelindung dari tonjolan saraf (Price, 1995).

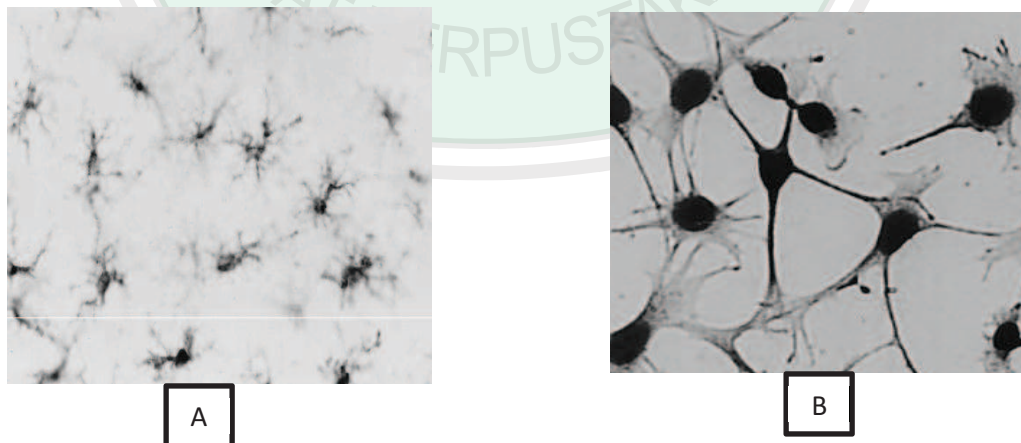
Mikroglia ditemukan dekat neuron dan pembuluh darah, dan dipercaya memiliki peran fagositik. Sel glia berukuran kecil dan prosesusnya lebih sedikit dari jenis sel glia lain. Sel epidemal membentuk membran epitelial yang melapisi rongga. Sel Neuroglia menunjang jaringan saraf dan member nutrient ke neuron dengan cara menghubungkan neuron pada pembuluh darah (Slone, 1994).

Mikroglia dan astrosit berperan penting dalam sistem homeostatis, detoksifikasi, dan respon imun melawan senyawa kimia, dan infeksi (Silva, *et al*, 2008). Sistem

imun sistem saraf pusat dikontrol oleh mikroglia, suatu kumpulan sel yang beristirahat secara normal dan tersebar, apabila diaktivasi dapat melakukan aktivitas amuboid dan mengeluarkan sejumlah sitoksin, kemoksin, eicosanoid, protease, komplemen dan eksitosin (Blaylock, 2004). Selain itu, sel neuroglia juga mensekresi bermacam faktor yang bersifat proinflamantori dan neurotoksik seperti $\text{TNF-}\alpha$, metabolit asam lemak, radikal bebas seperti *nitric acid* (Silva, *et al*, 2008).



Gambar 2.1. Kultur Sel Otak Mayat Manusia (A. Sel Neuron (Monolayer) B. Kultur Sel Neuroglia (Bipolar) pewarnaan hNPCs (Philips, 2003)).



Gambar 2.1. Kultur Sel Otak Tikus (A. Kultur Sel Neuroglia (Mikroglia) Pewarnaan GSA-I-B4-isolectin (Vincent, 1998) B. Kultur Sel Neuroglia (Astrosit) Pewarnaan Giemsa. (Lin, 1997)).

2.2 Proliferasi Sel Otak

Proliferasi merupakan proses pertumbuhan meliputi pembelahan sel secara aktif yang bersifat fundamental dan membutuhkan mekanisme regulasi (Albert, 1994). Proses ini berjalan dalam suatu mekanisme pengontrolan antara pertumbuhan, diferensiasi, dan apoptosis (Lowe dan Lin, 2000). Proliferasi sel terjadi dengan melibatkan peristiwa mitosis yang meliputi kondensasi kromatin, pembentukan benang-benang spindel yang melekatkan kromosom pada mikrotubul spindel (Cooper, 2000).

Proliferasi sel otak dapat dipengaruhi oleh suatu stimulus atau ligan. Ligan berikatan dengan reseptor pada membran sel, kemudian mengaktifkan beberapa protein di dalam sel melalui fosforilasi. Transduksi ligan tersebut diteruskan ke dalam inti sel untuk mengaktifkan faktor transkripsi yang selanjutnya dapat mengaktifkan siklus sel (Albert, 2002).

Mekanisme proliferasi sel yang terjadi sebagai respon terhadap adanya faktor pertumbuhan, faktor pertumbuhan sebuah sel dapat dirangsang untuk keluar dari fase G_1 (sel aktif tumbuh) pada siklus sel dan memasuki fase S (sintesis), G_2 (benang-benang gelendong disintesis dan jumlah DNA sudah belipat) dan akan terus melanjutkan sampai keseluruhan siklus sel selesai. Setelah tahapan pada fase G_2 selesai, apabila faktor pertumbuhan masih tersedia maka sel akan tetap meneruskan siklus sel jika penstimulusnya tidak ada maka sel akan kembali ke fase istirahat G_0 (Goodman, 1998).

Proliferasi sel dapat dirangsang oleh faktor pertumbuhan interinsik, kematian sel, bahkan dapat pula oleh deformasi mekanis sel. Mediator kimiawi

yang terdapat pada lingkungan mikro setempat dapat menghambat atau merangsang pertumbuhan sel. Kendali pertumbuhan yang terpenting adalah penginduksian sel istirahat (*resting cell*) pada fase G ke siklus sel (Robbins, 2007).

2.3 Tahapan-Tahapan Proliferasi Sel didalam Media Kultur

Pertumbuhan sel dalam medium kultur dibagi menjadi tiga tahapan yaitu *Lag Phase*, *Log Phase*, dan *Plateu Phase* (Budiono, 2000). Allah Swt menciptakan segala sesuatu melalui beberapa tahapan tidak terkecuali kultur primer sel otak fetus hamster. Sebagaimana firman Allah Swt dalam surat An-Nuh : 14 - 15.

وَقَدْ خَلَقَكُمْ أَطْوَارًا ﴿١٤﴾ أَلَمْ تَرَوْا كَيْفَ خَلَقَ اللَّهُ سَبْعَ سَمَوَاتٍ طِبَاقًا ﴿١٥﴾

"14. Dan Dia Sesungguhnya telah menciptakan kamu dalam beberapa tahapan kejadian. 15. Tidakkah kamu perhatikan bagaimana Allah telah menciptakan tujuh langit bertingkat-tingkat?" (Qs an-Nuh: 14 - 15).

Ayat tersebut menegaskan bahwa Allah Swt menciptakan makhluk hidup dengan melalui beberapa tahapan. Sel yang merupakan bagian unit terkecil dari makhluk hidup juga mengalami tahapan tersebut, salah satunya pertumbuhan sel otak fetus hamster selama proses kultur primer.

Lag Phase merupakan waktu proses subkultur dan *reseeding*, yaitu masa dimana belum terdapat peningkatan jumlah sel. Pada masa tersebut konsentrasi sel adalah sama atau hampir sama dengan konsentrasi pada waktu subkultur (10^4 sel/ml). Fase ini disebut sebagai periode adaptasi, sel mengganti elemen-elemen

glycocalyx yang hilang pada waktu tripsinasi, pelekatan pada substrat dan penyebaran sel (Budiono, 2002).

Log phase merupakan periode peningkatan jumlah sel secara eksponensial dan saat pertumbuhan mencapai konfluen, proliferasi akan terhenti setelah 1 atau 2 siklus berikutnya. Waktu *Log phase* tergantung pada konsentrasi awal sewaktu dilakukan *seeding*, kecepatan pertumbuhan sel, serta kepekatan terhadap proliferasi sel akan terhambat oleh kepekatan (Budiono, 2002). Pertumbuhan sel kultur pada fase ini akan mencapai 90%-100% dan kultur dalam fase ini adalah dalam keadaan sangat produktif, selain itu fase ini merupakan waktu yang optimal untuk sampling karena populasi sel sangat seragam dan viabilitasnya tinggi (Freshney, 2000).

Plateu phase, fase ini mendekati akhir dari log phase, kultur menjadi konfluen yaitu permukaan substrat untuk pertumbuhan sel sudah terpenuhi dan sel saling berhubungan dengan lingkungan sekitarnya. Setelah mencapai konfluen kecepatan tumbuhnya akan berkurang, dan pada tahap ini kultur mencapai tahap stationari, dan fraksi pertumbuhan akan turun mencapai 0%-10% (Budiono, 2002).

Tahapan proliferasi sel merupakan pengukuran jumlah sel yang tumbuh dan membelah dalam medium kultur sel *in vitro*. Proses ini dapat diketahui dengan adanya viabilitas, konfluenitas dan abnormalitas pada sel kultur (Willie, 2005).

2.3.1 Konfluenitas Sel Otak

Konfluenitas sel merupakan tumbuhnya sel secara homogen atau meratanya sel sebagai sel monolayer sampai menutupi subtrat (Wulandari, 2003). Sel

dikatakan konfluenitas apabila sel tersebut sudah menempel dan berkembang memenuhi substrat (Djati, 2006). Konfluen diketahui hasilnya dengan mengetahui lama setelah kultur primer sampai sel menempel pada dasar dan menutupi luas permukaan *tissie disk*. Waktu koefluen ditunjukkan dengan ditemukannya banyaknya sel pada *tissie disk* (Juwita, 2005).

Konfluenitas sel otak keterkaitannya dengan proses pembelahan mitosis, pembelahan secara mitosis membutuhkan waktu yang bervariasi. Mitosis dibagi menjadi empat fase, yaitu profase, metafase, anafase, dan telofase. Pada telofase akan diikuti dengan pembelahan sitoplasma (sel). Satu putaran reproduksi sel akan diikuti interfase. Dalam interfase sel mengadakan pertumbuhan, aktivitas waktu reproduksi sel. Interfase membutuhkan waktu sekitar 90 % dari seluruh waktu reproduksi sel. Interfase dibagi lagi dalam tahap G1 (*gap*) dimana sel akan aktif tumbuh. Pertumbuhan sel ditandai oleh bertambahnya sitoplasma, organela, dan sintesis bahan-bahan yang dibutuhkan untuk fase S (sintesis), dimana fase S (Sintesis) terjadi replikasi (perbanyakkan jumlah DNA dan sintesis), yang kemudian dilanjutkan pada fase G2, benang-benang gelondong (spindel) disintesis dan jumlah DNA sudah berlipat. Setelah interfase selesai akan diikuti oleh mitosis (kariokinesis) dan pembelahan sel (sitokenesis) (Nugroho, 2004).

2.3.2 Viabilitas Sel Otak

Viabilitas sel dapat didefinisikan sebagai jumlah sel-sel yang mampu berkembang dalam medium kultur. Pengujian viabilitas sel sering digunakan pada sel yang terisolasi misalnya pada sel primer dan dipelihara dalam kultur untuk menentukan kondisi kultur optimal untuk populasi sel (Wulandari, 2003).

Viabilitas sel adalah kemungkinan sel untuk dapat hidup. Viabilitas sel menunjukkan respon sel jangka pendek seperti konfluen sel perubahan permeabilitas membran atau adanya jalur metabolisme tertentu dalam sel. Viabilitas sel merupakan perbandingan jumlah sel yang hidup dan sel yang mati (Wulandari, 2003). Viabilitas sel sering digunakan sebagai penanda sitotoksitas suatu material. Tes sitotoksitas ini berguna untuk mengetahui sifat biologis suatu bahan apakah bersifat toksik terhadap sel tertentu atau tidak. Salah satu yang mengindikasikan sitotoksitas suatu bahan adalah adanya penurunan proliferasi sel dan penurunan viabilitas (Freshney, 2000). Viabilitas sel ditentukan dari kemampuan sel untuk hidup dan menjalankan metabolismenya dimana merupakan faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur sel (Prihastanti, 1999).

Metode yang paling mudah untuk menentukan jumlah sel hidup adalah penghitungan sel dengan menggunakan hemositometer dan menggunakan pewarna *tripan blue* 0,5 % karena tripan blue tidak mengubah integritas membran plasma dan memperlambat proses kematian sel. Tripan blue juga memperkecil jumlah sel dan memfasilitasi identifikasi sel yang akan dilihat dengan mikroskop (Bolt, 2001).

2.3.3 Abnormalitas Sel Otak

Sel abnormal apabila sel tersebut berukuran melebihi ukuran sel normal dan mengalami perubahan bentuk dari asalnya, terkontaminasi oleh bakteri dan jamur (Djati, 2006). Abnormalitas sel yang sering muncul pada kultur sel ditandai dengan adanya sel raksasa yaitu sel yang volume selnya, DNA, RNA serta massa

protein bertambah hingga dua puluh sampai dua ratus kali lipat dari pada sel normal (Freshney, 2000).

Pembentukan penonjolan berkaitan dengan perubahan konsentrasi ion Ca^{2+} di dalam sel. Mekanisme pembentukan penonjolan berhubungan dengan konsentrasi ATP. Bila dikaitkan dengan pengaruh Ca^{2+} terhadap pembentukan *blebs* (penonjolan), maka penurunan konsentrasi ATP dikarenakan meningkatnya konsentrasi Ca^{2+} di dalam sitosol berkaitan dengan transport dari luar sel ke dalam sel (Pospos, 2005).

2.4 Kerusakan Sel Otak

Kerusakan pada sel otak dapat diakibatkan oleh zat oksidatif yang terdapat pada sel. Secara *in vitro* sel otak dapat mengalami kerusakan yang dapat diakibatkan oleh faktor endogen dan eksogen. Faktor endogen yaitu faktor yang disebabkan oleh pengaruh dari dalam sel itu sendiri. Salah satunya autodoksi, merupakan produk dari proses metabolisme aerobik. Molekul yang mengalami autoksidasi berasal dari katekolamin, hemoglobin, mioglobin, sitokrom C yang tereduksi, dan thiol. Autoksidasi dari molekul diatas menghasilkan reduksi dari oksigen diradikal dan pembentukan kelompok reaktif oksigen. Superoksida merupakan bentukan awal radikal. Ion ferrous (Fe II) juga dapat kehilangan elektronnya melalui oksigen untuk membuat superoksida dan Fe III melalui proses autoksidasi (Droge, 2002).

Pada metabolisme normal dapat terbentuk produk sampingan sebagai hasil metabolisme aerobik. Pada proses metabolisme normal, tubuh memproduksi partikel kecil dengan tenaga besar yang disebut sebagai radikal bebas. Atom atau

molekul dengan elektron bebas ini dapat digunakan untuk menghasilkan tenaga dan beberapa fungsi fisiologis seperti kemampuan untuk membunuh virus dan bakteri, oleh karena mempunyai tenaga yang sangat tinggi, zat ini juga dapat merusak jaringan normal apabila jumlahnya terlalu banyak, radikal bebas dapat mengganggu produksi DNA, lapisan lipid pada dinding sel.

Winarsi (2007) menyebutkan, radikal bebas merupakan suatu senyawa atau molekul mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya, sehingga senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangannya. Radikal bebas akan membentuk radikal yang baru apabila bertemu dengan molekul lain, sehingga terjadi reaksi berantai dan bersifat merusak (sel otak). Daya perusak radikal bebas jauh lebih besar dibandingkan dengan oksidan biasa. Reaksi berantai tersebut baru terhenti apabila radikal tersebut dapat diredam dengan antioksidan salah satunya vitamin E (Percival, 1998).

Efek radikal bebas terhadap makromolekul akan menyebabkan terjadinya reaksi berantai, yang kemudian menghasilkan senyawa radikal baru, adanya peningkatan radikal bebas di dalam tubuh (sel) menimbulkan kerusakan membran sel, kerusakan protein, kerusakan DNA, peroksida lipid, dan penyakit degenerative (Sadikin, 2001).

Komponen utama membran sel adalah fosfolipid yang mengandung asam lemak tak jenuh (asam linoleat, linolenat dan arakhidonat) yang rentan terhadap serangan radikal, terutama radikal hidroksil, menyebabkan reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid, berdampak terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel tersebut, antara lain

aldehida, seperti *malondialdehyde* (MDA), 9-hidroksi-nonenal serta bermacam-macam hidrokarbon seperti etana (C₂H₆) dan pentana (C₅H₁₂). Dapat pula terjadi ikatan silang (*cross-linking*) antara dua rantai asam lemak atau antara asam lemak dan rantai peptida (protein) yang timbul karena reaksi dua radikal (Suryohudoyo, 2000).

Faktor eksogen yang bisa menyebabkan kerusakan pada sel diantaranya adalah pengaruh dari luar seperti pH, suhu, O₂, CO₂, infeksi bakteri, jamur dan virus (Arif, 2007). Faktor lain yang juga mempengaruhi kualitas sel adalah substrat dan lingkungannya, keadaan fisiokimia dari medium, keadaan fase gas dan temperatur pada waktu inkubasi (Trenggono, 2009).

2.5 Peran Vitamin E dalam Memperbaiki Kerusakan Sel Otak Selama Proses Kultur

Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron, secara biologis dapat diartikan sebagai senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan, termasuk enzim-enzim dan protein pengikat logam. Antioksidan dapat bekerja sebagai antioksidan pencegah (enzim dan non enzim), dengan cara mencegah terjadinya radikal hidroksil dengan cara memutuskan rantai oksidan (Suryohudoyo, 2000 dan Bast 1991). Vitamin E sebagai komponen dari sistem pertahanan antioksidan seluler, yang melibatkan enzim-enzim yang lain seperti superoksida dismutase (SODs), *glutation peroksidase* (GPXs), *glutation reduktase* (GR), *katalase*, *tioeredoksin reduktase* (TR), dan faktor-faktor non enzim (misalnya glutation, asam), yang mana banyak tergantung pada zat gizi esensial yang lain (Gallagher, 2004).

Vitamin E dapat direduksi radikal *tocopheroxyl* kembali menjadi *tocopherol*. Secara *in vivo* mekanisme reduksi *tocopheroxyl* dilakukan oleh beberapa reduktan intraseluler, sedangkan secara *in vitro* proses reduksi *tocopheroxyl* dapat terjadi dalam liposom oleh asam askorbat (vitamin C), dalam mikrosom oleh NADPH, dan dalam mitokondria oleh NADH dan suksinat (Combs, 1998). Masuknya vitamin E ke dalam sel dapat terjadi melalui proses mediasi reseptor (LDL(*Low-Density Lipoprotein*) membawa vitamin ini ke dalam sel) atau melalui proses yang dibantu oleh lipoprotein lipase dimana vitamin E dilepaskan dari kilomikron dan VLDL (*Very Low-Density Lipoprotein*). Di dalam sel, transport intraseluler dari *alpha tokoferol* kemudian berikatan dengan protein pengikat yaitu tokoferol intraseluler.

Mekanisme penghambatan peroksidasi lipid oleh vitamin E dimulai pada saat lipid kehilangan satu hidrogen dan menjadi membentuk radikal, yang bereaksi dengan oksigen bebas untuk menghasilkan *radikal peroksil*, dengan adanya reaksi *radikal peroksil* selanjutnya akan terbentuk reaksi berantai, hal ini dapat terjadi didalam membran sel yang dapat mengganggu integritas struktur membran (Von, 2005).

Vitamin E mampu memutus reaksi berantai di antara *Polyunsaturated fatty acids* (PUFAs) dalam dalam, hal ini karena reaktifitas dari *phenolic hydrogen* pada kelompok C-6 hidroksil dan kemampuan dari sistem cincin *chromanol* untuk menstabilkan elektron yang tidak berpasangan, yang melibatkan donasi hydrogen *phenol* ke radikal bebas dari asam lemak atau oksigen untuk melindungi serangan senyawa tersebut pada PUFAs yang lain (Combs, 1998). Oksigen merupakan

pereaksi radikal bebas dan selektif, dengan bantuan enzim dapat memicu *Reaktif Oksidatif Stres* (ROS), peristiwa ini berlangsung saat proses sintesis energi oleh mitokondria (Harliansyah, 2001).

Pertahanan sel terhadap *reaktif oksigen spesies* (ROS) melalui mekanisme reduksi enzimatik, pengeluaran oleh vitamin antioksidan, perbaikan membran dan DNA yang rusak oleh enzim dan kompartementasi. Vitamin E, vitamin C dan karotenoid, sebagai vitamin antioksidan dapat menghentikan reaksi berantai radikal bebas. Mekanisme perbaikan DNA dan pengeluaran asam lemak teroksidasi dari membran, juga dijumpai di sel. Pertahanan kompartementasi mengacu kepada pemisahan ROS dan dalam pembentukan ROS dari bagian sel lainnya (Dawn, 2000).

Hariyatmi (2004), menyatakan, vitamin E berada di dalam lapisan fosfolipid membran sel dan berfungsi melindungi asam lemak tak jenuh ganda dan komponen membran sel lain dari oksidasi radikal bebas dengan memutuskan rantai peroksida lipid karena adanya reaksi antara lipid dan radikal bebas dengan memberikan satu atom hidrogen dari gugus OH pada cincin ke radikal bebas, sehingga terbentuk radikal vitamin E yang stabil dan tidak merusak. Vitamin E berada pada bagian lemak dalam membran sel, melindungi fosfolipid asam lemak tak jenuh dalam membran dari degradasi oksidatif terhadap ROS yang tinggi dan radikal bebas. Vitamin E dapat mengurangi radikal bebas menjadi metabolit dengan memberikan gugus hidrogennya (Putri, 2009).