



Pengaruh Interleukin-1 β (IL-1 β) dan Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) terhadap Dopamin pada *Cerebral Palsy*

Effects of interleukine-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor-a (TNF-a) on dopamine of the cerebral palsy

SATIMIN HADIWIDJAJA[♥]

Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret (UNS)
Surakarta 57126

Diterima: 2 Pebruari 2004. Disetujui: 17 Maret 2004.

ABSTRACT

The caused of disability on cerebral palsy is unknown, but the human cerebral hypoxic, which affected to the motor cortex and motor pathways in the brain is believed cause of it. The major clinical manifestations are abnormality of movements and posture patterns. The immunity against the cerebral palsy (CP) is unknown, but interleukine-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) are expressed in cerebral damage including cerebral palsy. By biological effects of IL-1 β and TNF- α , they affect to the neuron dopaminergic in the brain, so dopamine in the vesicle of this neuron delivered to the extracellular tissue and to the intravascular compartment. Expressed dopamine in the extracellular and intravascular compartment has effects on motor pathways. IL-1 β , TNF- α and dopamine all together detectable in cerebrospinal fluid and in the blood. The aim of this study is to know the effects of IL-1 β and TNF- α as collectively to the dopamine in cerebral palsy. Diagnosis of the cerebral palsy is based on clinical manifestation in childhood by the abnormality of movements and posture patterns without involve the alteration of IL-1 β and TNF- α and dopamine in blood. This study is conducted by observational method as cross-sectional study. Material of this study is serum from the blood plasma, take by peripheral venous blood vessels; IL-1 β and TNF- α are analysis by ELISA and dopamine is analyzed by RIA. The results of this study show, that IL-1 β and TNF- α as collectively affect dopamine in cerebral palsy. The result of this study is very suggested in the cerebral palsy.

♥ Alamat korespondensi:
Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126
Tel. & Fax.: +62-271-664178.
e-mail: biology@mipa.uns.ac.id

Keywords: cerebral palsy, IL-1 β , TNF- α , dopamine.

PENDAHULUAN

Cerebral palsy (CP) adalah suatu sindrom akibat gangguan otak yang bersifat non progresif dan non hereditas pada anak-anak karena hipoksia serebri, yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan otak. Di banyak negara berkembang dan negara industri angka kejadian CP cukup tinggi, sebesar 2‰ (Paneth dan Kiely, 1984, dalam Wilsdon, 1996). SCOPE (1994, dalam

Wilsdon, 1996) melaporkan di London terdapat 2,5‰ kelahiran hidup, di Amerika Serikat terdapat 4,2‰, dan di Swedia terdapat sekitar 1,5‰.

Burt (1993) menyebutkan bahwa dopamin dapat mengontrol gangguan gerak yang disebabkan kerusakan otak. Dopamin yang merupakan neurotransmitter kelompok katekolamin banyak terdapat di jaringan otak, terutama ganglia basalis dan substantia nigra,

sehingga kerusakan jaringan otak karena hipoksia serebri dapat mempengaruhi kandungan dopamin.

Penelitian-penelitian jaringan otak (*sequelae*) menunjukkan bahwa kerusakan ini umumnya disebabkan hipoksia serebri yang dapat meningkatkan sitokin TNF- α dan IL-1 β (Betz, 1996; Silverstein, 1997; Yoon, 1997a,b). Setiap *traumatic brain injury* dapat meningkatkan IL-1 β dan TNF- α , yang juga diikuti peningkatan sitokin IL-8, IL-6, IL-10 dan TGF- β . Semua sitokin ini dapat ditemukan dalam liquor serebrospinalis dan serum (Morganti-Kossmann, 1997; Oygur, 1998). Sitokin IL-1 β dan TNF- α secara biologis dapat meningkatkan katabolisme jaringan, sehingga terjadi perubahan patologik di dalam otak akibat pengaruh hipoksia serebri. Hal ini akan semakin parah dengan meningkatnya katabolisme jaringan akibat kedua sitokin tersebut. Sitokin IL-1 β dan TNF- α ini dikeluarkan oleh mikroglia yang merupakan *stressed cell* akibat adanya *stressor* hipoksia serebri.

Hipoksia serebri akan mempengaruhi aktifitas neuron dopaminergik pada striatum tikus, sehingga menyebabkan peningkatan dopamin ekstraseluler. Peningkatan dopamin ekstraseluler bukan saja disebabkan meningkatnya *dopamine release* tetapi juga akibat adanya hambatan dari mekanisme *dopamine reuptake* (Akiyama, 1991). Perubahan patologik pada neuron dopaminergik akibat hipoksia serebri digambarkan dengan adanya *chromatolysis neuron*, ditandai dengan pembengkakan sitoplasma, penyebaran *Nissl body*, nukleus menuju ke pinggir sel, dan pembengkakan mitokondria. Pada akhirnya sel dan mitokondria akan ruptur, sehingga sel mati (Burt, 1993; Constantinides, 1994). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kadar IL-1 β dan TNF- α terhadap kadar dopamin dalam darah tepi pada *cerebral palsy*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian observasional, jenis *case-control study*. Kelompok kontrol diperankan oleh anak normal (*non cerebral palsy*) yang diambil berdasarkan kriteria inklusi. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah tepi. Darah diambil melalui vena mediana cubiti sebanyak 7 mL, dan dimasukkan dalam tabung venoject, kemudian disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 5

menit. Serum yang terjadi dibagi menjadi 3 bagian, yaitu untuk pemeriksaan IL-1 β , TNF- α , dan dopamin. Masing-masing bagian dimasukkan ke dalam tabung aliquot secara terpisah, dan disimpan pada suhu -20°C. IL-1 β dan TNF- α diperiksa dengan teknik ELISA, sedangkan dopamin diperiksa dengan teknik RIA.

Prosedur pemeriksaan TNF- α dengan teknik ELISA indirect (Sandwich) dengan reagen Quantikine HS kit.

Microplate di-coated dengan *murine monoclonal antibody* yang spesifik untuk TNF- α pada sumurannya, lalu ditambahkan 50 μ L *assay diluent* HD1-11 ke dalam setiap sumuran, dan 200 μ L standar (*TNF- α standard*) atau sampel ke dalam sumuran tersebut. TNF- α yang ada akan diikat oleh *antibody* yang di-coated dalam sumuran tadi. Sumuran ditutup dengan penutup perekat, dan diinkubasi selama 14-20 jam pada suhu 2-8°C. Sumuran dicuci 4 kali dan ditambahkan 200 μ L larutan *conjugate* yang mengandung *polyclonal antibody* berlabel enzim spesifik untuk TNF- α , kemudian ditutup dengan penutup perekat, diinkubasi selama 3 jam dalam suhu kamar. Selanjutnya sumuran dicuci 4 kali lagi, ditambahkan 50 μ L larutan *substrat* ke dalam setiap sumuran; ditutup dengan penutup perekat baru, kemudian diinkubasi selama 60 menit dalam suhu kamar. Sumuran ini tidak dicuci, tetapi langsung ditambah dengan 50 μ L larutan *amplifier*; ditutup dengan penutup perekat baru, kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam suhu kamar. Penambahan larutan *amplifier* ini mengawali munculnya perubahan warna. Selanjutnya ditambahkan 50 μ L *stop solution* (2N asam sulfat) ke dalam setiap sumuran. Kemudian dibaca pada *microplate reader* dengan panjang gelombang 490 nm (dalam 30 menit), pembacaan dikoreksi pada panjang gelombang 650 nm atau 690 nm. Penambahan *stop solution* ini tidak berpengaruh terhadap warna dalam sumuran.

Prosedur pemeriksaan IL-1 β dengan teknik ELISA indirect (Sandwich) dengan reagen Quantikine HS kit.

Microplate di-coated dengan *murine monoclonal antibody* yang spesifik untuk IL-1 β pada sumurannya, dimasukkan 100 μ L *assay diluent* HD1C dan 150 μ L standar (*IL-1 β standard*) atau sampel ke dalam setiap sumuran, kemudian ditutup dengan penutup perekat. IL-1 β akan diikat oleh *antibody* yang di-coated pada sumuran. Setelah diinkubasi selama 14-20 jam pada suhu

kamar. Selanjutnya dicuci 4 kali, ditambahkan 200 μ L larutan *conjugate* yang mengandung *polyclonal antibody* berlabel enzim spesifik untuk IL-1 β ke dalam setiap sumuran, ditutup dengan penutup perekat baru, kemudian diinkubasi selama 3 jam dalam suhu kamar dan dicuci kembali 4 kali. Setelah itu ditambahkan 50 μ L larutan *substrat* ke dalam setiap sumuran; ditutup dengan penutup perekat baru, kemudian diinkubasi selama 45 menit dalam suhu kamar. Sumuran ini tidak dicuci, tetapi langsung ditambah dengan 50 μ L larutan *amplifier*, ditutup dengan penutup perekat baru, kemudian diinkubasi selama 45 menit dalam suhu kamar. Penambahan larutan *amplifier* ini akan memulai timbulnya warna. Ditambahkan 50 μ L *stop solution* (2N asam sulfat) ke dalam setiap sumuran. Penambahan *stop solution* ini tidak berpengaruh terhadap warna dalam sumuran. Kemudian dibaca dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 490 nm (dalam 30 menit), pembacaan dikoreksi pada panjang gelombang 650 nm atau 690 nm

Prosedur pemeriksaan dopamin dengan reagen IBL dopamine RIA kit.

Persiapan reagen. *Enzyme solution* COMT dilarutkan ke dalam 0,5 mL akuades, lalu pipet 0,5 mL larutan co-enzim, kemudian ditambah dengan 1 mL enzim buffer ke dalam larutan campuran COMT tersebut, sehingga tercapai volume 2 mL larutan enzim. Siapkan larutan enzim baru sebelum digunakan (maximal 15 menit). ¹²⁵I-Tracer dopamine dilarutkan ke dalam 3 mL akuades. *Dopamine antiserum* dilarutkan dengan 2,75 mL akuades.

Ekstraksi (dalam *macro titer plate*): Dipipet 50 μ L masing-masing standar A-G & kontrol. Dipipet 500 μ L sampel plasma ke dalam sumuran *macro titer*. Dipipet 1 mL akuabides dan 500 μ L *extraction buffer*. Ditutup dengan plastik penutup dan plate digoyang selama 30 menit pada suhu ruang dengan *orbital shaker* kecepatan 600-900 rpm. Plate dikosongkan dengan cepat dan cairan residu dibuang. Dipipet 2 mL akuabides ke dalam masing-masing sumuran. Ditutup dengan plastik penutup dan plate digoyang selama 10 menit pada suhu ruang dengan *orbital shaker* kecepatan 600-900 rpm. Plate dikosongkan dengan cepat dan cairan residu dibuang. Dipipet 250 μ L HCl 0,025 N ke dalam setiap sumuran. Digoyang tanpa ditutup selama 15 menit pada *orbital shaker* dengan kecepatan 500 rpm

Dopamin-RIA (derivatisasi dan RIA dalam *acylating tubes-polypropylene*): Dipipet 25 mL larutan COMT segar. Digoyang *macro titer plate* sejenis. Dipipet 100 mL standar, kontrol dan sampel ke dalam tabung polypropylene. Untuk NSB dipipet 100 mL HCl 0,025 N. Dicampur dengan menggunakan *vortex*; diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Ditambah 50 μ L larutan ¹²⁵I-Tracer Dopamine pada semua sumuran. Ditambah 50 μ L dopamin antiserum ke dalam semua sumuran (kecuali T dan NSB). Dicampur pada *vortex* dan diinkubasi semalam (14-20 jam) pada suhu 2-8°C. Ditambah 1 mL *precipitating antiserum* kesemua tabung (kecuali T) dan dicampur pada *vortex*. Diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 1500-3000xg pada suhu ruang. Dibuang supernatan dari semua tabung kecuali T. Dibaca semua tabung dalam *gamma counter*, selama 1 menit.

Analisis data

Variabel IL-1 β , TNF- α dan dopamin dianalisis dengan bantuan perangkat lunak program SPSS versi 9.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deskripsi hasil pemeriksaan IL-1 β , TNF- α , dan dopamin kelompok kontrol dan *cerebral palsy* diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. IL-1 β , TNF- α dan dopamin pada CTL dan CP.

| Variabel | CTL | | CP | |
|-----------------------|--------|-------|--------|-------|
| | Rerata | SD | Rerata | SD |
| IL-1 β (pg/mL) | 0,505 | 0,182 | 1,193 | 0,775 |
| TNF- α (pg/mL) | 4,025 | 0,894 | 7,072 | 2,716 |
| Dopamin (ng/mL) | 0,419 | 0,229 | 0,608 | 0,246 |

Keterangan: Wilks Lambda = 0,314, p=0,001, CTL = kontrol, CP= *cerebral palsy*.

Untuk menguji pengaruh variabel IL-1 β dan TNF- α terhadap variabel dopamin pada *cerebral palsy* digunakan analisis regresi linier berganda. Analisis regresi berganda dengan dopamin (DA) sebagai variabel terikat yang dipengaruhi oleh IL-1 β dan TNF- α sebagai variabel bebas menggunakan pendekatan model regresi linier berganda. Hasil penghitungan dari komputer diperoleh persamaan regresi linier berganda sebagai berikut:

| | | |
|--|--------|---------|
| DA = 0,351 + 0,164 IL-1 β + 0,0008 TNF- α | | |
| Standar error | (0,065 | (0,018) |
| |) | |
| Nilai t | (2,544 | (0,470) |
| |) | |
| Signifikansi | (0,019 | (0,643) |
| |) | |
| Koefisien adj. R ² | 0,260 | |
| Koefisien R | 0,569 | |
| F ratio | 5,039 | |
| Signifikansi | 0,016 | |

Melalui Uji F pada analisis regresi diperoleh nilai F sebesar 5,039 dengan $\alpha = 0,016$, sehingga secara bersama-sama variabel IL-1 β dan TNF- α berpengaruh secara bermakna terhadap kadar dopamin pada $\alpha = 0,05$. Hasil uji-t menunjukkan bahwa variabel IL-1 β berpengaruh secara bermakna terhadap variabel dopamin pada $\alpha = 0,05$, sedang variabel TNF- α tidak berpengaruh terhadap variabel dopamin. Walaupun secara statistik variabel TNF- α tidak berpengaruh terhadap dopamin, tetapi secara biologis sebenarnya variabel IL-1 β dan TNF- α saling berinteraksi di tubuh, sehingga keduanya secara bersama-sama berpengaruh terhadap dopamin.

Cerebral palsy yang timbul akibat stresor hipoksia serebri ditandai munculnya gangguan gerak dan/atau sikap tubuh. Adanya patologi di otak (*sequelae*) akan mengganggu jaras motorik dan susunan neurokimiawi di dalam otak, keduanya berpotensi menimbulkan gangguan gerak dan/atau sikap tubuh.

Dalam keadaan normal, sitokin IL-1 β dan TNF- α yang diekspresikan oleh sel-sel mikroglia dapat ditemukan dalam liquor serebrospinalis dan serum, tetapi dalam kadar yang rendah. Sel-sel mikroglia yang mengalami stres akibat adanya *stressor* hipoksia, akan mengekspresikan sitokin IL-1 β dan TNF- α yang lebih besar dibandingkan keadaan normal (Baratawidjaja, 1996; Kresno, 1996). Peneliti lain juga menyebutkan bahwa setiap *traumatic brain injury* akan meningkatkan IL-1 β dan TNF- α dalam liquor serebrospinalis dan serum (Betz, 1996; Silverstein, 1997; Morganti-Kossmann, 1997). Sitokin IL-1 β dan TNF- α mempunyai fungsi biologis untuk mengaktifkan sel makrofag serta meningkatkan katabolisme jaringan (Klein, 1990; Roitt, 1993; Baratawidjaja, 1996; Kresno, 1996).

Ekspresi sitokin IL-1 β dan TNF- α yang tinggi di liquor serebrospinalis dan plasma akibat hipoksia serebri akan menyebabkan terjadinya

kerusakan otak karena meningkatnya katabolisme jaringan, sedang dalam konsentrasi yang rendah berfungsi untuk neuroproteksi terhadap jaringan otak akibat hipoksia serebri (Ross, 1994; Rothwell, 1995; Hagberg, 1996; Martin-Ancel, 1997; Ehrlich, 1999). Pada masa post-hipoksia serebri yang disertai dengan adanya kerusakan jaringan otak (*sequelae*) masih tetap dijumpai ekspresi sitokin IL-1 β dan TNF- α dalam konsentrasi di atas normal (Dammann, 1997). Kerusakan jaringan otak akibat ekspresi sitokin IL-1 β dan TNF- α akan mempengaruhi neuron dopaminergik, mulai dari mempengaruhi mekanisme *dopamine release* sampai ke hambatan *dopamine reuptake*, sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan kadar dopamin ekstraseluler (Kondoh, 1995).

KESIMPULAN

Variabel IL-1 β berpengaruh nyata terhadap dopamin dengan derajat signifikansi sebesar 5% pada *cerebral palsy*. Variabel TNF- α tidak berpengaruh nyata terhadap dopamin pada *cerebral palsy*. Secara bersama-sama variabel IL-1 β dan TNF- α mempunyai berpengaruh nyata terhadap dopamin dengan $\alpha = 0,05$ pada *cerebral palsy*.

DAFTAR PUSTAKA

- Akiyama, Y., K. Koshimura, T. Ohue, K. Lee, S. Miwa, S. Yamagata, and H. Kikuchi. 1991. Effects of hypoxia on the activity of the dopaminergic neuron system in the rat striatum as studied by in vivo brain microdialysis. *Journal of Neurochemistry* 57 (3): 997-1002.
- Baratawidjaja, K.G. 1996. *Imunologi Dasar*. Edisi ketiga. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Betz, A.L., Scheilke, G.P., Yang, G.Y. 1996. Interleukin-1 in cerebral ischemia. *Keio Journal of Medicine* 45: 3, 230-237.
- Burt, A.M. 1993. *Textbook of Neuroanatomy*. 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Constantinides, P. 1994. *General Pathobiology*. Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange.
- Dammann, O., and A. Leviton. 1997. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in preterm newborn. *Pediatric Research* 42: 1-8.
- Ehrlich, L.C., Peterson, P.K., Hu, S. 1999. Interleukin (IL)-1 beta-mediated apoptosis of human astrocytes. *Neuroreport* 10 (9): 1849-1852.
- Hagberg, H., E. Gilland, E. Bona, L.A. Hanson, M. Hahin-Zoric, M. Blennow, M. Holst, A. McRae, and O. Soder. 1996. Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatric Research* 40 (4): 603-609.
- Kondoh, T., S.H. Lee, and W.C. Low. 1995. Alteration in striatal dopamine release and uptake under conditions of

- mild, moderate and severe cerebral ischemia. *Neurosurgery* 37 (5): 948-954.
- Kresno, S.B. 1996. *Imunologi*. Edisi ketiga. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Martin-Ancel, A., A. Garcia-Alix, D. Pascual-Salcedo, F. Cabanas, M. Valcarce, and J. Quero. 1997. Interleukin-6 in the cerebrospinal fluid after perinatal asphyxia is related to early and late neurological manifestations. *Pediatric Research* 100 (5): 789-794.
- Morganti-Kossmann, M.C., P.M. Lenzlinger, V. Hans, P. Stabel, E. Csuka, E. Ammann, R. Stocker, and T. Kossmann, 1997. Production of cytokines following brain injury: Beneficial and deleterious for the damaged tissue. *Molecular Psychiatry* 2 (2): 133-136.
- Oygur, N., O. Sonmez, O. Saka, and O. Yegin. 1998. Predictive value of plasma and cerebrospinal fluid tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta concentrations on outcome of full term infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Archives Disease Child Fetal Neonatal* 79 (3): F190-193.
- Roitt, I.M., J. Brostoff, and D.K. Male. 1993. *Immunology*. 3rd ed. St.Louis. Baltimore: Mosby.
- Ross, S.A., M.I. Halliday, G.C. Campbell, D.P. Byrnes, and B.J. Rowlands. 1994. The presence of tumor necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury. *British Journal of Neurosurgery* 8 (4): 419-425.
- Rothwell, N.J. and P.J. Strijbos. 1995. Cytokines in the neurodegeneration and repair. *International Journal of Developmental Neuroscience* 13 (3-4): 179-185.
- Silverstein, F.S., J.D. Barks, P. Hagan, X.H. Liu, J. Ivacko, and J. Szaflarski. 1997. Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochemistry International* 30 (4-5): 375-383.
- Wilsdon, J. 1996. Cerebral palsy In: Stewart, A.M. (ed.). *Occupational Therapy and Physical Dysfunction*. 4th ed. New York: Wiley
- Yoon, B.H., J.K. Jun, R. Romero, K.H. Park, R. Gomez, J.H. Choi, and I.O. Kim. 1997a. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 177 (1): 19-26.
- Yoon, B.H., R. Romero, C.J. Kim, J.N. Koo, G. Choe, H.C. Syn, and J.G. Chi. 1997b. High expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 177 (2): 406-411.