**BAB I**

**PENDAHULUAN**

* 1. **Latar Belakang**

Cedera otot sering terjadi dalam olahraga dan mempengaruhi aktivitas fisik dalam waktu yang lama. Cedera otot dapat terjadi akibat trauma langsung seperti laserasi otot dan kontusio, maupun akibat trauma tidak langsung seperti *strain*. Lebih dari 90% cedera olahraga berupa kontusio maupun *strain*, sedangkan laserasi otot lebih jarang terjadi.1 Pada trauma ringan seperti *strain*, otot skelet dapat beregenerasi sempurna secara spontan. Sedangkan pada kasus trauma berat proses penyembuhan otot dapat berlangsung tidak sempurna yang mengakibatkan pembentukan jaringan fibrosis yang mengganggu fungsi otot.2

Trauma jaringan lunak tertutup atau cedera kontusio pada otot skelet relatif umum terjadi pada atlet (silat, taekwondo, karate, sepak bola, dll). Jenis cedera ini biasanya terjadi tiba-tiba, berat benda, gaya tekan pada otot, dan kontak langsung. Cedera otot kontusio secara klinis dimanifestasikan oleh rasa setempat, edema berkurangnya *range of motion* (ROM), dan nyeri tekan saat di palpasi.3 Pada cedera otot terjadi proses inflamasi yang terlihat pada peningkatan kadar *muscle creatin kinase* dan *reactive oxygen species* (ROS). *Muscle creatin kinase* merupakan enzim spesifik otot skelet yang berperan dalam pembentukan energi pada aktivitas sel otot melalui metabolisme anaerob. Peningkatan *muscle creatin kinase* dalam serum mengindikasikan kerusakan sel otot.4 Deteksi peningkatan aktivitas CK dalam serum berguna sebagai indikator injuri pada otot. Kadar enzim CK sebanding dengan derajat kerusakan jaringan dan seiring dengan proses penyembuhan luka, kadar enzim CK akan menurun. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Minematsu et al (2010) menyatakan bahwa kadar CK dalam eksudat merupakan biomarker yang lebih sensitif dibanding CK serum untuk mengetahui derajat injuri jaringan otot bagian dalam (jaringan subkutan). Sedangkan ROS berperan dalam memediasi sinyal transduksi fisiologis di mitokondria. Secara fisiologis ROS berfungsi dalam jalur pensinyalan seluler dan pada level tinggi dapat berkontribusi dalam kematian sel. Stimulus inflamasi (sitokin pro-inflamasi, stres oksidatif) dan ROS diproduksi

oleh mitokondria, NADPH oksidase, dan retikulum endoplasma memicu jalur kinase yang menghasilkan aktivasi NF-κB yang berkaitan dengan respon inflamasi.5

*Nuclear factor kappa B* (NF-κB) adalah suatu bentuk protein di dalam sitoplasma sel yang berfungsi mengatur inflamasi, respons imun, penyembuhan luka, serta kematian dan fungsi sel. NF-κB menginduksi ekspresi berbagai gen proinflamasi, termasuk yang mengkode sitokin dan kemokin, dan juga berpartisipasi dalam regulasi inflamasi. Selain itu, NF-κB memainkan peran penting dalam mengatur kelangsungan hidup, aktivasi dan diferensiasi sel imun bawaan dan sel T inflamasi. Akibatnya, aktivasi NF-kB yang dideregulasi berkontribusi pada proses patogen berbagai inflamasi. NF-κB dapat mentranslokasi ke nukleus dan menginduksi transkripsi gen target, seperti IL-1, dan IL-66,7

Pada saat terjadinya inflamasi beberapa factor sitokin inflamasi meningkat pada otot termasuk IL-6, IL-1, dan TNFα. Interleukin-1 (IL-1) merupakan sitokin proinflamasi utama yang bertanggung jawab untuk memediasi beberapa respons fisiologis seperti demam, aktivasi limfosit, dan induksi sintesis protein fase akut. Temuan terbaru menunjukkan bahwa respons seluler terhadap IL-1 dimediasi oleh kaskade kejadian intraseluler termasuk *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang terlibat dalam aktivasi AP-1 dan kinase IκB (IKK) yang terlibat dalam aktivasi NF-κB.IL-6 adalah sitokin utama yang diproduksi oleh makrofag / monosit, dan memainkan peran penting dalam reaksi imunologis, inflamasi dan hemopoietik.8,9 IL-6 memiliki sifat pro-dan anti-inflamasi yang bergantung pada konteks dan sekarang dianggap sebagai target utama untuk intervensi klinis. Sitokin inflamasi primer, interleukin-1 (IL-1), *tumor necrosis factor* (TNF), bakteri lipopolisakarida, infeksi virus akut, dan TGFβ masing-masing menginduksi ekspresi IL-6. Setelah terjadi cedera, konsentrasi plasma IL-6 bisa di deteksi dalam 60 menit dengan konsentrasi puncak antara 4 sampai 6 jam, dan dapat bertahan sampai 10 hari10,11

Penanganan pasca cedera otot telah banyak dilakukan mulai dari terapi dan pemberian herbal yang bertujuan pada pemulihan cedera otot. Dalam beberapa produk herbal ditemukan kandungan zat aktif sebagai anti-inflamasi dan antioksidan yang berperan dalam mengurangi gejala dan mempercepat penyembuhan pada cedera otot. Penelitian yang dilakukan oleh Menon dan Sudheer menyatakan bahwa curcumin memiliki zat fenolik yang berperan penting dalam melindungi membran sel dari radikal bebas dan kandungan anti-inflamasi yang setara dengan stenoid dan NSAID.Sedangkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Furrugia, et al menyatakan bahwa astaxantin berperan dalam menurunkan produksi serta ekspresi IL-1β dan IL-6 dalam proses inflamasi dengan menginhibisi translokasi nuklear NF-κB p65.12

Selenium adalah mineral penting yang secara alami ditemukan di tanah, air dan makanan. Selenium sebagai antioksidan merupakan salah satu elemen penting pada tubuh manusia dan terbukti sebagai suplemen makanan untuk kesehatan. Kebutuhan akan selenium untuk tubuh hanya sedikit per hari nya yaitu 55 mcg/hari,14 beberapa penelitian menunjukkan bahwa selenium sangat diperlukan untuk menjaga fungsi metabolisme yang normal. Defisiensi selenium dan polimorfisme atau mutasi pada gen selenoprotein dan sintesis kofaktor terlibat pada patofisiologi beberapa penyakit, termasuk diantaranya adalah kelainan jantung, disfungsi imunitas, kanker, kelainan otot dan tulang, fungsi endokrin dan kelainan saraf.13,14

Selenium berperan penting dalam banyak proses fisiologis. Selenium dapat mempengaruhi respon inflamasi, termasuk menghambat kaskade NF-κB yang menginduksi produksi interleukin dan *tumor necrosis factor α/ β*. Selenium berfungsi dalam penghambatan faktor transkripsi yang sensitif terhadap redoks (misalnya NF-κB) dan prostaglandin/leukotrien proinflamasi, sitokin regulasi. Ketika inflamasi terjadi, akan memicu pelepasan mediator-mediator inflamasi. Selama proses inflamasi berlangsung, diproduksi sinyal untuk menghentikan reaksi inflamasi. Mekanisme ini meliputi perubahan produksi mediator proinflamasi menjadi anti-inflamasi. Sistem tersebut dibutuhkan untuk mencegah terjadinya inflamasi yang berlebihan yang dapat memicu kerusakan jaringan.13,14

Selenoprotein merupakan selenium dalam bentuk asam amino selenosistein. *Glutation peroksidase* (GPx) merupakan selenoprotein yang berperan penting dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif, GPx memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. GPx dalam tubuh bekerja dengan mengontrol proses redoks sel seperti mereduksi disulfida pada protein dan memberikan hidrogen untuk ribonukleotida reduktase pada sintesis DNA serta mereduksi H2O2 dan memotong radikal bebas. Selenium secara fungsional berperan penting dalam beberapa aspek gangguan seperti sistem saraf, reproduksi pria, sistem endokrin, fungsi otot, sistem kardiovaskular, dan kekebalan tubuh.Berdasarkan penelitian Huang et al, menemukan bahwa suplementasi dengan Se (500 dan 2000 ug / hari untuk berbagai durasi) pada pasien yang kritis menurunkan angka kematian terkait dengan sepsis. Rekomendasi saat ini menunjukkan bahwa asupan Se yang dapat ditoleransi adalah antara 90 dan 400 ug / hari (asupan harian yang direkomendasikan antara 30 dan 55 ug / hari) untuk manusia (, 12) dan 0,4 mg / kg berat badan pada tikus.15,16

Inflamasi adalah respon fisiologis terhadap cedera. Ketika proses inflamasi tersebut berlangsung secara terus menerus akan menyebabkan kerusakan jaringan setempat dan fungsi jaringan terganggu. Sehinga pemberian anti-inflamasi diharapkan dapat mengurangi respon inflamasi. Penyembuhan otot yang cedera secara efektif membutuhkan tindakan terkoordinasi dari beberapa pensinyalan molekuler, seluler, dan signaling pathways.Studi pada hewan coba tertentu telah mengungkapkan bahwa ekspresi sitokin inflamasi dan stres oksidatif meningkat secara signifikan setelah cedera dan berperan penting dalam proses inflamasi akut dan regenerasi otot. Mekanisme regenerasi otot pada cedera otot sudah pernah dilakukan pada model cedera, atrofi otot, injeksi toksik, freeze-induced injury dan mdx pada tikus. Mekanisme inflamasi dan regenerasi otot pada cedera otot masih belum sepenuhnya dipahami, dan belum ada penelitian sistematis pada sitokin inflamasi, faktor oksidatif stres dan jalur pensinyalan sintesis protein pada kontusio injury.17

Berdasarkan uraian diatas maka dirumuskan tema sentral penelitian ini sebagai berikut:

Respon penyembuhan cedera otot yang buruk memperpanjang waktu penyembuhan yang lama, risiko cedera berulang, dan fibrosis yang menyebabkan hilangnya massa otot dan menggangu fungsi otot.

Penatalaksanaan cedera otot dilakukan pada fase akut maupun kronik setelah terjadinya cedera otot. Hal ini bertujuan untuk meminimalisasi terjadinya kerusakan lebih lanjut, menghilangkan rasa nyeri, dan spasme, mengurangi kejadian pendarahan dan edema serta mendukung penyembuhan. Respon perbaikan jaringan otot setelah cedera dipengaruhi oleh hormon, nutrisi, dan tingkat cedera. Pengembangan metode terapi yang efektif dalam meningkatkan respon penyembuhan otot setelah cedera penting untuk meminimalkan dampak dari cedera otot. Proses inflamasi memegang peran penting dalam penyembuhan dan regenerasi otot setelah cedera. Walaupun proses inflamasi berperan dalam regenerasi otot, namun inflamasi yang berlebihan menyebabkan kerusakan sekunder seperti fibrosis hingga degenerasi otot sehingga periode inflamasi setelah cedera otot harus ditekan.

Suplementasi selenium diketahui bersifat anti-inflamasi, sehingga pemberian selenium diharapkan dapat menghambat kaskade NF-kB, yang menginduksi produksi interleukin dan TNF.

Berdasarkan latar belakang dan tema sentral diatas, maka dilakukan penelitian untuk menganalisis pengaruh pemberian selenium pada cedera otot terhadap kadar muscle creatin kinase (CK-MM) dan ekspresi NF-kB, IL-1 dan IL-6 pada tikus jantan jenis wistar.

* 1. **Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang penelitian diatas maka rumusan masalah sebagai

berikut:

1. Apakah terdapat pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap kadar muscle creatin kinase pada cedera otot (Kontusio)?
2. Apakah terdapat pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap ekspresi protein NF-kB pada cedera otot (Kontusio)?
3. Apakah terdapat pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap ekspresi protein IL-1 pada cedera otot (Kontusio)?
4. Apakah terdapat pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap ekspresi protein IL-6 pada cedera otot (Kontusio)?
5. Apakah terdapat pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap fungsi berjalan otot pada cedera otot (Kontusio)?
   1. **Tujuan Penelitian**

Berdasarkan rumusan masalah diatas, disusun tujuan penelitian sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap kadar kreatin kinase pada cedera otot (kontusio)
2. Mengetahui pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap ekspresi NF-kB pada cedera otot (kontusio)
3. Mengetahui pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap ekspresi IL-1 pada cedera otot (kontusio)
4. Mengetahui pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap ekspresi protein IL-6 pada cedera otot (kontusio)
5. Mengetahui pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap fungsi berjalan otot pada cedera otot (kontusio)
   1. **Manfaat Penelitian**
6. Aspek Ilmiah

Memberikan informasi ilmiah pengaruh suplementasi selenium pada cedera otot (Kontusio Injury) serta gambaran perubahan kadar *muscle creatin kinase* dan ekspresi NF-kB, IL-1, dan IL-6

1. Aspek Praktis

Memberikan dasar penelitian lebih lanjut pengaruh suplementasi selenium terhadap cedera otot (Kontusio Injury) pada hewan coba di tinjau dari perubahan kadar *muscle creatin kinase* dan ekspresi NF-kB, IL-1, dan IL-6

**BAB II**

**KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA PEMIKIRAN**

**DAN HIPOTESIS**

* 1. **Kajian Pustaka**
     1. **Selenium**

Selenium adalah mineral penting yang secara alami ditemukan di tanah, air dan makanan. Selenium sebagai antioksidan merupakan salah satu elemen penting pada tubuh manusia dan terbukti sebagai suplemen makanan untuk kesehatan. Secara global konsentrasi selenium (Se) pada tanah berada pada kisaran 0,001–0,2 mg/kg. Konsentrasi yang lebih tinggi ditemukan pada tanah yang mengandung material seleniferus, seperti batu pasir, batu gamping, dan batu bara). Deposisi selenium yang berasal dari aktivitas antropogenik (pembakaran bahan bakar fosil, humus, dan komponen agrikultural seperti penyubur tanaman) memberikan kontribusi konsentrasi selenium yang lebih tinggi dibandingkan dengan sumber alami lainnya. Konsentrasi selenium yang dikonsumsi bergantung pada tempat suatu tanaman tumbuh dan diolah, tanah yang sering didiami oleh ternak, dan jumlah beserta jenis makanan mengandung selenium yang dikonsumsi. Beberapa kelompok makanan utama yang kaya akan selenium, yakni roti dan sereal, daging, ikan, telur, dan produk susu. Kacang Brazil telah diketahui sangat kaya akan kandungan gizi dengan konsentrasi seleniumnya sebesar 0,03-5,12 mg/kg.18,19

Konsentrasi selenium pada roti dan sereal bervariasi dari 0,01-30 mg/kg. Spesies selenium yang umum terkandung dalam roti dan sereal adalah selenometionin, selenosistein, selenat, dan selenit. Keberadaan selenium pada daging, terutama pada bagian hati dan ginjal, mengandung selenium yang tinggi dengan kisaran konsentrasi secara beururtan mengandung sekitar 0,2 mg/kg selenium. Selenium pada ikan memiliki konsentrasi yang lebih tinggi yakni sekitar 0,1-5,0 mg/kg. Satu butir telur ayam utuh mengandung sekitar 3-25 μg/kg selenium. Konsentrasi selenium pada produk-produk susu sangatlah bervariasi dengan kisaran konsentrasi sebesar 0,01-0,03 mg/kg. Sayur dan buah-buahan secara relatif mengandung selenium dalam jumlah yang kecil. Bawang putih yang tumbuh di tanah yang mengandung sedikit selenium hanya mengandung sekitar 0,5 mg/kg selenium. Namun bila tanah 8 tempat tumbuhan tertentu seperti bawang putih, bawang putih, dan brokoli mengandung cukup selenium maka tumbuh-tumbuhan tersebut dapat mengandung selenium dalam konsentrasi yang lebih tinggi yang berkisar antara 140-300 mg/kg. Selenium terlibat dalam pengaturan berbagai fungsi seluler (termasuk katalisis enzim dan transduksi sinyal), serta untuk mendukung fungsi otak. Selenium merupakan komponen penting dalam enzim glutation peroksidase yang berfungsi untuk mengkatalisasi proses reduksi hidrogen peroksidase pada jaringan.18,19

Selenium merupakan mineral essensial dan elemen gizi mikro yang penting bagi tubuh. Mineral ini penting dalam sebagain besar fungsi tubuh seperti kesehatan sistem imun, fungsi sistem tiroid, kardiovaskular dan dalam melawan stress oksidatif. Ada dua bentuk selenium yaitu bentuk organik dan anorganik. Asupan selenium dapat diperoleh dari makanan seperti daging, makanan laut dan tanaman yang kadarnya dipengaruhi oleh kadar selenium dalam tanah dan air yang digunakan. Kebutuhan selenium individu per harinya berkisar antara 30-85 µg/ hari.

Defisiensi asupan selenium dapat meningkatkan resiko terjadinya penyakit kardiovaskular, tiroiditis dan inflamasi. Sehingga banyak penelitian untuk membuktikan penggunaan suplementasi selenium dapat mengatasi penyakit tersebut.18,19

Selenium merupakan unsur dengan nomor atom 34, memiliki sifat semi logam dan berada dalam bentuk yang kimia yang beragam di alam. Selenium terdapat dalam dua bentuk, yaitu dalam bentuk anorganik dan dalam bentuk organik. Bentuk anorganik dari selenium adalah selenat (SeO4-2) dan selenit (SeO3-2), sedangkan bentuk organiknya adalah selenometionin dan selenosistein. Kandungan selenium dalam tanaman diperoleh dari tanah yang ditentukan oleh kadar selenium dalam tanah, kemampuan tanaman untuk menyerap selenium dam spesies tanaman. Sebagain besar selenium pada tanaman berada dalam bentuk selenometionin yang diserap seperti metionin. Selenometionin memiliki bioavaibilitas yang baik, karena sekitar 90% dari dosis selenometionin diabsorpsi oleh tubuh. Namun bentuk anorganik seperti selenat dan selenit yang digunakan sebagai suplemen juga memiliki bioavabilitas yang baik.13,14

* + 1. **Selemethionone dan Dosis Selenium**

Selenomethionine (SeMet) adalah asam amino yang terbentuk secara alami. Enantiomer L-selenomethionine adalah bentuk utama dari selenium yang ditemukan dalam kacang Brasil, biji-bijian sereal, kedelai, dan kacang-kacangan padang rumput, sedangkan Se-methylselenocysteine, atau turunan γ-glutamyl, adalah bentuk utama selenium yang ditemukan dalam Astragalus, Allium, dan Spesies Brassica. Selenomethionine mudah teroksidasi, aktivitas antioksidan selenomethionine muncul dari kemampuannya untuk mengurangi *reactive oxygen species* (ROS). Selenium dan metionin juga memainkan peran terpisah dalam pembentukan dan daur ulang *glutathione*, antioksidan endogen berperan penting dalam banyak organisme, termasuk manusia. Selenomethionine sudah tersedia sebagai suplemen makanan. Telah dikemukakan oleh ahli gizi bahwa selenomethionine, sebagai bentuk organik selenium, lebih mudah diserap tubuh manusia daripada selenite, yang merupakan bentuk anorganik. Ditentukan dalam uji klinis bahwa selenomethionine diserap 19% lebih baik daripada selenite.18,19

*World Health Organization* (WHO) merekomendasikan dosis selenium sehari berkisar antara 30-40 mg orang dewasa, dan menekankan bahwa dosis selenium 400 mg/hari tidak berbahaya. *The food and nutrition board of the national academy*, menyatakan bahwa kebutuhan selenium perhari berdasarkan usia dan jenis kelamin bervariasi, pada pria 40-70 mg dan pada wanita 45-55 mg. dosis selenium sehari 100-200 mg dapat menyebabkan kerusakan genetik.Referensi yang paling sering digunakan adalah *Recommended Dietary Allowance* (RDA), yaitu rata-rata asupan per hari yang cukup memenuhi 97%-98% kebutuhan orang sehat (National Institute of Health, 2016). RDA selenium dibedakan pada beberapa kelompok usia dan jenis kelamin. Keracunan selenium akut dihubungkan dengan asupan yang sangat tinggi, antara 3200-6700 μg/hari. Gejala awal keracunan selenium sudah muncul dengan jumlah asupan yang lebih sedikit. Karena itu Badan Makanan dan Nutrisi juga menentukan dosis maksimal yang masih dapat ditoleransi sebelum menunjukkan gejala kerontokan dan kerapuhan rambut dan kuku.20,21

* + 1. **Biovabilitas dan Distribusi**

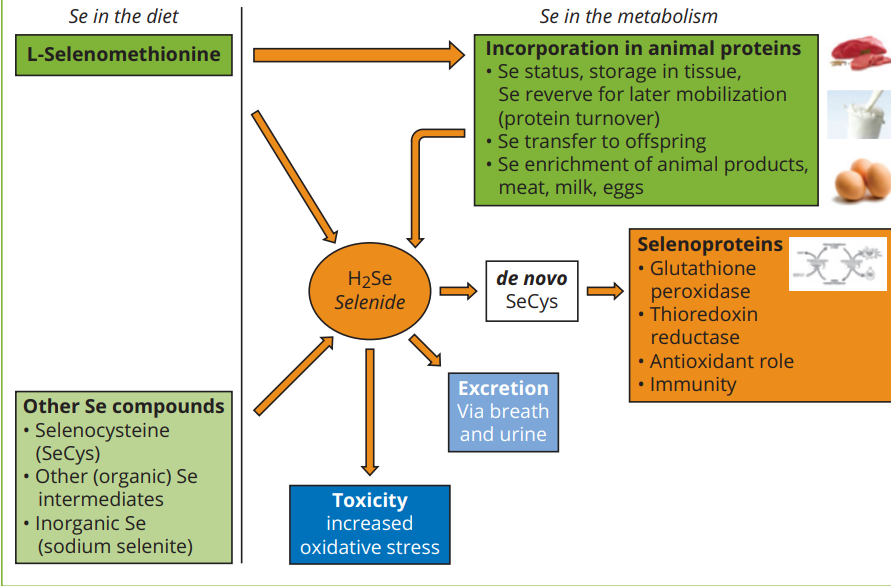
Tumbuhan mengkonversi selenium menjadi Se-Met yang merupakan jenis selenium yang paling banyak (>50%) dikandung tumbuhan diantara jenis selenium lainnya seperti Se-Cys, methyl-selenocysteine (Methyl-Se-Cys), dan γglutamyl-Se-Methyl-Cys. Hewan dengan kelas yang lebih tinggi tidak mampu mensintesis Se-Met, hanya Se-Cys yang terdeteksi. Pada mamalia, Se-Met yang dikonsumsi akan diabsorpsi di usus halus melalui transport sistem Na+-dependent neutral amino acids. Bioavailabilitas selenium bergantung pada konversi selenium yang dikonsumsi menjadi bentuknya yang aktif secara biologis. Regulasi di ginjal merupakan regulasi utama selenium dalam tubuh. Konsumsi selenium yang adekuat diestimasikan sekitar 50 μg per hari dengan estimasi toksisitas yakni 350-700 μg per harinya. Pada plasma, selenium ditemukan pada fraksi albumin, sedangkan pada eritrosit kebanyakan bergabung dengan hemoglobin (Hb). Selenium dalam bentuk Se-Met secara signifikan dijaga kadarnya pada protein di otak.22

* + 1. **Metabolisme Selenium**

Selenium masuk dalam tubuh manusia dalam bentuk anorganik dan organic, terdiri dari selenomethionine yang berasal dari makanan nabati dan selenocycteine yang berasal dari makanan hewani. Kedua bentuk ini menimbulkan implikasi berbeda pada bentuk selenium dalam jaringan. Penyerapan selenium terjadi di bagian bawah usus halus lewat berbagai jalur dan mekanisme. Selenium dari makanan memiliki biovailabilitas yang sangat baik. Selenomethionin dan selenocycteine diserap lebih dari 90% dan selenat hampir 100%. Selenit dapat diserap lebih dari 50%, tergantung interaksi luminal. Bentuk organic lebih dapat bertahan dalam tubuh dibandingkan inorganic. Proses asimilasi selenium terjadi melalui beberapa seri interkonversi (Fairweather-Tait dkk., 2011). Selenida (H2Se) diduga merupakan faktor sentral pada proses interkonversi metabolik selenium organik dan inorganik.20,21

*Selenomethionine* (Se-Met) yang diperoleh dari makanan dikonversi menjadi

selenocysteine (Se-Cys) dengan bantuan *cystathionine b-synthase* dan *cystathionine g-lyase*. Se-Cys β-liase melepaskan selenida dari Se-Cys. *Se-methylselenocysteine* yang diperoleh dari makanan dapat dikonversi menjadi *methylselenol* (CH3SeH) pada reaksi *cystathione g-lyase-catalysed*, dimana nantinya dapat dimetilasi untuk menghasilkan selenida (H2Se). Selenit dapat direduksi menjadi selenida melalui aksi *thioredoxin reduxtase* (TXNRD) dan dapat bereaksi dengan *glutathione* membentuk *selenodiglutathione*. *Selenodiglutathione* merupakan substrat yang akan direduksi menjadi *glutathioselenol* dengan *glutathione reductase*. Setelah diserap, selenium dibawa ke hati untuk dimetabolisme. Dari semua bentuk selenium, selenosistein memiliki keistimewaan, karena selain didapat langsung dari luar tubuh, derivat selenium lain, seperti selenometionin, akan diubah menjadi selenosistein. Selain itu, selenosistein juga disintesa oleh tubuh. Prosesnya terkode secara genetik di sistem ribosom. Karena itu, selenosistein dikenal sebagai asam amino ke-21. Selenosistein akan diubah menjadi hidrogen selenida bersama selenium inorganik, dan dengan bantuan ATP menghasilkan selenoprotein. Setelah selenoprotein dikatabolisme, maka selenium akan dikembalikan menjadi selenosistein. Selenoprotein yang sudah diproduksi di hati akan dilepaskan ke aliran darah dan didistribusikan ke organ targetnya, tempat selenoprotein tersebut bekerja. Kelebihan selenium akan dikeluarkan dengan mekanisme metilasi menjadi *dimetilselenida* (DMSe), yang diekskresi lewat hembusan nafas, kulit, feses dan gula selenida (selenosugars), dan *trimetil selenide ,*(TMSe), yang diekskresi lewat urin.20,21



Gambar 2.1 Metabolisme L-selemethionine dan senyawa selenium lainnya20,21

* + 1. **Selenoprotein dan fungsi**

Dua puluh dua jenis selenoprotein telah diketahui. Glutathione peroxidase (GPx), iodothyronine 5'-deiodinase (DI-I), dan thioredoxin reductase (TXNRD) telah diidentifikasi pada hewan dan manusia. Selenoprotein tersebut diketahui memiliki efek antioksidan yang baik, oleh karenanya kini banyak penyakit akibat peningkatan stres oksidatif dalam tubuh dan perubahan sinyalisasi redoks dikaitkan dengan defisiensi selenium. GPx memiliki fungsi fisiologis utama dalam mengatur level hidrogen peroksida (H2O2) yang tetap rendah di dalam sel sehingga menurunkan tingkat kerusakan sel akibat radikal bebas. Selenoprotein dibagi lagi menjadi beberapa kelompok berdasarkan lokasi Sec pada polipeptida selenoprotein. Kelompok I (kelompok GPx) merupakan kelompok yang paling banyak dan mengandung protein-protein dimana lokasi Sec terletak pada N-terminal yang terdiri dari 80-250 residu asam amino. Pada kelompok GPx, Sec dioksidasi selama katalisis menjadi asam selenenik atau bentuk ikatan selenosulfida. Kelompok kedua (kelompok TR) ditandai dengan kehadiran Sec di urutan C-terminal. Kelompok lain terdiri dari isoenzim deiodinase, Se-R, Se-N, SPS2 dan 15 kDa selenoprotein.21

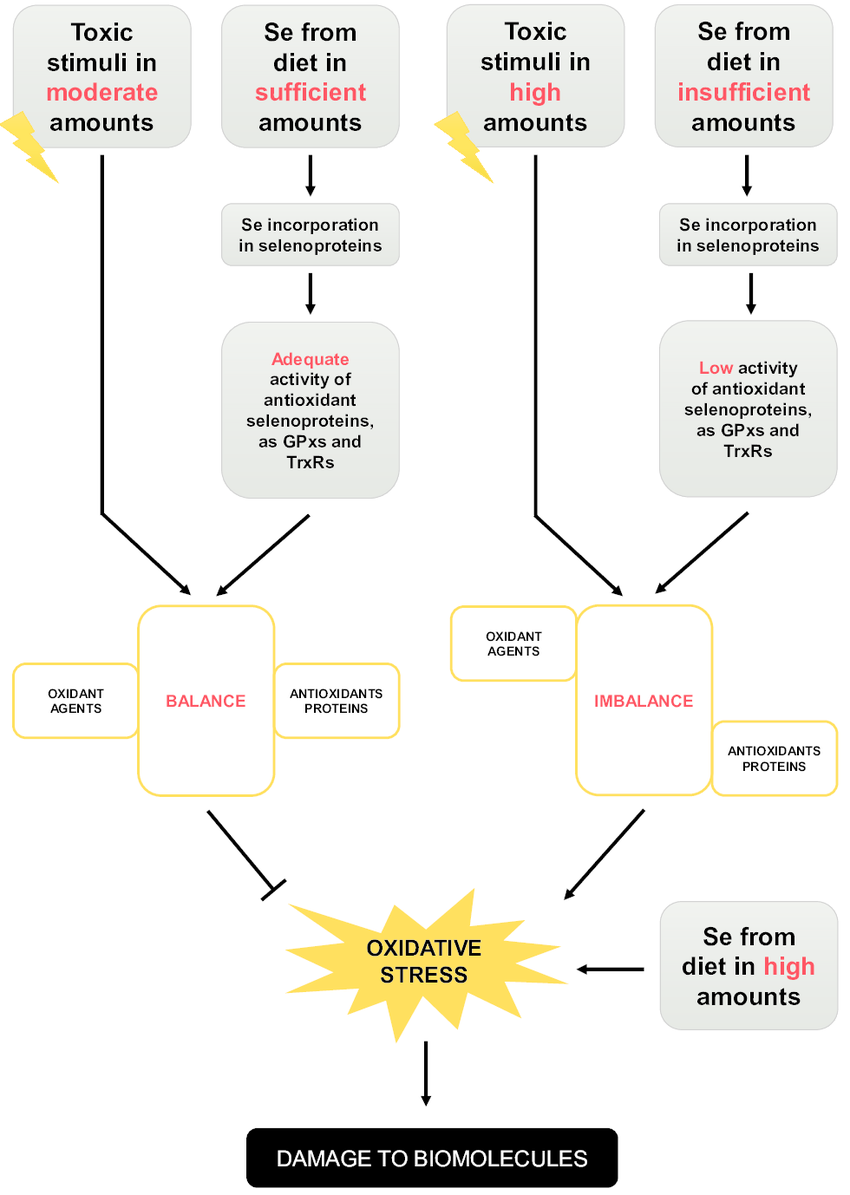
* + 1. **Selenium Sebagai Antioksidan dan Aktivasi Selenoprotein**

Selenium memiliki peran dalam mengurangi oxidative stress melalui selenoprotein yang berfungsi sebagai antioksidan. *Oxidative stress* terjadi ketika produksi radikal bebas, termasuk *reactive oxygen species* (ROS), *oxidesed protein*, dan *oxidised lipid*, di produksi melebihi kemampuan antioksidan yang mengakibatkan kerusakan selelur atau jaringan. Selenoprotein GPX dan TrxR yang mengandung *selenocysteine* yang berfungsi dalam reaksi oksidasi. GPx1 dapat mengurangi ROS dalam sitoplasma, GPx4 memiliki kemampuan untuk mengurangi *fatty acid hydroperoxides* (FAHP) dan phospholipid hydroperoxides dalam membrane sel. GPx4 dalam mitokondria terbukti mempertahankan produksi ATP selama oxidative stress yang dapat memiliki implikasi pada aktivitas seluler dan fungsi selama penyakit. *Tioredoksin* (Trx) mengurangi berbagai radikal termasuk lipid hidroperoksida, tiol protein, dan ROS. Trx teroksidasi kemudian dikembalikan ke bentuk tereduksi oleh TrenR selnoprotein.16

Tubuh manusia dilengkapi dengan berbagai macam antioksidan yang dapat menyeimbangkan efek oksidan. Antioksidan dibagi menjadi dua, Antioksidan terdiri dari antioksidan internal dan antioksidan eksternal. Antioksidan internal disebut juga antioksidan primer, yaitu antioksidan yang diproduksi oleh tubuh sendiri. Secara alami tubuh mampu menghasilkan antioksidan sendiri, tetapi kemampuan inipun ada batasnya. Sejalan bertambahnya usia, kemampuan tubuh untuk memproduksi antioksidan alami akan semakin berkurang. Hal inilah yang menyebabkan stres oksidatif, yaitu suatu keadaan dimana jumlah radikal bebas melebihi kapasitas kemampuan netralisasi antioksidan. Antioksidan internal bekerja dengan cara menangkal terbentuknya radikal bebas. Yang termasuk antioksidan internal adalah *Super Oxide Dismutase* (SOD), *Glutation Peroxidase* (GPx), Katalase (Cat). Antioksidan eksternal disebut juga antioksidan sekunder, yaitu antioksidan yang berasal dari makanan atau didapat dari luar tubuh. Tidak dihasilkan oleh tubuh tetapi berasal dari makanan seperti vitamin A, beta karoten, vitamin C, vitamin E, Selenium, Flavonoid dan lain-lain. Antioksidan eksternal bekerja dengan cara meredam atau menetralisir antioksidan yang sudah terbentuk.22

Katalase merupakan enzim antioksidan pertama yang dikarakterisasi dan berfungsi mengkatalis dua tahap konversi hidrogen peroksidan menjadi air dan oksigen. Katalase terdiri empat protein subunit, masing-masing mengandung grup heme dan molekul NADPH. Sebagian besar katalase terletak di dalam sel yaitu di dalam peroksisom yang juga mengandung sebagian besar enzim yang dapat menghasilkan hidrogen peroksida. Jumlah katalase di dalam sitoplasma dan kompartemen subseluler lainnya masih belum jelas karena peroksisom mudah hancur selama manipulasi sel. Katalase ditemukan di seluruh jaringan namun sebagian besar terdapat di hepar dan eritrosit.

Glutation peroksidase mengkatalis oksidasi glutation dengan mengorbankan hidroperoksida atau spesies ROS lain seperti *lipid hidroperoksida*. Glutation peroksidase membutuhkan selenium di situs aktif. Bentuk plasma glutation peroksidase disintesis terutama di ginjal. Di dalam sel konsentrasi tertinggi ditemukan di hati meskipun glutation peroksidase tersebar luas di hampir semua jaringan. Distribusi subselular yang paling dominan adalah di dalam sitosol dan mitokondria, hal ini menunjukkan bahwa glutation peroksidase merupakan ‘scavanger’ utama hidrogen peroksida dalam kompartemen subseluler. Aktivitas enzim tergantung pada ketersediaan dari glutation tereduksi. Rasio glutation tereduksi menjadi glutation teroksidasi dijaga konsentrasinya agar tetap tinggi sebagai hasil dari aktivitas enzim *glutation reductase*. *Superoxide dismutase* mengkatalis dismutase dari superoxide menjadi hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida harus dihilangkan oleh katalase atau glutation peroksidase, seperti yang dijelaskan pada formula di atas. Terdapat tiga bentuk superoxide dismutase pada jaringan mamalia dengan lokasi subseluler dan distrubusi jaringan yang berbeda-beda.23

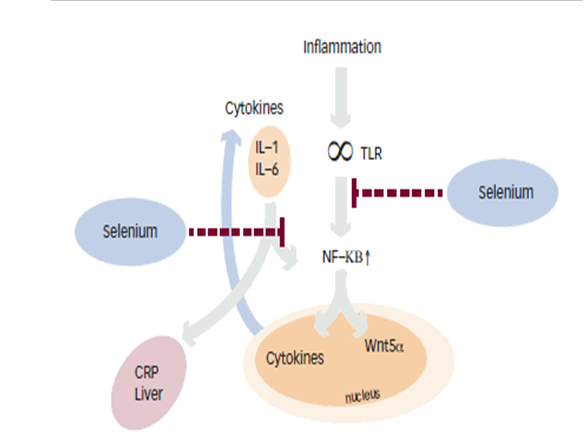


Gambar 2.2 Peristiwa utama yang mempengaruhi aktivitas antioksidan Se. Aktivitas antioksidan Se terjadi melalui selenoprotein, yang dipengaruhi oleh kadar Se yang diperoleh melalui diet.24

* + 1. **Mekanisme Selenium pada Inflamasi**

*Nuclear factor kappa beta* (NF-kB) berkaitan dengan respon inflamasi dan aktivasinya berkaitan erat dengan produksi interleukin 6 dan TNF-α. Terdapat beberapa jenis mekanisme antiinflamasi dari selenium. Selenium dapat menstimulasi terjadinya ekspresi gen selenoprotein yang dapat menghambat aktivasi NF-kB. Suplementasi selenium pada inflamasi kronis, dapat meningkatkan kadar Se serum dan biosintesis selenoprotein yang akan menekan produksi CRP dalam proses inflamasi.5,25

Penurunan kadar selenium secara inflamasi akut dan kronis dilihat melalui kadar CRP yang ditinggi. Kadar selenium rendah juga dilihat pada Severe Inflammatory Respone Syndrome (SIRS), yang ditandai dengan peningkatan produksi *Reactive Oxigen Species* (ROS) oleh makrofag teraktivasi, induksi kerusakan oksidatif dan cedera jaringan. Selenium dapat di berikan pada fase inflamasi akut. Mekanisme molekuler dari induksi inflamasi dimediasi oleh aktivasi nuklir faktor kappa-B (NFkB) yang kemungkinan mengaktifkan transkripsi Wnt5α dan meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi, seperti interleukin (IL) -1 dan IL-6, yang secara sinergis mungkin merangsang sintesis protein C-reaktif (CRP) di hati. Asupan selenium mungkin menghambat aktivasi NFkB dan mengurangi sintesis CRP.25



Gambar 2.3 Mekanisme Kerja Selenium25

* + 1. **Cedera Otot**

Cedera otot merupakan salah satu cedera yang paling sering terjadi pada olahraga. Cedera otot dapat terjadi akibat trauma langsung seperti laserasi otot dan kontusio, maupun akibat trauma tidak langsung seperti strain. Lebih dari 90% cedera olahraga berupa kontusio maupun strain, sedangkan laserasi otot lebih jarang terjadi. Pada trauma minor seperti strain, otot skelet dapat beregenerasi sempurna secara spontan. Namun pada kasus trauma berat proses penyembuhan otot dapat berlangsung tidak sempurna, mengakibatkan pembentukan jaringan fibrosis yang mengganggu fungsi otot.1,2

Perbaikan cedera otot diatur oleh beberapa faktor dan dapat dibagi menjadi fase akut, perbaikan dan remodeling. Fase akut awal ditandai dengan pembentukan hematoma secara bersamaan, nekrosis myofiber, degenerasi dan respons inflamasi. Tahap kedua, perbaikan, terdiri dari fagositosis jaringan nekrotikans dan regenerasi myofibers oleh sel-sel satelit yang diaktifkan dan berkembang biak. Fase terakhir ditandai dengan maturasi myofiber yang diregenerasi dan pembentukan jaringan parut.1,2

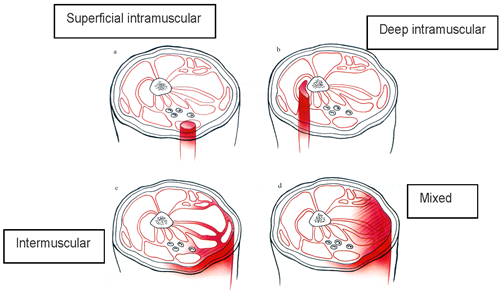
Klasifikasi cedera otot terdiri dari ringan, sedang, dan berat. Grade 1 sprain dan kontusio adalah cedera yang hanya mempengaruhi serat otot, dengan sedikit edema dan ketidaknyamanan, disertai sedikit atau kehilangan kekuatan dan keterbatasan gerak. Pada grade ini tidak menyebabkan gangguan fungsional yang signifikan. Grade II sprain dan kontusio moderat, menyebabkan kerusakan otot yang lebih besar, dengan hilangnya fungsi yang jelas (kemampuan berkontraksi). Hematoma terbentuk dalam 2 hingga 3 hari. Proses penyembuhan pada grade ini berlangsung selama 2 hingga 3 minggu dan sekitar 1 bulan, pasien dapat kembali beraktivitas fisik secara perlahan dan hati-hati. Cedera yang meluas di sekitar otot menyebabkan hilangkan fungsi otot dan nyeri hebat, di klasifikasikan sebagai sprain dan kontusio yang parah atau Grade III. Pada grade ini proses penyembuhan berkisar antara 4 hingga 6 minggu. Cedera ini membutuhkan rehabilitasi intesif untuk periode yang lama (3-4 bulan).25

Pada penyembuhan cedera otot dan penyembuhan tulang terdapat perbedaan dalam proses penyembuhan. Pada otot ada proses perbaikan, sedangkan di jaringan tulang ada proses regenerasi. Penyembuhan otot secara signifikan sesuai dengan penyebabnya, kontusio, sprain, dan laserasi. Secara umum mekanisme perbaikan cedera pada cedera otot terbagi dalam 3 tahap yaitu fase degenerasi dan inflamasi/peradangan, fase regenerasi/ perbaikan dan fase remodelling/ renovasi. Tahapan fase perbaikan dan renovasi seringkali berjalan bersamaan.26

Proses degenerasi dan inflamasi terjadi pada beberapa hari awal setelah cedera. Proses ini dicetuskan karenaadanya kerusakan sarkolema. Kemudian terjadi influks kalsium yang tidak teregulasi ke dalam sarkolema yang cedera. Jumlah kalsium dalam sitoplasma yang berlebihan menyebabkan enzim protease dan hidrolase teraktivasi sehingga terjadi kerusakan sel otot serta mengaktivasi berbagai enzim yang mendorong terproduksinya substansisubstansi mitogenik bagi sel otot dan sel imunitas. Hematoma terbentuk ketika terjadi kematian sel otot. Bersamaan dengan ini, Sel-sel inflamasi hadir di area yang rusak karena robeknya pembuluh darah. Ketika terjadi kerusakan pada sarkolema, berbagai eikosanoid terutama prostaglandin, prostasiklin, leukotrien dan tromboksan di keluarkan Eikosanoid berperan dalam pengaturan vasodilatasi, aktivitas kemotaktik dan peningkatan permeabilitas endotel vaskular yang menyebabkan masuknya sel-sel inflamasi ke daerah cedera. Neutrofil akan melakukan fagositosis untuk menghilangkan komponen-komponen hasil cedera dengan cara melepaskan lisosom protease yang akan mendegradasi protein. Neutrofil juga membentuk ROS untuk menghindari terjadinya eksaserbasi cedera. Neutrofil kemudian mensekresi sejumlah besar molekul-molekul proinflamasi faktor-faktor pertumbuhan dalam rangka menciptakan lingkungan mikro yang kemoatraktif bagi sel-sel inflamasi lainnya seperti monosit maupun makrofag. Neutrofil kemudian digantikan oleh monosit dalam waktu beberapa jam setelah cedera. Monosit kemudian akan berubah menjadi makrofag. Makrofag memiliki 2 fungsi utama, yaitu menghilangkan serabut otot yang nekrosis melalui proses fagositosis. Fungsi lainnya adalah bersama fibroblast, makrofag juga menghasilkan sinyal kemotaktik seperti faktor-faktor pertumbuhan, sitokin dan kemokin.

Regenerasi sel otot dimulai pada 4-5 hari pertama setelah kerusakan dan memuncak setelah 2 minggu. Kemudian secara gradual akan menurun pada 3-4 minggu setelah terjadi kerusakan. Fase ini terdiri atas 2 tahap, yaitu regenerasi sel otot dan pembentukan jaringan ikat atau fibrosis. Sel otot merupakan sel post-mitosis yang tidak memiliki kapasitas untuk membelah. Pada keadaan cedera, sel otot yang rusak tidak mampu diperbaiki tanpa kehadiran sel prekursor miogenik yaitu sel satelit. Tahap regenerasi ini dapat terjadi karena masih adanya sel-sel satelit yang berada di bawah lamina basalis sel otot. Pada sel otot dewasa, sel satelit berada pada status istirahat. Jumlah sel satelit ini bergantung pada usia, lokasi dan tipe sel otot. Ketika otot mengalami cedera, sel satelit teraktivasi oleh faktor-faktor pertumbuhan dalam 18 jam setelah cedera sebagai respon terhadap stimulus kimiawi. Regenerasi serabut otot hanya dapat terjadi ketika sel satelit teraktivasi. Aktivasi ini menyebabkan sel satelit berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi mioblast. Mioblast kemudian akan membentuk miotubul baru atau bergabung dengan serabut otot yang rusak, mengisi area antara serabut otot yang rusak dan kemudian menjadi serabut otot fungsional yang matur. Di saat yang bersamaan, terjadi pembentukan jaringan ikat oleh fibrin dan fibronektin yang berasal dari darah akibat pembentukan hematoma pada awal kerusakan jaringan. Kehadiran fibrin dan fibronektin pada area kerusakan akan menginisiasi terbentuknya matriks ekstraselular yang akan diisi secara cepat oleh fibroblast. Matriks ekstraseluler mengandung faktor-faktor pertumbuhan yang menjadi aktif ketika terjadi kerusakan jaringan. Beberapa faktor pertumbuhan tersebut adalah FGF, IGF-2, TGF-β, *hepatocyte growth factor* (HGF), *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), dan IL-6 (interleukin-6). Faktor-faktor ini akan memanggil dan mengaktivasi fibroblast yang kemudian akan menghasilkan kolagen, yang berkontribusi dalam regenerasi jaringan. Mereka juga menghasilkan sinyal yang dapat mengaktivasi proliferasi dan diferensiasi sel satelit. Jaringan ikat yang terbentuk pada fase ini akan memberikan dasar bagi fibroblast untuk mengisi jaringan granulasi serta memberikan kekuatan pada otot untuk menahan kontraksi. Namun dalam kasus proliferasi fibroblast yang berlebih, jaringan parut dapat terbentuk di antara otot yang rusak. Hal ini tidak hanya mengganggu proses perbaikan, tetapi juga menghambat proses regenerasi otot dan menyebabkan pemulihan fungsional otot pada fase selanjutnya menjadi tidak sempurna.

Fase ketiga ini terdiri atas proses remodelling yang dimulai 2-3 minggu setelah onset cedera dan dapat bertahan hingga 1 tahun atau lebih. Fase ini bertujuan untuk menghasilkan maksimal kekuatan regangan sel otot melalui proses reorganisasi, degradasi dan resintesis matriks ekstraselular. Fase ini ditandai dengan terbentuk sel-sel otot yang matur dengan perubahan pada matriks ekstraselular dan resolusi dari inflamasi awal serta terjadi reorganisasi jaringan ikat fibrosis serta kontraksi jaringan.



Gambar 2.4 Klasifikasi Intramuscular Cedera26

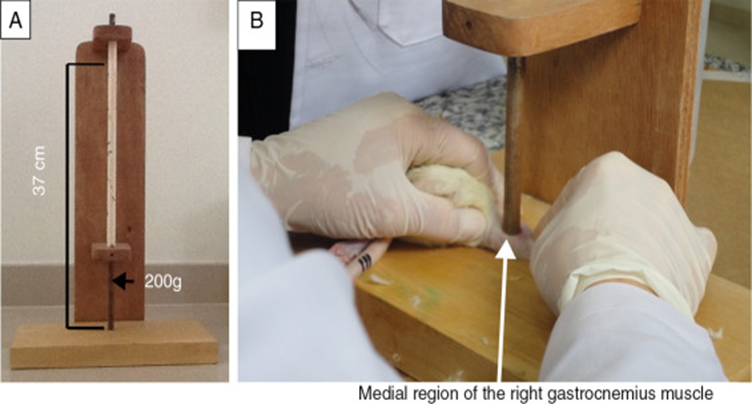
* + 1. **Kontusio Injury**

Kontusio adalah salah satu jenis cedera otot yang paling umum terjadi, dan terjadi ketika jaringan terpapar pada gaya tekan yang cepat dan kuat atau misalnya, pukulan langsung yang biasanya terjadi pembentukan hematoma di dalam otot. Gejalanya bervariasi dan tidak mengikuti pola yang khas, namun umumnya ada rasa sakit, nyeri saat digerakkan, ROM terbatas atau kombinasi dari gejala-gejala ini. Kontusio disebabkan oleh trauma benda tumpul yang terjadi di luar otot, yang mengakibatkan kerusakan jaringan dan seluler serta pendarahan di dalam otot. Terjadi nekrosis dan hematoma pada jaringan menyebabkan inflamasi. Memar yang terjadi disebabkan oleh darah yang keluar dari kapiler yang rusak ke jaringan interstitial. Dalam beberapa jam setelah cedera, keberadaan jaringan nekrosis dan hematoma memulai terjadinya inflamasi.3

Kontusio model yang dilakukan pada hewan coba memiliki tanda dan gejala klinis yang mirip dengan kontusio pada manusia. Cedera yang dihasilkan pada hewan ditemukan Ketika beban (massa dengan 300 g) diterapkan dari ketinggian 40 dan 50 cm akan menghasilkan cedera ringan sampai sedang; Namun, pada ketinggian 60 cm, cederanya dari sedang ke berat dan pada ketinggian 70 cm, hasilnya menunjukkan cedera otot yang parah diikuti oleh fraktur tibia dan fibula.27

Kontusio dinilai berdasarkan grade 1, 2, atau 3 tergantung pada tingkat keparahannya. Grade 1 (ringan): memar otot grade 1 menghasilkan memar ringan, sedikit rasa sakit dan tidak ada bengkak di lokasi cedera. Lutut bergerak secara normal atau sangat dekat dengan normal. Mungkin ada rasa sakit ringan saat tekanan diterapkan pada area cedera. Grade 2 (sedang): Cedera ini sedikit dalam dari kontusi grade 1 dan menghasilkan rasa sakit ringan dan sedikit pembengkakan. Orang dengan cedera grade 2 hanya dapat menekuk bagian lutut jalan dan dapat berjalan dengan sedikit lemas. Tekanan pada area cedera menyebabkan rasa sakit. Grade 3 (parah): memar otot yang parah sangat menyakitkan dan disertai pembengkakan yang nyata. Individu dengan cedera jenis ini biasanya akan mengalami memar yang jelas saat melihat cedera. Grade ini dapat menyebabkan hilangnya gerakan yang signifikan di lutut dan menyebabkan pincang yang jelas. Orang-orang dengan kontusio grade 3 mengalami nyeri dengan tekanan di lokasi cedera dan daerah sekitarnya.27

Model kontusio yang sederhana dapat dilakukan pada tikus. Sebelum pembuatan model kontusio, tikus di timbang dan dianestesi terlebih dahulu dengan ketamin dan xylazine (dosis 80 dan 10 mg/kgbb) secara intraperitioneal. Anestesi diberikan untuk membuat otot berada dalam kondisi relaksasi penuh sehingga dihasilkan cedera maksimal tanpa tahanan dari kontraksi otot. Tungkai belakang tikus dicukur dan dibersihkan dengn alkohol. Bagian tengah otot ditentukan dengan palpasi kemudian area perlakuan diberi tanda dengan tinta permanen. Tungkai belakang tikus diposisikan pada papan, pergelangan kaki diposisikan dorsi flexi hingga 90 derajat. Cedera dilakukan pada otot *right gastrocnemius muscle* (RGM) menggunakan perangkat yang terdiri dari platform kayu dengan tabung aluminium berongga, lurus, pada 5 cm, ditempatkan tegak lurus ke platform. Setelah cedera, tidak adanya fraktur tibialis dinilai dengan cara dipalpasi.28



Gambar 2.5 Model Kontusio28

* + 1. **Peranan ROS Pada Cedera Otot**

*Reactive Oxigen Species* (ROS) merupakan molekul sinyal penting yang memegang peranan kunci dalam proses inflamasi. ROS bersifat sangat reaktif dan keberadaannya bertahan hanya dalam waktu singkat. ROS meliputi radikal bebas seperti. Superoxide anion radical dan hydroxyl radical (OH), serta nonradical oxidant. Seperti *hydrogen peroxide* (H2O2) dan *singlet oxigyn* (1O2). Fase inisial produksi ROS yaitu reduksi univalen molekul oksigen (O2) untuk membentuk superoxide. Dalam kondisi fisiologis proses ini dimediasi oleh siklus transpor elektron di mitokondria.

ROS intraseluler paling banyak disebabkan akibat reduksi elektron oksigen tunggal untuk membentuk superoksida radikal. Dua molekul superoksida dapat dikonversi menjadi satu molekul ROS hidrogen peroksida non radikal dan satu molekul air oleh superoksida dismutase. ROS dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu radikal bebas dan non radikal. Molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan dan memberikan reaktivitasnya ke molekul lain disebut dengan radikal bebas. Sedangkan non radikal adalah ketika dua radikal bebas membagi elektron tidak berpasangannya. Tiga bentuk ROS utama, yaitu anion *superoksida* (O2-), *hidrogen peroksida* (H2O2) dan *hidroksil radikal* (•OH). Hidrogen peroksida dapat menerima elektron lain dari Fe2+ melalui reaksi fenton menjadi hidroksi radikal (•OH). Ketiga bentuk utama ROS tersebut memiliki reaktivitas yang berbeda yang dapat memberi efek yang berbeda pula pada fisiologi sel.29

ROS diproduksi oleh organisme hidup sebagai hasil dari metabolisme normal sel. Pada konsentrasi sedang, fungsi fisiologis sel masih dapat dipertahankan. Namun pada konsentrasi tinggi terjadi pergeseran modifikasi komponen sel, seperti lipid, protein, dan DNA. Pergeseran keseimbangan antara oksidan dan antioksidan disebut dengan stres oksidatif. Stres oksidatif berkontribusi pada sejumlah kondisi patologis. Anion superoksida terbentuk akibat penambahan satu elektron ke molekul oksigen. Proses ini dimediasi oleh *nicotine adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) *oksidase*, *xantin oksidase* atau oleh sistem transpor elektron mitokondria. Tempat utama untuk memproduksi anion superoksida adalah mitokondria yang merupakan mesin utama sel untuk menghasilkan *adenosine triphosphate* (ATP).

Pada keadaan normal, elektron ditansfer melalui rantai transpor mitokondria untuk mereduksi oksigen menjadi air, tetapi sekitar 1% sampai 3% dari seluruh elektron mengalami kebocoran sehingga menghasilkan superoksida. NADPH oksidase dapat ditemukan di leukosit polimorfonuklear, monosit dan makrofag. Ketika proses fagositosis, sel-sel tersebut memproduksi sejumlah superoksida yang menyebabkan aktivitas bakterisidal. Superoksida dikonversi menjadi hidrogen peroksida melalui aktivitas *superokside dismutase* (SOD). Hidrogen peroksida dapat berdifusi dengan mudah melewati membran plasma. Hidrogen peroksida juga diproduksi oleh *xantin oksidase*, asam amino oksidase, NADPH oksidase dan di peroksisom melalui konsumsi oksigen molekuler pada reaksi metabolik. Oksigen yang berasal dari radikal bebas lainnya adalah *peroksil radikal* ROO•. Bentuk paling sederhana dari radikal bebas ini adalah *hidroperoksil radikal* HOO• dan memiliki peran dalam peroksidasi asam lemak. Radikal bebas dapat menyebabkan reaksi peroksidasi rantai lemak dengan abstraksi atom hidrogen dari sisi rantai karbon metilen. Lipid radikal kemudian bereaksi dengan oksigen untuk memproduksi peroksil radikal. Peroksil radikal memulai rantai reaksi dan mentransformasi asam lemak poliunsaturated menjadi lipid peroksidase.29

* + 1. ***Muscle creatin kinase* (CK-MM)**

Creatine kinase (CK) adalah enzim yang mengkatalisis fosforilasi kreatin (Cr) yang reversibel oleh adenosin trifosfat (ATP). Secara fisiologis, ketika otot berkontraksi, ATP dikonversi menjadi adenosin difosfat (ADP), dan CK mengkatalisis reposforilasi ADP menjadi ATP menggunakan creatine phosphate sebagai reservoir fosforilasi. Enzim CK merupakan suatu molekul dimerik yang terdiri dari sepasang monomer berbeda yang disebut M (Muscle = berkaitan dengan otot), dan B (Brain = berkaitan dengan otak). Kombinasi kedua sub unit menghasilkan tiga isoenzim kreatin kinase yang berbeda yaitu CK1 (CKBB), CK2 (CK-MB), dan CK3 (CKMM). Enzim CK mengkatalis mengkatalis transfosforilasi secara reversible antara ATP dan fosfokreatin. Distribusi isoenzim CK relatif spesifik pada jaringan. Sumber jaringan utama CK adalah otak dan otot polos (BB), otot jantung (MB dan MM), dan otot rangka (MM). Enzim CK3 dan sMtCK ditemukan di otot skelet, sedangkan CK1 dan uMtCK banyak ditemukan di otak, otot polos dan jaringan lain. Injuri pada jaringan otak dapat meningkatkan aktivitas CK-BB dalam cairan otak, tetapi jarang meningkatkan aktivitas CK serum total. Enzim CK-MM dan CK-BB sama sekali tidak relevan untuk mendeteksi nekrosis pada otot jantung. Enzim CK-MB mempunyai konsentrasi yang tinggi di otot jantung, tetapi sedikit di otot skelet. Enzim CK-MM mayoritas terdapat pada otot skelet dan sedikit di otot jantung. Enzim ini akan meningkat aktivitasnya seiring dengan peningkatan aktivitas CK total.4,30

Kadar normal CK berkisar antara 20-200U/L dengan konsentrasi yang berbeda-beda tergantung pada jenis jaringandan peningkatan CK merupakan indikasi terjadinya kerusakan otot yang ditandai kemungkinan adanya perlukaan otot atau disebabkan pengobatan tertentu seperti obat golongan statin. Kreatin kinase mempunyai waktu paruh sangat pendek, aktivitasnya meningkat cepat puncaknya pada 6-12 jam dan kembali normal dalam 24-48 jam setelah injuri otot akut. Luka tusuk akibat jarum suntik maupun jarum infus dapat meningkatkan aktivitas CK 3-4 kali. Deteksi peningkatan aktivitas CK dalam serum berguna sebagai indikator injuri pada otot. Kadar enzim CK sebanding dengan derajat kerusakan jaringan dan seiring dengan proses penyembuhan luka, kadar enzim CK akan menurun.4,30,31

* + 1. **Ekspresi NF-kB, IL-1, IL-6 dan TNFβ Pada Cedera Otot**

*Nuclear factor kappa B* (NF-κB) adalah suatu bentuk protein di dalam sitoplasma sel yang terikat dalam bentuk inaktif yang berfungsi mengatur inflamasi, respons imun, penyembuhan luka, serta kematian dan fungsi sel. NF-κB menginduksi ekspresi berbagai gen proinflamasi, termasuk yang mengkode sitokin dan kemokin, dan juga berpartisipasi dalam regulasi inflamasi. Selain itu, NF-κB memainkan peran penting dalam mengatur kelangsungan hidup, aktivasi dan diferensiasi sel imun bawaan dan sel T inflamasi. Akibatnya, aktivasi NF-kB yang dideregulasi berkontribusi pada proses patogen berbagai inflamasi. NF-κB kemudian dapat mentranslokasi ke nukleus dan menginduksi transkripsi gen target, seperti TNF-α, IL-1, IL-8, dan IL-6.6,7

*Nuclear factor-κB* (NF-κB) mewakili keluarga faktor transkripsi yang dapat diinduksi, yang mengatur sejumlah besar gen yang terlibat dalam berbagai proses respons imun dan inflamasi. Aktivasi NF-κB melibatkan dua jalur pensinyalan utama, jalur kanonik dan noncanonikal (atau alternatif), keduanya penting untuk mengatur respon imun dan inflamasi meskipun terdapat perbedaan dalam mekanisme pensinyalan. NF-κB adalah mediator sentral dari induksi gen pro-inflamasi dan fungsinya pada sel imun bawaan dan adaptif. Aktivasi proses proinflamasi, termasuk respon trauma, radikal bebas, stres oksidatif, bakteri, dan infeksi virus memfasilitasi manifestasi penyakit melalui aktivasi jalur faktor-kappaB nuklir (NF- κ B). NF- κ B adalah faktor transkripsi yang sangat penting dalam respon imun dan proinflamasi, yang telah dikaitkan dengan peningkatan respons inflamasi, dan pengaktifannya telah signifikan berkorelasi dengan interleukin-6 dan produksi TNF-α. Ikatan ini terikat dalam sitoplasma dengan IκBα, yang difosforilasi oleh protein kinase yang distimulasi oleh ROS. Pelepasan NF- κB dari IκB mendorong NF-κB ke nukleus (translokasi) dan mengikat ke daerah promotor sitokin inflamasi. NF- κB dapat merangsang sintesis yang terakhir, yang diikuti oleh pintu masuknya ke dalam inti untuk mengikat dan mengangkut yang diaktifkan NF- κ B kembali ke sitoplasma. Molekul adhesi dapat merekrut neutrofil dan limfosit T ke tempat terjadinya inflamasi, dengan memproduksi sitokin IL-1, TNF-α dan IL-6, selanjutnya merangsang NF- κ B. Oleh karena itu, sitokin proinflamasi, yang mengaktifkan dan diaktifkan oleh NF-κ B, memediasi reaksi fase akut itu dengan peningkatan CRP.8,9

IL-1, *tumor necrosis factor* (TNF) dan IL-6 adalah sitokin utama yang diproduksi oleh makrofag / monosit, dan memainkan peran penting dalam reaksi imunologis, inflamasi dan hemopoietik. Interleukin-6 merupakan sitokin proinflamasi yang bersifat pleiotropik. Interleukin 6 (IL-6) memiliki efek luas pada sel-sel sistem kekebalan tubuh dan sel-sel yang tidak dari sistem kekebalan tubuh dan sering menampilkan karakteristik seperti hormon yang mempengaruhi proses homeostatis. IL-6 memiliki sifat pro-dan anti-inflamasi yang bergantung pada konteks dan sekarang dianggap sebagai target utama untuk intervensi klinis. Sitokin inflamasi primer, interleukin-1 (IL-1), *tumor necrosis factor* (TNF), bakteri lipopolisakarida, infeksi virus akut, dan TGFβ masing-masing menginduksi ekspresi IL-6. Setelah terjadi cedera, konsentrasi plasma IL-6 bisa di deteksi dalam 60 menit dengan konsentrasi puncak antara 4 sampai 6 jam, dan dapat bertahan sampai 10 hari.10,11

Interleukin-1 (IL-1) merupakan sitokin proinflamasi utama yang bertanggung jawab untuk memediasi beberapa respons fisiologis seperti demam, aktivasi limfosit, dan induksi sintesis protein fase akut. Temuan terbaru menunjukkan bahwa respons seluler terhadap IL-1 dimediasi oleh kaskade kejadian intraseluler termasuk *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang terlibat dalam aktivasi AP-1 dan kinase IκB (IKK) yang terlibat dalam aktivasi NF-κB. Interleukin-1 memiliki berbagai macam fungsi pada berbagai macam tipe sel dan organ tubuh disebut juga sebagai sitokin pleiotropik. Efek lokal yang dimediasi oleh IL-1 antara lain: menstimulasi monosit dan makrofag untuk memproduksi (lebih banyak) IL-1 dan sitokin lainnya seperti *tumor necroting factor* (TNF) dan IL-6; menstimulasi proliferasi sel B dan meningkatkan sintesis imunoglobulin; serta menstimulasi sel T untuk memproduksi sitokin.8,9

IL-1 menginduksi sintesis dan sekresi prostaglandin oleh sel endotelial dan sel otot halus sehingga menyebabkan kontraksi otot polos dan konstriksi pembuluh darah serta mengatur adhesi sel molekul, menyebabkan produksi mekanisme pertahanan yang efektif terhadap bakteri, jamur dan parasit. IL-1 yang diproduksi dalam jumlah banyak menimbulkan efek endokrin dan terdapat dalam sirkulasi darah perifer, sebagai contoh dapat menyebabkan demam dan menyebabkan pembentukan fase akut. Inhibitor alami IL-1 menghambat aktivitas IL-1, contohnya adalah kortikosteroid dan prostaglandin yang dapat menekan sekresi IL-1. Fungsi IL-1, yang berperan sebagai mediator respon inflamasi terhadap infeksi dan stimulus lainnya. IL-1 berperan dalam respon inflamasi local maupun sistemik, sedangkan IL-1 bersama-sama dengan IL-6 dan TNF-α adalah sitokin pro-inflamasi yang sangat berperan pada fase awal penyembuhan luka.8,9,

* + 1. **Efek Selenium Terhadap Sitokin Proinflamasi**

Selenium memiliki peran dalam mengurangi *oxidative stress* melalui selenoprotein yang berfungsi sebagai antioksidan*. Oxidative stress* terjadi ketika produksi radikal bebas, termasuk *reactive oxygen species* (ROS), *oxidesed protein*, dan *oxidised lipid*, di produksi melebihi kemampuan antioksidan yang mengakibatkan kerusakan selelur atau jaringan.Selenium (Se) dikenal sebagai komponen penting dari selenoenzim antioksidan seperti *glutathione peroxidase* (GSH-Px) dan *thioredoxin reductase* (TRX). Karena kemampuan antioksidannya, selenoprotein melindungi sel inang dari kerusakan oksidatif pada kondisi inflamasi.16

Respon inflamasi berupa aktivasi makrofag dan limfosit T melepaskan mediator proinflamasi antara lain, IL-1, IL-6, TNF-β yang dihasilkan oleh makrofag pada luka endotel. Sitokin pro-inflamasi IL-1, IL-6, TNF-β dilepaskan pada saat terjadi cedera jaringan (otot), dimulai dari *acute phase reaction* (APR). IL-1 menginduksi sintesis dan sekresi prostaglandin oleh sel endotelial dan sel otot halus sehingga menyebabkan kontraksi otot polos dan konstriksi pembuluh darah serta mengatur adhesi sel molekul, menyebabkan produksi mekanisme pertahanan yang efektif terhadap bakteri, jamur dan parasit. IL-1 yang diproduksi dalam jumlah banyak menimbulkan efek endokrin dan terdapat dalam sirkulasi darah perifer, sebagai contoh dapat menyebabkan demam dan menyebabkan pembentukan fase akut. Interleukin 6 (IL-6) memiliki efek luas pada sel-sel sistem kekebalan tubuh dan sel-sel yang tidak dari sistem kekebalan tubuh dan sering menampilkan karakteristik seperti hormon yang mempengaruhi proses homeostatis. IL-6 memiliki sifat pro-dan anti-inflamasi yang bergantung pada konteks dan sekarang dianggap sebagai target utama untuk intervensi klinis.Setelah terjadi cedera, konsentrasi plasma IL-6 bisa di deteksi dalam 60 menit dengan konsentrasi puncak antara 4 sampai 6 jam, dan dapat bertahan sampai 10 hari. IL-1 bersama-sama dengan IL-6 dan TNF-α adalah sitokin pro-inflamasi yang sangat berperan pada fase awal penyembuhan luka.8,9,10,11 sitokin pro-inflamasi diaktivasi oleh NF-κB, adanya Inhibisi sinyal NF-κB melalui selenium akan menurunkan ekspresi NF-κB saat terjadi cedera otot.6

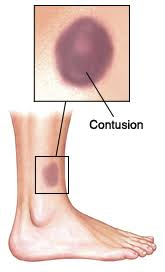
* 1. **Kerangka Pemikiran**

Trauma jaringan lunak tertutup atau cedera kontusio pada otot skelet relatif umum terjadi pada atlet (silat, taekwondo, karate, sepak bola, dll). Jenis cedera ini biasanya terjadi tiba-tiba, berat benda, gaya tekan pada otot, dan kontak langsung. Cedera otot kontusio secara klinis dimanifestasikan oleh rasa setempat, edema berkurangnya range of motion (ROM), dan nyeri tekan saat di palpasi.3 Pada cedera otot terjadi proses inflamasi yang terlihat pada peningkatan kadar *muscle creatin kinase* dan *reactive oxygen species* (ROS). *Muscle creatin kinase* merupakan enzim spesifik otot skelet yang berperan dalam pembentukan energi pada aktivitas sel otot melalui metabolisme anaerob. Peningkatan muscle creatin kinase dalam serum mengindikasikan kerusakan sel otot. ROS terbentuk sebagai produk alami dari aktivitas normal sel dan pada level ROS rendah berfungsi dalam jalur pensinyalan seluler. ROS mitokondria dapat berasal dari endogen dan eksogen. ROS endogen dapat dimediasi oleh NADPH oksidase dan sistem transpor elektron pada mitokondria. ROS diproduksi oleh mitokondria, NADPH oksidase, dan retikulum endoplasma memicu jalur kinase yang menghasilkan aktivasi NF-κB yang berkaitan dengan respon inflamasi. NF-κB kemudian dapat mentranslokasi ke nukleus dan menginduksi transkripsi gen target, seperti IL-1, dan IL-6.4,5,6

Pada penyembuhan cedera otot dan penyembuhan tulang terdapat perbedaan dalam proses penyembuhan. Pada otot ada proses perbaikan, sedangkan di jaringan tulang ada proses regenerasi. Penyembuhan otot secara signifikan sesuai dengan penyebabnya, kontusio, sprain, dan laserasi. Secara umum mekanisme perbaikan cedera pada cedera otot terbagi dalam 3 tahap yaitu fase degenerasi dan inflamasi/peradangan, fase regenerasi/ perbaikan dan fase remodelling/ renovasi. Tahapan fase perbaikan dan renovasi seringkali berjalan bersamaan.29

Respon penyembuhan cedera otot yang buruk berakibat pada waktu penyembuhan yang lama, risiko cedera berulang, dan fibrosis yang menyebabkan hilangnya massa otot dan menggangu fungsi otot. Pada fase akut inflamasi akan di berikan perlakuan berupa pemberian suplementasi selenium yang bersifat sebagai anti-inflamasi.

Selenium adalah mineral penting yang secara alami ditemukan di tanah, air dan makanan. Selenium sebagai antioksidan merupakan salah satu elemen penting pada tubuh manusia dan terbukti sebagai suplemen makanan untuk kesehatan. Kebutuhan akan selenium untuk tubuh hanya sedikit per hari nya yaitu 55 mcg/hari. Selenium berperan penting dalam banyak proses fisiologis. Selenium dapat mempengaruhi respon inflamasi, termasuk menghambat kaskade NF-κB yang menginduksi produksi interleukin dan tumor necrosis factor α/ β. Ketika inflamasi terjadi, akan memicu pelepasan mediator-mediator inflamasi. Selama proses inflamasi berlangsung, diproduksi sinyal untuk menghentikan reaksi inflamasi. Mekanisme ini meliputi perubahan produksi mediator proinflamasi menjadi anti-inflamasi. Sistem tersebut dibutuhkan untuk mencegah terjadinya inflamasi yang berlebihan yang dapat memicu kerusakan jaringan.13,14 Selenoprotein merupakan selenium dalam bentuk asam amino selenosistein. Glutation peroksidase (GPx) merupakan selenoprotein yang berperan penting dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif, GPx memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. GPx dalam tubuh bekerja dengan mengontrol proses redoks sel seperti mereduksi disulfida pada protein dan memberikan hidrogen untuk ribonukleotida reduktase pada sintesis DNA serta mereduksi H2O2 dan memotong radikal bebas. Berdasarkan penelitian Huang et al, menemukan bahwa suplementasi dengan Se (500 dan 2000 ug / hari untuk berbagai durasi) pada pasien yang kritis menurunkan angka kematian terkait dengan sepsis.15,16 Pemberian suplementasi selenium pada fase akut diharapkan terjadi pengendalian respons inflamasi yang fisiologis dan terjadi penurunan ROS, sehingga fungsi otot dan respon penyembuhan cedera lebih cepat terjadi.



Trauma benda tumpul

ROS ↑ dan CK-MM ↑

Peningkatan Ekspresi NF-kB, IL-1, dan IL-6.

Pemberian selenium pada fase akut

Penurunan fungsi otot (saat berjalan)

Pengendalian respons inflamasi dan penurunan ROS

Penyembuhan cedera lebih cepat

Peningkatan fungsi otot (saat berjalan)

Gambar 2.6 Kerangka Pemikiran

* 1. **Premis**

Berdasarkan latar belakang, rumusan masalah maupun kerangka pemikiran yang telah dibahas sebelumnya, maka dapat dibuat suatu urutan premis:

**Premis 1**

Cedera otot terjadi akibat benturan benda tumpul yang menimbulkan kerusakan struktural pada jaringan. Cedera otot kontusio secara klinis dimanifestasikan oleh rasa setempat, edema berkurangnya range of motion (ROM), dan nyeri tekan saat di palpasi.1,2,3,25,26,27

**Premis 2**

Pada cedera otot terjadi proses inflamasi yang terlihat pada peningkatan kadar *muscle creatin kinase.* Peningkatan *muscle creatin kinase* dalam serum mengindikasikan kerusakan sel otot.4,30,31

**Premis 3**

Pada cedera otot terjadi proses inflamasi yang terlihat pada peningkatan kadar *reactive oxygen species* (ROS). ROS berperan dalam memediasi sinyal transduksi fisiologis di mitokondria. Secara fisiologis ROS berfungsi dalam jalur pensinyalan seluler dan pada level tinggi dapat berkontribusi dalam kematian sel.5,29

**Premis 4**

*Nuclear factor kappa B* (NF-κB) adalah suatu bentuk protein di dalam sitoplasma sel yang berfungsi mengatur inflamasi, respons imun, penyembuhan luka, serta kematian dan fungsi sel. NF-κB dapat metranslokasi ke nucleus dan menginduksi IL-1, dan IL-6.6,7

**Premis 5**

IL-1, *tumor necrosis factor* (TNF) dan IL-6 adalah sitokin utama yang diproduksi oleh makrofag / monosit, dan memainkan peran penting dalam reaksi imunologis, inflamasi dan hemopoietik.8,9,10,11

**Premis 6**

Selenium dapat menekan respon inflamasi, termasuk menghambat NF-κB kaskade yang menginduksi produksi interleukin dan *tumor necrosis factor* α/ β. 13,14

**Premis 7**

Selenoprotein merupakan selenium dalam bentuk asam amino selenosistein. Glutation peroksidase (GPx) merupakan selenoprotein yang berperan penting dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif, GPx memiliki aktivitas antioksidan yang kuat.15,16,21

**Premis 8**

Cedera otot yang buruk berakibat pada waktu penyembuhan yang lama, risiko cedera berulang, dan fibrosis yang menyebabkan hilangnya massa otot dan menggangu fungsi otot.2,3,29,30

* 1. **Hipotesis**

**Hipotesis 1**

Terdapat pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap kadar *muscle creatin kinase* pada cedera otot (kontusio injury). (premis 1,2)

**Hipotesis 2**

Terdapat pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap penurunan ekspresi NF-κB pada cedera otot (kontusio injury) (premis 4,6,7)

**Hipotesis 3**

Terdapat pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap penurunan ekspresi IL-1, IL-6, dan TNFβ pada cedera otot (kontusio injury) (premis 4,5)

**Hipotesis 4**

Terdapat pengaruh pemberian suplementasi selenium terhadap peningkatan fungsi otot (saat berjalan) pada cedera otot (kontusio injury) (premis 1,8)

**BAB III**

**OBJEK, BAHAN, DAN METODE PENELITIAN**

1. **Objek, Bahan, dan Alat Penelitian**
2. **Objek Penelitian**

Objek pada penelitian ini adalah tikus galur wistar (*Rattus Norwegicus*) jantan berusia 8 minggu. Yang diberikan perlakuan berupa kontusio injury dan suplementasi selenium, dibagikan kedalam 4 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol (P0): tikus jantan galur wistar berusia 8 minggu yang diberi kontusio kemudian diberikan terapi selenium pada fase akut. Kelompok Perlakuan 1 (P1): tikus jantan galur wistar berusia 8 minggu yang diberi kontusio. Kelompok perlakuan II (P2): tikus jantan galur wistar yang diberi selenium selama 8 minggu tanpa perlakuan (PTP): tikus jantan galur wistar berusia 8 minggu yang tidak diberikan perlakuan apapun.

Kriteria Inklusi dalam penelitian adalah, tikus galur wistar, jenis kelamin jantan,8 minggu, BB 200-220 gram, Tidak terdapat cedera (luka kulit, berjalan miring, bulu rontok, dan mata bernanah), Tidak agresif dan hiperaktif

Kriteria Eksklusi dalam penelitian ini adalah, tikus mengalami fraktur saat perlakuan dan tikus dengan kenaikan berat badan kurang dari 10%

1. **Bahan dan Alat Penelitian**

Berikut ini adalah alat dan bahan yang diperlukan dalam penelitian ini:

1. Kandang tikus, makanan dan minuman standar
2. Alat bedah minor
3. Stiker label
4. Handscoon
5. Alat alat laboratorium
6. Peralatan untuk kontusio injury
7. Western Blot
8. Kamera digunakan untuk dokumentasi selama penelitian
9. Laptop merk ASUS, 4GB, series X441N, buatan Cina, tahun 2017 yang digunakan untuk mengolah data.
10. **Prosedur Adaptasi dan Terminasi**

Aklimatisasi tikus percobaan dilakukan selama 7 hari untuk penyesuaian tikus pada semua kelompok dengan kondisi lingkungan tempat penelitian. Selama 1 minggu pertama untuk adaptasi di kandang dan ruangan kandang untuk menyeragamkan cara hidup dan makanannya sebelum dilakukan perlakuan cedera otot (kontusio model). Tikus akan diberikan makanan (pakan) standar dan minum secara tidak terbatas, ditempatkan di kandang dengan suhu terjaga 20-25°C, berada jauh dari gangguan kebisingan, dan kebersihan kandang yang selalu terjaga sehingga mengurangi stress pada hewan coba. Tikus diberikan fasilitas penerangan yang cukup dan diatur penerangannya 12 jam gelap 12 jam terang sesuai dengan kehidupan alami dan tingkah laku spesies tikus percobaan dan dapat tidur dengan nyaman. Prosedur pengambilan sampel pada akhir penelitian ini telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan anestesi serta eutanasia dengan metode yang manusiawi oleh orang yang telah terlatih.

Prosedur terminasi tikus percobaan dilakukan pada hari terakhir penelitian. Terminasi tikus percobaan dilakukan dengan pemberian ketamin xylazyne (dosis 5 mg/kg BB) secara intraperitoneal. Setelah tampak efek sedasi, selanjutnya dilakukan dislokasi servikal dan dekapitasi. Jaringan target sampel seperti darah, liver, otot, dan kulit dipisahkan dan dibekukan dalam liquid nitrogen untuk disimpan dalam suhu -80C hingga digunakan.

1. **Metode penelitian**

Metode penelitian pada penelitian ini adalah eksperimental pada hewan coba. Pada penelitian ini menggunakan hewan coba tikus jantan galur wistar, yang akan diberikan perlakuan cedera otot (kontusio injury) dan suplementasi selenium.

1. **Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium pada hewan coba (*in vivo*), pada penelitian ini dibagi kedalam 3 kelompok kontrol. Masing-masing kelompok diberikan perlakuan cedera otot, suplementasi selenium, dan tanpa perlakuan apapun. Pengaruh suplementasi selenium pada cedera otot terhadap peningkatan *kadar muscle creatin kinase* dalam darah dan ekspresi NF-kB, IL-1, IL-6, dan TNF β, dengan menggunakan *western blot* dan Elisa, gambaran kontusio secara makroskopis, serta fungsi motorik tikus dengan *gait analysis*.

1. **Sampel Penelitian**

Objek pada penelitian ini adalah tikus galur wistar (*Rattus Norwegicus*) jantan berusia 8 minggu. Dengan 4 kelompok perlakuan, hasil rerata dari keempat kelompok akan di uji dengan menggunakan *one-way* ANOVA. Pertimbangan penggunaan one-way ANOVA sebagai analisis statistik pada penelitian ini, maka jumlah sampel dihitung menggunakan pendekatan “*resource equation*”

Pada pendekatan ini, digunakan derajat kebebasan atau *degree of freedom* (DF) dengan rentang 10-20. Berdasarkan hasil penghitungan di atas, jumlah subjek yang diperlukan yaitu 4-6 ekor tikus perkelompok atau 16-24 ekor tikus secara keseluruhan. N merupakan jumlah total subjek yang digunakan, n menunjukan jumlah subjek dalam satu kelompok, dan k menerangkan jumlah kelompok yang digunakan.33

Untuk kepentingan blinding, akan dilakukan pengelompokan tikus secara acak sederhana (simple random sampling). Masing-masing kelompok ditambah 10% dari jumlah tikus untuk mengantisipasi terjadinya drop out sehingga jumlah tikus maksimal yang akan digunakan yaitu 8 ekor perkelompok atau 24 ekor secara keseluruhan.

1. **Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional**

Variabel merupakan pengelompokan secara logis dari dua atau lebih atribut dari objek yang diteliti sehingga menemukan kesimpulan yang pasti.

Adapun variabel dari penelitian ini yaitu:

1. Variabel bebas yang diteliti dalam penelitian ini adalah Suplementasi selenium dan kontusio injury.
2. Variabel terikat yang diteliti dalam penelitian ini adalah CK-MM dan ekspresi NF-kB, IL-1, IL-6 dan TNF β dan Fungsi berjalan.

Table 3.1 Definisi Operasional

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Variabel | Definisi Operasional | Alat ukur | Cara ukur | Hasil ukur |
| Selenium | Selenium adalah mineral penting yang secara alami ditemukan di tanah, air dan makanan. Selenium sebagai antioksidan merupakan salah satu elemen penting pada tubuh manusia dan terbukti sebagai suplemen makanan untuk kesehatan. |  |  | Mg |
| Kontusio | Kontusio adalah salah satu jenis cedera otot yang diakibatkan oleh trauma benda tumpul, yang cepat dan kuat atau misalnya, pukulan langsung yang biasanya terjadi pembentukan hematoma di dalam otot. |  | Ukuran jejas diamati secara visual dan dengan perangkat Image J secara serial (per 24 jam) |  |
| CK-MM | Creatine kinase (CK) adalah enzim yang mengkatalisis fosforilasi kreatin (Cr) yang reversibel oleh adenosin trifosfat (ATP). | Nominal | ELISA |  |
| Ekspresi NF-kB | NF-kB adalah sitokin bentuk protein di dalam sitoplasma sel yang yang berfungsi mengatur inflamasi, respons imun, pemyembuhan luka, serta kematian dan fungsi sel. | Nominal | Western Blot |  |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Variabel | Definisi Operasional | Skala ukur | Cara ukur | Hasil ukur |
| Ekspresi IL-1 | Interleukin-1 (IL-1) merupakan sitokin proinflamasi utama yang bertanggung jawab untuk memediasi beberapa respons fisiologis seperti demam, aktivasi limfosit, dan induksi sintesis protein fase akut. | Nominal | Western Blot |  |
| Ekspresi IL-6 | Interleukin-6 merupakan sitokin proinflamasi yang bersifat pleiotropik. IL-6 memiliki sifat pro-dan anti-inflamasi. | Nominal | Western Blot |  |
| Fungsi Otot | Cedera otot yang buruk berakibat pada waktu penyembuhan yang lama, risiko cedera berulang, dan fibrosis yang menyebabkan hilangnya massa otot dan menggangu fungsi otot | Skor 0-4 | *Gait analysis* | Skor 0-4 |

1. **Alur Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental laboratorium pada hewan coba. Objek dalam penelitian ini adalah hewan coba tikus jantan galur wistar yang berusia 8 minggu, dan memiliki berat badan 200-220 kg, selanjutnya dilakukan perlakuan cedera otot (kontusio injury) pada tikus. Tikus dibagi masing-masing kedalam 4 kelompok. Pengukuran *gait analisys* dan kadar CK-MM (ELISA) dilakukan sebelum dan sesudah diberikan suplementasi selenium. Dosis selenium didapatkan dari dosis konversi manusia ke tikus. Dosis manusia 200 mcg/hari, per berat badan manusia 70 kg. Hasil konversi dosis manusia ke tikus yaitu 0,0513 mg/kg BB, dilarutkan kedalam aquadest dengan pemberian 1x sehari, 7 hari selama 8 minggu. Gait analisys dilakukan untuk melihat fungsi otot saat berjalan. Pemberian selenium dilakukan pada fase akut pasca cedera otot (kontusio injury), selanjutnya dilakukan pengambilan sampel jaringan otot untuk pemeriksaan ekspresi NF-kB, IL-1, dan IL-6dengan menggunakan western blot. Hasil Pemeriksaan disajikan dalam bentuk rerata, kemudian dibandingkan antara semua kelompok dengan uji statistik *one-way* ANOVA.

Adaptasi selama 2 minggu

Pengajuan etik

Contusion model

CK-MM (*PreTest*)

*Gait Analisys*

(*PreTest*)

(PTP) tanpa perlakuan

Perlakuan II (P2)

Selenium

Perlakuan I (P1)

Contusion

Kontrol (P0) Contusion dan selenium

Dosis selenium 0,0513 mg dalam aquadest 1 ml. pemberian 1x sehari, 7 hari selama 8 minggu

ELISA

*Gait analysis* dan CK-MM (*PostTest*)

Pengambilan sampel jaringan otot untuk Pemeriksaan ekspresi NF-kB, IL-1, dan IL-6

Western Blot

Analisis Statistik

Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

1. **Skema Timeline Penelitian**

tikus jantan galur wistar yang berusia 8 minggu (n=24)

Tikus (n=24) dengan berat 200-220 kg

Randomized sample, dibagi menjadi 4 kelompok

Day 0 - cedera

Day 0 - cedera

Day 0 - cedera

Contusion + selenium group

Selenium group

Tanpa Perlakuan

Contusion group

Day 1 – Gait Analysis dan CK-MM

Day 1 – Gait Analysis dan CK-MM

Day 1 – Gait Analysis dan CK-MM

Day 3-7

Day 8 - Euthanasia

Day 8 - Euthanasia

Day 3-7

Day 3-7 – Selenium

Day 8 – gait analysis dan CK-MM

Day 8 – gait analysis dan CK-MM

Day 8 – gait analysis dan CK-MM

Day 8 - Euthanasia

Day 8 - Euthanasia

Outcomes:

* Peningkatan CK-MM
* Penurunan ekspresi NF-kB, IL-1, IL-6 dan TNF β
* Peningkatan fungsi otot (saat berjalan)

1. **Prosedur Pemeriksaan**
2. **Prosedur Westren Blot**

Identifikasi protein dengan metode Westren-blot memerlukan beberapa tahapan antara lain ekstrasi protein, persiapan sampel, persiapan gel, elektroforesis, elektrotransfer, serta bloking dan inkubasi antibodi.33 Prosedur pemeriksaan westren-blot terdiri dari:

1. Persiapan sampel

Persiapan sampel melalui proses ekstrasi dan denaturasi. Hasil biopsi dipotong dan ditimbang dengan berat 25±1 mg, kemudian dilakukan proses chopping kecil dimasukkan ke dalam microtube 1,5 ml. Sampel diberikan SLS (sodium laureth sulfate) sebagai lysis buffer sebanyak 200 µL untuk setiap sampel. Lanjutkan dengan proses homogenisasi jaringan dengan homogenizer, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Bagian supernatan/lisat dipisahkan, dan dimaskkan pada microtube baru kemudian dicampurkan dengan sample buffer dengan perbandingan 1:1. Microtube dimasukkan ke dalam heat block selama 5 menit dengan suhu 95-105°C selama 5 menit.

1. Elektroforesis

Langkah pertama adalah membuat gel sebagai media untuk penempatan lisat. Gel untuk western blot terdiri dari dua bagian yaitu stocking gel pada bagian atas dan separating gel pada bagian bawah. Stocking gel berfungsi sebagai tempat untuk menampung lisat yang akan dituangkan. Jumlah lisat yang dituangkan pada stocking gel adalah 10 µL untuk tiap/well (sumur) dengan masing-masing gel memiliki 15 well. Separating gel berfungsi untuk memisahkan protein yang diinginkan, separating gel terdiri dari 50 µL APS 10% dan 8 µL TEMED. Satu lembar gel dapat menampung tiga set sampel (setiap satu sampel terdiri dari empat lisat) dan satu ladder sebagai penanda yang memisahkan satu protein dengan lainnya berdasarkan berat molekulnya. Setelah semua well terisi, dilakukan proses pemisahan protein dengan elektroforesis pada 80 V selama 15-20 menit sampai lisat turun pada batas antara stocking gel dan separating gel, kemudian voltase dinaikan menjadi 100V dan dilanjutkan selama satu jam sampai menyentuh bagian bawah dari separating gel.

1. Transfer protein

Transfer protein dari gel ke membran nitroselulosa menggunakan teknik sandwich dengan urutan kaset dari bawah ke atas. Katoda (-), Kasa basah, 2-3 lembar kertas saring, 1 lembar membran nitroselulosa, Gel WB, 2-3 lembar kertas saring, Anoda (+). Kaset diletakkan dalam media Invitrogen dari Thermo Fisher Scientific, diberi transfer buffer, dan selanjutnya dielektroforesis 200 mA selama 30 menit. Setelah transfer protein ke membran nitroselulosa selesai, inkubasi dengan pewarnaan Ponceau Red selama ±1 menit kemudian dicuci dengan air bersih selama 5 menit. Rendam membran dengan susu skim 0,75% dan kemudian lakukan pencucian kembali dengan PBST 0,1% selama 5 menit sebanyak 3 kali.

1. Deteksi protein target dan antibody

Inkubasi membran dengan antibodi primer pada suhu 4°C selama satu malam. Setelah selesai, membran dicuci dengan cairan PBST selama 5 menit sebanyak 3 kali. Inkubasi dengan antibodi sekunder selama 1 jam diatas shaker, diikuti pencucian dengan cairan PBST selama 5 menit sebanyak 3 kali. Membran diberikan substrat fluorescene dalam kondisi gelap kemudian dimasukkan ke dalam mesin WB Li-Cor Thermo Fisher Scientific untuk dibaca.

1. **Prosedur Pemeriksaan ELISA**

Prosedur pengujian yang dilakukan dengan menggunakan prosedur Biochrom EZ Read 400, diantaranya:34

1. Preparasi Sampel

Preparasi sampel merupakan persiapan bahan sebelum dilakukan pengujian sebagai berikut:

1. Timbang sampel sebanyak 25 gram kemudian tambahkan 100 ml aquades atau larutan garam 0,9% homogenisasi sampel seama 15 menit dan didiamkan selama 10-15 menit.
2. Aduk kembali sampel selama 15 menit dan didiamkan lagi selama 10-15 menit sampai terbentuk fasa cair dan endapan.
3. Saring fasa cair dari sampel menggunakan kertas whatman no.4 (untuk mendapatkan ekstrak yang lebih baik dapat dilakukan proses sentrifugasi sebelum disaring) sampai didapatkan ekstrak sampel.
4. Pengujian Sampel

Setelah dilakukan preparasi pada sampel, maka dilakukan pengujian sampel sebagai berikut:

1. Pipet 100 µL ekstrak sampel atau control positif pada wells uji.
2. Inkubasi pada suhu ruang selama 45 menit.
3. Cuci wells uji dengan cairan pencuci sebanyak 3 kali.
4. Tambahkan 50 µL species biotin pada wells uji.
5. Inkubasi pada suhu ruang selama 45 menit.
6. Cuci wells uji dengan cairan pencuci sebanyak 3 kali.
7. Tambahkan 50 µL larutan konjugat (Avidin Peroxidase Conjugate) ke dalam wells uji.
8. Inkubasi pada suhu ruang selama 15 menit.
9. Cuci wells uji dengan cairan pencuci sebanyak 5 kali.
10. Tambahkan 100 µL TMB substrat pada wells uji.
11. Inkubasi pada suhu ruang selama 45 menit tanpa pengocokan.
12. Tambahkan 50 µL stop solution pada wells uji.
13. Campur selama 10 detik untuk menghentikan perubahan warna dan meratakan stop solution. Perubahan warna terjadi dari biru ke kuning.
14. Ukur absorbansinya menggunakan ELISA reader pada λ 450 nm. Kontrol negative menggunakan aquades.
15. **Kontusio Model**

Model kontusio dapat dilakukan pada hewan coba tikus.27 Prosedur pembuatan kontusio dilakukan berdasarkan penelitian Macedo et al.,2016:

1. Tikus di timbang dan dianestesi terlebih dahulu dengan ketamin dan xylazine (dosis 80 dan 10 mg/kgbb) secara intraperitioneal. Anestesi diberikan untuk membuat otot berada dalam kondisi relaksasi penuh sehingga dihasilkan cedera maksimal tanpa tahanan dari kontraksi otot.
2. Tungkai belakang tikus dicukur dan dibersihkan dengn alkohol. Bagian tengah otot ditentukan dengan palpasi kemudian area perlakuan diberi tanda dengan tinta permanen.
3. Tungkai belakang tikus diposisikan pada papan, pergelangan kaki diposisikan dorsi flexi hingga 90 derajat.
4. Cedera dilakukan pada otot gastrocnemius kanan (RGM) menggunakan perangkat yang terdiri dari platform kayu dengan tabung aluminium berongga, lurus, pada 5 cm, ditempatkan tegak lurus ke platform.
5. Setelah cedera, tidak adanya fraktur tibialis dinilai dengan cara dipalpasi
6. ***Gait Analysis***

Gait analysis efektif digunakan dalam menilai mobilitas dan fungsi otot.

Secara klinis gait analysis dapat digunakan dalam diagnosis dan penilaian pengobatan. Gait analysis pertama kali di rancang untuk manusia, namun seiring berkembangnya penelitian maka gait analysis dapat digunakan pada hewan coba tikus.35,36

Gait analisis dilakukan dengan menggunakan tinta hitam pada permukaan ventral kaki belakang. Semua tikus dibiarkan berjalan sepanjang selembar kertas. Tikus percobaan diamati secara visual dan jejak kaki dibuat oleh kaki yang cedera otot (kontusio) kanan dibandingkan dengan kaki yang tidak terjadi cedera otot (kontusio) untuk menilai penahan berat selama pergerakan. Percobaan dilakukan pad 24 tikus, dilakukan selama 2-8 hari untuk mendapatkan skor. Pada tahap awal gait analysis dilakukan selama 5 menit, dengan tujuan agar tikus dapat beradaptasi. Pada tahap selanjutnya gait analysis dilakukan 2-3 menit.37



Gambar 3.2 Skala Penilaian Visual.37

Berdasarkan skala penilaian visual di atas didapatkan skor gait analysis sebagai berikut:

Tabel 3.2 Skor Penilaian Visual

|  |  |
| --- | --- |
| Skor | Kriteria |
| 0 | Tekanan Normal |
| 0,5 | Tekanan Normal, tetapi jari kaki tidak sama untuk mengontrol |
| 1 | Tekanan kaki sedikit berkurang |
| 1,5 | Tekanan berkurang |
| 2 | Tekanan berkurang secara moderat, kaki melengkung, hanya beberapa bagian kaki yang menyentuh lantai |
| 2,5 | Tekanan berkurang secara moderat, kaki hanya bias melengkung, dan jari-jari kaki sesekali menyentuh lantai |
| 3 | Tekanan sangat berkurang, dan tidak sampai menyentuh lantai |

1. **Pengolahan Data**

Setelah semua data terkumpul, maka dilakukan analisis dan penelitian.

Proses ini menggunakan sistem komputerisasi program SPSS, dengan tingkat signifikan p<0,05. Hasil Pemeriksaan disajikan dalam bentuk rerata, kemudian dibandingkan antara semua kelompok dengan uji statistik *one-way* ANOVA.

Langkah awal pengolahan data yang dilakukan yaitu melakukan uji normalitas dan homogenitas data. Uji normalitas data menggunakan uji Saphiro-Wilk karena jumlah sample kurang dari 50. Uji homogenitas varian data dilakukan dengan uji Levene. Data diolah dan disajikan menggunakan program stastical package for social science (SPSS) versi 16.0

Jika uji normalitas dan homogenitas data terpenuhi (p>0,05), maka data dianalisis dengan uji *one-way* ANOVA (uji parametrik), tetapi jika salah satu atau kedua uji tidak terpenuhi maka data dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis (uji non-parametrik). Jika pada uji *one-way* ANOVA bermakna, maka dilanjutkan dengan uji lanjut menggunakan uji LSD (*least significant differences test*) dengan membandingkan rerata antar kelompok, sedangkan pada uji *Kruskal-Wallis* dilanjtkan analisis lebih lanjut menggunakan uji lanjut *Mann-Whitney*. Uji ini tidak hanya berfungsi membandingkan median, tapi juga rerata antara dua kelompok. Nilai kemaknaan atau signifikansi hasil uji dinyatakan dengan p<0,05.

1. **Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan departemen Anatomi Fisiologi dan Biologi Sel Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran Jatinangor dan Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran Jatinangor. Waktu penelitian dilakukan selama 4 bulan, yang dimulai dengan pengajuan etik penelitian, pengambilan sampel, pelaksanaa pemeriksaan, dan analisis data. Penelitian dimulai pada bulan februari 2019.

1. **Etik Penelitian**

Penelitian dilakukan setelah mendapat persetujuan pembimbing dan penguji, pengesahan Komite Etik Penelitian FK Unpad, dan izin tempat pelaksanaan penelitian. Penelitian ini menggunakan objek penelitian tikus jantan muda 3R yaitu: *reduction, refinement, dan replacement*.

*Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan coba yang sudah dipertimbangkan dan diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh mahluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Reduction* adalah penggunaan hewan coba dalam penelitian dengan jumlah seminimal mungkin tetapi tetap mendapatkan hasil penelitian yang optimal. Pada penelitian hewan coba yang digunakan berjumlah 24.

*Refinement* adalah suatu tindakan memperlakukan hewan coba secara manusiawi.

1. **Dummy table**

Table 3.3 Dummy Tabel

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Variabel** | **Kelompok** | | | |
| **P0**  **Selenium** | **P1**  **kontusio** | **P2**  **Selenium** | **PTP**  **Tanpa perlakuan** |
| 1. Kadar CK-MM *(ELISA)*   Mean±SD  Rentang (min, maks)  Nilai p\*  Nilai p† terhadap kontrol | .....  .....  .....  ..... | .....  .....  .....  ..... | .....  .....  .....  ..... | .....  .....  .....  ..... |
| 1. Kadar NF-kB *(Western blot)*   Mean±SD  Rentang (min, maks)  Nilai p\*\*  Nilai p†† terhadap kontrol | .....  .....  .....  ..... | .....  .....  .....  ..... | .....  .....  .....  ..... | .....  .....  .....  ..... |
| 1. Kadar IL-1,(*Western blot*)   Mean±SD  Rentang (min, maks)  Nilai p\*\*  Nilai p†† terhadap kontrol |  |  |  |  |
| 1. Kadar IL-1,(*Western blot*)   Mean±SD  Rentang (min, maks)  Nilai p\*\*  Nilai p†† terhadap kontrol |  |  |  |  |
| 1. Perubahan maskroskopis fungsi otot (Gait Analysis) |  |  |  |  |

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Edouard, P., & Alonso, J.-M. (2013). Epidemiology of Track and Field Injuries. New Studies in Athletics, 28(1/2), 85–94.
2. Laumonier, T., & Menetrey, J. (2016). Muscle injuries and strategies for improving their repair. Journal of Experimental Orthopaedics, 3(1).
3. Elmer, S., Mcdaniel, J., Mattson, J., & Martin, J. (2012). Effect of a kontusio injury on muscular force, power, work, and fatigue. Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 22(4), 488–494.
4. Magal, M., Dumke, C. L., Urbiztondo, Z. G., Cavill, M. J., Triplett, N. T., Quindry, J. C., Epstein, Y. (2010). Relationship between serum creatine kinase activity following exercise-induced muscle damage and muscle fibre composition. Journal of Sports Sciences, 28(3), 257–266.
5. Duntas, L. H. (2009). Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Métabolisme, 41(6), 443–447.
6. Lawrence, T., & Fong, C. (2010). The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF-κB. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 42(4), 519–523.
7. Serasanambati, M., & Chilakapati, S. R. (2016). Function of Nuclear Factor Kappa B (NF-kB) in Human Diseases-A Review. South Indian Journal of Biological Sciences, 2(4), 368–387.
8. Chamberlain, C. S., Leiferman, E. M., Frisch, K. E., Brickson, S. L., Murphy, W. L., Baer, G. S., & Vanderby, R. (2013). Interleukin Expression after Injury and the Effects of Interleukin-1 Receptor Antagonist. PLoS ONE, 8(8), 1–12.
9. Park, J. Y., Chung, T. W., Jeong, Y. J., Kwak, C. H., Ha, S. H., Kwon, K. M., Kim, C. H. (2017). Ascofuranone inhibits lipopolysaccharideinduced inflammatory response via nfkappab and ap-1, p-ERK, TNF-α, IL-6 and IL-1β in RAW 264.7 macrophages. PLoS ONE, 12(2), 1–14.
10. Belizário, J. E., Fontes-Oliveira, C. C., Borges, J. P., Kashiabara, J. A., & Vannier, E. (2016). Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6. SpringerPlus, 5(1), 2–15.
11. Smith, J. K. (2018). IL-6 and the dysregulation of immune, bone, muscle, and metabolic homeostasis during spaceflight. Npj Microgravity, 4(1), 1–8.
12. Huang, M.-T. (2007). Antioxidant and Antitumorigenic Properties of Curcumin. Food Factors for Cancer Prevention, (September 2001), 249–252.
13. Vunta, H., Davis, F., Palempalli, U. D., Bhat, D., Arner, R. J., Thompson, J. T., Prabhu, K. S. (2007). The anti-inflammatory effects of selenium are mediated through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2 in macrophages. Journal of Biological Chemistry, 282(25), 17964–17973.
14. Kim, Y., Kim, D. C., Cho, E. S., Ko, S. O., Kwon, W. Y., Suh, G. J., & Shin, H. K. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory effects of selenium in oral buccal mucosa and small intestinal mucosa during intestinal ischemia-reperfusion injury. Journal of Inflammation (United Kingdom), 11(1), 1–8.
15. Avery, J. C., & Hoffmann, P. R. (2018). Selenium, selenoproteins, and immunity. Nutrients, 10(9).
16. Mattmiller, S. A., Carlson, B. A., & Sordillo, L. M. (2013). Regulation of inflammation by selenium and selenoproteins: Impact on eicosanoid biosynthesis. Journal of Nutritional Science, 2, 1–13.
17. Tidball, J. G. (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 288(2 57-2).
18. Riaz, M., & Mehmood, K. T. (2012). Selenium in human health and disease: A review. Journal of Postgraduate Medical Institute, 26(2), 120–133.
19. Rayman, M. P. (2012). Selenium and human health. The Lancet, 379(9822), 1256–1268.
20. Nettleford, S. K., & Prabhu, K. S. (2018). Selenium and selenoproteins in gut inflammation—A review. Antioxidants, 7(3), 1–12.
21. Huang, Z., Rose, A. H., & Hoffmann, P. R. (2012). The role of selenium in inflammation and immunity: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxidants and Redox Signaling, 16(7), 705–743.
22. Birben et al. (2012). Oxidative, stress and antioxidants defenses. WAO Journal, 44(5), 9–19.
23. Vásquez-Trincado, C., García-Carvajal, I., Pennanen, C., Parra, V., Hill, J. A., Rothermel, B. A., & Lavandero, S. (2016). Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. Journal of Physiology, 594(3), 509–525.
24. Ellwanger, J. H., Franke, S. I. R., Bordin, D. L., Prá, D., & Henriques, J. A. P. (2016). Biological functions of selenium and its potential influence on Parkinson’s disease. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, *88*(3), 1655–1674.
25. Duntas, L. H., & Hubalewska-Dydejczyk, A. (2015). Selenium and inflammation-potential use and future perspectives. US Endocrinology, 11(2), 97–102.
26. Fernandes, T. L., Pedrinelli, A., & Hernandez, A. J. (2011). Muscle Injury – Physiopathology, Diagnosis, Treatment and Clinical Presentation. Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition), 46(3), 247–255.
27. Dantas, M. G. B., Damasceno, C. M. D., De Barros, V. R. P., Menezes, E. S., Fontoura, H. D. S., de Lima, R. S., Almeida, J. R. G. da S. (2017). Creation of a kontusio injury method for skeletal muscle in rats with differing impacts. Acta Cirurgica Brasileira, 32(5), 369–375.
28. Macedo, A. C. B. de, Ywazaki, J. L., Macedo, R. M. de, Noronha, L., & Gomes, A. R. S. (2016). Morphologic study of different treatments for gastrocnemius muscle kontusio in rats. Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition), 51(6), 697–706.
29. Sullivan, Lucas B, N. S. C. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. Cancer and Metabolism, 2(17), 2–12.
30. Baird, M. F., Graham, S. M., Baker, J. S., & Bickerstaff, G. F. (2012). Creatine-kinase- and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. Journal of Nutrition and Metabolism, 2012, 13.
31. Rebalka, I. A., & Hawke, T. J. (2014). Potential biomarkers of skeletal muscle damage. Biomarkers in Medicine, 8(3), 375–378.
32. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2(March), 2–9.
33. Arifin, W. N., & Zahiruddin, W. M. (2017). Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. Malaysian Journal of Medical Sciences, 24(5), 101–105.
34. Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. North American Journal of Medical Sciences, 4(9), 429–434.
35. Asensio, L., Gonzalez, I., Garcia, T., Mrtin R. Determination of Food authenticity by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). Food Control Journal, 2007;19 : 1-8.
36. Lakes, E. H., & Allen, K. D. (2016). Gait analysis methods for rodent models of arthritic disorders: reviews and recommendations. Osteoarthritis and Cartilage, 24(11), 1837–1849.
37. Boettger, M. K., Leuchtweis, J., Schaible, H. G., & Schmidt, M. (2011). Videoradiographic analysis of the range of motion in unilateral experimental knee joint arthritis in rats. Arthritis Research and Therapy, 13(3), 2–11.
38. Ängeby Möller, K., Kinert, S., Størkson, R., & Berge, O. G. (2012). Gait Analysis in Rats with Single Joint Inflammation: Influence of Experimental Factors. PLoS ONE, 7(10), 1–12.
39. Liu, X., Zeng, Z., Zhao, L., Xiao, W., & Chen, P. (2018). Changes in inflammatory and oxidative stress factors and the protein synthesis pathway in injured skeletal muscle after kontusio. Experimental and Therapeutic Medicine, 15(2), 2196–2202.
40. Urso, M. L. (2013). Anti-inflammatory interventions and skeletal muscle injury: Benefit or detriment? Journal of Applied Physiology, 115(6), 920–928.
41. Srikuea, R., Pholpramool, C., Kitiyanant, Y., & Yimlamai, T. (2010). Satellite cell activity in muscle regeneration after kontusio in rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 37(11), 1078–1086.
42. Rebalka, I. A., & Hawke, T. J. (2014). Potential biomarkers of skeletal muscle damage. Biomarkers in Medicine, 8(3), 375–378.