



**MODUL
MATA KULIAH PENUNJANG DISERTASI (MKPD)**

**PERAN ANTOSIANIN PADA TIKUS MODEL
DEMENSIA DENGAN INDUKSI D-GALAKTOSA**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA**

2019

PETUNJUK UMUM

1. Tujuan Melakukan Praktikum

Memahami peran antosianin pada demensia.

Membandingkan pendapat-pendapat/teori-teori yang ada dan kemudian mengambil kesimpulan akhir.

Membantu dalam mempelajari efek yang ditimbulkan / diharapkan.

2. Cara Pelaksanaan

Modul digunakan sebagai pegangan dalam pelaksanaan pembelajaran secara mandiri.

Pada setiap kegiatan selalu dilakukan pencatatan pada buku catatan harian (log book).

Pada setiap pelaksanaan perkuliahan, selalu difasilitasi oleh dosen.

3. Penilaian/Evaluasi

Penilaian dilakukan terhadap proses dan hasil akhir pembelajaran yang dilakukan.

Pada akhir pelaksanaan pembelajaran dilakukan pembuatan tinjauan pustaka.

4. Aturan Pelaksanaan

Tidak diperkenankan terlambat hadir saat kegiatan perkuliahan.

Mengirimkan surat keterangan apabila berhalangan hadir saat kegiatan perkuliahan.

DEMENSIA

PENGANTAR

Model hewan memiliki peran yang penting dalam penelitian demensia Alzheimer (DA). Hewan pengerat telah banyak digunakan dalam penelitian DA karena kesamaan yang relatif banyak dalam struktur fisik dan sistem kognitif, serta ketersediaannya dan biaya yang relatif rendah dibandingkan dengan sistem primata. Model tikus dianggap jauh lebih baik dibandingkan invertebrata lainnya dalam hal fungsi memori, motorik, neuroanatomi dan sistem endokrin. Model hewan pada DA diklasifikasikan berdasarkan mekanisme spontan, diinduksi zat kimia, transgenik dan model lainnya. Zat kimia yang digunakan untuk menginduksi antara lain D-galactose, streptozotocin, colchicine, protein A β , alkohol, scopolamine dan lain-lain (Kumar et al, 2016).

Model hewan yang paling umum dalam penelitian demensia dengan menggunakan D-galaktosa untuk mempercepat proses penuaan otak (Haider et al., 2015; Lu et al., 2010). Pemberian D-galactose pada hewan dapat menginduksi aspek penuaan otak yang sama seperti pada penuaan otak manusia dalam banyak hal, antara lain adanya defisit memori, degenerasi neuronal dan apoptosis, peningkatan stres oksidatif, penurunan produksi ATP, peningkatan mutasi DNA mitokondria, gangguan struktur mitokondria dan kontrol ekspresi gen abnormal di otak (Banji et al., 2014; Kumar, 2013).

Pengujian kognitif pada tikus model DA menilai domain kognitif yang identik dengan uji neuropsikologis DA pada manusia. Tikus demensia merupakan tikus dengan gangguan perilaku yang secara obyektif dapat dilihat tikus yang malas bergerak, tidak mempunyai keinginan untuk melakukan eksplorasi, berkurangnya aktivitas spontan dan ditandai oleh proses belajar yang sangat lambat.

1. Mekanisme seluler penuaan

Salah satu teori yang diajukan pertama tentang penuaan adalah teori stres oksidatif, yang pada mulanya dikenal sebagai teori radikal bebas. Teori ini pertama kali diusulkan pada tahun 1950 oleh Denham Harman. Teori ini menghubungkan spesies oksigen reaktif (ROS) dengan proses penuaan, menunjukkan bahwa stres oksidatif meningkatkan kerusakan sel. Secara khusus, itu menunjukkan bahwa ROS mempengaruhi makromolekul, seperti lipid dan protein, dan DNA.

Teori mitokondria penuaan adalah teori baru yang memperluas konsep inti dari teori stres oksidatif. Teori ini didasarkan pada siklus mutasi somatik DNA mitokondria (mtDNA) menimbulkan disfungsi rantai pernapasan, meningkatkan produksi radikal oksigen yang merusak DNA. Mirip dengan teori stres oksidatif, akumulasi mutasi mtDNA menyebabkan disfungsi jaringan dan degenerasi jaringan, dan mungkin penyakit neurodegeneratif. Rentang kehidupan organisme ditentukan oleh tingkat kerusakan oksidatif, sehingga peningkatan kerusakan oksidatif akan memperpendek umur organisme. Penurunan umur terkait dengan penurunan bertahap dalam sel dan fungsi jaringan. Hasilnya menunjukkan bahwa kandungan protein karbonil, penanda umum untuk oksidasi protein, konsumsi oksigen mitokondria, dan kadar ROS meningkat secara signifikan pada semua organ. Secara keseluruhan, kedua teori penuaan berhipotesis bahwa ROS berkontribusi pada proses penuaan dan berkorelasi dengan penyakit neurodegeneratif (Lee, Lin, Boelsterli, & Chung, 2009).

Penuaan otak akhirnya mengarah pada gangguan kognitif, yang merupakan gejala utama dari beberapa penyakit neurodegeneratif pada orang tua. Untuk meneliti mekanisme dasar penuaan otak, beberapa model hewan telah digunakan. D-galaktosa dapat mempercepat proses penuaan otak pada model hewan merupakan model yang paling umum digunakan dalam penelitian proses penuaan otak (Haider et al., 2015). Pemberian D-galactose pada hewan dapat menginduksi aspek penuaan otak yang sama dalam banyak hal seperti pada penuaan otak

manusia, antara lain defisit memori, degenerasi neuronal dan apoptosis, peningkatan stres oksidatif, penurunan produksi ATP, peningkatan mutasi DNA mitokondria, gangguan struktur mi- tochondrial dan kontrol ekspresi gen abnormal di otak (Banji et al., 2014; Kumar, 2013).

2. Model hewan coba untuk demensia

Model D-galaktosa dapat digunakan untuk studi penuaan dan gangguan neurologis terkait penuaan termasuk penyakit Alzheimer (Shwe *et al.*, 2018). Pemberian D-galaktosa pada hewan menginduksi aspek penuaan otak seperti pada penuaan otak manusia dalam berbagai hal, antara lain adanya defisit memori, degenerasi neuronal dan apoptosis, peningkatan stres oksidatif, penurunan produksi ATP, dan gangguan struktur mitokondria (Banji *et al.*, 2014).

D-galaktosa adalah suatu aldohexose yang terdapat secara alami di tubuh termasuk di dalam otak. D-galaktosa juga merupakan gula pereduksi yang terdapat pada berbagai makanan seperti madu, bit, keju, yoghurt, mentega, susu, buah kiwi, kecap, buah plum, buah ara kering, ceri, dan seledri. Ketika makanan kaya D-galaktosa dimakan, maka gula mencapai lumen usus kemudian diangkut ke dalam sel oleh sodium-dependent glucose cotransporters tipe 1 (SGLT-1) dan keluar sel dengan glucose transport tipe 2 (GLUT-2) untuk selanjutnya memasuki aliran darah. Terdapat dua enzim yaitu galactokinase dan uridyl transferase yang memetabolisme D-galaktosa menjadi glukosa untuk memasuki jalur glikolisis atau disimpan sebagai glikogen dalam hati, otot dan jaringan adiposa (Coelho et al., 2015).

Penyerapan D-galaktosa ke dalam otak melalui sawar darah otak dimediasi oleh glucose transport tipe 1 (GLUT-1). Konsentrasi normal D-galaktosa dalam darah kurang dari 10 mg/dL. Dosis harian maksimal yang disarankan untuk orang dewasa yang sehat adalah 50 g galaktosa dan sebagian besar akan dieleminasi dari tubuh dalam waktu sekitar 8 jam setelah konsumsi (Morava, 2014).

3. Tikus model demensia dengan induksi D-galaktosa

Menilai efek penuaan pada suatu organisme merupakan suatu tantangan. Salah satu

tantangan ini adalah meningkatnya frekuensi kematian hewan dengan bertambahnya usia. Dalam sebuah penelitian yang secara khusus menilai rentang hidup tikus jantan Sprague Dawley (N = 747 tikus), dilaporkan bahwa rentang hidup berkisar antara 20 - 26 bulan. Para penulis juga melaporkan tingkat kelangsungan hidup 50% pada 23 bulan, dan persentase kematian tertinggi terjadi antara 18 - 29 bulan. Karena tingkat kematian yang tinggi, tingkat kelangsungan hidup yang rendah, dan jumlah minimum tikus yang diperlukan untuk menjalankan statistik, menilai efek usia tua sulit kecuali jika seseorang memiliki sejumlah besar tikus pada awal penelitian.

Beberapa solusi telah dicoba untuk mengatasi tantangan ini. Salah satu solusinya adalah penciptaan dan implementasi strain hewan mutan. Sebagai contoh, beberapa model tikus mutan untuk penyakit Alzheimer telah dikembangkan, seperti tikus 3xTgAd, model tikus mutan triple yang mengekspresikan protein prekursor amiloid, mutasi presenilin-1, dan tau. Mutan model yang secara khusus mengubah pembelajaran dan memori juga dibuat. Secara khusus, model mouse P8 adalah strain mouse mutan yang menunjukkan gangguan belajar dan fungsi memori di awal kehidupan. Strain ini juga memiliki umur yang relatif pendek dibandingkan dengan galur mouse lainnya (Komatsu et al., 2008). Kerugian untuk strain hewan mutan mungkin yang pertama memperpendek umur. Sebagai contoh, model mouse P8 memberikan gangguan belajar dan memori di awal kehidupan, tetapi jangka hidup yang diperpendek membatasi penelitian terhadap efek usia tua, atau usia tua yang ekstrim, setelah belajar dan fungsi memori. Kerugian kedua adalah biaya tinggi per hewan. Biasanya, strain hewan mutan akan lebih mahal per hewan daripada strain laboratorium standar. Peningkatan harga ini biasanya karena manipulasi genetik yang dilakukan untuk mendapatkan sifat-sifat genetik yang diinginkan.

Pendekatan alternatif dengan biaya lebih efektif melibatkan penerapan zat kimia untuk mempercepat penuaan. D-galaktosa adalah zat kimia yang digunakan dalam beberapa dekade terakhir yang mungkin mempercepat proses penuaan. Selain itu, telah diindikasikan secara

khusus mempengaruhi memori spasial. Para peneliti di China secara kebetulan menemukan kemampuan zat ini sebagai model penuaan saat menguji toksisitas sub-akut dari beberapa karbohidrat. Para peneliti melaporkan bahwa d-galaktosa menginduksi gangguan neurologis pada hewan pengerat, memperpendek umur hewan, dan menyebabkan neurodegeneration. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa perubahan yang disebabkan oleh d-galaktosa menyerupai perubahan yang diamati dalam proses penuaan normal. Perubahan ini termasuk penurunan aktivitas neuromuskuler, peningkatan produksi radikal bebas, aktivitas enzim antioksidan yang mati, dan berkurangnya respons imun (Song et al., 1999).

Sejak penemuan awal tersebut, peneliti telah menggunakan d-galaktosa sebagai model penuaan dan melakukan beberapa penelitian untuk menentukan bagaimana terjadinya penuaan hewan dengan d-galaktosa. Saat awal, d-galactose merupakan penurun gula yang bereaksi dengan amina bebas dari asam amino dalam protein untuk membentuk produk akhir glikasi lanjut (AGEs) melalui glikasi nonenzimatik. Glikasi non enzimatik diyakini berkontribusi pada proses penuaan melalui modifikasi lambat dari parameter struktural, fungsional, dan biokimia dari protein dan DNA, termasuk mtDNA. Modifikasi ini dimediasi oleh pembentukan AGEs (Sensi, Pricci, Andreani, & Mario, 1991).

Cara kedua di mana glikasi nonenzimatik berkontribusi pada penuaan adalah melalui asosiasi AGEs dan produksi langsung ROS. Pada tingkat normal, d-galaktosa mungkin tidak memiliki efek buruk pada tubuh, dan biasanya diubah menjadi glukosa; Namun, pada tingkat tinggi, dapat teroksidasi menjadi H₂O₂, yang melalui reaksi lebih lanjut dengan lipid dan protein dapat menghasilkan aldehida. Akumulasi H₂O₂ dan aldehida dapat memulai disfungsi mitokondria yang menyebabkan kerusakan intraseluler. Song dkk. (1999) melakukan penelitian untuk menyelidiki hubungan antara d-galaktosa dan AGEs. Tikus C57BL / 6J betina berumur 5 bulan disuntik secara subkutan dengan 50 mg / kg d-galaktosa selama 8 minggu. Para penulis menunjukkan bahwa tikus muda yang diobati dengan d-galaktosa memiliki

peningkatan kadar AGEs jika dibandingkan dengan tikus kontrol. Selain itu, penulis melaporkan bahwa tikus muda yang diobati dengan d-galaktosa mengalami penurunan aktivitas motorik spontan, peningkatan kesalahan memori dalam tes penghindaran pasif, penurunan proliferasi limfosit dan produksi IL-2, dan penurunan aktivitas superoksida dismutase bila dibandingkan dengan kontrol.

Secara keseluruhan, d-galaktosa berkaitan erat dengan proses penuaan melalui glikasi nonenzimatik dan produksi AGEs. Efek glikasi dan AGEs serupa dengan yang disebabkan oleh stres oksidatif dan kerusakan mitokondria. Glikasi dapat mengubah struktur dan fungsi DNA dan mtDNA, sehingga memiliki hasil yang sama dengan yang diprediksi oleh teori mitokondria pada penuaan. AGEs dapat menghasilkan ROS yang menyebabkan disfungsi jaringan, menunjukkan hasil yang serupa dengan yang diprediksi oleh teori stres oksidatif pada penuaan.

Pemberian dosis eksogen D-galaktosa yang berlebihan di luar konsentrasi normal dapat menginduksi efek penuaan pada beberapa organ dengan meningkatkan pembentukan ROS yang menyebabkan disfungsi mitokondria, stres oksidatif, inflamasi dan apoptosis pada sel-sel saraf (Kumar, 2013; Rehman et al., 2017). Penggunaan injeksi D-galaktosa jangka panjang merupakan metode yang sudah dikenal untuk studi demensia yang ditandai oleh peningkatan marker aging seperti *advanced glycation end products* (AGE), *receptors for advanced glycation end products* (RAGE), *aldose reductase* (AR), *sorbitol dehydrogenase* (SDH), pemendekan panjang telomere, aktivitas telomerase, *beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme-1* (BACE-1), amyloid beta protein (A β 1–42), gen terkait penuaan (p¹⁶, p²¹, p⁵³, p^{19Arf}, p^{21Cip1/Waf1}) dan SA- β -gal staining.

Selain marker aging, beberapa penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa pemberian jangka panjang D-galaktosa menyebabkan gangguan fungsi kognitif yang berkorelasi dengan gejala penuaan otak sehingga digunakan sebagai model untuk mempercepat penuaan otak pada tikus. (Haider et al., 2015; Lu et al., 2010).

Model D-galaktosa dapat digunakan untuk studi penuaan dan gangguan neurologis terkait penuaan termasuk DA (Shwe *et al.*, 2018). Pemberian dosis eksogen D-galaktosa yang berlebihan di luar konsentrasi normal dapat menginduksi efek penuaan pada beberapa organ dengan meningkatkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang menyebabkan disfungsi mitokondria, stres oksidatif, inflamasi dan apoptosis pada sel-sel saraf (Rehman *et al.*, 2017). Penuaan otak yang diinduksi D-galaktose sangat tergantung dosis, dimulai dari 100 mg/kg/hari hingga 500 mg/kg/hari dengan pemberian selama 6-8 minggu (Du *et al.*, 2012). Hipokampus berperan penting dalam konsolidasi memori untuk penyimpanan memori spasial dan perilaku emosional yang terkait dengan defisit kognitif pada DA. Hipokampus rentan terhadap senyawa toksik dan mudah mengalami kerusakan pada tahap awal DA. Kerusakan otak pada bagian hipokampus akibat stres oksidatif ini dapat memicu penurunan memori dan orientasi spasial (Banji *et al.*, 2014).

4. Efek D-galaktose pada proses selular penuaan dan kognitif

Dalam dekade terakhir, penelitian tentang d-galaktosa telah berfokus pada mekanisme kerjanya di dalam otak dan dampaknya pada pembelajaran dan ingatan. Sebagaimana dibahas di atas, stres oksidatif yang diinduksi oleh d-galaktosa dianggap menyebabkan beberapa efek yang merugikan, seperti penurunan kognitif. Dukungan lebih lanjut untuk hipotesis ini adalah penelitian tentang biomarker stres oksidatif di dalam otak. Biomarker stres oksidatif *in vivo* umum termasuk malondialdehyde (MDA), kemampuan antioksidan total (T-AOC), total superoksida dismutase (T-SOD), dan glutathione peroxidase (GSH-Px). MDA adalah pengukuran jumlah ROS dalam organisme, sementara T-AOC, T-SOD, dan GSH-Px mengukur tingkat enzim yang menonaktifkan radikal bebas. Mengukur biomarker adalah salah satu cara untuk menentukan mekanisme aksi galaktosa. Cui dkk. (2006) melakukan penelitian di mana mereka menyelidiki efek paparan d-galaktosa kronis terhadap kerusakan oksidatif pada tikus. Mencit C57BL / 6 jantan dewasa diberi suntikan d-galactose subkutan 100 mg / kg

sekali sehari selama tujuh minggu. Setelah selesainya minggu ketujuh, darah dikumpulkan dan digunakan untuk menganalisis kadar MDA, T-AOC, T-SOD, dan GSH-Px dalam serum. Para penulis melaporkan peningkatan MDA yang dikombinasikan dengan penurunan aktivitas T-AOC, T-SOD, dan GSH-Px pada tikus yang diobati dengan d-galaktosa bila dibandingkan dengan kontrol. Hasil ini menunjukkan bahwa d-galaktosa meningkatkan stres oksidatif dengan menghambat fungsi enzim yang menghambat dan memecah ROS dalam tikus.

Sehubungan dengan belajar dan memori, bukti menunjukkan bahwa injeksi kronis d-galaktosa selama 6 - 10 minggu menyebabkan disfungsi astrocytes, neurodegenerasi, gangguan neurogenesis, dan penurunan memori spasial (Cui et al., 2006). Penelitian dengan astrocytes adalah salah satu dari beberapa cara untuk mempelajari neurodegenerasi, khususnya neurodegenerasi yang terkait dengan penyakit Alzheimer. Astrosit adalah jenis sel glial yang paling melimpah di otak, dan memiliki peran penting dalam pengaturan pembentukan jaringan sinaptik dan aktivitas listrik saraf, serta memberikan perlindungan saraf. Dalam lingkungan ROS tinggi, seperti organisme yang secara kronis disuntik dengan d-galaktosa, astrosit mengalami perubahan subselular. Perubahan ini termasuk hipertrofi di mana proses bengkak ini akhirnya menelan struktur sinapsis proksimal, sehingga mengorbankan jaringan sekitarnya. Cara kedua untuk menyelidiki neurodegenerasi adalah untuk mengukur sel-sel apoptosis. Dalam sebuah penelitian yang dilakukan oleh Cui et al. (2006) mencit C57BL / 6 jantan diberikan injeksi subkutan 100 mg / kg d-galaktosa sekali sehari selama tujuh minggu. Setelah itu, jaringan dipotong dan diproses menggunakan pewarnaan hematoxylin dan eosin (H & E) dan terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. Para penulis melaporkan bahwa empat bagian dari formasi hipokampus (CA1, CA2, CA3, dan dentate gyrus) semuanya mengalami peningkatan nuklei pyknotic, inti sel yang mengalami apoptosis, dan sel TUNEL positif, atau sel dengan degradasi DNA.

Hippocampus adalah area utama di otak orang dewasa tempat terjadinya neurogenesis. Kegiatan yang melibatkan pembelajaran baru dan latihan dapat meningkatkan neurogenesis dalam suatu organisme, sehingga meningkatkan kemampuan belajar dan memori, termasuk memori spasial. Proses ini dapat terjadi pada neuron yang sudah ada atau menggantikan neuron yang hancur akibat faktor lingkungan. Neurogenesis adalah proses yang menurun seiring bertambahnya usia dan juga dapat dipercepat oleh stres oksidatif. Dalam sebuah penelitian yang dilakukan oleh Zhang dkk. (2005), mencit jantan C57BL / 6 diberikan injeksi subkutan 100 mg / kg d-galaktosa sekali sehari selama tujuh minggu. Hasilnya menunjukkan penurunan proliferasi sel dan kelangsungan hidup jangka panjang dari sel yang baru lahir di dalam dentate gyrus.

Studi lain meneliti efek dari dosis serupa d-galaktosa pada memori spasial pada tikus C57. Secara khusus, Wei, Li, Song, Ai, Chu, & Li (2005) menyelidiki efek d-galaktosa pada pembelajaran pada Morris Water Maze (MWM). Tikus C57 perempuan muda diberikan suntikan subkutan 50, 100, atau 200 mg / kg d-galaktosa sekali sehari selama delapan minggu. Prosedur MWM terdiri dari empat hari pembelajaran dan pelatihan memori diikuti oleh uji coba probe pada hari ke lima. Setiap hari pelatihan terdiri dari blok pagi dan sore, dengan masing-masing blok terdiri dari dua uji coba 60-an. Hasilnya menunjukkan peningkatan latensi melarikan diri dalam kelompok 100 dan 200 mg / kg, tetapi bukan kelompok 50 mg / kg, jika dibandingkan dengan kontrol. Selain itu, tikus yang diobati dengan 100 atau 200 mg / kg berenang secara signifikan lebih sedikit waktu dan jarak di target kuadran selama uji coba probe. Hasil ini menunjukkan defisit dalam memori spasial. Kedua studi ini bersama menunjukkan efek melemahkan d-galaktosa pada memori spasial, serta atenuasi neurogenesis di dentate gyrus dari hippocampus, area yang biasanya berkontribusi pada kemampuan memori spasial.

Singkatnya, d-galaktosa adalah zat yang sebelumnya ditunjukkan untuk menginduksi perubahan seluler dalam suatu organisme yang menyerupai penuaan alami. Efek merusak dari d-galaktosa telah dikaitkan dengan peningkatan stres oksidatif, serta penghambatan sistem yang bertanggung jawab untuk menurunkan ROS dalam tubuh. Selain itu, sistem yang biasanya terpengaruh termasuk wilayah otak yang berkontribusi langsung atau tidak langsung ke proses pembelajaran dan memori. Hingga saat ini, penelitian yang dipublikasikan tentang pengobatan d-galactose sebagai model penuaan yang dipercepat telah menggunakan tikus. Agaknya d-galactose akan memiliki efek yang sama pada hewan pengerat lainnya, meskipun ini belum ditentukan.

5. Mekanisme gangguan kognitif dengan induksi D-galaktosa

Mekanisme stres oksidatif D-galaktosa terjadi pada tingkat sub-seluler, khususnya di mitokondria otak (Banji et al., 2014; Kumar, 2013). Peningkatan konsentrasi D-galaktosa akan dioksidasi oleh galactose oksidase untuk membentuk hidrogen peroksida (H_2O_2), yang menyebabkan penurunan superoksida dismutase (SOD) (Hsieh et al., 2009). Peningkatan H_2O_2 bereaksi dengan besi (Fe) membentuk ion hidroksida (OH^-). H_2O_2 dan OH^- keduanya merupakan jenis spesies oksigen reaktif (ROS) yang bersama dengan yang lainnya dapat menyebabkan peroksidasi lipid dalam membran sel dan merusak homeostasis redoks, yang menyebabkan kerusakan saraf (Hsieh et al., 2009). Selain itu, D-galaktosa bereaksi dengan amina untuk membentuk senyawa yang tidak stabil (disebut produk dasar Schiff) yang mengalami beberapa reaksi selama beberapa hari untuk membentuk senyawa yang lebih stabil yang dikenal sebagai produk Amadori. Produk Amadori ini berubah secara irreversibel menjadi senyawa yang dikenal sebagai produk akhir glikasi (AGE) selama berbulan-bulan/tahun (Hsieh et al., 2009). Ketika AGE berikatan dengan reseptornya RAGE, terjadi peningkatan oksidasi dari nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) dan produksi ROS, yang mengakibatkan kerusakan saraf dan disfungsi kognitif (Hsieh et al., 2009). Selain itu, kadar D-

galaktosa yang tinggi diturunkan oleh galaktosa reduktase dengan membentuk galactitol yang menghasilkan stres osmotik dan menurunkan aktivitas rantai transpor elektron (ETC) di mitokondria yang menyebabkan peningkatan produksi ROS, dan akhirnya menyebabkan terjadinya disfungsi mitokondria (Hsieh et al., 2009). Penanda stres oksidatif lainnya pada penuaan otak yang diinduksi D-galaktosa dalam beberapa penelitian adalah malondialdehyde (MDA), kadar nitrit, H₂O₂, 8-oxoguanine, p91phox, p22phox, p47phox, p67phox dari NADPH oxidase (NOX) 2, total nitric oxide synthase (TNOS), sintase nitrit oksida yang dapat diinduksi (iNOS), ROS, protein karbonil dan AOPP.

D-galaktosa dapat menginduksi penuaan otak dengan menyebabkan stres oksidatif dan disfungsi mitokondria pada berbagai area otak yang berbeda seperti hippocampus, korteks serebral, korteks pendengaran dan nucleus koklear ventral. Penuaan otak yang diinduksi D-galactose sangat tergantung dosis, dimulai dari 100 mg/kg/hari hingga 500 mg/kg/hari dengan pemberian selama 6-8 minggu (Banji et al., 2014; Du et al., 2012).

D-galaktosa juga menyebabkan penurunan enzim antioksidan seperti glutathione, katalase, superoksida dismutase, aktivitas glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase dan total anti-oksidan capacity. Oleh karena itu, ketidakseimbangan antara spesies oksigen reaktif dan aktivitas antioksidan pada model penuaan D-galaktosa menyebabkan peningkatan stres oksidatif dan disfungsi mitokondria yang signifikan dalam proses penuaan.

Disfungsi mitokondria yang diinduksi D-galaktosa ditandai oleh pengurangan enzim rantai pernafasan dan aktivitas antioksidan, yang kemudian meningkatkan stres oksidatif, mutasi DNA mitokondria, penurunan sintesis ATP, perubahan potensial membran mitokondria dan menyebabkan kerusakan struktur mitokondria. D-galaktosa tidak hanya menyebabkan disfungsi mitokondria dan stres oksidatif, tetapi juga menginduksi apoptosis neuronal.

D-galaktosa mengaktifkan jalur ekstrinsik dan intrinsik dari apoptosis. Jalur ekstrinsik 'death receptor' secara langsung mengaktifkan efektor caspase melalui JNK (c-Jun-N-terminal

kinase) dan menyatu dengan jalur apoptosis intrinsik pada mitochondria. Ditemukan bahwa D-galactose mengaktifkan p-JNK dan meningkatkan kadar kompleks sitokrom (cyt c) yang menstimulasi aktivasi caspase-3, caspases-9 dan pemecahan *poly ADP ribose polymerase* (PARP-1). D-galaktosa juga memicu mitochondria untuk melepaskan cyt c, menurunkan kadar ekspresi anti-apoptosis Bcl2 dan meningkatkan Bax apoptosis. Semua peristiwa tersebut menunjukkan bahwa D-galaktosa memicu proses apoptosis. Selain menimbulkan apoptosis, D-galaktosa juga memicu neuroinflamasi dan neurodegenerasi. Dosis D-galaktosa mulai menginduksi apoptosis adalah 100 mg-500 mg/kg/hari, dengan durasi selama 6 sampai 9 minggu.

Penanda inflamasi yang digunakan untuk memantau model penuaan yang diinduksi D-galaktosa adalah siklooksigenase (COX-2), iNOS, NOS-2, tumor ne-crosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL-1 β), IL-6, nuclear factor (NF- κ B) protein yang berinteraksi thioredoxin (Txnip), p-NF- κ Bp65, p-I κ B α , p-IKK α , p-IKK β . Semua penelitian ini menunjukkan bahwa D-galactose meningkatkan penanda inflamasi dan menginduksi neuroinflamasi melalui aktivasi faktor transkripsi NF κ -B melalui Ras dan jalur sinyal redoks-sensitif, yang mengakibatkan gangguan memori. Dosis D-galaktosa mulai menginduksi inflamasi adalah 50 mg-180 mg/kg/hari dengan durasi antara 6 minggu hingga 60 hari.

Sejumlah penelitian menemukan bahwa pemberian D-galaktosa secara sistemik jangka panjang telah digunakan secara luas untuk memediasi kerusakan fungsi kognitif yang terkait dengan gejala penuaan (Lu et al., 2010b; Rehman et al., 2017). Dosis kerusakan fungsi fungsi kognitif mulai dari 50 mg hingga 180 mg / kg / hari dalam durasi 6-9 minggu. Tes yang digunakan untuk mendeteksi fungsi kognitif yang memantau efek model penuaan D-galaktosa adalah tes berikut: labirin air Morris, lapangan terbuka, langkah-langkah penghindaran pasif, step-down, peningkatan plus paradigma labirin, dan Y- labirin seperti dirangkum dalam Tabel 4. Gangguan kognitif dalam model D-galaktosa telah terbukti disebabkan oleh disfungsi

mitokondria, stres oksidatif, apoptosis, peradangan dan penuaan (Lu et al., 2010b; Rehman et al., 2017).

6. Penilaian gangguan kognitif pada tikus model demensia

Pengujian kognitif pada tikus model AD menilai domain kognitif yang identik dengan uji neuropsikologis AD pada manusia. Tikus demensia merupakan tikus dengan gangguan perilaku yang secara obyektif dapat dilihat tikus yang malas bergerak, tidak mempunyai keinginan untuk melakukan eksplorasi, berkurangnya aktivitas spontan dan ditandai oleh proses belajar yang sangat lambat. Memori kerja merupakan salah satu aspek defisit memori yang paling banyak dimodelkan pada AD. mengacu pada proses mental untuk menyimpan informasi dalam waktu yang terbatas dengan cara meniru perilaku (Webster, 2014).

Ada banyak tugas perilaku yang telah dikembangkan untuk mengevaluasi perubahan perilaku pada DA. Tugas memori kerja berbasis spasial banyak digunakan dalam pengujian memori kerja tikus yaitu Morris Water Maze (MWM). MWM terdiri dari kolam terbuka besar dengan platform pelarian tersembunyi (terendam) yang terletak di suatu tempat di dalam kolam. Hewan harus mempelajari di mana platform berada, mengingat lokasi platform dan kemudian menggunakan isyarat spasial pada percobaan berikutnya untuk menavigasi kembali ke platform tersembunyi. Sejumlah besar model tikus AD telah dinilai dengan MWM dan kebanyakan menunjukkan defisit kognitif terkait AD (Webster et al., 2013).

Ada banyak tugas perilaku yang telah dikembangkan untuk mengevaluasi perubahan perilaku pada DA. Sebagian besar tugas perilaku dirancang untuk menilai memori yang tergantung pada peran hipokampus diantaranya adalah test Y-maze. Y-Maze merupakan tugas perilaku yang banyak digunakan untuk pembelajaran spasial dan memori dengan cara menilai keaktifan tikus dalam mengeksplorasi lingkungan yang baru (Sharma et al., 2010). Tes ini didasarkan fakta bahwa hewan pengerat termotivasi untuk mengeksplorasi lingkungan dan mencari makanan dengan cepat dan efisien. Labirin ini hanya memberikan dua pilihan yaitu

lengan kiri atau lengan kanan, masing-masing berisi hadiah makanan. Setelah hadiah makanan diambil dari satu lengan, kecenderungan alami hewan adalah mengubah pilihan mereka untuk mendapatkan hadiah makanan dari lengan yang berlawanan. Kemampuan untuk mengingat lokasi spasial ini diadaptasi menjadi tugas perilaku sederhana untuk menguji fungsi kognitif pada tikus. Tugas ini membutuhkan kemampuan memori spasial untuk mengingat lokasi lengan yang sudah dikunjungi yang merupakan peranan dari hipokampus. Y-Maze sangat mirip dengan T-Maze namun Y-Maze lebih disukai daripada T-Maze karena memiliki perubahan yang lebih bertahap sehingga dapat mengurangi waktu pembelajaran pada tikus yaitu sudut lengan 120 derajat pada Y-Maze dan 90 derajat pada T-Maze (Deacon *et al.*, 2013). Tikus umumnya lebih memilih bergerak menuju lengan yang baru dibandingkan kembali ke lengan yang sudah dilewatinya. Tes ini mampu menilai fungsi otak berbagai area terutama hipokampus, septum, basal forebrain dan korteks prefrontal (Wright dan Conrad, 2005).

7. Memori dan fungsi kognitif pada demensia

Karakteristik paling mencolok saat terjadi dan berkembangnya DA adalah gangguan kognitif yang terkait dengan gangguan pada hipokampus untuk penyimpanan memori spasial dan perilaku emosional. Memori spasial pada binatang berperan dalam menemukan lokasi yang menyediakan makanan dan keselamatan untuk mempertahankan hidup (Dogru *et al.* 2003). Memori spasial binatang sama dengan memori deklaratif pada manusia. Memori deklaratif adalah memori tentang suatu objek yang berhubungan dengan lingkungan sekitarnya (Guyton dan Hall, 2007).

Memori merupakan bentuk penyimpanan informasi yang didapat dari proses pembelajaran atau latihan berulang. Proses pembelajaran tersebut akan disandikan (*coding*), disimpan (*storage*) dan kemudian dikeluarkan kembali (*retrieve* atau *recall*) dalam bentuk ingatan (Kandel *et al.*, 2000). Secara umum informasi tersimpan dalam bentuk konsep dan dapat juga berupa kata demi kata (Sherwood, 2014). Penyimpanan informasi dilakukan dalam dua cara

yaitu ingatan jangka pendek (*short term memory*) dan ingatan jangka panjang (*long term memory*) (Guyton dan Hall, 2007). Ingatan jangka pendek memiliki kapasitas penyimpanan terbatas dan berlangsung detik hingga jam, sedangkan ingatan jangka panjang berkapasitas sangat besar dan dipertahankan dalam hitungan harian hingga tahunan. Berdasarkan jenis informasi yang disimpan terdapat dua jenis memori yaitu memori deklaratif (eksplisit) dan memori non-deklaratif (implisit). Memori eksplisit terlibat dalam proses mengingat secara sadar terhadap informasi tentang individu, kejadian spesifik, tempat, dan benda. Sedangkan memori implisit terlibat dalam proses mengingat bawah sadar terhadap pelaksanaan tugas dan prosedur seperti keterampilan motorik (Sherwood, 2014).

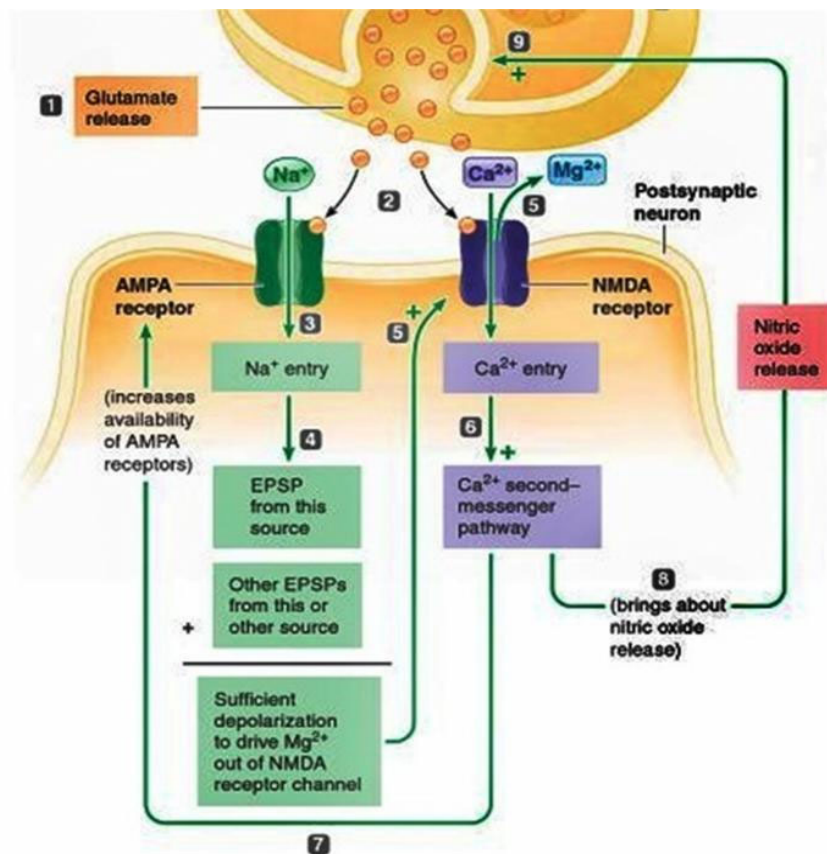
Memori spasial termasuk dalam memori deklaratif atau eksplisit. Memori spasial berkaitan dengan kemampuan mengingat ruang bidang, mengenali bentuk, jarak, dan luas, serta mengetahui arah atau posisi. Tanpa adanya memori spasial maka individu akan mengalami kesulitan dalam memahami posisi diri, melihat bentuk dan ruang bidang, tidak dapat mengingat arah atau letak suatu benda, serta tidak dapat memperkirakan jarak suatu tempat.

Hipokampus merupakan tempat dominan terjadinya transfer dan penguatan memori jangka pendek menjadi memori jangka panjang yang disebut dengan konsolidasi memori. Hipokampus merupakan bagian dari sistem limbik yang terletak pada bagian tengah lobus temporalis. *Long Term Potentiation* (LTP) yang terjadi di hipokampus merupakan proses penting dalam pembentukan memori berupa peningkatan transmisi sinaps yang mengikuti stimulasi berfrekuensi tinggi dari serabut saraf aferen. Proses ini dibangkitkan melalui pengaktifan sinaps dari reseptor glutamat post sinaps dan depolarisasi post sinaps yang disebabkan oleh stimulasi berulang pada sinaps (Sherwood, 2014).

Proses penyimpanan dan mengingat kembali sesuatu hal dimulai ketika neuron presinaps melepaskan neurotransmitter eksitatorik glutamat sebagai respon potensial aksi seperti terlihat pada gambar 2.1 (Sherwood, 2014). Glutamat berikatan dengan dua jenis reseptor di neuron

post sinaps yaitu reseptor *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDA) dan reseptor *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA). Reseptor AMPA memiliki saluran yang permeabel terhadap kation monovalen (Na^+ dan K^+), dan pengaktifan reseptor AMPA menyebabkan ion-ion tersebut masuk dan membangkitkan respons eksitasi sinaps ketika sel berada pada potensial membran istirahat. Sedangkan reseptor NMDA bergantung pada voltase yang kuat karena hambatan pada salurannya oleh magnesium pada potensial membran negatif. Akibatnya reseptor NMDA hanya berperan sedikit pada respon post sinaps selama aktivitas sinaps basal. Magnesium terpisah dari tempat ikatannya didalam saluran reseptor NMDA pada keadaan sel depolarisasi menyebabkan kalsium dan natrium memasuki celah dendrit. Peningkatan kalsium intraseluler dibutuhkan untuk membangkitkan LTP. Akan tetapi kanal reseptor ini ditutup oleh pintu dan ion magnesium yang secara fisik menghambat kanal untuk membuka pada potensial istirahatnya. Kanal NMDA terbuka bila ada dua kejadian yang terjadi hampir bersamaan, yaitu pelepasan glutamat prasinaps dan depolarisasi pascasinaps oleh masukan lain (Zito, 2009). Kanal NMDA terbuka jika berikatan dengan glutamat, akan tetapi aksi ini sendiri tidak membiarkan masuknya Ca. Depolarisasi tambahan pada neuron post sinaps akibat terikatnya glutamat pada reseptor AMPA cukup diperlukan untuk mendepolarisasikan neuron pascasinaps agar dapat dipaksa keluar dari kanal ini (Sherwood, 2014).

Ketika kanal reseptor NMDA terbuka, secara bersamaan glutamat memasuki sel pasca sinaps mengaktifkan jalur ion kalsium yang berperan sebagai *second messenger* melekatkan diri pada protein calmodulin dan enzim Protein Kinase C (PKC) membentuk *Calcium calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)*. Jalur *second messenger* ini menyebabkan penyisipan fisik reseptor AMPA tambahan pada membran pascasinaps, sehingga menyebabkan peningkatan ketersediaan reseptor AMPA yang dapat meningkatkan potensial aksi eksitatorik neuron pascasinaps untuk mempertahankan ingatan jangka panjang. Selain itu, jalur *second messenger* ini juga mengeluarkan nitrat oksida yang akan memberikan umpan balik positif. Umpan balik positif ini akan meningkatkan pelepasan glutamat dan membantu mempertahankan ingatan (Sherwood, 2014).



Gambar 2.7. Jalur Potensial Aksi Memori (Sherwood, 2014)

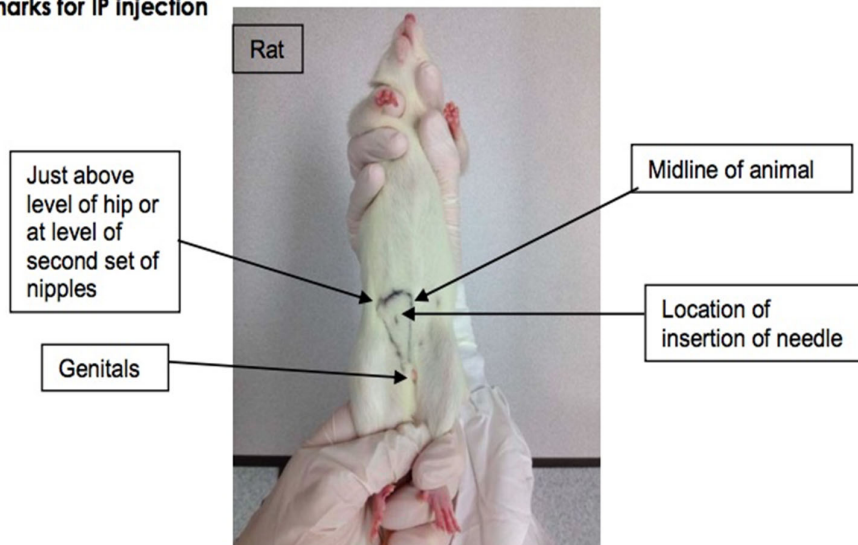
Modifikasi yang berlangsung selama pembentukan ingatan jangka panjang akan bertahan lama meskipun aktivitas yang menyebabkan perubahan ini telah berhenti. Sehingga informasi

akan disampaikan disepanjang jalur sinaps yang sama dengan lebih efisien jika teraktivasi kembali di masa yang akan datang (proses mengingat). Ingatan jangka panjang bersifat spesifik bagi jalur yang teraktivasi. Jalur di antara masukan prasinaps inaktif lainnya dan sel pascasinaps yang sama tidak terpengaruh (Sherwood, 2014). Sehingga jika kita mengingat sesuatu yang baru dalam jangka panjang, maka akan ada pembentukan sinaps baru khusus yang permanen dalam jalur pengingatan hal tersebut. Berbeda dengan ingatan jangka pendek yang hanya memperkuat hubungan sinaps-sinaps yang sudah ada (Guyton & Hall, 2007).

8. Pembuatan Tikus Model Demensia

Tikus wistar jantan disiapkan di kandang pada fasilitas perawatan hewan Laboratorium FKH UNUD hingga mencapai umur 3-3,5 bulan dengan berat 200-250 gram. Kandang yang dipakai adalah kandang yang tidak mudah rusak, tikus terlihat dari luar dan tahan terhadap gigitan sehingga tikus tidak bisa keluar. Makanan yang diberikan adalah makanan yang memenuhi syarat sehingga tikus tidak sakit. Dengan memperhatikan kriteria inklusi dan eksklusi, tikus wistar jantan dirandomisasi untuk dijadikan sampel.

Landmarks for IP injection



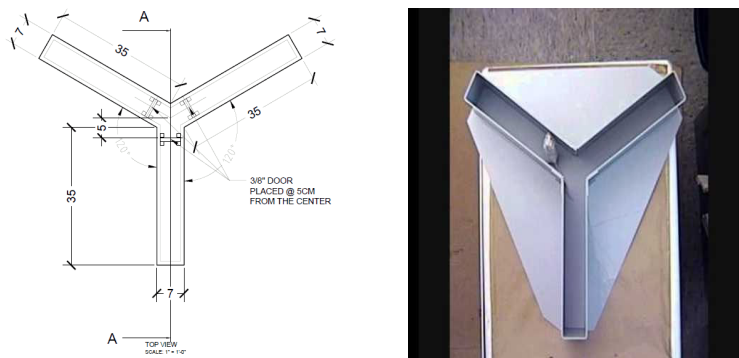
Gambar 2.8 Lokasi penyuntikan intraperitoneal pada tikus (Andrews K., 2012)

Tikus model demensia diinduksi dengan injeksi D-galaktosa intra peritoneal dosis 100 mg/kg/hari selama 8 minggu. Tikus dipegang dengan menjepit kepala menggunakan ibu jari

dan telunjuk, ekornya dijepit antara jari manis dan kelingking dalam posisi terlentang dengan posisi kepala lebih rendah dari abdomen. Setelah melakukan desinfeksi dengan alcohol 70%, injeksi intraperitoneal D-galaktosa dilakukan pada daerah kuadran bawah abdomen agak lateral dari garis tengah, kearah kepala dengan sudut 10 derajat. Penyuntikan dilakukan setiap hari dengan mengubah sisi yang disuntikkan antara kanan dan kiri.

9. Penilaian memori kerja spasial

Penilaian memori kerja spasial menggunakan test Y-maze dilakukan pada akhir minggu ke 8 (hari ke 56) setelah tikus selesai mendapatkan perlakuan. Alat yang digunakan berbentuk huruf Y simetris terbuat dari plexiglass/pelat baja abu-abu dengan tiga lengan masing-masing 120 derajat satu sama lain. Tiap lengan mempunyai panjang 35 cm, lebar 5 cm dan tinggi 10 cm seperti tampak pada gambar 2.2. Lengan membentuk pusat triangular yang ekuilateral dengan area pada aksis terpanjang 15 cm. Tikus umumnya lebih memilih bergerak menuju lengan yang baru dibandingkan kembali ke lengan yang sudah dilewatinya. Tes ini mampu menilai fungsi otak berbagai area terutama hipokampus, septum, basal forebrain dan korteks prefrontal (Wright&Condrad, 2005).



Gambar 2.9 Alat uji Y-Maze

Uji Y-maze dilakukan pada ruangan tertutup dan tenang, menggunakan stop watch. Lampu ruangan dinyalakan redup untuk mengurangi kegelisahan pada tikus. Uji dilakukan selama 5 menit, yaitu tikus dibiarkan melakukan eksplorasi pada ketiga lengan Y-maze dengan bebas. Jika tikus memanjat dinding maze maka akan langsung dikembalikan ke lengan yang

ditinggalkan. Lengan awal bervariasi pada tiap tikus untuk menghindari bias penempatan yang ditandai dengan huruf A, B, dan C. Antar sesi dilakukan pembersihan ketiga lengan Y maze menggunakan alkohol 5% dan dibiarkan kering untuk mencegah isyarat bau. Jumlah masuk direkam menggunakan kamera video dan pilihan pertama dari lengan maze dicatat berdasarkan hasil rekaman. Hewan uji dinyatakan masuk ke lengan bila 85% dari tubuh tikus memasuki lengan. Memori spasial dinyatakan dengan alternasi spontan (%). Alternasi spontan dinyatakan berhasil bila hewan uji masuk ke ketiga lengan berbeda secara berurutan, dihitung dari set triple yang overlapping. Alternasi spontan (%) ini dihitung dari jumlah masuk yang benar dalam 3 lengan berbeda (ABC) dibagi dengan jumlah kemungkinan pergantian (jumlah masuk lengan total dikurangi 2). Misal lengan yang dimasuki tikus ABCABACA (8 lengan) maka kemungkinan alternasi spontan adalah $8-2=6$, sedangkan alternasi yang benar ada 4 (ABC-BCA-CAB-BAC), maka persentase alternasi spontan = $(4/6) \times 100 = 67\%$. Tikus dengan jumlah masuk lengan kurang dari 8 lengan selama percobaan 5 menit dikeluarkan dari analisis. Tikus model dengan uji kognitif Y maze memiliki alternasi spontan kurang dari 50% berarti menunjukkan telah terjadi gangguan memori spasial (Deacon et al., 2013).

10. Pengambilan Sampel Otak Tikus wistar

Setelah penilaian memori kerja spasial pada hari ke 56, dilakukan anestesi menggunakan injeksi intraperitoneal ketamin (100 mg/kg berat badan) dan xylazin (10 mg/kg berat badan), selanjutnya dilakukan *euthanasia* pada tikus wistar menggunakan metode *cervical dislocation*. Tikus dipastikan tidak sadar atau tidak menunjukkan gerakan spontan kemudian dilakukan pengambilan jaringan otak tikus dengan melakukan pembedahan kranium. Pembedahan tersebut dilakukan dengan cara menggantung kranium dengan arah sagital dari kaudal (oksipital) menuju ke rostral (frontal), tepat diantara kedua hemisfer otak. Selanjutnya dilakukan pembebasan otak tikus pada regio basal dari jaringan ikat sekitarnya. Hemisfer otak tikus kanan dan kiri dipisahkan kemudian diambil hemisfer otak sisi kiri dimasukkan kedalam

botol yang telah diisi larutan formalin 10% dan hemisfer sisi kanan dimasukkan ke dalam plastik. Botol yang berisi hemisfer kiri otak tikus dan larutan formalin tersebut selanjutnya ditutup rapat. Tahap selanjutnya adalah melakukan pemotongan jaringan otak dan pembuatan slide dengan paraffin block yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.

Jaringan otak dimasukkan tabung yang diisi larutan formalin 10% kemudian dipotong dengan rotary mikrotom setebal 4 mikron, tempelkan pada obyek glass yang telah diolesi dengan kemudian diletakkan dalam poly-L-lysine dan dibiarkan dalam suhu kamar. Selanjutnya dilakukan deparafinisasi, tetapi sebelumnya slide dipanaskan dahulu pada suhu 60°C selama 60 menit. Dilakukan penambahan larutan berikut secara berurutan: xilol (2x10 menit), etanol absolut (2x10 menit), etanol 90% (1x5 menit), etanol 80% (1x5 menit), etanol 70% (1x5 menit), akuades steril (3x5 menit).

11. Peran antosianin pada tikus model demensia dengan induksi D-galaktosa

11.1 Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah suatu keadaan ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan di dalam tubuh. Radikal bebas sebagian besar terbentuk dari metabolisme molekul oksigen di mitokondria sehingga menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS). Otak merupakan organ yang rentan terhadap stres oksidatif karena sebagian besar komposisinya terdiri dari lemak tidak tersaturasi dengan level antioksidan yang rendah dan tingkat transisi redoks ion metal relatif tinggi (Huang *et al.*, 2016).

Stres oksidatif pada DA dicetuskan oleh A β yang dapat dimulai dari mitokondria, sitoplasma, ataupun ekstraselular. Oligomer diduga mengganggu struktur dan fungsi mitokondria. A β mencetuskan produksi ROS melalui jalur yang melibatkan reseptor glutamat dan aktivasi NADPH oksidase di mikroglia dan mungkin juga di astrosit (Agostinho *et al.*, 2010). Peningkatan produksi dan penurunan klirens peptida A β menyebabkan akumulasi A β

yang dapat mengganggu berbagai mekanisme sinyal sel, menyebabkan degenerasi sinaps, kematian neuron, dan penurunan fungsi kognitif. Peningkatan ini diduga merupakan suatu mekanisme pertahanan diri sel terhadap stres oksidatif itu sendiri. Konsentrasi fisiologis A β secara efektif dapat menghalangi oksidasi lipoprotein di otak, meningkatkan potensiasi jangka panjang hipokampus. Namun A β dalam jumlah tinggi akan memicu akumulasi dan agregasi antar A β sendiri, mencetuskan stres oksidatif lebih tinggi lagi (Zhao *et al.*, 2013).

Stres oksidatif juga memiliki peran dalam hiperfosforilasi dan polimerisasi tau. Hiperfosforilasi tau pada DA sendiri adalah akibat dari peningkatan enzim protein kinase dan penurunan aktivitas dari enzim protein fosfatase (Zhao *et al.*, 2013; Chauhan *et al.*, 2006). Filamen helikal berpasangan pada tau akan mengalami glikasi non enzimatis, menghasilkan AGE. AGE-tau kemudian menghasilkan radikal bebas oksigen mengaktifasi transkripsi *nuclear factor kappa B* (NF κ B), meningkatkan APP, dan pada akhirnya meningkatkan jumlah peptida A β (Chauhan *et al.*, 2006).

Antosianin sama seperti flavonoid lainnya merupakan antioksidan unik karena dapat menghancurkan ROS dan RNS secara langsung, yang bisa dinilai dari tingginya kapasitas absorpsi dari radikal oksigen (ORAC) dan peningkatan pertahanan antioksidan intrinsik dari sel (Hwang *et al.*, 2011). Antosianin memberikan perlindungan kuat dari toksisitas hidrogen peroksida dalam berbagai jalur sel saraf. Superoksida dan hidrogen peroksida terdapat pada proses fisiologis, dan semakin meningkat akibat proses neurodegenerasi karena terjadi disfungsi mitokondria dan inflamasi glial. Antosianin mampu menghancurkan ROS sehingga tepat untuk kondisi kerusakan oksidatif pada penyakit Alzheimer (Poulose *et al.* 2016).

Perbaikan tidak langsung stres oksidatif dan nitrosatif oleh antosianin dengan melalui peningkatan kadar aktivitas enzim antioksidan yaitu enzim katalase antara lain hidrogen peroksida dan SOD1 baik *in vitro* dan *in vivo*. Antosianin juga meningkatkan kadar GSH dengan meningkatkan aktivitas glutathione peroxidase, yang berperan dalam detoksifikasi

hidrogen peroksida. Selain itu antosianin terbukti mengurangi stres oksidatif dan disfungsi mitokondria dengan inhibisi Bcl-2. Efek neuroprotektif dari anthocyanin dimediasi melalui aktivitas antioksidan langsung dan tidak langsung dalam otak (Kelsey *et al.* 2011). Efek antioksidan sangat tergantung pada gugus hidroksil pada cincin B. Efek antioksidan antosianin adalah melalui mekanisme: 1) Mencegah pembentukan radikal bebas dengan enzim xanthine oksidase dan khelasi metal; 2) Mendonorkan elektron dan menangkap radikal bebas, 3) Menghambat proses propogasi reaksi oksidatif, 4) Menginduksi ekspresi antioksidan endogen (Montilla *et al.*; 2010; de Pascual-Teresa, 2014).

11.2 Proses inflamasi kronis

Deposit A β mengaktivasi respon imun akut dari sel mikroglia dan astrosit. Secara bersamaan plak amyloid juga memproduksi dan mengaktivasi protein yang terkait inflamasi seperti faktor komplemen, protein fase akut, kemokin dan sitokin. Inflamasi kronis pada Alzheimer merangsang peningkatan sel kemotaksis fagositik, yang artinya meningkatkan mikroglia disekitar agregasi A β . Adanya A β di mikrovaskular mengakibatkan lepasnya IL-8, MCP-1, MIP-1, MIP-1 α dan MIP-1 β , yang akan menyebabkan diferensiasi monosit menjadi makrofag dan bermigrasi melewati sawar darah otak. Kemokin pada SSP dapat memicu migrasi sel sistem imun lokal dan perifer untuk terjadinya respon imun. Produksi kemokin yang terus menerus berkontribusi terhadap progresivitas penyakit (Meraz-Rios *et al.*, 2013).

Proses inflamasi pada AD dilihat dari perubahan morfologi mikroglia dan adanya astrogliosis yang ditandai dengan peningkatan jumlah, ukuran dan motilitas astrosit. Aktivasi astrosit tampak dari meningkatnya ekspresi kadar GFAP, vimentin, dan nestin. Aktivasi astrosit menyebabkan gangguan pada fungsi normal astrosit untuk pemeliharaan konsentrasi glutamat ruang ekstraseluler sehingga terjadi perubahan homeostasis dan depolarisasi neuron lokal yang akan menimbulkan kerusakan sitotoksik. Aktivasi astrosit memiliki fungsi proteksi

pada otak namun aktivasi yang terus menerus akan memicu kerusakan neuron dan mempercepat progresivitas penyakit (Meraz-Rios *et al.*, 2013).

Antosianin mampu mengurangi induksi protein pro-inflamasi seperti iNOS dan COX-2 sebagai respons terhadap stimulasi dengan lipopolisakarida (LPS), komponen dinding sel bakteri yang diketahui menginduksi respon inflamasi yang nyata. Ekstrak kaya antosianin secara signifikan mengurangi produksi dan sekresi oksida nitrat, IL-1 β dan TNF- α . Modulasi jalur sinyal proinflamasi oleh antosianin dinilai dari tingkat aktivasi *c-Jun-N-terminal kinase* (JNK), *p38-mitogen activated protein kinase* (p38-MAPK), *ekstraseluler signal regulated kinase 1/2* (ERK1/2) dan Akt yang menurun secara signifikan. Pengurangan aktivitas jalur sinyal ini berkorelasi dengan berkurangnya aktivasi *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), dan mencegah translokasinya ke nukleus, yang dapat memediasi transkripsi gen pro-inflamasi (Poulose *et al.*, 2012).

Penelitian pada tikus yang mendapat antosianin dari ubi ungu setelah injeksi dengan LPS menunjukkan penurunan tajam penanda neuroinflamasi (Wang *et al.*, 2010). Kadar iNOS dan COX-2 secara signifikan menurun pada otak tikus yang diberi antosianin, disertai adanya peningkatan signifikan dalam tugas kognisi dan memori. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak kaya antosianin dari kedelai hitam secara efektif mengurangi inflamasi pada tikus model penuaan yang diinduksi dengan D-galaktosa (Poulose *et al.*, 2016, Rehman *et al.*, 2016). Terdapat penurunan secara signifikan kadar NOX-2, penurunan tingkat aktivitas iNOS dan NF- κ B, serta penurunan produksi TNF- α dan ROS, dan peroksidasi lipid. Penelitian ini melaporkan penurunan kadar astrosit reaktif dan mikroglia aktif pada jaringan hipokampus tikus yang diberi antosianin (Rehman *et al.*, 2016).

Studi *in vivo* menunjukkan bahwa antosianin mempunyai efek anti inflamasi yang bermakna. Seperti contoh pada tikus yang diberikan lipopolisakarida, ternyata antosianin dari ubi ungu secara bermakna menekan efek lipopolisakarida untuk mengekspresikan COX, iNOS,

TNF- α , IL-1 β , IL-6 pada otak tikus (Wang *et al.*, 2010). Antosianin yang diekstrak dari ubi jalar manis berwarna ungu mempunyai efek menekan ekspresi iNOS dan COX-2 pada liver tikus yang diinduksi dengan dimetilnitrosamin (Hwang *et al.*, 2011).

Penelitian antosianin yang diekstrak dari ubi jalar ungu kultivar Bali, pada mencit yang mengalami stres oksidatif, dapat menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA), yang merupakan suatu pertanda oksidasi lipid pada membran atau organ (Jawi *et al.*, 2008). Penelitian oleh Jawi *et al.*, (2012a) memperlihatkan ekstrak ubi jalar ungu yang mengandung antosianin pada tikus yang diberikan streptozotocin untuk menginduksi terjadinya diabetes melitus, terdapat peningkatan total kadar antioksidan yang bermakna ($p < 0,05$) pada tikus yang diberikan ekstrak ubijalar ungu, serta terjadi perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) peningkatan glukose darah dan kadar MDA pada tikus yang tidak diberikan ekstrak ubi jalar ungu.

Ekstrak ubi jalar ungu kultivar Bali juga mempunyai efek antihipertensi dan peningkatan ekspresi eNOS pada tikus yang diinduksi hipertensi (Jawi *et al.*, 2012). Efek ekstrak ubi jalar ungu terhadap proteksi stres oksidatif pada endotel aorta kelinci diteliti oleh Jawi *et al.* (2014). Hasil dari penelitian ini adalah terjadi peningkatan yang bermakna ($p < 0,05$) kadar SOD-2, NRF2, dan penurunan yang bermakna ($p < 0,05$) kadar *vascular celluler adhesion molecule-1* (VCAM-1).

11.3 Apoptosis

Apoptosis merupakan salah satu mekanisme utama kematian neuron pada DA. Apoptosis ditandai oleh disfungsi mitokondria yang menimbulkan aktivasi caspase, yang selanjutnya memicu degradasi proteolitik dari sitoplasma dan protein nukleus, kondensasi nukleus, degradasi DNA, dan akhirnya terjadi kematian sel. Bukti kematian neuronal akibat apoptosis pada otak DA ditunjukkan oleh adanya perubahan tingkat kematian sel yang terkait protein Bcl-2. Famili Bcl-2 mengatur integritas mitokondria dan aktivasi caspase. Kelompok proapoptotik lainnya Bak dan Bad dilaporkan meningkat relatif pada otak AD terhadap kontrol

dengan usia yang sama, sedangkan protein antiapoptotik Bcl-2 dan Bcl-xl ada pada kadar lebih rendah. Paparan A β in vitro pada neuron menimbulkan aktivasi kaspase dengan kaspase 3 sebagai efektor utama dari proses apoptosis neuron. Fragmentasi DNA pada otak AD terbukti dalam neuron apoptosis (Bamberger *et al.*, 2016).

Paparan neuron terhadap fibril A β in vitro memprovokasi kematian sel apoptosis. Fibril peptida A β pada otak yang terdapat di ekstraseluler dapat langsung berinteraksi dengan neuron dan menstimulasi proses intraseluler untuk terjadinya apoptosis. Mekanisme kematian yang diinduksi peptide A β bahwa fibril A β berikatan dengan protein pada permukaan sel yang menimbulkan aktivasi kaskade sinyal intraseluler proapoptotik. Peptida A β memicu peningkatan kadar kalsium intraseluler dan disregulasi homeostasis kalsium yang mendasari kerentanan neuron terhadap terjadinya apoptosis. Neuron dengan paparan peptida A β in vitro menunjukkan bukti kerusakan oksidatif dan peningkatan kadar peroksida. Selain itu peptida A β itu sendiri juga berperan memproduksi radikal bebas. Stres oksidatif menimbulkan aktivasi dari protein kinase JNKs (c-Jun NH (2) -terminal kinase yang menghantarkan sinyal stres ke inti, mengatur ekspresi gen, dan menginduksi apoptosis (Bamberger *et al.*, 2016).

Efek antosianin pada apoptosis dengan mempengaruhi sinyal protein yang merangsang terjadinya pertumbuhan dan mengatur jalur apoptosis yang tergantung dan tidak tergantung dari kaspase (Reddivari *et al.*, 2007). Pemberian ekstrak ubi jalar ungu pada tikus model penuaan D-galaktosa dapat menekan aktivasi protein pro-apoptosis seperti JNK selain itu juga mencegah pelepasan sitokrom c mitokondria dan pelaksanaan selanjutnya dari jalur sinyal apoptosis (Lu *et al.*, 2010, Ye *et al.*, 2010). Efek ini dimediasi oleh aktivasi phosphoinositide-3-kinase (PI3K), yang merupakan aktivator hulu Akt sebagai pengatur utama sinyal pro-survival. Anthocyanin mampu memodulasi ekspresi anggota keluarga Bcl-2. Antosisnin mencegah pelepasan *Apoptosis-inducing factor* (AIF) dari mitokondria yang merupakan jalur apoptosis tidak tergantung pada kaspase (Min *et al.*, 2011).

Jumlah sel hipokampus dan korteks serebri yang mengalami apoptosis meningkat pada tikus yang diberikan D-galaktose, tetapi pada tikus yang diberikan D-galaktose dan antosianin dari ekstrak ubi ungu ternyata jumlah sel hipokampus dan korteks yang mengalami apoptosis lebih rendah secara bermakna ($p < 0,001$). Juga terjadi penurunan aktivasi kaspase-3 yang diperiksa dengan western blotting pada otak tikus yang diberikan ekstrak ubi ungu ($p < 0,001$) (Lu, *et al*; 2010).

Berdasarkan efek antosianin seperti disebutkan oleh peneliti di atas yang mempunyai efek anti oksidan dan anti inflamasi sehingga memberi perlindungan terjadinya apoptosis, maka penulis ingin meneliti ekstrak ubi jalar ungu terhadap stress oksidatif, inflamasi dan apoptosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Bamberger, M.E., Landreth, G.E. 2016. Inflammation, apoptosis, and Alzheimer's Disease. *The Neuroscientist*. 276-283
- Banji, O.J., Banji, D., Ch, K., 2014. Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain. *Food Chem. Toxicol.* 74, 51–59.
- Chauhan, V., Chauhan, A. 2006. Review: Oxidative Stress In Alzheimer's Disease. *Patophysiology*. 13:195-208
- Coelho, A.I., Berry, G.T., Rubio-Gozalbo, M.E. 2015. Galactose metabolism and health. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 18, 422–427.
- De Pascual-Teresa, S. 2014. Molecular mechanisms involved in the cardiovascular and neuroprotective effects of anthocyanins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 559: 68-74.
- Deacon, R.M.J., Rawlins, N.P. 2006. T-Maze Alternation in Rodent. *Nature Protocols*. 1, 7-12
- Dogru, E.J., Gumusbas,U., Kara, F. 2003. Individual variation in the spatial reference and working memory assessed under allothetic and idiothetic orientation cues in rat. *Acta Neurobiologic.* 63:17-23.
- Du, X., Wang, X., Geng, M. 2018. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Translational Neurodegeneration*. 7:2 DOI 10.1186/s40035-018-0107-y
- Du, Z., et al., 2012. NADPH oxidase-dependent oxidative stress and mitochondrial damage in hippocampus of D-galactose-induced aging rats. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* 32, 466–472
- Guyton, A.C., Hall, J.E. 2007. The Cerebral cortex; Intellectual functions of the brain: Learning and memory, Textbook of Medical Physiology, 10th edition, Philadelphia
- Haider, S., Liaquat, L., Shahzad, S., Sadir, S., Madiha, S., Batool, Z., Tabassum, S., Saleem, S., Naqvi, F., Perveen, T. 2015. A high dose of short term exogenous D-galactose administration in young male rats produces symptoms simulating the natural aging process. *Life Sci.* 124, 110–119.
- Hsieh, H.M., Wu, W.M., Hu, M.L., 2009. Soy isoflavones attenuate oxidative stress and improve parameters related to aging and Alzheimer's disease in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Food Chem. Toxicol.* 47, 625–632.
- Huang, W.J., Zhang, X., Chen, W.W. 2016 "Role of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease (Review)". *Biomedical Reports*. 4:519-522.
- Hwang, Y.P., Choi, J.H., Choi, J.M., Chung, Y.C., Jeomg, H.G. 2011. Protective mechanisms of anthocyanin from purple sweet potato against tert-butyl hydroperoxide induced hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol*; 49: 93-99.
- Jawi IM, Yasa IWPS, Mahendra AN. Antihypertensive and antioxidant potential of purple sweet potato tuber dry extract in Hypertensive rats. *Bali Medical Journal (Bali Med J)* 2016, Volume 5, Number 2: 252-255
- Jawi, I.M., Suprpta, D.N., Dwi, S.U., Wiwiek, I. 2008. Ubi jalar Ungu menurunkan Kadar MDA dalam Darah dan Hati Mencit setelah Aktivasi Fisik Maksimal. *Jurnal Veteriner Jurnal Kedokteran Hewan Indonesia*; 9(2): 65-72.
- Kandel, E., Schwart, J.H., Jessel, T. 2000. Principles of Neural Science. Edisi ke-4. USA: McGraw-Hill.
- Kelsey, N., W. Hulick, A. Winter, E. Ross, and D. Linseman. 2011. "Neuroprotective effects of anthocyanins on apoptosis induced by mitochondrial oxidative stress." *Nutr Neurosci* 14 (6):249-59.

- Kumar, A., Aggarwal, A., Singh, A. 2016. Animal Models in Drug Discovery of Alzheimer's Disease: A Mini Review. *EC Pharmacology and Toxicology*. 2.1: 60-79
- Lu, J., D. M. Wu, Y. L. Zheng, B. Hu, and Z. F. Zhang. 2010. "Purple sweet potato color alleviates D-galactose-induced brain aging in old mice by promoting survival of neurons via PI3K pathway and inhibiting cytochrome C-mediated apoptosis." *Brain Pathol* 20 (3):598-612.
- Meraz-Ríos, MA., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Villeda-Hernández, J., Campos-Peña, V. 2013. Inflammatory process in Alzheimer's Disease Marco. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. Vol 7;59
- Min, J., S. W. Yu, S. H. Baek, K. M. Nair, O. N. Bae, A. Bhatt, M. Kassab, M. G. Nair, and A. Majid. 2011. "Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia." *Neurosci Lett* 500 (3):157-61.
- Montilla, E.C., Hillebrand, S., Winterhalter P. 2011. Anthocyanin in Purple sweet Potato (ipomoea batatas L) varieties. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*; 5(2): 19-24
- Morava, E. 2014. Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; re-view and outlook for a novel treatable CDG. *Mol. Genet. Metab.* 112, 275–279.
- Poulose, S. M., D. F. Bielinski, A. Carey, A. G. Schauss, and B. Shukitt-Hale. 2016. "Modulation of oxidative stress, inflammation, autophagy and expression of Nrf2 in hippocampus and frontal cortex of rats fed with acai-enriched diets." *Nutr Neurosci*.
- Rehman, S.U., et al., 2017. Anthocyanins reversed D-galactose-induced oxidative stress and Neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats. *Mol. Neurobiol.* 54, 255–271.
- Sherwood L. 2014. Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem. Edisi ke-8. Editor Pendit et al. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Shwe, T., Prachayasakul, W., Chattipakorn, N., Chattipakorn, SC. 2018. Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. *Experimental Gerontology*.101;13-36
- Webster, S.J., Bachstetter, A.D., Nelson, P.T., Schmitt, F.A., Van Eldik, L.J. 2014. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioural changes in 10 mouse models. *Frontiers in Genetics*; 5;88.
- Wright, R.L., Conrad, C.D. 2005. Chronic stress leave novelty-seeking behaviour intact while impairing spatial recognition memory in the Y-Maze. *Stress*. 8, 151-154
- Yuan, J., Yankner, B.A. 2000. Neuronal apoptosis sculpts the developing brain and has a potentially important role in neurodegenerative disease. *Nature*; 407: 802-9.
- Zhao, Y., Zhao, B. 2013. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Publishing Corporation