

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit alzheimer merupakan gangguan neurodegeneratif yang paling menonjol pada penuaan. Penyakit alzheimer merupakan penyebab 60-70% kasus demensia. Terdapat 55 juta penderita demensia di seluruh dunia saat ini dan sekitar 10 juta kasus baru setiap tahunnya (World Health Organization, 2023). Penyakit ini mengalami peningkatan insiden dengan cepat dari tahun ke tahun dan diperkirakan akan diderita oleh 74,7 juta orang secara global pada tahun 2030 dan 131,5 juta penderita pada tahun 2050 (Alzheimer's Disease International, 2016). Jumlah penderita alzheimer di Indonesia semakin meningkat setiap tahunnya. Prevalensi penyakit Alzheimer di Indonesia sekitar 27,9% dan lebih dari 4,2 juta penduduk Indonesia menderita demensia (Farina *et al.*, 2023).

Penyakit alzheimer atau *alzheimer disease* (AD) merupakan penyakit neurodegeneratif yang menyebabkan disfungsi memori, menurunnya kemampuan berpikir, analisa, bahasa, dan aktivitas nervus lainnya yang selanjutnya dapat mengubah perilaku individu dan juga kepribadiannya (Ajami *et al.*, 2016). Kelainan secara makroanatomi pada otak penderita alzheimer memperlihatkan adanya atrofi, pelebaran dari *sulcus* dan ventrikel serta penipisan dari *gyrus* yang berakibat pada penurunan massa otak bisa mencapai 35% (Purba, 2020).

Etiologi penyakit alzheimer belum diketahui secara pasti sampai saat ini. Faktor-faktor yang mempengaruhi timbulnya alzheimer antara lain: proses penuaan, mempunyai riwayat keluarga alzheimer dan genetik pembawa gen apolipoprotein-E4 (APOE-e4), pengaruh zat toksik seperti alumunium, logam berat, diabetes, penyakit autoimun, proses inflamasi yang dipicu oleh penumpukan protein beta amyloid, kondisi hipertiroid maupun hipotiroid (Alzheimer's Association, 2018). Faktor risiko lain yaitu cedera otak traumatis, depresi, deplesi estrogen yang berhubungan dengan usia pada wanita (menopause) serta faktor risiko kardiovaskular yaitu hipertensi dan diabetes (Xu *et al.*, 2013).

Beberapa hipotesis telah diajukan atas dasar berbagai faktor penyebab untuk menjelaskan gangguan multifaktorial ini seperti hipotesis beta-amyloid, hipotesis tau, hipotesis neuroinflamasi, dan hipotesis kolinergik (Kumar *et al.*, 2015). Hipotesis kaskade amiloid dan hipotesis tau merupakan mekanisme patogenik yang paling banyak dianut (Mohandas *et al.*, 2009).

Patofisiologi utama dari neurodegeneratif yaitu adanya produksi yang berlebihan atau akumulasi β -amiloid ($A\beta$) yang memiliki beberapa efek merusak pada aktivitas sinaptik. Protein $A\beta$ dihasilkan dari protein prekursor amiloid (APP), yaitu protein membran sel, melalui pembelahan proteolitik oleh enzim BACE-1 (Das & Yan, 2017). Gangguan metabolisme APP, suatu glikoprotein membran integral di otak, yang melibatkan BACE-1 mengakibatkan ketidakseimbangan produksi dengan degradasi (*clearance*) beta amyloid ($A\beta$) sehingga terjadi akumulasi $A\beta$ berlebihan yang bersifat neurotoksik dan memicu stres oksidatif. Stres oksidatif terbukti memberikan

umpan balik positif terhadap peningkatan ekspresi BACE-1 yang mengakibatkan akumulasi A β lebih lanjut, pembentukan *neurofibrillarytangle* (NFTs) dan kematian neuron (Butterfield *et al.*, 2013).

Kadar sekresi A β diatur melalui proses umpan balik. Terganggunya mekanisme reaksi umpan balik sehingga produksi A β berjalan tanpa adanya inhibisi yang menimbulkan penumpukan plak A β menjadi salah satu kemungkinan masalah pada penderita penyakit Alzheimer. Hal ini memicu aktivasi sistem imun, yaitu mikroglia yang mendefinisikan plak sebagai bahan asing yang toksik. Kejadian ini dapat berlanjut pada kematian neuron terutama di daerah hippocampus (Panza *et al.*, 2009).

Beta amyloid ditranspor melewati sawar darah otak melalui reseptor yang memediasi proses transitis. Adanya pembersihan A β , dalam keadaan normal akan mempertahankan kadar A β yang rendah di otak. A β dibersihkan melalui sawar darah otak oleh reseptor *Low density lipoprotein receptor related protein 1* (LRP1) dan akan masuk ke otak melalui sawar darah otak dengan bantuan *receptor of advanced glycation endproduct* (RAGE) (Zlokovic, 2008)

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yuli *et al* (2015) menunjukkan bahwa histopatologi otak marmut pada model alzheimer mengalami degenerasi dan kematian sel neuron serta terjadi peningkatan aktivitas sel-sel glia (gliosis). Kematian neuron ditandai dengan sel yang berwarna merah, angular, inti padat, dan sitoplasma berwarna eosinofilik.

Berdasarkan hipotesis kaskade amiloid, APP biasanya dibelah oleh α -sekretase dan diproses secara menyimpang oleh β dan γ -sekretase yang

mengakibatkan ketidakseimbangan antara produksi dan pembersihan peptida A β (Kumar *et al.*, 2015). Pada usia tua atau dalam kondisi patologis, kemampuan metabolisme untuk mendegradasi A β menurun, dan peptida A β dapat terakumulasi. A β 40 dan A β 42 (lebih hidrofobik dari A β 40), masing-masing mengandung 40 dan 42 residu asam amino, merupakan komponen utama dari akumulasi A β . Peningkatan kadar A β 42 atau peningkatan rasio A β 42 menginduksi pembentukan fibril A β , dan akumulasi fibril A β berkembang menjadi plak amiloid, menyebabkan neurotoksisitas dan induksi patologi protein tau, yang menyebabkan kematian sel saraf dan neurodegenerasi (Kametani & Hasegawa, 2018).

Patologi *Neuro Fibrillary Tangle* (NFT) pada penyakit alzheimer berhubungan dengan hiperfosforilasi protein tau. Tau adalah protein yang terdapat pada mikrotubul neuronal dan diregulasi melalui fosforilasi oleh beberapa protein kinase. Normalnya terdapat 2-3 mol fosfat per mol tau, akan tetapi pada hiperfosforilasi terdapat peningkatan hingga 3-4 kali lipat normal. Hiperfosforilasi tau ini menyebabkan pembentukan mikrotubul tidak normal dan beragregasi menjadi NFT yang berisi filamen helikal berpasangan. Protein A β dan NFT umumnya muncul bersamaan pada penyakit alzheimer yang diperkirakan berhubungan dengan radikal bebas yang dihasilkan oleh stres oksidatif (Chauhan & Chauhan, 2006). Ekspresi protein tau sangat tinggi di jaringan akson kortikal nonmielin terutama di *region cortex limbic*, termasuk *hippocampus* yang berperan dalam konsolidasi memori (Hampel *et al.*, 2010).

Akumulasi protein A β dianggap dapat memulai disfungsi sinaptik yang bergantung pada tau. Protein tau ditemukan di dalam sel saraf ruang intraseluler (Breijyeh & Karaman, 2020). Kehadiran protein tau merangsang aktivitas reseptor N-metil-D-aspartat (NMDA). Ketika protein A β terakumulasi di ruang ekstraseluler, protein tau terakumulasi di ruang intraseluler sel saraf (Bloom, 2014). Hal ini akan menyebabkan masuknya ion kalsium pada dendrit yang mengakibatkan kematian sel saraf.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa apoptosis menyebabkan kematian saraf pada penyakit alzheimer. Caspase-3 dianggap sebagai bagian penting dalam apoptosis. Sejumlah penelitian telah menunjukkan peningkatan kadar caspase-3 pada penyakit alzheimer (Płóciennik *et al.*, 2015). Selanjutnya, caspase 3 terlibat dalam plastisitas neuron dan hilangnya sinaptik (D'Amelio *et al.*, 2011). Penghambatan caspase 3 dianggap membantu dalam proses pemulihan komposisi pasca-sinaptik (Louneva, 2008).

Gen BACE1 adalah gen yang mengkodekan enzim BACE-1. Enzim BACE-1 memainkan peran penting dalam pembentukan beta-amyloid, yang merupakan komponen utama plak senil yang terkait dengan penyakit alzheimer. Gen BACE-1 berlokasi pada kromosom 11 pada lokus 11q23.2-q23.3, dan terdiri dari 11 ekson yang mengandung kode untuk 501 asam amino. Mutasi dalam gen BACE-1 dapat memengaruhi fungsi enzim BACE-1 dan memengaruhi pembentukan beta-amyloid, yang dapat menyebabkan peningkatan risiko terkena penyakit alzheimer atau gangguan kognitif lainnya (Hampel *et al.*, 2021).

Belum ada terapi farmakologis yang dapat menyembuhkan penyakit alzheimer. Pengobatan terbatas pada pencegahan perkembangan penyakit dan pengendalian faktor risiko yang memperburuk alzheimer (Faradila *et al.*, 2020). Terapi penyakit alzheimer difokuskan untuk memperbaiki gejala serta mengurangi tingkat perkembangan kerusakan otak. Terapi tersebut belum secara signifikan mengatasi penyakit (Mendiola *et al.*, 2016). Beberapa terapi dengan pendekatan baru seperti vaksinasi DNA, modulasi NOS, atau penghambatan caspase masih terus dipelajari (Kumar *et al.*, 2015).

Pencegahan alzheimer dapat dibagi menjadi dua kelompok. Pertama, dikaitkan dengan gaya hidup. Kedua, dikaitkan dengan diet sehat (Mendiola *et al.*, 2016). Mekanisme bagaimana suplemen makanan dengan probiotik meningkatkan fungsi kognitif pada pasien dengan penyakit alzheimer atau gangguan kognitif ringan masih belum jelas (Zhu *et al.*, 2020). Salah satu bahan pangan yang mengandung probiotik adalah dadih.

Dadih merupakan bahan pangan tradisional yang dikenal di Sumatera Barat. Dadih berasal dari susu kerbau yang dituang ke dalam tabung bambu dan dibiarkan terfermentasi secara alamiah pada suhu ruang selama 24-48 jam (Afrizal, 2019). Dadih merupakan pangan fungsional yang mengandung probiotik. Dadih juga mengandung antioksidan dan dapat meningkatkan antioksidan alami dalam tubuh (Harun, 2020). Pangan fungsional sumber antioksidan memiliki efek perlindungan terhadap gangguan kognitif (Rahmawati *et al.*, 2016).

Dadih mengandung air (82,10%), protein (6,99%), lemak (8,08%), laktosa 5,29%, PH 3,4 serta daya cerna protein yang cukup tinggi yaitu 86,4-97,7%. Kandungan asam amino dadih sebanyak 16 , dimana terdapat 13 asam amino esensial dan 3 asam amino non esensial, dan vitamin A 1,70-7,22 IU/g (Sirait & Setianto (1995) dalam Harahap (2018)).

Saluran gastrointestinal manusia mempunyai ekosistem mikroba yang kompleks yang terdiri dari sekumpulan bakteri, *eukaryota* dan *arkea* yang disebut mikrobiota usus (Thursby & Juge, 2017). Komposisi mikrobiota usus dipengaruhi oleh sejumlah faktor diantaranya: umur, genetika, diet, stress, dan termasuk cara persalinan (Long-Smith *et al.*, 2020).

Saluran cerna dapat dinyatakan sehat jika mengandung mikrobiota dengan jumlah cukup untuk memberikan manfaat kesehatan, misalnya memproteksi dari bakteri patogen, berperan pada metabolisme inang dan zat gizi, serta modulasi sistem imun. Berdasarkan penelitian, terdapat sekitar 1000 spesies dan 7000 strain organisme mikroskopis yang menghuni saluran pencernaan manusia (seluruhnya 10^{13} - 10^{14} mikroorganisme), di antaranya yang paling banyak dikenal adalah *Firmicutes* (51%) dan *Bacteroidetes* (48%). 1% bakteri sisanya termasuk dalam divisi lain seperti *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia* , dan *Lentisphaerae* (Kaiyrlzykzy *et al.*, 2022).

Penelitian dari model hewan alzheimer menunjukkan perbedaan substansial dalam komposisi mikrobiota usus tikus transgenik yang mengekspresikan gen APP manusia dan PS1 dari tikus tipe liar. Jumlah *Firmicutes* , *Verrucomicrobia* , *Proteobacteria*, dan *Actinobacteria*

menurun secara signifikan, sedangkan *Bacteroidetes*, *Tenericutes* meningkat pada tikus CONVR-APPPS1 berusia 8 bulan dibandingkan dengan tikus liar. Selain itu, di otak tikus CONVR-APPPS1 yang dibiakkan dalam kondisi steril, terdapat penurunan substansial pada $A\beta$ dibandingkan hewan dengan genotipe yang sama yang dihasilkan dalam kondisi normal (Kaiyrlykyzy *et al.*, 2022).

Mikrobiota usus memberikan banyak manfaat bagi manusia, seperti memperkuat integritas usus atau membentuk epitel usus, melindungi terhadap patogen dan mengatur imunitas. Kondisi dimana mekanisme ini menjadi terganggu yaitu terjadinya ketidakseimbangan komposisi dari mikrobiota dikenal sebagai disbiosis (Thursby & Juge, 2017). Disbiosis dapat menyebabkan berbagai penyakit, mulai dari penyakit radang usus hingga obesitas, diabetes, dan asma, serta penyakit alzheimer, parkinson, dan depresi (Sherwin *et al.*, 2018).

Beberapa penelitian sebelumnya tentang adanya konektivitas antara otak dan usus, sering disebut sebagai *microbiota-gut-brain axis* menjadi bukti adanya peran mikrobiota usus dalam mengubah fungsi kognitif dan perilaku. Koneksi *top-down* dan *bottom-up* antara mikrobiota enterik dan otak mewakili hubungan simbiosis yang berkontribusi pada kesehatan maupun gangguan pada tubuh dan otak. Konektivitas *gut-brain* ini melibatkan sejumlah saraf, sistem endokrin dan sistem imun (Long-smith *et al.*, 2020).

Penelitian tentang tikus dan disbiosis yang diinduksi antibiotik telah menunjukkan perubahan produksi metabolit penting untuk proses kognitif seperti *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), *Gamma-Aminobutyric*

Acid (GABA), reseptor N-metil-D-aspartat (NMDA), dan triptofan serta perubahan kecemasan dan perilaku sosial. Hal ini memberikan bukti untuk peran langsung dari mikrobiota usus dalam memodulasi fungsi saraf. Penelitian telah menunjukkan pentingnya keanekaragaman mikroba dalam menjaga kesehatan (Biagi *et al.*, 2016). Sebaliknya, disbiosis telah diamati pada penyakit perkembangan saraf, penyakit neurodegeneratif termasuk penyakit alzheimer, penyakit huntington dan penyakit parkinson (Di Meo *et al.*, 2019).

Konsumsi probiotik oral dapat secara langsung meningkatkan keanekaragaman dan jumlah mikroba menguntungkan, berpotensi menyebabkan perubahan dalam produksi metabolit turunan mikrobiota, mengurangi inflamasi, perubahan HPA axis dan perubahan integritas *gut-barrier* (Lebeer *et al.*, 2018; Plaza-Diaz *et al.*, 2019). Penelitian pada hewan coba memperlihatkan kemungkinan efek positif dari probiotik (Wang *et al.*, 2016). Perbaikan defisit kognitif juga telah dilaporkan pada model hewan dengan kecemasan (Savignac *et al.*, 2015), parkinson (Castelli *et al.*, 2020) dan diabetes (Davari *et al.*, 2013). Probiotik yang berasal dari bakteri asam laktat (BAL) merupakan kandidat potensial sebagai antioksidan alami (Liu, 2011). Probiotik secara *in vivo* dan *in vitro* terbukti meningkatkan antioksidan tubuh (Wang *et al.*, 2016).

Penelitian ini menggunakan dadih yang berasal dari alahan panjang, Solok. Menurut Purwati (2016), salah satu jenis dadih yang paling efektif menghambat bakteri patogen dibandingkan dengan dadih yang berasal dari daerah lain di Sumatera Barat adalah dadih dari Alahan Panjang, Solok. Hal

tersebut disebabkan oleh potensi dadih sebagai probiotik dan memiliki kandungan BAL yang lebih banyak (Harun, 2020). Penelitian pada manusia dan hewan telah menunjukkan strain bakteri asam laktat dapat menangkal ROS (Stecchini *et al*, 2001). Probiotik secara in vivo dan in vitro terbukti meningkatkan antioksidan tubuh (Wang et al., 2016)

Peneliti telah melaksanakan pra penelitian untuk mendapatkan dosis pemberian AlCl_3 yang bertujuan untuk menginduksi alzheimer terhadap 5 ekor tikus *Rattus norvegicus* jantan. Dosis AlCl_3 dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu dosis 200 mg/KgBB, 300 mg/KgBB dan 400 mg/KgBB. Dari pra penelitian tersebut disimpulkan bahwa terdapat pembentukan plak amyloid pada pemberian AlCl_3 dosis 300 mg/KgBB, sedangkan pada pemberian dengan dosis 400 mg/KgBB didapatkan tikus banyak mati. Sehingga penelitian ini menggunakan AlCl_3 dosis 300 mg/KgBB untuk menginduksi tikus model Alzheimer. Berdasarkan latar belakang di atas maka peneliti ingin membuktikan pengaruh pemberian dadih terhadap ekspresi beta-amyloid, ekspresi protein tau, ekspresi gen caspase 3 dan ekspresi gen BACE-1 pada otak tikus model Alzheimer (*Rattus norvegicus*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah, maka dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

- a. Apakah ada pengaruh pemberian AlCl_3 terhadap otak tikus pada pemeriksaan Y-Maze Test?
- b. Apakah ada pengaruh pemberian dadih terhadap ekspresi *beta-amyloid* pada tikus model alzheimer (*Rattus norvegicus*)?

- c. Apakah ada pengaruh pemberian dadih terhadap ekspresi protein tau pada tikus model alzheimer (*Rattus norvegicus*)?
- d. Apakah ada pengaruh pemberian dadih terhadap ekspresi gen caspase 3 pada otak tikus model alzheimer (*Rattus norvegicus*)?
- e. Apakah ada pengaruh pemberian dadih terhadap ekspresi gen BACE-1 pada otak tikus model alzheimer (*Rattus norvegicus*)?
- f. Apakah ada pengaruh pemberian dadih terhadap otak tikus model alzheimer pada pemeriksaan Y-Maze Test?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Menganalisis pengaruh pemberian dadih terhadap ekspresi beta-amyloid, protein tau, gen caspase 3, gen BACE-1 pada otak tikus model alzheimer (*Rattus norvegicus*) dan pemberian $AlCl_3$ terhadap otak tikus pada Y-Maze test serta pengaruh dadih terhadap otak tikus pada Y-Maze Test.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Menganalisis pengaruh pemberian $AlCl_3$ terhadap otak tikus (*Rattus norvegicus*) pada pemeriksaan Y-Maze Test.
- b. Menganalisis pengaruh pemberian dadih terhadap ekspresi beta-amyloid pada otak tikus model alzheimer (*Rattus norvegicus*).
- c. Menganalisis pengaruh pemberian dadih terhadap ekspresi protein tau pada otak tikus model alzheimer (*Rattus norvegicus*).
- d. Menganalisis pengaruh pemberian dadih terhadap ekspresi gen caspase-3 pada otak tikus model alzheimer (*Rattus norvegicus*).

- e. Menganalisis pengaruh pemberian dadih terhadap ekspresi gen BACE-1 pada otak tikus model alzheimer (*Rattus norvegicus*).
- f. Menganalisis pengaruh pemberian dadih terhadap otak tikus (*Rattus norvegicus*) model alzheimer pada pemeriksaan Y-Maze Test.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Perkembangan Ilmu Pengetahuan

Hasil Penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah mengenai pengaruh pemberian dadih terhadap ekspresi beta amyloid, protein tau, gen caspase-3 dan gen BACE-1 pada Alzheimer serta memberikan inspirasi penelitian lanjutan untuk memaksimalkan kegunaan dadih sebagai pangan fungsional untuk penyakit alzheimer.

1.4.2 Klinis

Bahan pertimbangan bagi klinisi untuk memberikan dadih sebagai tambahan terapi sehingga merupakan solusi baru yaitu dadih sebagai pangan fungsional untuk penyakit alzheimer

1.4.3 Masyarakat

Meningkatkan pengetahuan masyarakat tentang manfaat dadih di samping sebagai makanan bergizi juga bermanfaat sebagai pangan fungsional untuk penyakit alzheimer