

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Pendahuluan

Demensia merupakan istilah umum yang menggambarkan berbagai gejala penyakit ketika sel-sel saraf di otak mati atau fungsinya tidak lagi normal yang ditandai dengan penurunan fungsi memori. Penyebab utama demensia adalah kematian sel otak terutama pada hipokampus yang diakibatkan radikal bebas. Salah satu bahan alam, yaitu kurkumin telah terbukti mengurangi kerusakan oksidatif dan defisit memori yang terkait dengan penuaan (Prasetya, 2014). Stres oksidatif merupakan suatu kondisi yang terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dengan sistem pertahanan antioksidan di dalam tubuh. Konsumsi suplemen herbal menjadi *trend* saat ini untuk menjaga kesehatan (*preventif*) karena dianggap lebih praktis dan tanpa efek samping. Daun sirsak (*Annonamuricata* L) dan kulit manggis (*Garcinia mangostana* L) merupakan salah satu bahan yang digunakan sebagai suplemen herbal dan sangat populer di pasaran (Puspitasari *et al*, 2016)

Annona muricata L. merupakan salah satu tanaman dari familia Annonaceae yang membuktikan bahwa adanya senyawa antioksidan yang mengandung flavonoid (Sari,*et al*, 2015). Sampaio *et al* (2008) melakukan penelitian terhadap aktivitas inhibisi AChE dari familia Annonacea, yaitu dari biji buah sirsak (*Annona muricata* Linn). Hasil pengujian inhibisi AChE dengan metode Ellman menunjukkan bahwa ekstrak heksana dan etanol biji sirsak menunjukkan adanya inhibisi AChE. Kandungan senyawa kimia yang sama baik di biji buah maupun di daun sirsak yaitu asetogenin, alkaloid, asetogenin, dan fenol (Moghadamtousi *et al.*, 2015). Hasil pengujian inhibisi asetilkolinesterase oleh fraksi etanol daun sirsak memberikan inhibisi tertinggi (Ratu, *et al*, 2017).

B. Memori dan Fungsi Kognitif

Memori merupakan suatu proses kognitif yang terdiri atas serangkaian proses, yakni penyimpanan (*storage*), retensi dan pengumpulan informasi

(*information gathering*) (Rahmawati, 2010). Kognitif merupakan kemampuan untuk berfikir rasional termasuk proses mengingat, menilai, orientasi, persepsi dan memperhatikan. Kemampuan berfikir sangat tergantung oleh keadaan otak (Nehlig, 2010).

Kognitif merupakan suatu aspek yang kompleks yang melibatkan sekurangnya aspek memori, perhatian, fungsi eksekutif, persepsi, bahasa dan fungsi psikomotorik (Nehlig, 2010). Faktor-faktor yang mempengaruhi perkembangan kognitif dapat diakibatkan beberapa factor, diantaranya diakibatkan perkembangan organik dan kematangan sistem syaraf (Djaali, 2011).

Otak terbagi menjadi 3 daerah utama yaitu *forebrain* (otak depan), *midbrain* (otak tengah), dan *hindbrain* (otak belakang). Otak depan terdiri dari cerebrum, thalamus, dan hypothalamus. Cerebrum (otak besar) adalah bagian terbesar dari otak depan dan mengandung hampir 90% sel saraf yang ada di system saraf pusat (Colville & Bassert, 2002).

Memori spasialis merupakan salah satu memori kerja, yaitu bentuk memori mengenai ruang dan tempat yang berhubungan dengan kemampuan bertahan hidup dari suatu individu maupun spesies. Memori spasial berperan penting dalam *fraging behavior* (perilaku mencari makan) pada hewan pengerat dan jenis unggas (Alvin dan Terry, 2009).

Proses penyimpanan ingatan melalui jalur saraf-saraf sensori yang berlangsung dalam waktu yang pendek. Informasi yang diperoleh melalui panca indera (penglihatan, perabaan, penciuman, pendengaran dan pengecap) hanya mampu bertahan selama 1 atau 2 detik (Rahmawati, 2010). Perubahan dalam kemampuan kognitif dan pemrosesan dalam informasi dipercaya tergantung pada fungsi system saraf pusat (Papalia, *et al.*, 2008).

Penurunan terkait hal ini ditunjukkan dalam kecepatan, memori jangka pendek, memori kerja dan memori jangka panjang. Raz dan Rodrigue menyebutkan bahwa garis besar perubahan *post mortem* pada otak meliputi volume dan berat otak yang berkurang, pembesaran ventrikel dan pelebaran sulkus, hilangnya sel-sel saraf di neokorteks, hipokampus dan sereblum, pengurangan densitas sinaps, dan

penurunan kemampuan perbaikan DNA. Gangguan pada memori kerja, atensi dan fungsi akseptif dipengaruhi dengan memburuknya lobus frontalis (Myers, 2008).

Informasi dalam bentuk impuls-implus pesan akan dihantarkan ke korteks serebri yang akan menjadi memori jangka pendek yang selanjutnya diubah menjadi memori jangka panjang oleh hipokampus melalui *long term potentiation* (LTP) pada saat seseorang tidur. *Long term potentiation* (LTP) merupakan proses penguatan hantaran impuls antar neuron yang terjadi melalui plastisitas berulang dalam jangka waktu yang lama. Proses LTP terjadi di sel-sel pyramidal hipokampus. LTP terjadi melalui dua fase yaitu fase *early long-term potentiation* (E-LTP) dan *late long-term potentiation* (L-LTP). E-LTP berlangsung antara 1-521 jam dan pada fase ini tidak terjadi sintesis protein *post-sinaps*. L-LTP berlangsung selama sehari-hari. Pada L-LTP terjadi sintesis protein *post-sinaps* yang akan semakin menguatkan proses hantaran impuls, sehingga terjadi plastisitas yang berulang. Plastisitas didefinisikan sebagai perubahan pada berkas neuron yang terjadi berkaitan dengan pengalaman karena suatu kebiasaan yang didapat (Byrne & Roberts, 2004).

C. Memori Kerja dan Hipokampus

Memori adalah proses pengelolaan informasi yang meliputi perekaman dan pemanggilan kembali. Psikologi kognitif mengidentifikasi tiga operasi umum memori yaitu *encoding*, *storage*, dan *retrieval*. Pada saat *encoding*, seseorang merubah data sensoris menjadi bentuk representasional. Pada *storage*, seseorang menyimpan informasi yang didapat sebagai memori dan pada *retrieval*, seseorang mengambil kembali informasi yang telah disimpan sebagai memori (Stenberg dan Sternberg, 2009).

Berdasarkan rentang waktu individu kehilangan memorinya, memori dapat dibedakan menjadi memori segera (*immediate memory*), memori baru (*recent memory*), memori jangka menengah (*recent pastmemory*), dan memori jangka panjang (Nasrun, 2013). Berdasarkan jenis materi yang diingat memori dapat dibagi menjadi memori prosedural dan memori deklaratif. Memori prosedural (*memori implisit*) merupakan bentuk memori yang tidak dapat dinyatakan atau dibawa melalui penglihatan. Bentuk memori ini menekankan pada *recall* keahlian *kognitif*

dan motorik setelah suatu prosedur khusus. Daerah yang berperan dalam sistem memori prosedural antara lain adalah *neostriatum*, *cerebellum* dan korteks sensorimotor. Memori deklaratif (*memori eksplisit*) merupakan memori yang berupa pengetahuan yang dapat dinyatakan dan dibawa ke dalam pikiran selama penglihatan sadar yang dapat dipanggil kembali dari memori, ditempatkan dalam pikiran, dan dilaporkan. Jenis memori ini berkaitan erat dengan fungsi hipokampus dan struktur lobus temporal mesial lainnya (Sherwood, 2014).

Memori kerja memberikan konsep sistem yang mempertahankan dan menyimpan informasi pada waktu yang singkat dan sistem ini mendasari proses manusia berpikir. Memori kerja terdiri dari lima elemen yaitu *visuospatial sketchpad*, *phonological loop*, *central executive*, *subsidiary "slave system"*, dan *episodic buffer* (Baddeley, 2003). Salah satu ciri khas dari memori kerja adalah tingginya limitasi yang membatasi seberapa banyak informasi yang disimpan secara aktif dan simultan. Limitasi ini menunjukkan perbedaan antara memori kerja dengan *long term memory* yang diperkirakan memiliki kapasitas penyimpanan informasi baru yang tak terhingga (Eriksson *et al.*, 2015).

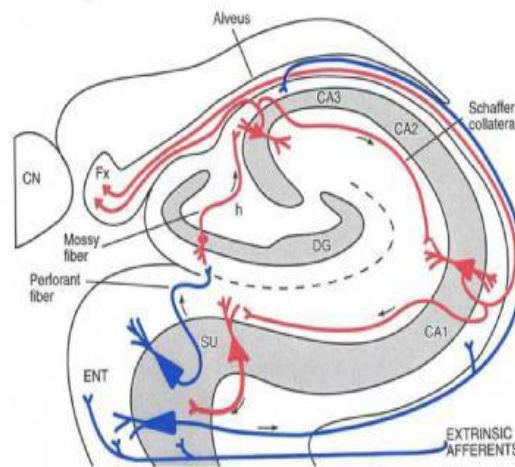
Memori spasial adalah kemampuan untuk menyimpan sementara dan menggunakan informasi yang berhubungan dengan tujuannya sebagai petunjuk kegiatan yang akan datang. Memori spasial merupakan memori jangka pendek yang selanjutnya menjadi dasar terbentuknya memori jangka panjang. Bagian otak yang terlibat dalam memori spasial adalah hipokampus (Durtewitz *et al.*, 2000). Memori spasial pada binatang berperan membantu binatang menemukan lokasi yang dapat menyediakan, diantaranya makanan dan keselamatan untuk mempertahankan hidup (Dogru *et al.*, 2003).

Hipokampus merupakan bagian dari otak yang terletak di bagian medial lobus temporal (Saladin, 2006). Hipokampus termasuk kelompok archikorteks yang tersusun oleh tiga lapisan kelompok sel. Lapisan terluar disebut lamina polimorfik dan lapisan terdalam disebut lamina molekularis, sedangkan di antara keduanya terdapat lamina piramidalis. Pada lamina piramidalis terdapat neuron piramidal yang berperan sebagai neuron utama dihipokampus Terdapat dua lapisan tipis neuron yang melipat satu sama lain, yaitu *gyrus dentatus* dan *cornu ammonis hipokampus*.

Cornu ammonis terbagi menjadi empat bagian yaitu, CA1, CA2, CA3, dan CA4. Bagian terpenting dari bagian-bagian tersebut adalah CA1 dan CA3. Pada sel piramidal di CA1 terdapat plastic sinapsis yakni LTP dan LTD yang berperan dalam proses belajar dan memori, apabila ada kerusakan di bagian ini maka proses belajar dan mengingat akan terganggu juga (Siegel, *et al.*, 2005).

Hipokampus memiliki enam lapisan yaitu: 1) stratum lacunosum-moleculare yang mengandung serabut *perforant path* yang bersinaps di dendrit apikal sel piramidal dan terdapat juga serabut dari *Schaffer collateralis*; 2) stratum radiatum yang berisi serabut *Schaffer collateralis* untuk membentuk jalur CA3-CA1; 3) stratum lucidum yang merupakan region terminasi dari mossy fiber; 4) stratum piramidal yang berisi neuron piramidal; 5) stratum oriens yang terdiri dari sel basket dan dendrit basal dari neuron piramidal; 6) alveus yang memiliki komisura sel piramidal melalui fimbria. Gyrus dentatus memiliki tiga lapisan yang terdiri dari : 1) lapisan polimorfik yang berhubungan dengan asosiasi-asosiasi di dalam gyrus dentatus; 2) lapisan granular yang merupakan kumpulan dari neuron-neuron berbentuk bulat atau oval dan merupakan tempat mossy fibers berasal; dan 3) lapisan molekuler yang merupakan daerah terminasi *perforant path* (Taupin, 2008; Waxman, 2009).

Serabut eferen yang berasal dari hipokampus berjalan menuju corpus mamillaris, thalamus anterior, area septalis, tuber cinereum melalui fornix, dan area subcallosus melalui striae longitudinale. Sementara serabut aferen yang menuju ke hipokampus berasal dari gyrus dentatus melalui mossy fiber, septum melalui cornix, dan lobus limbicus melalui cingulum. Sel granuler dari gyrus dentatus mengirimkan akson yaitu mossy fiber yang berakhir pada neuron piramidal di area CA3 pada hipokampus. Cabang kolateral yaitu kolateral *Schaffer* dari neuron CA3 akan memproyeksikan akson ke area CA1 hipokampus (Waxman, 2009).



Gambar 1. Struktur hipokampus otak (Jones, 2013)

Memori digolongkan menjadi dua, yaitu memori deklaratif dan memori prosedural. Karakteristik memori prosedural antara lain melibatkan komponen keterampilan dan tingkah laku, membutuhkan pengulangan dan latihan yang memerlukan waktu lama, tetapi lebih sukar untuk dilupakan. Memori spasial termasuk dalam memori prosedural. *Morris Water Maze* (MWM) merupakan salah satu uji yang paling sering digunakan untuk menilai memori spasial pada mencit. *Morris Water Maze* memiliki beberapa keunggulan diantaranya hanya membutuhkan sedikit tahap pre-training, dapat digunakan lintas spesies (mencit, mencit dan manusia), reliabilitas yang cukup tinggi, dan telah tervalidasi untuk menilai fungsi hipokampus terkait memori spasial (Juananda & Astari, 2018).

Morris water maze tes merupakan model eksperimen yang sudah sejak lama digunakan dalam pengujian kemampuan kognitif dan memori pada hewan uji. Rangkaian tes di dalam uji ini terbukti dapat menggambarkan kinerja memori spasial hewan uji dengan membuat hewan uji mendayagunakan otak bagian hipokampus dengan memberikan tes yang memerlukan penggunaan asosiasi elemental dan juga asosiasi konfigural kompleks dari hewan untuk menyelesaikannya (Septiana & Puruhita, 2015).

Metode *Morris water-maze* secara umum menggunakan kolam air berbentuk bulat dengan air yang dijaga suhunya sesuai suhu ruang serta memiliki *platform* yang tersembunyi di bawah permukaan air. *Platform* disembunyikan dengan cara

menambahkan bahan tertentu yaitu susu atau zat pewarna yang tidak berbahaya, agar air terlihat opaque. *Platform* terbuat dari plexiglass yang bening, atau *platform* diberi cat yang sama dengan dasar dan dinding kolam. Beberapa objek gambar dengan bentuk geometri yang berbeda-beda seperti lingkaran, segitiga, persegi, dan lain-lain ditempelkan pada dinding kolam untuk menandai kuadran kolam dan dapat digunakan mencit sebagai alat bantu navigasi dalam kolam. Mencit secara individu dimasukkan dalam kolam untuk kemudian dicatat waktu dan jarak tempuh yang dibutuhkan untuk mencapai *platform*. Mencit yang menggunakan navigasi visuo spasial dianggap mempunyai kontribusi yang sama pada manusia untuk penggunaan proses kognitif sehari-hari. Oleh karena itu, model uji menggunakan *Morris water-maze* dianggap relevan dengan studi pada penyakit neurodegenerative atau neuropsikiatri di mana terdapat gangguan fungsi memori (Alvin *et al.* 2009).

Morris water maze berupa kolam berbentuk drum sirkuler berukuran diameter 1,8 m dan tinggi 0,5 m. Kolam diisi air hingga kedalaman 0,2 m. *Platform* berbentuk sirkuler berwarna putih dengan diameter 13 cm dan tinggi 18 cm ditempatkan 2 cm di bawah permukaan air. Agar *platform* tidak terlihat, digunakan zat pewarna putih yang ditambahkan ke dalam air. Sebuah kamera video ditempatkan di atas kolam untuk merekam. Permukaan drum dibagi menjadi 4 kuadran A, B, C, D. Sebelum diberikan perlakuan diuji dahulu dengan *Morris water maze* metode *hidden platform test (escape latency)* selama 5 hari berturut-turut untuk dihitung waktunya mencapai *platform*. Tiap hari dilakukan 2 kali percobaan pada tiap mencit (Alvin *et al.* 2009). Tahap dalam metode *Morris water maze* yaitu tes *acquisition trial*, tes *probe trial*, dan uji kemampuan sensori-motoris. Pada tahap tes *acquisition trial* merupakan tes untuk melihat latihan pembelajaran untuk pembentukan memori spasial selama 5 hari, tahap tes *probe trial* untuk melihat fungsi memori hewan uji. Pada tahap akhir dilakukan uji kemampuan sensori-motoris untuk kemampuan hewan uji dalam berenang sebagai motoris dan indra penglihatan sebagai sensoris untuk memotivasi hewan keluar dari air.

a. Test acquisition trial

Acquisition trial adalah tes untuk melihat fase latihan sebagai proses pembelajaran untuk pembentukan memori spasial. Fase ini dilakukan selama 5 hari

berturut-turut dengan 4 latihan perhari. *Acquisition trial* dilakukan selama 5 hari. Mencit dilatih untuk menemukan *platform* yang terletak 2 cm di bawah permukaan air pada salah satu kuadran sebanyak empat kali per hari. Pada awal percobaan mencit dimasukan ke dalam kolam pada salah satu kuadran secara random. Waktu diakhiri jika mencit telah mencapai *platform*. Jika mencit tidak berhasil menemukan *platform* dan ditempatkan di atas *platform* selama 15 detik sebelum latihan berikutnya. Waktu dan jarak tempuh mencit mencapai *platform* dicatat. Waktu yang dibutuhkan mencit untuk sampai ke *platform* disebut *escape latency* (Vorhees & Williams 2006). Mencit istirahat 30 detik di *platform*, lalu dikeringkan dan dikembalikan ke dalam kandang untuk menghangatkan tubuh sebelum dilakukan percobaan lagi berikutnya. Setiap kali percobaan harus selesai dalam waktu 90 detik. Bila dalam 90 detik mencit gagal mencapai *platform*, maka mencit dituntun ke arah *platform* dan dibiarkan selama 15 detik untuk beristirahat. Setelah itu, mencit diletakkan kembali ke kandang untuk persiapan diadakan percobaan berikutnya.

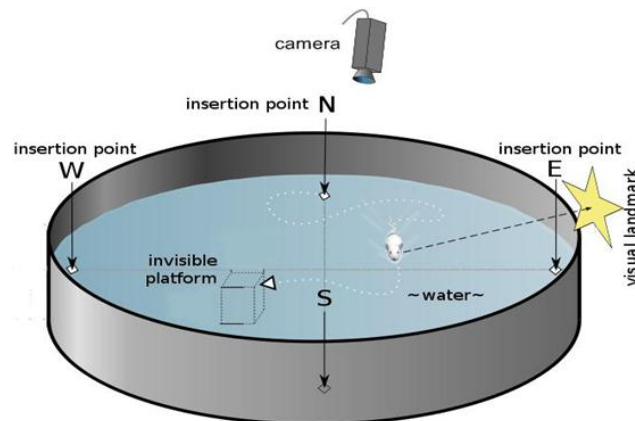
b. Tes *Probe trial*

Probe trial adalah tes untuk melihat fungsi memori hewan uji yaitu kemampuan penyimpanan memori spasial setelah fase pembelajaran pada *acquisition trial*. *Probe trial* dilakukan selama satu hari dengan empat kali tes. Pada *probe trial* mencit dibiarkan berenang selama 60 detik tanpa *platform*. Kemudian dilakukan pencatatan terhadap waktu lamanya mencit berada di kuadran letak *platform*, hal ini juga dilakukan sebanyak empat kali tiap mencit (Vorhees & Williams 2006).

c. Uji kemampuan sensori-motoris

Pada uji kemampuan sensori-motoris digunakan sebagai kemampuan indra penglihatan mencit sebagai kemampuan sensoris, dan motivasi mencit untuk keluar dari air sebagai faktor yang akan mempengaruhi kecepatan berenang mencit, sehingga tidak akan menggambarkan kemampuan belajar maupun fungsi memori spasial mencit karena mencit tidak harus mencari dan mengingat letak *platform* tetapi cukup melihat tanda untuk bisa menemukan posisi *platform*. Pada uji kemampuan sensori-motoris, *platform* terletak 2 cm di bawah air diberi penanda dengan warna mencolok. Letak *platform* diubah-ubah pada kuadran yang berbeda

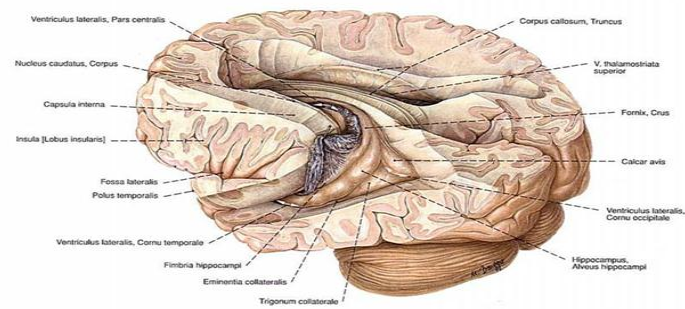
tiap latihan. Mencit dimasukan pada salah satu kuadran, kecuali pada kuadran yang ditempati *platform*. Tiap mencit dilatih empat kali, jika selama 60 detik mencit tidak mencapai *platform* maka mencit akan dibimbing untuk menemukan *platform*. Waktu tempuh mencit untuk menemukan *platform* dicatat (Vorhees & Williams 2006).



Gambar 2. Kolam *Morris water maze*

Hipokampus merupakan bagian dari sistem limbik yang berperan dalam belajar, mengingat, pengaturan emosi, dan hipotalamus. Sel di hipokampus berbentuk piramidal dan meliputi regio *cornu ammonis* (CA) 1, 2, dan 3. Sel-sel di regio CA1 dan CA2 rentan terhadap *hipoksia*, sedangkan regio CA3 rentan terhadap *stressor* fisik dan juga stres kronik. Hal-hal tersebut dapat mengakibatkan depresi dan menghilangnya neuron di hipokampus dan amigdala yang selanjutnya dapat menurunkan kemampuan memori dan kognitif seseorang (Arjadi *et al.*, 2012).

Hipokampus terutama bagian *cornu ammonis* merupakan bagian otak yang paling cepat mengalami penurunan fungsi akibat stres. Hipokampus diketahui mempunyai peran penting dalam fungsi kognitif, mengontrol umpan balik pada respons stres, dan proses belajar dan mengingat. Cornu ammonis (CA3 dan CA1) merupakan struktur di hipokampus yang merupakan pusat *learning and memory*.



Gambar 3. Hipokampus manusia (Paulsen dan Waschake, 2012)

D. Demensia

Demensia merupakan istilah umum yang menggambarkan berbagai penyakit dan kondisi yang berkembang ketika sel-sel saraf di otak mati atau fungsinya tidak lagi normal. Kematian atau kerusakan sel-sel saraf (neuron) menyebabkan perubahan memori, perilaku dan kemampuan seseorang untuk berpikir jernih. Bentuk demensia yang paling umum dan paling sering dijumpai adalah penyakit Alzheimer yang terdapat pada 50% sampai 70% dari semua kasus demensia. Penyakit Alzheimer adalah penyakit menurunnya kemampuan fungsi otak secara berangsur-angsur (Anonim, 2012).

Penyakit Alzheimer berkaitan dengan peningkatan kematian sel neuron dan gangguan fungsi kognitif. Penyakit ini dicirikan oleh pembentukan plak di otak (Santa *et al.*, 2005). Plak ini terdiri dari pertumbuhan syaraf yang abnormal, sel-sel mati dan amiloid beta. Banyak bukti yang telah ditemukan menunjukkan bahwa penumpukan dan agregasi peptida amiloid beta ($A\beta$) di otak merupakan penanda awal dalam patogenesis demensia Alzheimer (Piccini *et al.*, 2005).

E. Stress Oksidatif

Stres oksidatif adalah suatu keadaan ketidakseimbangan jumlah prooksidan (radikal bebas) dengan jumlah antioksidan yang ada. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan sel dan merupakan dasar patogenesis bagi proses penyakit kardiovaskuler, penyakit pulmoner, penyakit autoimun, keganasan, gangguan metabolik dan penuaan (Halliwell & Gutteridge: 2007). Kujoth *et al.*

(2007) melaporkan bahwa stres oksidatif dapat mengganggu proses oksidasi-fosforilasi di mitokondria, penurunan produksi ATP, dan peningkatan kebutuhan energi metabolisme secara keseluruhan (Serra *et al.* 2003; Speakman *et al.* 2004; Balaban *et al.* 2005). Hasil penelitian Liu *et al.* (2010) menunjukkan bahwa stres oksidatif dapat menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid dan akumulasi deposit-deposit metabolit yang bersifat neurotoksik. Stres oksidatif dapat mengganggu aktivitas enzim Ca^{2+} -ATPase yang berperan dalam proses regulasi konsentrasi Ca^{2+} intraseluler dan gangguan ini dapat menginduksi terjadinya degenerasi neuron di hipokampus. Gangguan fungsi hipokampus ditandai dengan gangguan struktur sel atau jaringan (Dringen *et al.*, 2000). Munculnya berbagai macam gangguan ini dapat menimbulkan pengaruh merusak pada protein dan lipid membran sel, modifikasi membran dan fungsi seluler, dan akhirnya menyebabkan kematian neuron cornu ammonis di hipokampus (Liu *et al.* 2010).

F. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah suatu gugus molekul atom atau ion yang mempunyai satu elektron yang tidak berpasangan⁸. Beberapa radikal bebas dalam tubuh merupakan derivat nitrogen yang disebut *reactive nitrogen species* (RNS) dan derivat oksigen yang disebut *reactive oxygen species* (ROS). ROS bisa terdapat dalam bentuk O_2^- , radikal hidroksil (OH), asam hipoklorit (HOCL), radikal alkoksil dan radikal peroksil. ROS dapat merusak sel dengan merusak membran lipid melalui serangkaian reaksi kimia yang disebut peroksidasi lipid (Lieberman & Marks, 2009). Sumber-sumber endogen terbentuknya radikal bebas meliputi sistem NADPH oksidase, reaksi fosforilasi oksidatif, enzim oksidasi dan metabolisme arakhidonat, sedangkan sumber eksogen terbentuknya radikal bebas adalah radiasi ionisasi, merokok, alkohol, paparan polutan, sinar ultraviolet dan radiasi terionisasi (Siswonoto, 2008).

Pengukuran radikal bebas secara langsung sangat sulit dilakukan, oleh karena radikal bebas tidak menetap lama, mempunyai waktu paruh yang pendek dan menghilang dalam hitungan detik. Radikal bebas dapat menyebabkan suatu kondisi stress oksidatif jika keberadaan radikal-radikal bebas dalam tubuh melampaui atau

tidak seimbang dengan kapasitas antioksidan yang terdapat didalam tubuh. Radikal bebas mempunyai banyak bentuk seperti radikal hidroksil, peroksil, anion superoksida dan lain-lain. Masing-masing bentuk radikal tersebut mempunyai waktu yang berbeda-beda dalam menimbulkan stres oksidatif tergantung pada tingkat kereaktifan, selektifitas dan serangan terhadap molekul-molekul organik yang terdapat dalam jaringan tubuh (Sunarno, 2009).

Radikal bebas menyebabkan efek merusak secara langsung pada sel terutama pada DNA, protein dan lipid, menyebabkan peroksidasi lipid dan akhirnya menyebabkan kematian sel apoptosis. Polusi dan stres (baik fisik maupun psikis) mempercepat terbentuknya berbagai radikal bebas. Penyakit degeneratif disebabkan karena antioksidan yang ada di dalam tubuh tidak mampu menetralkan peningkatan konsentrasi radikal bebas sehingga meningkatkan proses peroksidasi lipid. Senyawa yang dapat menghambat peroksidasi lipid akibat radikal bebas adalah antioksidan (Asmoro, 2011).

G. Malondialdehid

Malondialdehid (MDA) merupakan salah satu senyawa yang dapat menggambarkan aktivitas oksidan (radikal bebas) dalam sel (Asni dkk., 2009). MDA banyak didapatkan dalam sirkulasi dan merupakan produk utama hasil reaksi radikal bebas dengan fosfolipid yang diproduksi secara konstan sesuai dengan proporsi peroksidasi lipid yang terjadi, sehingga merupakan indikator yang baik untuk melihat kecepatan peroksidasi lipid *in vivo* (Siswonoto, 2008).

Pengukuran MDA dapat dengan beberapa metode yaitu metode TBARS, dan metode *high performance liquid chromatography* (HPLC)/Spektrofotometri.

1. Tes Thiobarbituric Acid-Reactive Substance (TBARS)

Dasar pemeriksaan metode TBARS adalah reaksi spektrofotometrik sederhana, dimana satu molekul MDA akan terpecah menjadi 2 molekul 2-asam thiobarbiturat. Reaksi ini berjalan pada pH 2-3. TBA akan memberikan warna *pink-chromogen* yang dapat diperiksa secara spektrofotometrik. Tes TBA selain mengukur kadar terbentuk karena peroksidasi lipid juga mengukur produk aldehid lainnya termasuk produk non-volatil yang terjadi akibat panas yang ditimbulkan pada saat pengukuran

MDA yang sebenarnya. Kadar MDA dapat diperiksa baik di plasma, jaringan maupun urin (Konig, 2002 dalam Arkhaesi, 2008). Beberapa metode pengukuran TBA adalah sebagai berikut:

1.1 Pengukuran Reaksi TBA dengan Kolorimetri

Pengukuran reaksi TBA dengan metode kolorimetri dengan spektrofotometri merupakan kadar MDA yang paling sering dilakukan. Pengukuran MDA dilakukan dengan dasar reaksi MDA dengan asam tiobarbiturat (TBA) yang membentuk senyawa bernama MDA-TBA₂ dan mengabsorpsi sinar dengan panjang gelombang 532-534 nm. Senyawa berwarna tersebut dapat diukur konsentrasinya berdasarkan absorbansi warna yang terbentuk, dengan membandingkannya pada absorbansi warna larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya.

Metode yang digunakan adalah metode Yagi. Metode ini mudah dilakukan akan tetapi bersifat tidak spesifik pula karena mengukur produk aldehid lainnya (Dalle-Donne, 2006 dalam Arkhaesi 2008).

1.2 Pengukuran reaksi TBA dengan metode fluoresensi

Metode ini memiliki keunggulan dibanding metode kolorimetri oleh karena tidak terganggu oleh beberapa substansi produk TBA yang larut air. Pemeriksaan dilakukan dengan metode Spektrofluorometri (Dalle-Donne, 2006 dalam Arkhaesi, 2008).

2. Pengukuran MDA-TBA dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Metode ini secara spesifik dapat mengukur kompleks TBA, sehingga pengukuran kadar MDA lebih akurat. Namun demikian metode ini membutuhkan kondisi asam dengan suhu tinggi sehingga tetap ada kemungkinan terbentuknya MDA yang bukan peroksidasi lipid (Dalle-Donne, 2006 dalam Arkhaesi 2008).

H. Antioksidan

Antioksidan memberikan perlindungan dari toksisitas amiloid- β . Banyak penelitian telah mengamati efek toksik langsung dari amiloid- β pada neuron. Antioksidan mampu melindungi sel-sel hipokampus yang mengalami stres radikal

bebas (Perez *et al.*, 2006). Dalam salah satu percobaan formulasi *nutraceutical* yang termasuk folat, *alpha-tocopherol*, B12, *S-adenosyl methioinine*, *N-acetyl cysteine*, dan *acetyl-L-carnitine* untuk pasien penyakit Alzheimer menghasilkan stabilisasi kognitif. Fungsi antioksidan serupa terbukti bermanfaat dalam meningkatkan memori dan kinerja kognitif pada orang dewasa (Tonnie and Trushina, 2017).

Antioksidan dapat menghambat atau memperlambat oksidasi melalui dua jalur yaitu: (1) melalui penangkapan radikal bebas (*free radical scavenging*). Antioksidan jenis ini disebut sebagai antioksidan primer. Mekanisme antioksidan dalam menghambat reaksi berantai pada radikal bebas dapat disebabkan oleh 4 macam mekanisme, yaitu :

- a) Pelepasan hidrogen dari antioksidan
- b) Pelepasan elektron dari antioksidan
- c) Adisi lemak ke dalam cincin aromatik pada antioksidan
- d) Pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan (Wijaya, 1996).

Jalur yang ke dua (2) tanpa melibatkan penangkapan radikal bebas. Antioksidan ini disebut dengan antioksidan sekunder yang mekanisme pengikatannya melalui pengikatan logam, menangkap oksigen, mengubah hidroperoksida menjadi spesies non radikal, menyerap sinar ultraviolet dan mendeaktivasi oksigen singlet.

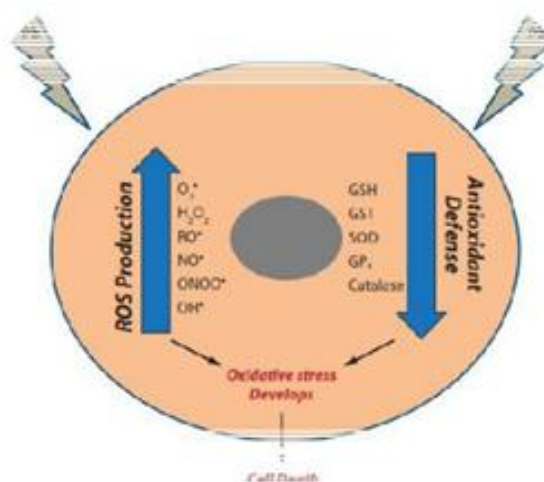
I. Plumbum Asetat

Plumbum (Pb) atau dikenal juga dengan nama timbal atau timah hitam merupakan logam yang mempunyai empat bentuk isotop, ²⁰⁸Pb, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, dan ²⁰⁴Pb, berwarna kebiruan atau abu-abu keperakan dengan titik leleh pada 327,5°C dan titik didih pada 1740°C di atmosfer. Secara kimiawi, Pb mempunyai titik uap yang rendah dan dapat menstabilkan senyawa lain sehingga memiliki banyak manfaat pada bidang industri (Lubis *et al.*, 2013). Dalam penelitiannya Gracia dan Snodgrass (2007) menyebutkan bahwa anak dengan *Blood Lead Level* (BLL) lebih dari 10 µg/dL dan orang dewasa dengan BLL lebih dari atau sama dengan 45 µg/dL

harus dievaluasi lebih lanjut. Gejala toksisitas Pb biasanya berkorelasi dengan kadar BLL 25–50 $\mu\text{g/dL}$ pada anak dan 40 –60 $\mu\text{g/dL}$ pada dewasa.

Penelitian Liu *et al.* (2015) menunjukkan bahwa paparan Pb dapat memicu *microgliosis* abnormal dan *astrogliosis* pada hipokampus tikus muda, yang kemudian dapat mengganggu neurogenesis hipokampus. Penelitian (Mello *et al.*, 1998) menunjukkan bahwa intoksikasi plumbum asetat dapat menyebabkan perubahan yang menyimpang terhadap perkembangan perilaku tikus. Plumbum menunjukkan kemampuan berbagi elektron yang menghasilkan formasi ikatan kovalen. Ikatan ini terbentuk diantara bagian Pb dan gugus sulfhydryl yang ada dalam enzim antioksidan, yang menjadi target yang paling rentan bagi Pb dan perlahan akan terinaktivasi. Pb menginaktivasi glutathione dengan cara itu. Cara yang sama juga digunakan Pb untuk menginaktivasi enzim lain seperti *d-amino levulinic acid dehydratase* (ALAD), *glutathione reductase* (GR), *glutathione peroxidase* (GP), dan *glutathione-S-transferase*. Selain menargetkan gugus sulfhydryl, Pb juga dapat menggantikan ion Zn yang berperan sebagai kofaktor bagi enzim antioksidan dan pada akhirnya akan menginaktivasi enzim tersebut. Enzim antioksidan penting yang diinaktivasi oleh Pb adalah *super oxide dismutase* (SOD) dan *catalase* (CAT). Penurunan konsentrasi SOD dan CAT mengurangi pembuangan radikal superoksida sehingga terjadilah stres oksidatif (Flora *et al.*, 2012). Skema terjadinya stres oksidatif akibat logam berat dapat dilihat pada gambar

4



Gambar 4. Mekanisme terjadinya stres oksidatif akibat logam berat (Flora *et al.*, 2012)

Pada penelitian Mello *et al.* (1998) tikus diintoksikasi dengan plumbum asetat sebanyak 1,0 mM. Pemberian diet yang mengandung Pb tinggi pada tikus saat menyusui menyebabkan gangguan pertumbuhan, perubahan hematologis, kerusakan blood-brain barrier, mortalitas yang meningkat, dan efek yang signifikan pada perkembangan neuromotorik tikus. Penelitian Liu *et al.* (2013) menunjukkan bahwa efek neurotoksik sudah dapat terjadi dengan induksi Pb selama 7 hari.

J. Kuersetin

Flavonoid termasuk dalam kategori senyawa polifenol yang diproduksi secara eksklusif pada tumbuhan. Senyawa-senyawa ini mampu membawa berbagai aktivitas biologis dan farmakologis dalam sel-sel hewan. Antioksidan sangat penting untuk melindungi sel-sel dari menjalani kerusakan kimia akibat oksidasi. Banyak senyawa diketahui memiliki antioksidan dan pro-oksidan. Sifat pro-oksidan dapat menguntungkan atau merugikan sistem biologis dan dapat mempengaruhi perkembangan penyakit kronis pada manusia. Kuersetin, flavonoid yang paling banyak, bertindak sebagai keduanya antioksidan dan prooksidan. Saat ini, tidak ada metode yang dapat diandalkan untuk menjaga keseimbangan di antara kedua aktivitas di seluruh organism (Alrawaiq, 2014).

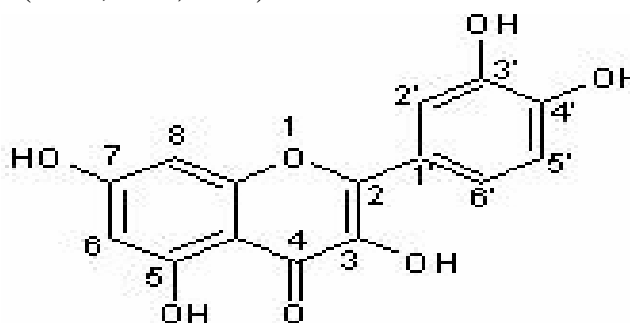
Flavonoid termasuk senyawa fenolik alam yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Senyawa-senyawa ini dapat ditemukan pada batang, daun, bunga dan buah. Flavonoid dalam tubuh manusia berfungsi sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Manfaat flavonoid antara lain adalah untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektivitas vitamin C, anti-inflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotic (Palak, *et al*, 2016)

Kuersetin adalah senyawa kelompok flavonol terbesar, Kuersetin dan glikosidanya berada dalam jumlah sekitar 60-75% dari flavonoid. Kuersetin dipercaya dapat melindungi tubuh dari beberapa jenis penyakit degeneratif dengan cara mencegah terjadinya proses peroksidasi lemak. Kuersetin memperlihatkan kemampuan mencegah proses oksidasi dari *Low Density Lipoproteins* (LDL) dengan

cara menangkap radikal bebas dan menghelat ion logam transisi (Maalik, *et al*, 2014).

Kuersetin mempunyai rumus kimia 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone dan dapat melebur pada suhu 316,5⁰C. Kuersetin tidak larut dalam air dan eter, tetapi larut dalam alkohol dan aseton. Kuersetin merupakan antioksidan yang paling kuat di antara senyawa polifenol. Kuersetin berpotensi sebagai antivirus antibakteri, anti kanker dan anti-inflamasi (Maalik,*et al*, 2014).

Ketika flavonol Kuersetin bereaksi dengan radikal bebas, Kuersetin mendonorkan protonnya dan menjadi senyawa radikal, tapi elektron tidak berpasangan yang dihasilkan didelokalisasi oleh resonansi, hal ini membuat senyawa Kuersetin radikal memiliki energi yang sangat rendah untuk menjadi radikal yang reaktif (Palak, *et al*, 2016).



Gambar 5 . Struktur Kuersetin

K. Sirsak (*Anona muricata* L.)

1. Klasifikasi

Berdasarkan kedudukan dalam tata nama tanaman, sirsak termasuk ke dalam klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Polycarpiceae
Familia	: Annonaceae
Genus	: Annona

Spesies : *Annona muricata* L. (Sunarjono, 2005).

II. Kandungan senyawa antioksidan daun sirsak

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) oleh masyarakat dimanfaatkan sebagai antibakteri, antivirus, antioksidan, antijamur, antiparasit, dan antihipertensi (Gajalakshmi *et al.*, 2012). Kandungan kimia yang terdapat pada daun sirsak adalah flavonoid, karbohidrat, glikosida, saponin, tannin, fitosterol, terpenoid, dan protein (Endeoga, *et al.*, 2005). Senyawa fenolik utama yang ditemukan dalam daun sirsak yaitu kuersetin dan asam galat dianggap sebagai *phytochemical* utama yang bertanggung jawab atas aktivitas antioksidan (Gavamukulya *et al.*, 2017).



Gambar 6. Daun sirsak (*Annona muricata* L.)(Siswarni *et al.*, 2016)

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa komponen aktif utama yang terdapat dalam daun sirsak adalah *acetogenin* (Siswarni, *et al.*, 2016). *Acetogenin* adalah senyawa *polyketides* dengan struktur 30 – 32 rantai karbon tidak bercabang yang terikat pada gugus *5-methyl-2-furanone*. Rantai *furanone* dalam gugus hydrofuranone pada C23 memiliki aktivitas sitotoksik (Luciana, 2010).

L. Landasan Teori

Demensia merupakan sindrom penyakit neurodegeneratif. Sebagian besar terjadi pada usia lanjut tapi bukan merupakan bagian normal penuaan. Penyakit Alzheimer adalah salah satu bentuk demensia yang paling banyak ditemui dan merupakan penyebab utama pada sebagian besar kasus demensia. Deposit amyloid β peptide telah terbukti memainkan peran penting dalam pathogenesis penyakit

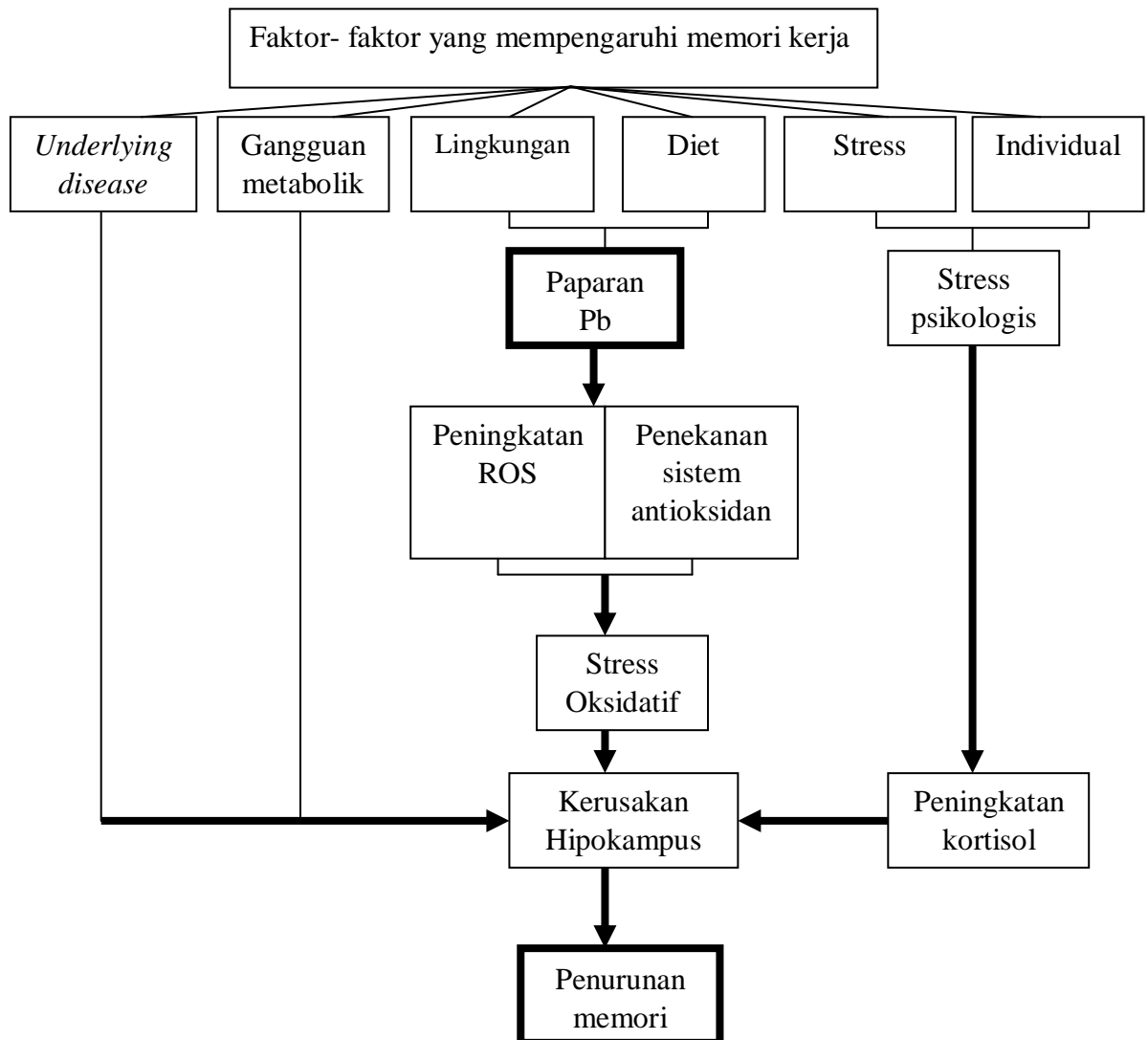
Alzheimer. Plak amiloid ini terbentuk akibat stress oksidatif parah dalam neuron. Stres oksidatif terjadi karena antioksidan yang ada di dalam tubuh tidak mampu menetralkan peningkatan konsentrasi radikal bebas, sehingga kadar radikal bebas dalam tubuh menjadi tinggi.

Radikal bebas menghasilkan kerusakan pada komponen utama dari sel yaitu inti, DNA mitokondria, membran, dan protein sitoplasma (Christen, 2000). Stres oksidatif ini dapat menyebabkan kerusakan pada sel neuron hipokampus yang pada akhirnya sel tersebut mengalami kematian. Kematian sel-sel neuron hipokampus ini akan menurunkan memori spasial. Meningkatnya stres oksidatif terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas dan kapasitas antioksidan bergeser ke bagian radikal bebas yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada lipid (Arimura dan Kaibuchi, 2005).

Plumbum merupakan logam berat yang bersifat toksik bagi tubuh dan dapat masuk ke dalam tubuh melalui sistem pernapasan maupun pencernaan. Plumbum yang masuk dapat menyebabkan stres oksidatif dengan meningkatkan radikal bebas dan menekan sistem antioksidan (Ercal *et al.*, 2001). Stres oksidatif menunjukkan adanya ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan kemampuan sistem biologis untuk segera mendetoksifikasi zat antara atau memperbaiki kerusakan yang dihasilkan. Hal tersebut dilaporkan menjadi mekanisme utama keracunan yang diinduksi Pb. Karena pengaruh Pb, onset stres oksidatif muncul dengan dua pathways yang terjadi secara simultan. Pertama-tama hadir generasi *reactive oxygen species* (ROS) seperti singlet oxygen (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Setelah itu cadangan antioksidan dalam tubuh akan berkurang. Pertahanan antioksidan dalam tubuh berperan untuk menghilangkan ROS yang dihasilkan. Salah satu antioksidan yang penting dan ditemukan dalam sel adalah glutathione (GSH). GSH adalah sebuah tripeptida yang memiliki gugus sulfhydryl dan ditemukan pada jaringan mamalia dalam konsentrasi milimolar. GSH penting untuk meredam radikal bebas. GSH ada dalam dua bentuk yaitu bentuk tereduksi (GSH) dan teroksidasi (GSSG). GSH mendonasikan *reducing equivalent* (H^++e^-) dari gugus thiol dan menstabilkan ROS (Flora *et al.*, 2012).

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan tanaman yang mengandung senyawa fenolik. Senyawa fenolik penting yang ditemukan dalam daun sirsak dianggap sebagai *phytochemical* utama yang bertanggung jawab atas aktivitas antioksidan (Gavamukulya,*et al.*, 2017). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai efek ekstrak etanol daun sirsak terhadap memori spasial, dan gambaran histopatologi hipokampus mencit model demensia yang diinduksi plumbum acetat.

M. Kerangka Konsep



Keterangan:

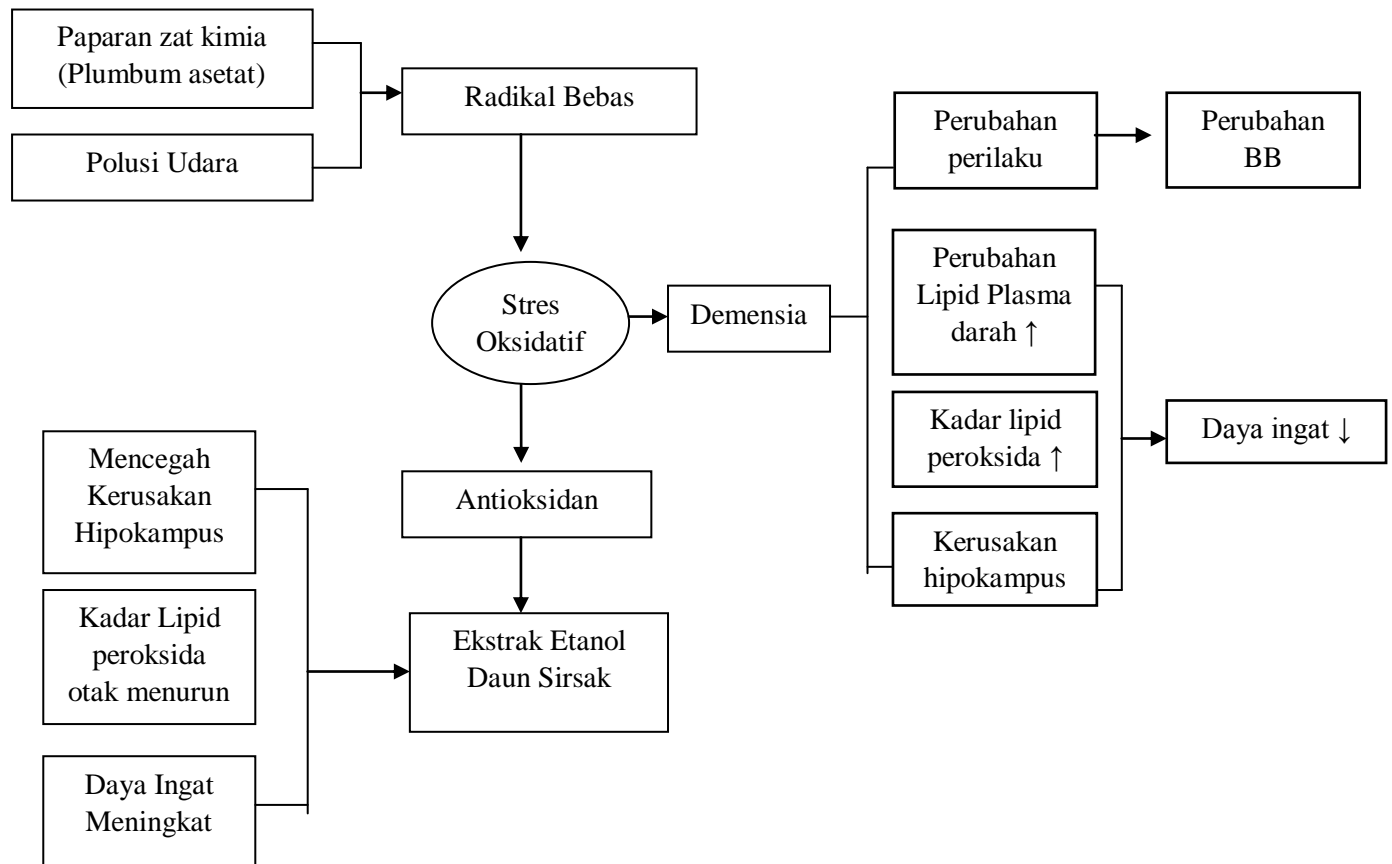


: variabel yang diteliti



: memicu

Gambar 7. Kerangka Teori Pengaruh Induksi Plumbum Asetat terhadap Memori Kerja



Gambar 8. Kerangka konsep

N. Hipotesis

Berdasarkan latar belakang dan landasan teori di atas, dapat dirumuskan hipotesis bahwa:

1. Pemberian ekstrak etanol daun sirsak dengan dosis 100, 200, dan 400 mg/KgBB dapat memperbaiki memori spasial dan menurunkan kadar malondialdehid pada mencit model demensia yang diinduksi dengan plumbum asetat.
2. Pemberian ekstrak etanol daun sirsak dengan dosis 100, 200, dan 400 mg/KgBB dapat memperbaiki memori spasial, menurunkan kadar malondialdehid, dan menurunkan jumlah sel pyramidal CA1 serta CA2-CA3 yang mengalami kerusakan pada mencit model *demensia* yang diinduksi dengan plumbum asetat.
3. Pemberian ekstrak etanol daun sirsak dengan dosis 100, 200, dan 400 mg/KgBB dapat menurunkan jumlah sel pyramidal CA1 dan CA2-CA3 yang mengalami kerusakan pada mencit model demensia yang diinduksi dengan plumbum asetat.