



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK EKSTRAK ETANOL *CENTELLA ASIATICA* (L.) TERHADAP
EKSPRESI PROTEIN *SYNAPTOPHYSIN* DAN *POST-SYNAPTIC
DENSITY-95* (PSD-95) PADA HIPOKAMPUS TIKUS DEWASA MUDA
DAN HUBUNGANNYA DENGAN FUNGSI MEMORI**

TESIS

ADIBAH

1506768431

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN FISILOGI**

JAKARTA

JUNI 2018



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK EKSTRAK ETANOL *CENTELLA ASIATICA* (L.) TERHADAP
EKSPRESI PROTEIN *SYNAPTOPHYSIN* DAN *POST-SYNAPTIC*
DENSITY-95 (PSD-95) PADA HIPOKAMPUS TIKUS DEWASA MUDA
DAN HUBUNGANNYA DENGAN FUNGSI MEMORI**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister
Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia**

ADIBAH

1506768431

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK**

KEKHUSUSAN FISILOGI

JAKARTA

JUNI 2018

Halaman Pernyataan Orisinalitas

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun yang dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Adibah

NPM : 1506768431

Tanda Tangan :



Tanggal : 8 Juni 2018

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Adibah

NPM : 1506768431

Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik

Judul Tesis : Efek ekstrak etanol *Centella asiatica* (L.) terhadap ekspresi protein *synaptophysin* dan *post-synaptic density-95* (PSD-95) pada hipokampus tikus dewasa muda dan hubungannya dengan fungsi memori.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada program studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. drg. Sri Redjeki, MS.

(.....)

Pembimbing II: Dr. Dra. Ria Kodariah, MS.

(.....)

Penguji I : dr. Sophie Yolanda, M.Biomed

(.....)

Penguji II : Prof. Dr. dr. Erni Hernawati Purwaningsih, MS.

(.....)

Penguji III : Dr. Dra. Puspita Eka Wuyung, MS.

(.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 8 Juni 2018

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Dr.rer.physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi



KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena berkat rahmat dan karunia-Nya, tesis ini dapat diselesaikan dengan baik. Tesis ini disusun dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Ilmu Biomedik dari Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penulis sangat menyadari bahwa dalam keberhasilan menulis dan menyusun tesis ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. drg. Sri Redjeki, MS selaku Pembimbing I dan Dr. Dra. Ria Kodariah, MS selaku pembimbing II yang telah berkenan meluangkan waktunya untuk membimbing, mengarahkan, memberi masukan, dukungan dan semangat kepada penulis selama masa studi, penyusunan proposal penelitian, penelitian, penyusunan hingga ujian tesis.
2. dr. Sophie Yolanda, M.Biomed selaku Penguji I dan ketua peminatan Fisiologi, Prof. Dr. dr. Erni Hernawati Purwaningsih, M.S. sebagai Penguji II dan Dr. Dra. Puspita Eka Wuyung,MS. sebagai penguji III yang telah memberikan masukan yang membangun dalam menguji dan mengevaluasi penulisan tesis.
3. Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi, selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
4. Dr. dr Ermita Ilyas, M.S, selaku Ketua Departemen Fisiologi FKUI 2009 – 2017, yang selama penulis menjalani masa studi selalu memberikan motivasi, semangat dan bimbingan terutama ketika penulis menghadapi masalah yang terkait dengan penelitian.
5. Dr. dr. Dewi Irawati, MS, selaku Ketua Departemen Fisiologi FKUI 2018 – 2022 dan staf pengajar Fisiologi yang telah mengarahkan dan membimbing penulis dalam masa studi mendalami Ilmu Fisiologi Kedokteran.

6. Seluruh staf pengajar Program Magister Ilmu Biomedik FKUI, terutama staf pengajar di kekhususan Fisiologi, Dr. dr. Neng Tine Kartina, M.Kes,AIFO; Dr. dr. Minarma Siagian MS, AIFM; Dr. dr. Nurhadi Ibrahim, PhD ; dr. Imelda Rosalyn Sianipar, PhD ; dr. Nurul Paramita, Sp.KFR ; dan drg. Antonia MS; dr. H.M. Djauhari Widjajakusumah, PFK yang telah mengarahkan dan membimbing penulis selama masa studi di kekhususan Fisiologi.
7. Orang Tua tercinta, Ferhad Basandid dan Aliyah Usman yang telah mencurahkan banyak dukungan, perhatian, doa dan semangat sehingga penulis dapat terus berjuang menyelesaikan penulisan tesis ini.
8. Suami tersayang, Sabilarasyad Bahamalah, yang terus menemani dan memberi dukungan, doa dan semangat selama penelitian berlangsung hingga selesai penulisan tesis ini.
9. Kedua mertua, Umar Bahamalah dan Latiffah Nahdi yang selalu memberikan doa dan dukungan kepada penulis.
10. Kedua adik, Hanifah Fairus dan Mohammad Ilyas yang membantu penulis dalam menyusun tesis dan artikel serta memberikan doa dan dukungan kepada penulis.
11. Sepupuku tersayang, Sakinah Basandid yang membantu penulis dalam menyusun naskah tesis, terima kasih banyak semoga sukses selalu.
12. Rekan satu tim penelitian, dr. Astri Handayani dan Auliyani Andam Suri yang selalu memberikan motivasi, teman bertukar pikiran, dan rekan kerja penelitian hingga penelitian selesai dengan baik.
13. Teman sekelompok satu angkatan Magister Biomedik, Meidika Dara R, S.Pd., M. Biomed, Yora Permata Dewi, M.Biomed, dr. Fitri, Dilla Shavera, S.Si., Apt., M. Biomed., dan Siti Hardiyanti. Terima kasih atas semangat, motivasi, bantuan, dan canda tawa serta kebersamaan yang masih terus terjalin.
14. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof. Dr. Moestopo (B) yang telah memberikan kesempatan dan dukungan kepada penulis sejak awal kuliah hingga selesainya penulisan tesis ini.

15. Rekan – rekan dosen di FKG UPDM (B), Dr. drg. Yulitri Hapsari, Sp.Perio, drg. Yufitri Mayasari, M.Kes., drg. Wulan Apridita Sebastian, MPH., Dr. drg. Paulus Januar,MS., yang telah memberikan dukungan, doa, dan membantu penulis dalam menyusun tesis dan mengolah data hasil penelitian.
16. Teman – teman kuliah Magister Biomedik Kekhususan Fisiologi, dr. Deddy Arnold, Tahyatul Bariroh, dr. Rininta yang telah memberikan motivasi dan dukungan hingga penulis menyelesaikan tesis ini.
17. Rekan–rekan kekhususan Fisiologi, Faizah Abdullah, S.ST.,M.Biomed, dr. Riskiani Juleshodia Wulandari, Diah Ayu Aguspa Dita, S.Kep, Ners, M.Biomed dan Gulshan Fahmi El Bayani, S.Gz, M.Biomed. Terima kasih atas saran, bantuan, dan masukan membangun kepada penulis selama penelitian.
18. Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) yang telah memberikan kepercayaan kepada penulis untuk mendapatkan dana bantuan untuk menyelesaikan penelitian.
19. Staf administrasi Departemen Fisiologi FKUI Bu Rini, Pak Maksan, Pak Satam, Pak Sugeng dan Pak Andi, yang telah banyak membantu penulis selama masa studi.
20. Staf Departemen Patologi Anatomi FKUI, khususnya Bu Wiwik, Bapak Irawan dan Bapak Slamet yang telah banyak membantu selama penulis melakukan analisis protein.
21. Staf Laboratorium Oral Biologi FKG UI, khususnya Mbak Vivie, Mbak Asti dan Mas David yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian.
22. Staf Departemen Farmasi Kedokteran FKUI, Mbak Refita, Mbak Emi dan Mbak Ani atas bantuan yang telah diberikan selama penulis melakukan penelitian.
23. Semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung terlibat selama studi hingga penulisan tesis yang tidak dapat penulis sebutkan seluruhnya satu-persatu.

Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan dan bantuan kemudahan kepada semua pihak yang telah membantu penulis menyelesaikan tesis ini. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam tesis ini, oleh karena itu penulis terbuka untuk menerima saran dan kritik untuk perbaikan tesis ini. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan Ilmu Fisiologi Kedokteran, Neurosains, Obat Tradisional, dan Ilmu Biomedik pada khususnya dan berbagai ilmu lainnya pada umumnya.

Jakarta, Juni 2018

Adibah

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPERLUAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Adibah

NPM : 1506768431

Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik

Departemen : Fisiologi

Fakultas : Kedokteran

Jenis Karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Efek ekstrak etanol *Centella asiatica* (L.) terhadap ekspresi protein *synaptophysin* dan *post-synaptic density-95* (PSD-95) pada hipokampus tikus dewasa muda dan hubungannya dengan fungsi memori

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Tanggal : 8 Juni 2018

Yang menyatakan,

(Adibah)

ABSTRAK

Nama : Adibah

Program Studi : Ilmu Biomedik

Judul : Efek ekstrak etanol *Centella asiatica* (L.) terhadap ekspresi protein *synaptophysin* dan *post-synaptic density-95* (PSD-95) pada hipokampus tikus dewasa muda dan hubungannya dengan fungsi memori

Penurunan fungsi memori merupakan salah satu karakteristik dari proses penuaan yang dapat menurunkan kualitas hidup seseorang. Hipokampus merupakan bagian otak yang paling rentan mengalami perubahan seiring dengan proses penuaan yakni dengan adanya penurunan fungsi memori ditandai dengan adanya perubahan plastisitas sinaps. Plastisitas sinaps merupakan mekanisme selular yang mendasari proses pembentukan memori. Terdapat dua protein yang penting dalam plastisitas sinaps dan sering dijadikan marker plastisitas sinaps yakni *Synaptophysin* (SYP) dan *Postsynaptic density-95* (PSD-95). Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengatasi masalah penurunan fungsi memori, salah satunya melalui terapi herbal. Tanaman *Centella asiatica* memiliki kandungan triterpenoid dan flavonoid telah lama dikenal berperan dalam meningkatkan fungsi memori. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol *Centella asiatica* (CeA) terhadap ekspresi protein SYP dan PSD-95 di hipokampus tikus. Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in-vivo* menggunakan 18 ekor tikus Wistar jantan usia 6 bulan yang dibagi secara acak menjadi 3 kelompok: (1) kelompok kontrol (K) (2) kelompok CA300 dan (3) kelompok CA600. Kelompok kontrol diberikan akuades, kelompok CA300 diberikan CeA dosis 300 mg/kg.BB dan kelompok CA600 diberikan CeA dosis 600 mg/kg.BB yang dilakukan selama 28 hari berturut-turut secara oral. Setelah 28 hari, tikus didekapitasi dan hipokampus diisolasi dari jaringan otak. Ekspresi protein SYP dan PSD-95 di jaringan hipokampus dianalisis menggunakan teknik imunohistokimia pada regio CA1 hipokampus. Hasil penelitian menunjukkan, pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* dosis 600 mg/kg.BB dapat meningkatkan ekspresi protein SYP dan PSD-95 secara signifikan.

Kata kunci : Plastisitas sinaps, *Synaptophysin*, PSD-95, *Centella asiatica*.

ABSTRACT

Name : Adibah

Program : Biomedical Science

Title : Effect of *Centella asiatica* (L.) ethanol extract on hippocampal expression of *synaptophysin* and *post-synaptic density-95* (PSD-95) in young adult rats and its correlation with memory function.

Decreased memory function is one of the characteristics of the aging process that can reduce the quality of life. Hippocampus is the most vulnerable part of the brain undergoing changes along with the aging process that is with the decline in memory function characterized by the change in synaptic plasticity. Synaptic plasticity is the cellular mechanism that underlies the process of memory formation. There are two important proteins in synaptic plasticity and are often used as synaptic plasticity markers *Synaptophysin* (SYP) and *Postsynaptic density-95* (PSD-95). Various efforts have been made to overcome the problem of memory function decline, one of them through herbal therapy. *Centella asiatica* (CeA) plants contain triterpenoids and flavonoids have long been known to play a role in improving memory function. The purpose of this study was to investigate the effect of *Centella asiatica* ethanol extract (CeA) on expression of SYP and PSD-95 protein in rats hippocampus. The study was an *in-vivo* experimental study using 18 male Wistar rats aged 6 months randomly divided into 3 groups: (1) control group (K) (2) CA300 group and (3) CA600 group. The control group was given aquadest, a group of CA300 given a 300 mg/kg.BW CeA and a CA600 group administered a 600 mg/kg.BW CeA administered for 28 consecutive days orally. After 28 days, rat were decapitated and the hippocampus were isolated from brain. The expression of the SYP and PSD-95 proteins in the hippocampal tissue was analyzed using immunohistochemical techniques in the hippocampal CA1 region. The results showed, giving *Centella asiatica* ethanol extract with dose 600mg/kg.BW can increase expression of SYP protein and PSD-95 significantly.

Keyword : Synaptic Plasticity, *Synaptophysin*, PSD-95, *Centella asiatica*.

DAFTAR ISI

Halaman Judul	2
Halaman Pernyataan Orisinalitas	II
Halaman Pengesahan	III
Kata Pengantar	IV
Halaman Pernyataan Persetujuan Publikasi Karya Ilmiah untuk Keperluan Akademis	VIII
Abstrak	IX
<i>Abstract</i>	X
Daftar Isi	XI
Daftar Tabel	XIV
Daftar Gambar	XV
Daftar Lampiran	XVII
Daftar Singkatan	X
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Pertanyaan Penelitian	5
1.4 Hipotesis Penelitian	6
1.5 Tujuan Penelitian.....	6
1.5.1 Tujuan Umum.....	6
1.5.2 Tujuan Khusus	6
1.6 Manfaat Penelitian	7
1.7 Kerangka Teori.....	8
1.8 Kerangka Konsep	9
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Pemelajaran dan Memori	10
2.1.1 Proses Pembentukan Memori	12
2.1.2 Plastisitas Sinaps sebagai Bentuk Molekuler Pembentukan Memori... 14	
2.1.3 Peran Hipokampus dalam Plastisitas Sinaps	14
2.1.4 Mekanisme LTP di Hipokampus	19

2.2 Peran Protein Presinaps dan Post-sinaps dalam Pembentukan Memori ...	21
2.2.1 <i>Synaptophysin</i> (SYP).....	22
2.2.2 <i>Post Synaptic Density-95</i> (PSD-95).....	25
2.3 <i>Centella asiatica</i>	29
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	34
3.1 Desain Penelitian	34
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	34
3.3 Subjek dan Sampel Penelitian.....	34
3.3.1 Penetapan Jumlah Subjek dan Sampel Penelitian.....	35
3.3.2 Kriteria Hewan Coba.....	36
3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel.....	36
3.5 Prosedur Penelitian	37
3.5.1 Bahan dan Alat Penelitian.....	37
3.5.1.1 Bahan Sampel Hewan.....	37
3.5.1.2 Bahan Obat Uji.....	37
3.5.1.3 Alat Penelitian	37
3.5.1.4 Zat Kimia yang Dipakai.....	37
3.5.2 Cara Kerja.....	38
3.5.2.1 Pemberian Ekstrak Bahan Obat Uji.....	38
3.5.2.2 Perlakuan Subjek Penelitian	39
3.5.2.3 Prosedur Dekapitasi dan Tahap Isolasi Jaringan Hipokampus.....	40
3.5.2.4 Prosedur Pembuatan Blok Parafin dari Jaringan Hipokampus.....	40
3.5.2.5 Prosedur Pulasan Hematoksin Eosin (HE)	41
3.5.2.6 Prosedur Pemeriksaan Protein SYP dan PSD-95 dengan Metode Imunohistokimia (IHK).....	41
3.5.2.7 Pengukuran Parameter Penelitian	43
3.5.2.8 Interpretasi Hasil Pulasan Imunohistokimia (IHK)	46
3.6 Analisis Data.....	47
3.7 Alur Penelitian.....	48
BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	49
4.1 Karakteristik Subyek Penelitian	49
4.2 Hasil Analisis Protein dengan Metode IHK	50

4.3 Pemeriksaan IHK protein SYP di Area CA1 Hipokampus	51
4.4 Pemeriksaan IHK protein PSD-95 di Area CA1 Hipokampus.....	53
4.5 Hasil Analisis Korelasi Ekspresi Protein.....	56
BAB 5 PEMBAHASAN	58
5.1 Karakteristik Subyek Penelitian.....	58
5.2 Ekspresi Protein	59
5.2.1 Ekspresi Protein SYP di Area CA1 Hipokampus	59
5.2.2 Ekspresi Protein PSD-95 di Area CA1 Hipokampus.....	63
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	66
6.1 Kesimpulan.....	66
6.2 Saran.....	66
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN	72
RIWAYAT HIDUP	89

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Variabel penelitian dan definisi operasional	36
--	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jenis – jenis memori.....	10
Gambar 2.2 Proses pembentukan memori.....	13
Gambar 2.3 Gambaran histologis sel piramidal hipokampus	16
Gambar 2.4 Morfologi dendrit CA1 dan input sinaptik	17
Gambar 2.5 Anatomi hipokampus dan Jalur pengolahan informasi.....	18
Gambar 2.6 Jeram sinyal yang memediasi penguatan sinaps dan pembentukan LTP	21
Gambar 2.7 Model SYP dalam proses daur ulang vesikel sinaps.....	24
Gambar 2.8 Diagram skematik dari struktur domain PSD-95	26
Gambar 2.9 Model konformasi domain PDZ pada PSD-95 dan interaksinya dengan molekul dan struktur lain	26
Gambar 2.10 Influx ion Ca^{2+} melalui reseptor NMDA.....	27
Gambar 2.11 Regulasi PSD-95 oleh ikatan BDNF-TrkB	28
Gambar 2.12 <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban (Apiaceae)	29
Gambar 2.13 Struktur flavonoid. A. Struktur umum flavonoid. B. Struktur quercetin, suatu flavonoid kelompok flavonol	31
Gambar 2.14 Flavonoid.....	32
Gambar 3.1 Tampilan jendela IHC <i>Profiler</i>	44
Gambar 3.2 Tampilan jendela Mode	45
Gambar 3.3 Tampilan jendela <i>color deconvultion</i>	45
Gambar 3.4 Tampilan hasil IHC <i>Profiler</i>	46
Gambar 4.1 Rerata berat badan subjek penelitian ketiga kelompok pada minggu awal sebelum perlakuan dan minggu keempat setelah perlakuan	50
Gambar 4.2 Hasil pewarnaan HE.....	50
Gambar 4.3 Jaringan otak besar tikus	51
Gambar 4.4 Pulasan IHC protein SYP pada area CA1 jaringan hipokampus tikus Wistar jantan	52
Gambar 4.5 Perbandingan rerata skor densitas optik protein SYP pada ketiga kelompok	53
Gambar 4.6 Jaringan otak besar tikus	54
Gambar 4.7 Pulasan IHC protein PSD-95 pada area CA1 jaringan hipokampus	

	tikus Wistar jantan	54
Gambar 4.8 Perbandingan rerata skor densitas optik protein PSD-95 pada		
	ketiga kelompok	55
Gambar 4.9 Hubungan antara ekspresi protein SYP dengan fungsi memori		56
Gambar 4.10 Hubungan antara ekspresi protein PSD-95 dengan fungsi memori....		57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan Lolos Kaji Etik.....	72
Lampiran 2. Sertifikat Pengujian <i>Centella asiatica</i>	73
Lampiran 3. Sertifikat Pengujian <i>Centella asiatica</i>	74
Lampiran 4. Perhitungan Pemberian ekstrak etanol <i>Centella asiatica</i>	75

DAFTAR SINGKATAN

AC	: <i>Adenyl Cyclase</i>
AMPA	: <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
BDNF	: <i>Brain Derived Neurotropic Factor</i>
CA1	: <i>Cornu Ammonis 1</i>
CA3	: <i>Cornu Ammonis 3</i>
CAMKII	: <i>Calcium/Calmodulin-dependent kinase II</i>
cAMP	: <i>cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CeA	: <i>Centella asiatica</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-Binding protein</i>
ERK	: <i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
Keap1-Nrf2-ARE	: <i>((Kelch-like ECH-Associating Protein 1) nuclear factor erythroid 2 related factor 2-antioxidant response element)</i>
LTD	: <i>Long Term Depression</i>
LTP	: <i>Long Term Potentiation</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activate & protein Kinase</i>
MUNC-18	: <i>mammalian homologue of UNC-18</i>
NMDA	: <i>N-methyl-D-Aspartate</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
PKA	: <i>Protein Kinase A</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PSD-95	: <i>Post-Synaptic Density-95</i>
SNAP25	: <i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
SNARE	: <i>Soluble NSF Attachment Protein Receptor</i>
SYP	: <i>Synaptophysin</i>
TARP	: <i>transmembran AMPA receptor regulatory protein</i>
TrkB	: <i>Tropomyosin Receptor Kinase B</i>
VAMP	: <i>Vesicle Associated Membrane Protein</i>
VSCC	: <i>Voltage Sensitive Calcium Channel</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penuaan merupakan proses biologis alami yang ditandai dengan adanya penurunan fungsi fisiologis tubuh disertai dengan adanya kemunduran kondisi sistem organ. Salah satunya yaitu terjadinya penurunan fungsi memori di otak.^{1, 2} Adanya penurunan fungsi memori yang menyertai proses penuaan dapat mempengaruhi kualitas hidup seseorang dan dapat menimbulkan masalah seperti perubahan persepsi, masalah dalam berkomunikasi, penurunan fokus dan atensi, serta hambatan dalam melaksanakan tugas harian.^{3,4}

Penurunan fungsi memori dapat terjadi pada proses penuaan yang normal maupun pada proses penuaan yang disertai dengan penyakit degeneratif.² Hipokampus, merupakan bagian dari otak yang erat kaitannya dengan fungsi memori dan merupakan bagian otak yang paling rentan mengalami perubahan seiring dengan proses penuaan. Salah satu perubahan tersebut yaitu adanya perubahan plastisitas sinaps di berbagai sirkuit hipokampus.¹

Plastisitas sinaps merupakan perubahan kekuatan sinaps yang dipengaruhi oleh aktivitas neuron.⁵ Plastisitas sinaps merupakan mekanisme selular yang mendasari proses pembentukan memori.⁶ Memori merupakan retensi dan pencarian fakta atau kejadian yang dibentuk dari pengalaman.⁷ Memori merupakan kemampuan untuk merekam pengalaman hidup, sehingga mempengaruhi sikap atau kebiasaan seseorang sesuai dengan kondisi lingkungannya.⁸

Plastisitas sinaps yang mendasari pembentukan memori dapat dimediasi pada tingkat presinaps maupun post-sinaps.⁵ Pada presinaps, plastisitas sinaps dipengaruhi oleh protein membran presinaps yaitu *synaptophysin* (SYP). *Synaptophysin* merupakan salah satu protein yang paling banyak digunakan sebagai marker plastisitas sinaps di hipokampus.⁹ SYP merupakan protein vesikel sinaps pertama yang ditemukan dan merupakan protein vesikel sinaps terbanyak yaitu 10% dari total protein vesikel.¹⁰ SYP berperan dalam eksositosis, pembentukan sinaps, biogenesis dan endositosis vesikel sinaps. Menurut

penelitian disebutkan bahwa mencit yang kekurangan SYP akan mengalami penurunan potensiasi jangka panjang (LTP).¹¹ Penelitian lain juga menyebutkan bahwa mencit yang kehilangan SYP akan mengalami retardasi mental dan/atau kesulitan belajar.¹⁰ SYP ini penting karena kehilangan protein vesikel presinaps di hipokampus dapat menimbulkan penurunan memori.⁹ Hal ini menunjukkan bahwa SYP berperan dalam regulasi transmisi sinaps di sirkuit neuron dalam proses belajar dan memori.¹⁰

Pada post-sinaps, plastisitas sinaps dimediasi oleh molekul adesi sinaps. Salah satu molekul adesi sinaps yang secara langsung berinteraksi dengan domain sitoplasma adalah PSD-95 (*postsynaptic density-95*).¹² PSD-95 merupakan protein perancah utama pada densitas post-sinaps di sinaps eksitatori glutamatergik. PSD-95 termasuk dalam anggota *membrane-associated guanylate kinase* (MAGUK).¹³ Secara umum, PSD-95 berperan dalam mempertahankan dan memodulasi kekuatan sinaps.¹⁴ PSD-95 juga berperan dalam meregulasi reseptor AMPA yang penting dalam plastisitas sinaps.¹² Selain itu, PSD-95 juga sering digunakan sebagai marker sinaps pada post sinaps.¹⁵

Protein presinaps dan post-sinaps yaitu SYP dan PSD-95 ini penting dalam fungsi memori. Menurut penelitian disebutkan bahwa seiring dengan proses penuaan akan terjadi perubahan morfologi sinaps yaitu adanya kehilangan protein presinaps (SYP) dan post sinaps (PSD-95), serta kehilangan densitas sinaps secara progresif. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam proses penuaan akan menimbulkan terjadinya penurunan fungsi memori di hipokampus.¹⁶

Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengatasi masalah penurunan fungsi memori. Kementerian Kesehatan RI mengupayakan diselenggarakannya senam sehat bugar (SSB) dan senam vitalitas otak bagi lansia. Namun demikian, perlu diingat bahwa semakin meningkatnya usia, kemampuan beraktivitas fisik juga berkurang hingga 30 – 50%.³ Cara lain untuk mengatasi penurunan fungsi memori yaitu melalui sistem pengobatan. Pengobatan sintesis diketahui memiliki efek samping yang tidak diinginkan, sehingga sistem pengobatan mulai beralih ke sistem pengobatan herbal dengan efek samping yang sangat minimal. Sistem pengobatan Ayurveda dan pengobatan tradisional Cina telah lama menggunakan herbal dalam mengatasi masalah penuaan dan penurunan fungsi memori. Salah

satu tanaman yang digunakan untuk mengatasi penurunan fungsi memori yaitu *Ginkgo biloba*. Ekstrak *G. biloba* banyak diresepkan di Negara Jerman, Perancis dan merupakan suplemen herbal yang paling banyak digunakan di Amerika Serikat. Ekstrak *G. biloba* ini digunakan untuk mencegah penurunan kognisi dan demensia. Namun demikian, tanaman ini tidak ada di Indonesia.⁷

Di Indonesia tanaman yang secara tradisional sering digunakan untuk meningkatkan fungsi memori adalah *Centella asiatica*. *Centella asiatica* (CeA) atau yang dikenal sebagai pegagan merupakan tanaman obat dari famili *Apiaceae* berasal dari negara - negara Asia Tenggara termasuk Indonesia. *Centella asiatica* merupakan tanaman tropis yang telah lama digunakan sebagai terapi alternatif.¹⁷ Dalam pengobatan Ayurveda, CeA dipercaya dapat meningkatkan proses belajar dan memori.¹⁸ *Centella asiatica* sering dijumpai di tempat yang terbuka, pada tanah yang lembab dan subur seperti di pematang sawah, di padang rumput, dipinggir parit dan di pinggir jalan.¹⁹

22, 23, 24

Centella asiatica memiliki berbagai komponen kimia yang penting antara lain yaitu triterpenoid dan flavonoid.²⁰ Triterpenoid memiliki komponen aktif yang terdiri atas asam asiatica dan asiaticosida.²¹ Beberapa penelitian menyatakan bahwa asam asiatica dan asiaticosida berperan dalam pertumbuhan luka, efek rangsang pada otak, perawat hipertensi dan mikroangiopati, antioksidan dan anti-tumor yang potensial.²² Asam asiatica dan asiaticosida memiliki efek neuroprotektif, antioksidan dan anti-inflamasi.^{23,24} Kandungan flavonoid pada CeA memiliki sifat antioksidan yang dapat mencegah neurotoksisitas.²⁵ Sejumlah penelitian telah menemukan bahwa flavonoid, termasuk quercetin dalam CeA dapat menembus sawar darah otak dan memiliki fungsi seperti faktor neurotropis di otak. Flavonoid ini kemudian akan mengaktifkan jalur sinyal intraseluler sehingga dapat mempengaruhi berbagai aktivitas neuroprotektif, mencegah apoptosis, menekan neuroinflamasi dan meningkatkan antioksidan.

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* selama 8 minggu dengan dosis 300 mg/kg.BB meningkatkan fungsi kognisi tikus Wistar jantan berusia 2 bulan.²⁵ Tidak diketahui apakah peningkatan fungsi kognisi ini berhubungan dengan beberapa protein yang mendasari pembentukan fungsi memori. Di sisi lain penelitian yang dilakukan

oleh Sari dkk, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* dosis 600 mg/kg.BB pada tikus yang diinduksi stres kronik dapat meningkatkan kadar BDNF di dalam serum.²⁰ BDNF merupakan protein neurotropin yang dapat memicu peningkatan protein sinaps lainnya seperti *synaptophysin* dan PSD-95 dan diduga berhubungan dengan fungsi memori.

Dengan mempertimbangkan bahwa tanaman CeA mudah ditemukan di Indonesia, dan mengingat betapa pentingnya mengatasi masalah penurunan fungsi memori, maka dilakukan penelitian ini. Dalam penelitian ini dilakukan pemberian ekstrak etanol CeA pada tikus Wistar jantan usia 6 bulan selama 28 hari berturut – turut dengan dosis 300mg/kg.BB dan 600mg/kg.BB, kemudian dilihat bagaimana pengaruhnya terhadap ekspresi protein SYP dan PSD-95 di hipokampus tikus tersebut. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol CeA dapat meningkatkan fungsi memori,²⁰ namun hingga kini masih belum ada penelitian yang melihat pengaruh ekstrak CeA terhadap protein plastisitas sinaps.

Mengingat penurunan fungsi memori terjadi sejak awal usia dewasa yaitu sejak usia 20 tahun,²⁶ maka usia hewan coba dalam penelitian ini yaitu berusia 6 bulan, dimana usia tersebut bila dikonversi ke manusia setara dengan usia 18 tahun.²⁷ Dengan melihat ekspresi dari kedua protein tersebut diharapkan penelitian ini dapat membuktikan bahwa ekstrak CeA dapat meningkatkan plastisitas sinaps sehingga dapat digunakan sebagai bentuk pencegahan terhadap penurunan fungsi memori.

Penelitian ini merupakan bagian dari satu proyek penelitian besar yang bertujuan untuk melihat pengaruh ekstrak etanol CeA terhadap fungsi memori secara umum. Dalam penelitian besar dilakukan beberapa uji terkait pengaruh ekstrak CeA yakni terhadap fungsi memori, ekspresi protein BDNF, TrkB, AMPAR, serta protein SYP dan PSD-95 di hipokampus tikus Wistar jantan.

Dalam penelitian ini akan dibahas keterkaitan antara ekspresi protein SYP dan PSD-95 dengan fungsi memori di hipokampus tikus Wistar jantan, sebagai bentuk informasi tambahan yang didapat dari hasil penelitian sebelumnya yang merupakan bagian dari penelitian payung.

1.2 Rumusan Masalah

Penurunan fungsi memori merupakan salah satu karakteristik dari proses penuaan yang dapat menurunkan kualitas hidup seseorang.^{1, 2} Berbagai strategi dilakukan untuk mengatasi masalah penurunan fungsi memori, diantaranya aktivitas fisik dan senam otak yang sering dianjurkan pada lansia. Namun hingga kini belum efektif dalam mencegah penurunan fungsi memori. Oleh karena itu diperlukan upaya pencegahan lain yang lebih efektif dalam memperkuat fungsi memori. Salah satu upayanya adalah melalui pengobatan herbal. Tanaman herbal yang banyak dijumpai di Indonesia dan telah lama digunakan secara tradisional dalam meningkatkan fungsi memori yaitu *Centella asiatica*. Komponen aktif dalam CeA yakni asam asiatika dan asiaticosida bekerja sebagai antioksidan dan bersifat neuroprotektif.^{17, 18} Kandungan flavonoid dalam CeA juga dapat menekan proses neuroinflamasi, mencegah apoptosis dan meningkatkan kerja antioksidan.^{22,23, 24}

Berdasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu pemberian ekstrak etanol CeA dosis 300 mg/kg.BB dapat meningkatkan fungsi kognisi,²⁵ dan pemberian ekstrak etanol CeA dosis 300 mg/kg.BB dan 600 mg/kg.BB dapat meningkatkan kadar BDNF dalam serum darah.²⁰ Pemberian ekstrak CeA pada dosis 300 mg/kg.BB dan 600 mg/kg.BB selama 28 hari berturut – turut pada tikus Wistar jantan usia 6 bulan diharapkan dapat meningkatkan ekspresi protein *synaptophysin* dan PSD-95 pada neuron hipokampus. Dengan demikian, melalui penelitian kali ini akan dibuktikan bahwa ekstrak CeA dapat digunakan sebagai bentuk pencegahan terhadap penurunan fungsi memori.

1.3 Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka pertanyaan penelitian ini, adalah:

1. Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol CeA dosis 300 mg/kg.BB dan 600 mg/kg.BB dalam meningkatkan ekspresi protein *synaptophysin* di hipokampus tikus Wistar Jantan?

2. Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol CeA dosis 300 mg/kg.BB dan 600 mg/kg.BB dalam meningkatkan ekspresi protein PSD-95 di hipokampus tikus Wistar jantan?
3. Apakah terdapat korelasi antara ekspresi protein *synaptophysin* dan PSD-95 dengan fungsi memori di hipokampus tikus Wistar jantan yang diberikan ekstrak etanol CeA dosis 300 mg/kg.BB dan 600 mg/kg.BB?

1.4 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* meningkatkan ekspresi protein *synaptophysin* di hipokampus tikus Wistar jantan.
2. Pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* meningkatkan ekspresi PSD-95 di hipokampus tikus Wistar jantan.
3. Terdapat korelasi antara ekspresi protein *synaptophysin* dan PSD-95 dengan fungsi memori di hipokampus tikus Wistar jantan yang diberikan ekstrak etanol *Centella asiatica*.

1.5 Tujuan Penelitian

1.5.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Centella asiatica* terhadap plastisitas sinaps melalui ekspresi protein *synaptophysin* dan PSD-95 di hipokampus tikus Wistar jantan.

1.5.2 Tujuan Khusus

Membandingkan dan menganalisis:

1. Pengaruh ekstrak *Centella asiatica* dosis 300 mg/kg.BB dan dosis 600 mg/kg.BB terhadap ekspresi protein *synaptophysin* di CA1 hipokampus tikus Wistar jantan.
2. Pengaruh ekstrak *Centella asiatica* dosis 300 mg/kg.BB dan dosis 600 mg/kg.BB terhadap ekspresi protein PSD-95 di CA1 hipokampus tikus Wistar jantan.

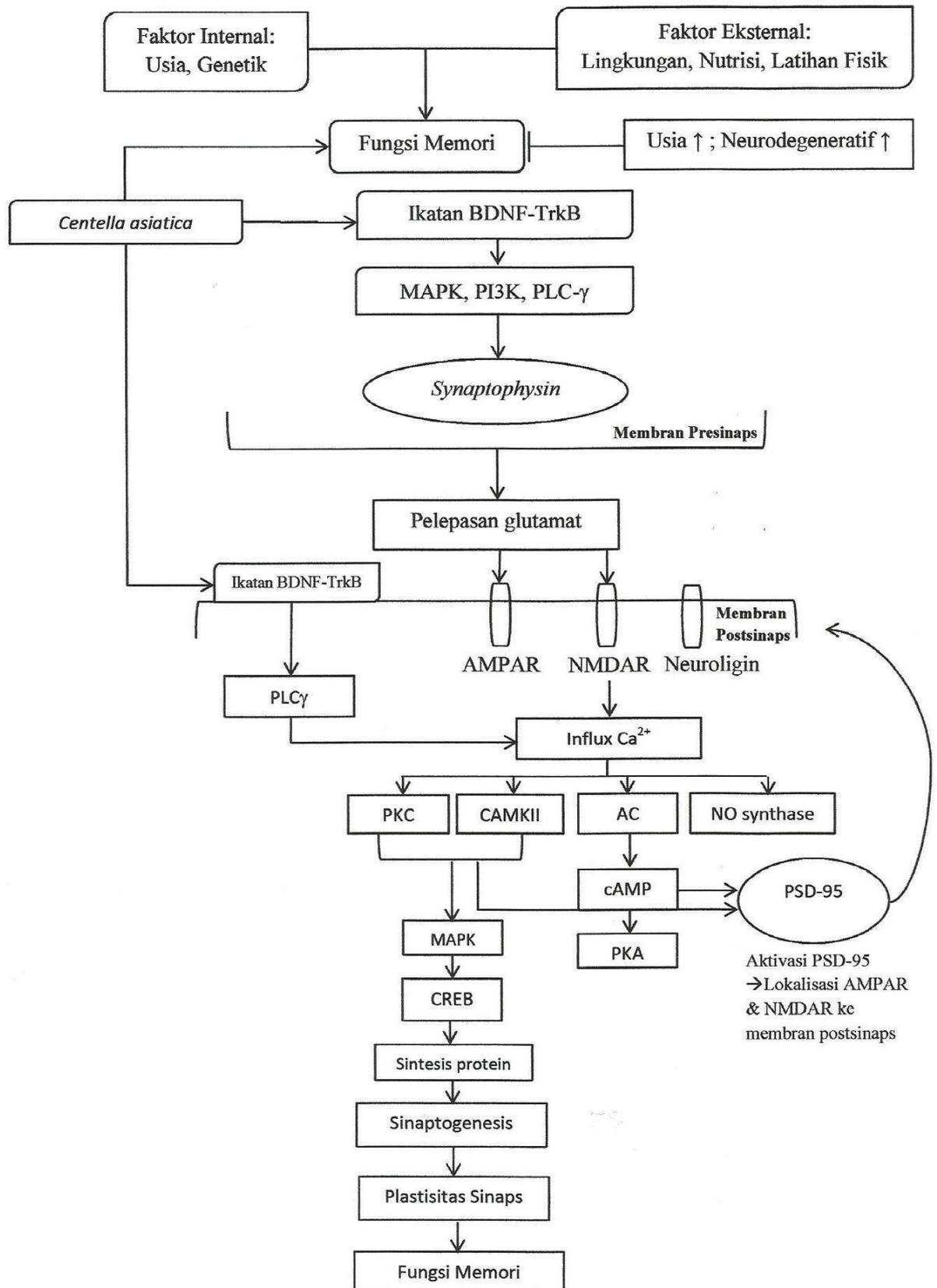
3. Korelasi antara ekspresi protein *synaptophysin* dan PSD-95 dengan fungsi memori di hipokampus tikus Wistar jantan yang diberikan ekstrak etanol *Centella asiatica* dosis 300 mg/kg.BB dan 600 mg/kg.BB.

1.6 Manfaat Penelitian

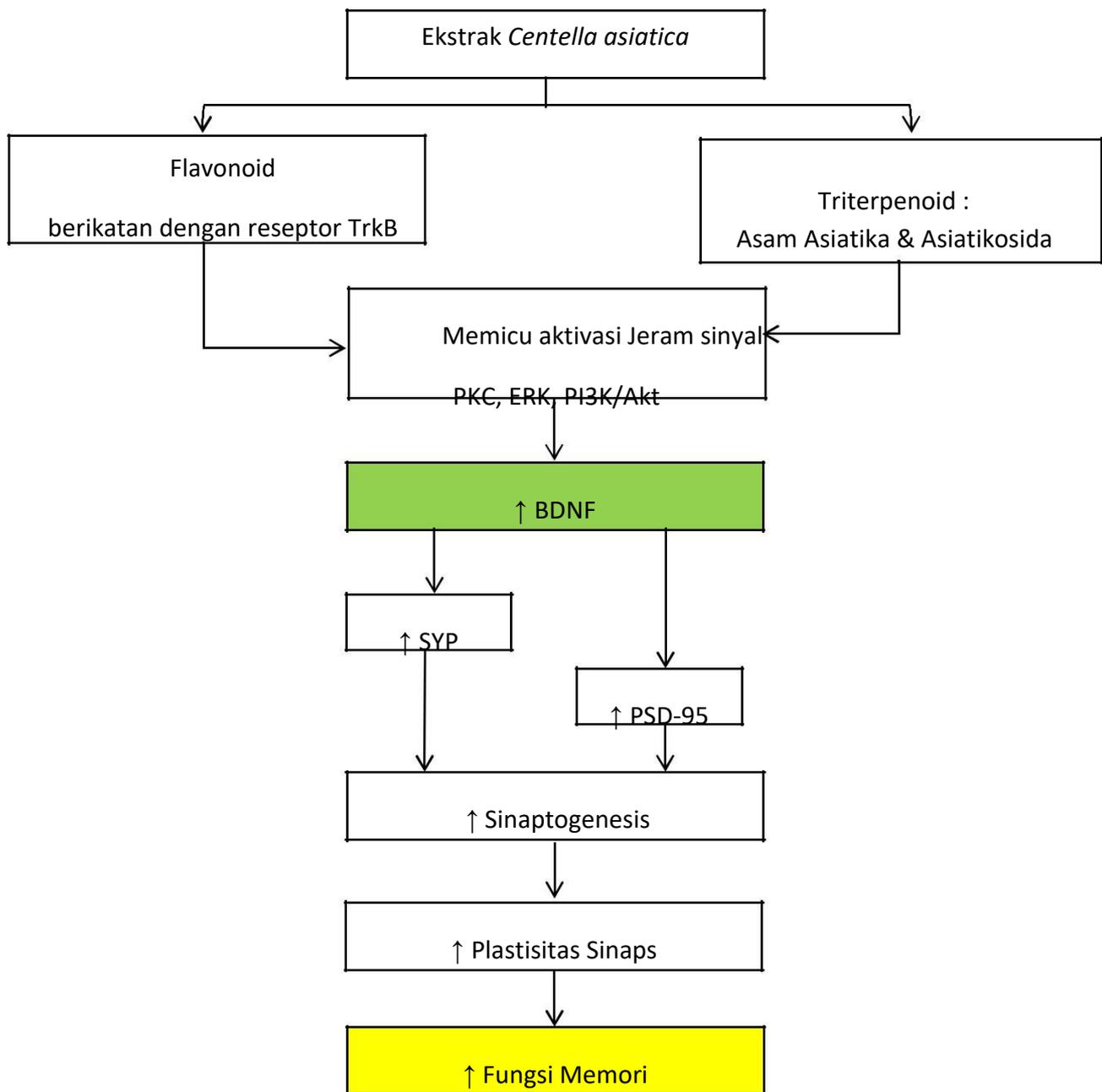
Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi berbagai pihak, di antaranya:

1. Memberikan kontribusi dalam pengayaan keilmuan secara umum mengenai pengaruh ekstrak *Centella asiatica* terhadap plastisitas sinaps di hipokampus, melalui ekspresi protein *synaptophysin* dan PSD-95.
2. Memperluas wawasan mengenai manfaat ekstrak *Centella asiatica* terhadap plastisitas sinaps di hipokampus secara seluler dan molekuler melalui ekspresi protein *synaptophysin* dan PSD-95 terkait pencegahan penurunan fungsi memori.
3. Memberikan ide dan data tambahan bagi penelitian berikutnya mengenai pengaruh ekstrak *Centella asiatica* terhadap plastisitas sinaps di hipokampus.
4. Meningkatkan pengetahuan dan keahlian dalam melakukan penelitian di bidang biomedik.

1.7 Kerangka Teori



1.8 Kerangka Konsep



Keterangan :



Diteliti



Tidak diteliti



Diteliti oleh peneliti
lain dalam 1 tim
penelitian



Data sekunder

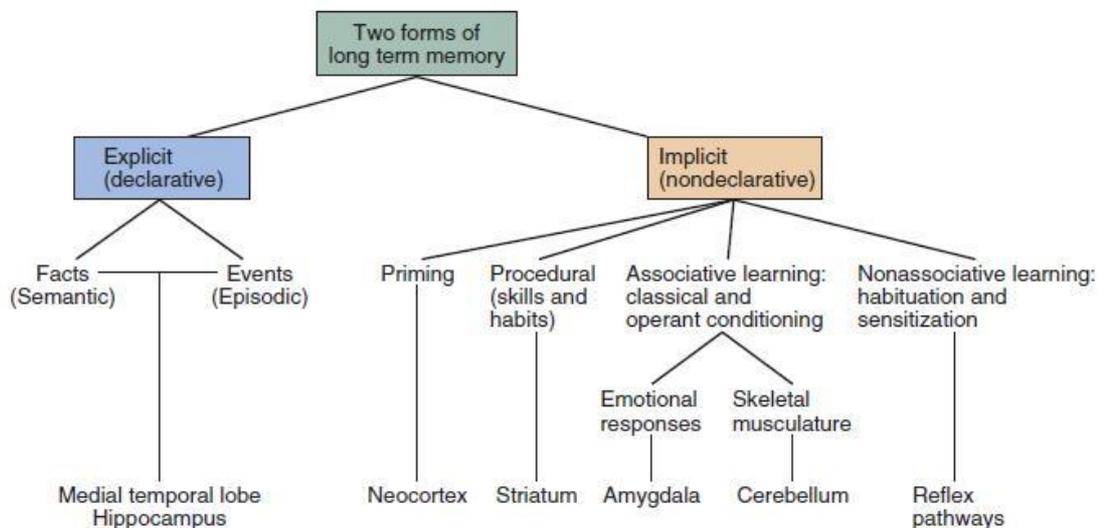
Bab 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pemelajaran dan memori

Pemelajaran merupakan proses mendapatkan pengetahuan atau kemampuan yang didapatkan dari pengalaman, instruksi, atau keduanya. Pemelajaran sangat bergantung pada interaksi individu dengan lingkungannya. Memori merupakan proses penyimpanan pengetahuan atau kemampuan yang telah didapatkan dari pemelajaran untuk kemudian dapat digunakan kembali. Pemelajaran dan memori merupakan dasar bagi individu untuk dapat mengadaptasikan sikapnya terhadap lingkungan sekitarnya. Tanpa mekanisme ini, tidaklah mungkin individu dapat memutuskan untuk berinteraksi dengan baik atau menolak berinteraksi dengan lingkungannya sesuai dengan tujuannya.²⁸

Para ahli fisiologi telah mempelajari mengenai pemelajaran dan memori kemudian membedakannya menjadi jenis – jenis memori. Berdasarkan pada jenis informasi yang disimpan, memori terbagi menjadi dua bagian besar yaitu memori deklaratif dan memori non deklaratif.^{29, 30}



Gambar 2. 1 Jenis – jenis memori³¹

Memori deklaratif disebut juga sebagai memori eksplisit karena memori tersebut dihasilkan secara sadar. Memori deklaratif mudah dibentuk namun mudah juga dilupakan. Memori deklaratif mencakup dua jenis memori yaitu memori semantik yang merupakan memori mengenai fakta, kata – kata atau konsep dan memori episodik yakni memori mengenai kejadian atau pengalaman hidup. Memori ini tersimpan di bagian lobus temporal medial dan hipokampus.^{29, 32}

Memori non deklaratif disebut juga memori implisit karena dihasilkan dari pengalaman yang telah terbentuk sebelumnya. Memori non deklaratif memerlukan pengulangan dan latihan dalam waktu lama, namun memori ini sulit dilupakan. Memori non deklaratif merupakan memori prosedural yakni memori mengenai kemampuan, kebiasaan dan perilaku. Sebagai contoh memori prosedural yaitu kemampuan mengendarai sepeda, bermain piano, ataupun mengikat tali sepatu. Memori prosedural ini melibatkan beberapa bagian di otak yaitu serebelum, striatum, amigdala dan hampir seluruh bagian – bagian otak, serta jalur refleks.^{29, 32}

Pembentukan memori prosedural melalui dua kategori pembelajaran yaitu pembelajaran non asosiatif dan pembelajaran asosiatif. Pembelajaran non asosiatif yaitu perubahan respon sikap yang terjadi terhadap satu jenis stimulus. Pembelajaran non asosiatif terdiri atas dua jenis yaitu habituasi dan sensitisasi. Habituasi merupakan pembelajaran mengabaikan stimulus yang kurang penting sedangkan sensitisasi merupakan bentuk pembelajaran yang meningkatkan respon terhadap stimulus tertentu yang sebelumnya tidak menimbulkan reaksi. Pembelajaran asosiatif akan menghasilkan respon terhadap dua kejadian terkait. Pembelajaran asosiatif terdiri atas dua jenis yaitu *classical conditioning* dan *instrumental conditioning*. *Classical conditioning* yakni mengasosiasikan stimulus yang memicu respon dengan stimulus yang secara normal tidak menimbulkan respon. Subyek belajar bahwa satu stimulus akan menimbulkan stimulus lain. *Instrumental conditioning*, yakni mengasosiasikan suatu respon dengan aksi motorik terhadap stimulus yang berarti. Subyek belajar bahwa suatu respon akan memberikan konsekuensi tertentu.²⁹

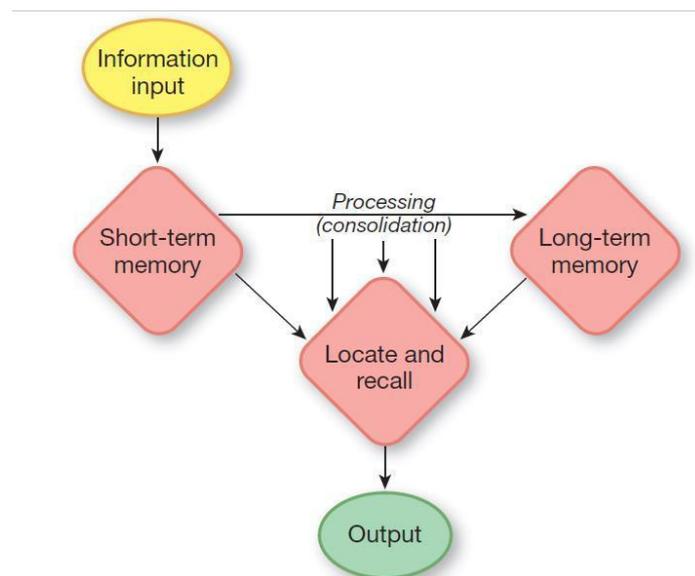
Memori deklaratif dan beberapa bentuk memori non deklaratif melibatkan memori jangka pendek dan jangka panjang. Memori jangka pendek yakni memori yang bertahan beberapa detik hingga beberapa jam. Memori jangka panjang yakni memori yang disimpan selama beberapa tahun dan terkadang seumur hidup.³¹

2.1.1 Proses pembentukan memori

Memori memiliki berbagai tingkatan penyimpanan dan proses penyimpanan memori berubah – ubah secara konstan. Ketika stimulus masuk ke sistem saraf pusat, maka stimulus tersebut diproses menjadi memori jangka pendek, yaitu daerah penyimpanan yang terbatas yang dapat menahan hanya 7 – 12 potongan informasi pada satu waktu. Memori jangka pendek akan mudah hilang kecuali dengan usaha seperti pengulangan, sehingga akan membuatnya menjadi bentuk memori yang lebih permanen. Bentuk memori yang lebih permanen disebut memori jangka panjang yaitu daerah penyimpanan memori yang mampu menampung sejumlah besar informasi dalam jangka waktu lama.³³ Proses penyimpanan memori yang mengubah memori jangka pendek menjadi memori jangka panjang disebut konsolidasi. Selama proses konsolidasi, memori dapat digunakan dan diingat kembali. Memori kerja, yang merupakan bentuk khusus dari memori jangka pendek, akan menyatukan informasi yang baru didapat dengan informasi yang telah lama disimpan sehingga dapat digunakan untuk memberikan respon yang sesuai. Memori kerja dibedakan dari memori jangka pendek dengan kapasitasnya yang sangat terbatas, diperlukannya pengulangan, dan durasinya yang sangat pendek. Memori jangka pendek masih dapat bertahan tanpa pengulangan, namun memori jangka pendek dapat segera terlupakan bila tidak mengalami konsolidasi menjadi memori jangka panjang.^{29, 33}

Memori kerja merupakan tipe kompleks dari memori jangka pendek yang digunakan sebagai dasar untuk melakukan aktivitas sehari – hari. Memori kerja secara temporer mempertahankan dan mengkorelasikan berbagai potongan informasi yang relevan dengan tugas mental yang sedang dikerjakan. Memori kerja dihasilkan dari pemrosesan data yang baru didapat

kemudian dikorelasikan dengan pengetahuan yang telah disimpan sebelumnya sehingga dapat mengevaluasi data yang baru masuk tersebut. Dengan adanya memori kerja, seseorang dapat mempertahankan dan memproses data untuk segera digunakan.²⁸ Fungsi integrasi ini sangat penting terutama untuk keperluan penalaran, perencanaan, membuat penilaian, pemahaman, dan pemelajaran.^{28, 34} Memori kerja mempertahankan informasi dalam bentuk atau tahap yang sangat mudah diakses dengan waktu yang sangat singkat (beberapa detik hingga beberapa menit).³⁵ Istilah memori kerja diadopsi secara independen oleh Olton³⁴ yakni dengan menghubungkan performa hewan coba seperti tikus dalam melaksanakan tugas pada labirin radial multilengan. Hewan coba tersebut diberikan beberapa percobaan per hari sehingga dapat mengingat lengan mana yang telah dikunjungi untuk mendapatkan makanan lebih cepat.³⁴ Memori kerja pada dasarnya melibatkan berbagai representasi (seperti verbal, visual, auditori, spasial) dan prosedur atau tindakan yang berurutan (seperti ketika memasak mengikuti resep). Memori kerja melibatkan beberapa bagian otak yang berbeda dimana representasi tersebut disimpan.³⁵



Gambar 2. 2 Proses pembentukan memori.³³

2.1.2 Plastisitas sinaps sebagai bentuk molekuler pembentukan memori

Para ahli yang telah mempelajari konsolidasi memori jangka pendek menjadi memori jangka panjang, menemukan bahwa proses yang terlibat dalam pembentukan memori mencakup adanya perubahan koneksi sinaps pada sirkuit yang terlibat dalam proses pembelajaran.³³ Perubahan kekuatan sinaps disebut dengan plastisitas sinaps.⁵ Sinaps dibentuk oleh kontak fungsional antara akson dengan terminal post-sinaps neuron target yang berdekatan. Perubahan persisten pada sinaps akan menghasilkan potensiasi jangka panjang (LTP) yang merupakan dasar pembentukan dan penyimpanan memori.¹⁶ LTP akan bertahan selama beberapa hari atau minggu, cukup lama untuk mengkonsolidasi memori jangka pendek menjadi memori jangka panjang. LTP ini paling sering terjadi di hipokampus, yang merupakan daerah penting untuk mengubah memori jangka pendek menjadi memori jangka panjang.²⁸

2.1.3 Peran hipokampus dalam plastisitas sinaps

Hipokampus merupakan bagian dari otak mamalia yang memiliki kapasitas reorganisasi struktural. Hipokampus telah dinyatakan sebagai struktur yang plastis sepanjang hidup, yaitu dengan terjadinya neurogenesis yang terus menerus melalui modifikasi sirkuit saraf pada kompleksitas dendrit dan jumlah sinaps. Dengan strukturnya yang plastis maka dinyatakan bahwa hipokampus memiliki berbagai fungsi seperti pembelajaran dan memori,

kecemasan dan regulasi stres.

^{36, 37}

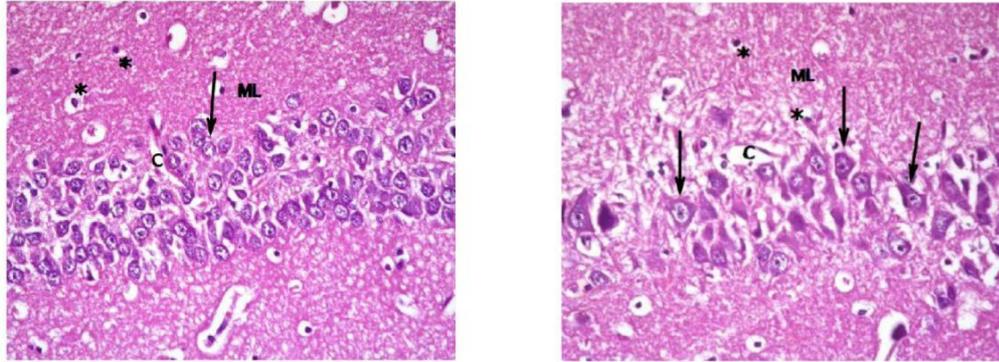
Selain itu, hipokampus juga merupakan

bagian otak yang paling sering digunakan untuk mempelajari plastisitas sinaps seperti LTP dan LTD.³⁸

Hipokampus terletak di tepi lobus temporal korteks serebri.³⁷ Hipokampus terdiri atas dua lapis tipis sel saraf yang melipat di atas satu sama lain. Satu lapis disebut girus dentatus (*dentate gyrus*) dan lapis lainnya disebut tanduk Ammon (*Ammon's horn*).³⁹ Secara histologis, tanduk Ammon terbagi lagi menjadi empat bagian yaitu CA1, CA2, CA3 dan CA4.³⁷ Dari empat area pada tanduk Ammon, terdapat dua area penting yaitu Cornu Ammonis 3 (CA3) dan Cornu Ammonis 1 (CA1).³⁹ CA1 terdiri atas sel piramidal dan

berperan penting dalam mencocokkan informasi yang didapat dari CA3. Di seberang CA1 terletak *subiculum*, yang menghubungkan hipokampus dengan korteks enthorinal.³⁷

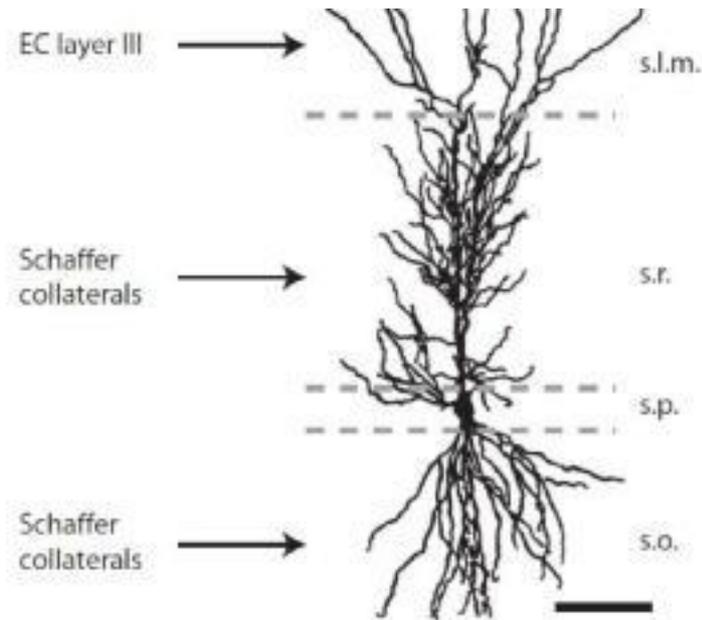
Gambaran histologis hipokampus terdiri atas sel piramidal pada bagian tanduk Ammon dan sel granular pada girus dentatus. Sel piramidal pada tanduk Ammon hipokampus berbentuk segitiga membulat atau menyerupai tetesan air dengan jumlah sitoplasma dan spina dendrit yang bervariasi. Neuron piramidal hipokampus dikarakteristikan dengan nukleus berbentuk bulat ditengah dengan kromatin halus. Neuron piramidal juga ditandai dengan dendrit yang panjang mengerucut berawal dari dasar soma.^{40 41} Pada area CA1 hipokampus terdiri atas sel – sel piramidal yang ukurannya lebih kecil dibandingkan dengan sel piramidal di CA3 hipokampus. Pada girus dentatus terdiri atas sel – sel granular yang kecil. Di antara area hipokampus tersebut terdapat akson, dendrit, sel glial dan sel – sel neuron yang tersebar.⁴² Sel piramidal di hipokampus juga dikenal sebagai *place cell*, yakni neuron dengan pola *firing* yang spesifik terhadap lokasi. *Place cell* merupakan neuron hipokampus yang aktif pada frekuensi tinggi ketika seekor hewan mengunjungi suatu wilayah tertentu dari suatu lingkungan. Sebagian *place cell* aktif sebagai respon terhadap kombinasi posisi seekor hewan dan faktor lain seperti perilaku atau rangsangan sensoris, sedangkan sebagian *place cell* lainnya aktif hanya berdasarkan posisi hewan saja. Pada area CA1, sel piramidal menunjukkan aktivitas *place cell* yang paling menonjol dibandingkan area lain di hipokampus, yakni berkisar 10 – 25% sel piramidal di CA1 menunjukkan aktivitas *place cell* ini. *Place cell* tidak hanya ditemukan pada tikus dan mencit, tetapi juga ditemukan di hipokampus manusia.^{43, 44}



Gambar 2. 3 Gambaran histologis sel piramidal hipokampus (A) nampak 5-6 lapisan padat dari sel – sel piramidal di area CA1 hipokampus, dan (B) beberapa lapisan longgar sel piramidal di area CA3 hipokampus. (Tanda panah: Nukleus vesikular ; tanda bintang (*) : sel glia ; ML: Lapisan Molekular ; C: Cornu).⁴²

Struktur CA1 hipokampus terdiri atas empat lapisan. Lapisan selular utama disebut lapisan sel piramidal. Lapisan sel piramidal sangat padat pada CA1 dan agak longgar di regio CA2 dan CA3. Sel piramidal pada CA1 menunjukkan percabangan dendrit yang lebih homogen dibandingkan dengan CA2 dan CA3. Lapisan sel yang relatif bebas dekat dengan lapisan sel piramidal CA1 disebut dengan stratum oriens. Lapisan ini terdiri atas basal dendrit sel – sel piramidal dan beberapa interneuron. Stratum radiatum terletak persis di atas lapisan sel piramidal CA1. Stratum *lacunosum-molekulare* merupakan lapisan dimana serat dari korteks enthorinal berakhir. Stratum radiatum dan stratum *lacunosum-molekulare* terdiri atas apikal dendrit.⁴⁵

Neuron piramidal CA1 memiliki sekitar 30.000 spina dendrit. Struktur spina tidak statis melainkan mengalami perubahan sesuai respon terhadap aktivasi reseptor neurotransmitter atau lingkungan dan sinyal hormonal. Pertumbuhan spina baru dan perubahan struktur spina yang telah ada merupakan substrat yang cocok bagi plastisitas sinaps di hipokampus.⁴⁵

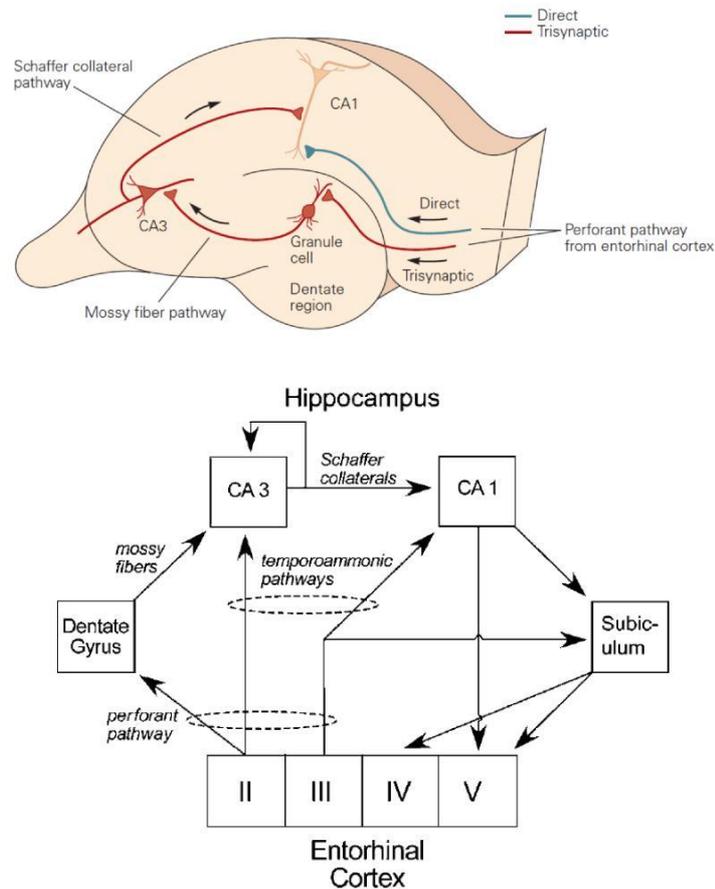


Gambar 2. 4 Morfologi dendrit CA1 dan input sinaptik. Badan sel neuron piramidal terletak di stratum pyramidale (s.p), basal dendrit di stratum oriens (s.o), apical dendrit di stratum radiatum (s.r) dan stratum *lacunosum-molekulare* (s.l.m).⁴⁵

Hipokampus menerima informasi spasial dan sensoris multimodal dari korteks enthorinal dan jalur keluar utama dari hipokampus adalah melalui neuron piramidal di area CA1 yang diproyeksikan kembali ke korteks enthorinal dan ke *subiculum*. Informasi dari korteks enthorinal mencapai neuron CA1 melalui dua jalur eksitatori, yaitu jalur langsung (*direct pathway*) dan jalur tidak langsung (*indirect pathway*). Kedua input tersebut dinamakan jalur perforan (*perforant pathway*).³²

Jalur langsung berasal dari neuron layer III korteks enthorinal. Akson dari neuron ini membentuk sinaps pada bagian distal apikal dendrit neuron CA1. Jalur ini juga disebut dengan *temporoammonic pathway*. Pada jalur tidak langsung, informasi dari neuron layer II korteks enthorinal mencapai neuron CA1 melalui *trisynaptic pathway*. Neuron layer II korteks enthorinal terproyeksikan melalui jalur perforan menuju sel granul di girus dentatus. Akson sel granul terproyeksikan di jalur *mossy fiber* (*mossy fiber pathway*) untuk mengeksitasi sel piramidal di area CA3 hipokampus. Selanjutnya, akson

CA3 terproyeksikan melalui jalur *Schaffer collateral* (*Schaffer collateral pathway*) untuk membuat sinaps eksitatori pada bagian paling proksimal dendrit sel piramidal pada area CA1. Karena neuron piramidal pada area CA1 menerima informasi melalui dua jalur tersebut, neuron CA1 dapat membandingkan informasi pada sirkuit tidak langsung dengan input sensoris dari jalur langsung.³²



Gambar 2.5 Anatomi hipokampus (atas) dan jalur pengolahan informasi (bawah).^{32, 46}

Sebagian besar penelitian dan literatur terfokus pada area CA1 hipokampus. Hal ini dikarenakan bahwa rekaman potensial aksi dan kejadian intraseluler relatif lebih mudah didapatkan pada CA1 hipokampus. Selain itu, akson *Schaffer collateral* dari CA3 membentuk jalur yang homogen sehingga lebih mudah untuk dilakukan penelitian transmisi dan plastisitas sinaps. Berbagai penelitian menggunakan area CA1 juga dikarenakan sel piramidal

area CA1 memiliki apikal dendrit yang lebih besar dan lebih mudah untuk menjaga sel di regio tersebut tetap utuh. Faktor – faktor tersebut dapat memudahkan dalam memahami transmisi sinaps, integrasi dendrit, dan plastisitas sinaps.⁴⁵

Penemuan penting oleh Timothy Bliss dan Terje Lomo pada tahun 1973 menyatakan bahwa rangsangan elektrik frekuensi tinggi pada sinaps jalur perforan pada neuron girus dentatus akan menghasilkan LTP.³⁷ Penelitian berikutnya menyatakan bahwa, rangsangan frekuensi yang tinggi juga menghasilkan LTP pada semua jalur trisinaptik dan juga pada jalur langsung yang bersinaps dengan neuron CA1.³² Potensiasi jangka panjang di sinaps hipokampus terutama pada area CA1 merupakan bentuk plastisitas yang paling sering dipelajari, yang terdiri atas tiga rangkaian tahapan yaitu potensiasi jangka pendek dan *early-LTP*, dan *late-LTP*.⁴⁷

2.1.4 Mekanisme LTP di hipokampus

Potensiasi jangka panjang (LTP) dijelaskan sebagai perubahan kekuatan sinaps yang dihasilkan oleh stimulasi yang kuat pada jalur saraf.³² Dengan kata lain, LTP merupakan penguatan sinaps yang telah ada sebelumnya akan meningkatkan kemampuan neuron presinaps mengeksitasi neuron post-sinaps, sehingga sinaps yang terbentuk berikutnya akan semakin kuat. Potensiasi jangka panjang (LTP) memiliki dua fase. Suatu rangkaian potensial aksi yang menghasilkan sebuah fase LTP yang bertahan 1 hingga 3 jam disebut dengan *early LTP* (E-LTP), sedangkan empat atau lebih rangkaian stimulasi sinaps akan menginduksi *late LTP* (L-LTP) yang bertahan hingga 24 jam. Fase E-LTP hingga kini dijelaskan tidak memerlukan sintesis protein baru, aktivasi *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP), ataupun protein kinase A (PKA) sedangkan fase L-LTP memerlukan cAMP dan PKA, serta perubahan pada transkripsi gen dan sintesis protein baru.³²

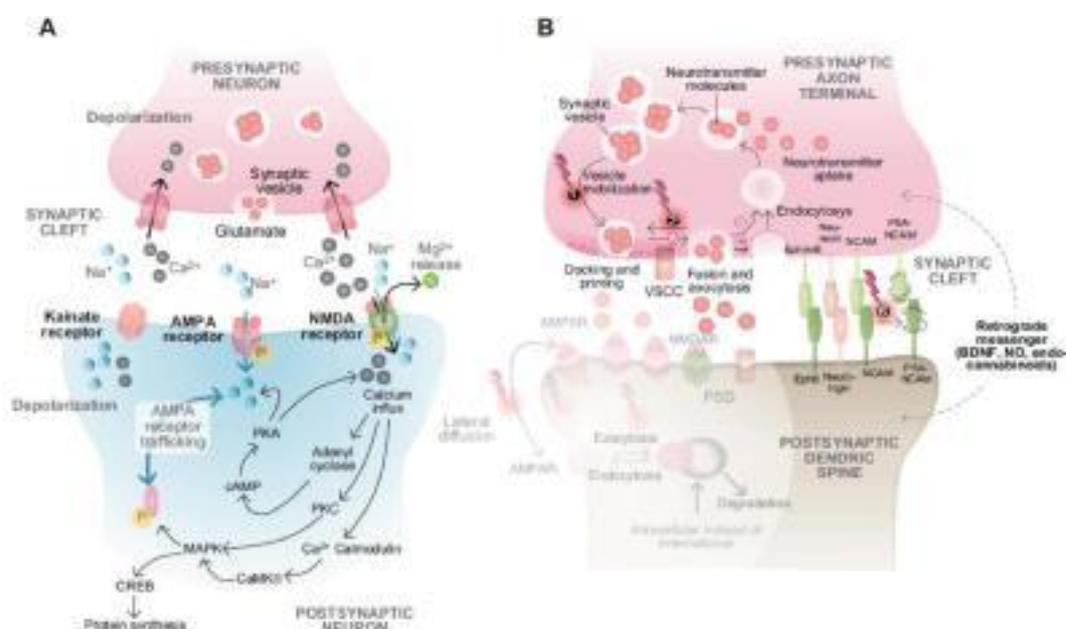
Berbagai proses terjadi dalam penguatan sinaps dan pembentukan LTP. Diawali dengan adanya potensial aksi di presinaps akan menghantarkan sinyal

menuju post-sinaps. Potensial aksi yang mencapai presinaps akan membuat masuknya ion kalsium melalui *voltage-sensitive calcium channels* (VSCC) menyebabkan pelepasan glutamat pada zona aktif (*active zone*, AZ). Neurotransmitter ini kemudian akan terikat pada ligannya di neuron post-sinaps yaitu pada reseptor AMPA dan NMDA.⁴⁴

Aktivasi pada post-sinaps dimulai setelah neurotransmitter glutamat terikat dengan reseptor AMPA menyebabkan terbukanya kanal reseptor AMPA sehingga ion Na^+ masuk ke dalam neuron post-sinaps dan menyebabkan depolarisasi. Aktivasi kanal reseptor NMDA tidak hanya memerlukan ikatan dengan neurotransmitter glutamat, tetapi juga memerlukan depolarisasi membran. Depolarisasi ini kemudian akan membuat ion Mg^{2+} terlepas dari kanal reseptor NMDA sehingga membuat ion kalsium masuk ke dalam sitosol post-sinaps yang kemudian mengaktifkan enzim – enzim kalsium dependen seperti *calcium/calmodulin-dependent kinase II* (CAMKII), protein kinase C (PKC), dan *adenyl cyclase* (AC). *Adenyl cyclase* akan mengaktifkan PKA melalui cAMP. Aktivasi PKC dan CAMKII akan mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang akan mengawali jeram sinyal untuk memudahkan insersi reseptor AMPA pada membran dengan fosforilasi *subunit* reseptor AMPA yang spesifik. Aktivasi MAPK oleh PKC dan CAMKII juga diketahui memicu transkripsi di nukleus melalui jalur fosforilasi CREB yang akan mengaktifasi sintesis protein baru di post-sinaps.⁴⁴ Dengan meningkatnya ketersediaan reseptor AMPA pada post-sinaps, maka neuron post-sinaps akan mengalami potensiasi yang lebih besar sebagai respon terhadap pelepasan glutamat dari neuron presinaps. Tingginya sensitivitas neuron post-sinaps terhadap glutamat dari neuron presinaps akan mempertahankan LTP.²⁸

Post-sinaps melepaskan sinyal *retrograde* menuju presinaps. Protein – protein sinyal *retrograde* seperti *brain-derived neurotropic factor* (BDNF), *nitric oxide* (NO), dan endocannabinoids akan dilepaskan oleh post-sinaps dan terikat dengan reseptornya di membran presinaps. Kemudian ikatan protein dengan reseptornya tersebut akan memicu pelepasan neurotransmitter yaitu

dengan memodulasi masuknya ion kalsium ke dalam membran presinaps. Meningkatnya konsentrasi ion kalsium diikuti dengan mobilisasi vesikel dalam jumlah besar yang menyebabkan proses *docking* dan *priming* vesikel dan diakhiri dengan fusi vesikel serta pelepasan neurotransmitter. Vesikel akan di daur ulang dengan proses endositosis dan neurotransmitter akan dibawa kembali oleh transporter spesifik. Sinyal *retrograde* menyebabkan perubahan pelepasan neurotransmitter pada sisi presinaps, yang artinya penguatan sinaps juga dapat ditentukan melalui mekanisme presinaps, termasuk tingginya mobilisasi vesikel dan tingginya pelepasan neurotransmitter.⁴⁴ *Feedback* positif dari sinyal *retrograde* ini akan memperkuat sinyal pada sinaps dan juga mempertahankan LTP.²⁸



Gambar 2. 6 Jeram sinyal yang memediasi penguatan sinaps dan pembentukan LTP. **A.** Sinyal dari presinaps ke post-sinaps. **B.** sinyal *retrograde* dari post-sinaps ke presinaps.⁴⁴

2.2 Peran protein presinaps dan post-sinaps dalam pembentukan memori

Proses pembentukan dan penyimpanan memori didasari oleh perubahan pada sinaps atau disebut plastisitas sinaps. Sinaps terdiri atas protein – protein dimana beberapa di antaranya berperan langsung dalam transmisi sinaps, sedangkan beberapa protein lainnya meregulasi fungsi sinaps atau berperan

sebagai protein perancah struktural.⁴⁸ Perubahan kekuatan sinaps yang mendasari proses memori dapat terjadi pada kedua sisi sinaps yaitu baik di presinaps maupun di post-sinaps. Plastisitas sinaps yang terjadi di presinaps mencakup perubahan jumlah neurotransmitter yang dilepaskan, sedangkan di post-sinaps melibatkan perubahan jumlah reseptor post-sinaps.⁴⁹

2.2.1 *Synaptophysin*

Komunikasi antar sinaps melibatkan proses pelepasan neurotransmitter dari terminal presinaps, difusi melewati celah sinaps, dan kemudian berikatan dengan reseptor di post-sinaps. Neurotransmisi terjadi sangat cepat dan teratur. Terminal presinaps terdiri atas vesikel sinaps yang berisi neurotransmitter, matriks padat sitoskeleton dan protein perancah pada daerah pelepasan neurotransmitter yang disebut zona aktif. Probabilitas pelepasan neurotransmitter sangat bervariasi sehingga mempengaruhi jumlah neurotransmitter yang dilepaskan. Hal ini menjadi salah satu mekanisme yang dapat mengubah kekuatan sinaps selama plastisitas sinaps.⁵⁰

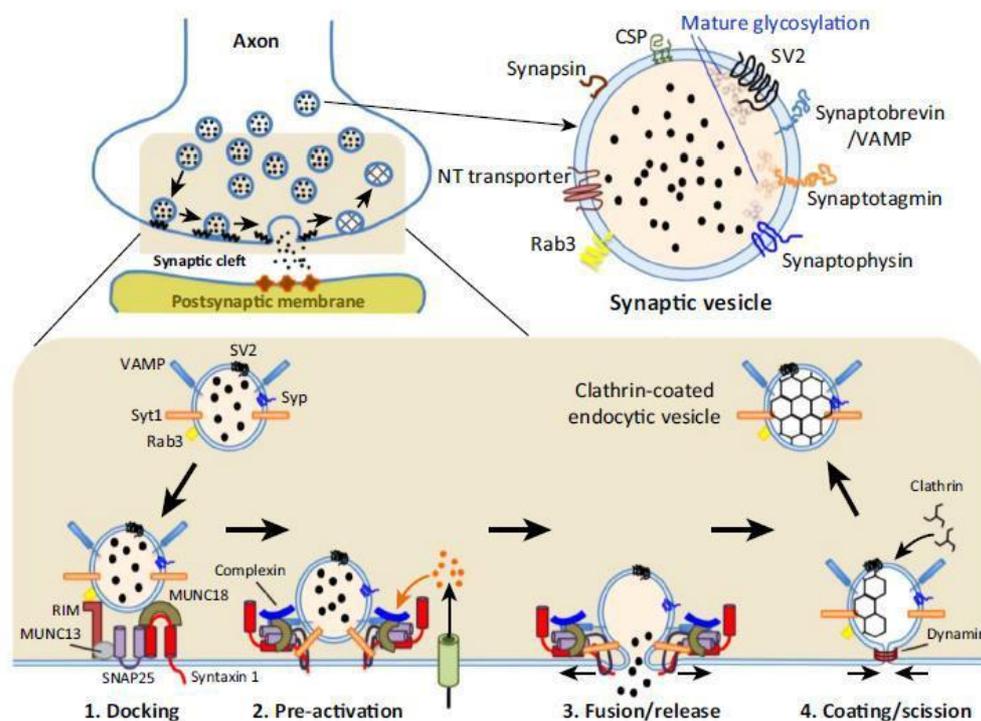
Vesikel sinaps adalah organel utama di presinaps dengan diameter 40 nm yang membawa neurotransmitter ke celah sinaps untuk kemudian dilepaskan, dan menyebarkan sinyal antar neuron ketika berfusi dengan membran plasma. Setiap terminal presinaps mengandung ratusan vesikel sinaps yang berisi neurotransmitter.^{51, 52} Siklus hidup vesikel sinaps merupakan proses yang kompleks dan sangat teratur diawali dengan endositosis, maturasi, pemuatan neurotransmitter hingga *docking* dan pelepasan neurotransmitter. Dalam proses siklus hidupnya, vesikel sinaps dipengaruhi oleh protein vesikel sinaps.⁵² Beberapa tipe protein vesikel sinaps seperti *vamp*, *rab3A*, *synaptophysin*, dan *synaptotagmin* berperan dalam transpor vesikel sinaps menuju zona aktif pada membran presinaps, fusi vesikel sinaps pada membran sinaps, dan serangkaian proses daur ulang vesikel sinaps di terminal presinaps.⁵³

Synaptophysin (SYP) merupakan glikoprotein yang terikat kalsium dengan berat 38-kDa,⁵⁴ dan merupakan protein vesikel sinaps terbanyak diperkirakan mencapai jumlah 8 – 10% dari total protein vesikel.⁵⁵ Terdapat

sebanyak 30 salinan SYP pada tiap vesikel sinaps. SYP merupakan anggota dari keluarga protein *physin* yang terdiri atas *synaptoporin* (SYNPR), *pantophysin* (SYPL1), *mitsugumin* (SYPL2), dan *synaptogyrin* 1-4 (SNG1-4). SYP memiliki struktur yang menyerupai kanal heksamerik dan SYP membentuk kanal yang sensitif terhadap kalsium.⁵² Karena SYP secara khusus terletak di vesikel sinaps, maka seringkali SYP digunakan sebagai marker presinaps. Penelitian molekuler menyatakan sejumlah peran SYP dalam fungsi sinaps antara lain, eksositosis, pembentukan sinaps, biogenesis dan endositosis vesikel sinaps.¹⁰

Peran SYP dalam proses transpor vesikel sinaps dijelaskan sebagai berikut. Proses transpor vesikel sinaps terdiri atas fase *docking*, *priming*, fusi dan endositosis. Pada fase *docking*, vesikel sinaps yang berkontak dengan membran plasma terjadi melalui ikatan kompleks antara protein – protein syntaxin 1, *synaptosomal-associated protein 25* (SNAP25), dan *vesicle associated membrane protein* (VAMP) yang tergabung dalam *soluble NSF attachment protein receptor* (SNARE) dengan efektor SNARE seperti *mammalian homologue of UNC-18* (MUNC-18). Fase berikutnya yaitu *priming*, diawali dengan meningkatnya konsentrasi ion Ca^{2+} di presinaps di deteksi oleh SYP, kemudian mengubah konformasi kompleks SNARE menjadi lebih ketat oleh protein *synaptotagmin*. Perubahan konformasi tersebut akan menginduksi vesikel sinaps berfusi dengan membran plasma dan mengeluarkan isinya berupa neurotransmitter ke celah sinaps. Proses tersebut dinamakan fusi. Setelah fusi selesai, akan terjadi endositosis yaitu proses mengembalikan vesikel sinaps kembali ke *releaseable pool*. Endositosis vesikel sinaps memiliki beberapa cara. Pertama, pori fusi menutup langsung dipotong oleh protein *dynamin* dan terbentuklah kembali vesikel sinaps. Proses endositosis yang pertama ini disebut *kiss and run*. Cara kedua yaitu, fusi lengkap, yaitu dengan meratakan vesikel sinaps ke permukaan membran plasma, diikuti endositosis yang diperantarai protein klatrin, SYP, *synaptotagmin*, VAMP dan protein lainnya, membentuk vesikel lalu melepaskan protein klatrin dan mengembalikan vesikel sinaps ke *releaseable pool*. Cara ketiga yaitu dengan fusi lengkap lalu berfusi dengan endosom dan

vesikel yang matang dibentuk di endosom tersebut kemudian barulah vesikel terisi dengan neurotransmitter (lihat Gambar 2.7).⁵⁶



Gambar 2.7 Model SYP dalam proses daur ulang vesikel sinaps.⁵⁶

Synaptophysin berperan pada berbagai tahap dalam siklus hidup vesikel sinaps. Pada pemeriksaan mencit yang kehilangan SYP dinyatakan bahwa terjadi kelainan pada proses endositosis vesikel sinaps. Hal ini disebabkan oleh jumlah vesikel sinaps yang berkurang dan adanya deformasi membran plasma.⁵⁵ Selain itu, SYP juga diketahui terikat dengan VAMP2 pada vesikel sinaps. Penelitian terbaru menyatakan bahwa SYP terlibat dalam lalu lintas VAMP2 dari membran plasma kembali ke vesikel sinaps selama endositosis, dan hal tersebut merupakan fungsi utama SYP.⁵² *Synaptophysin* merupakan protein yang terikat kalsium sehingga sangat berperan dalam proses eksositosis vesikel sinaps yang sangat bergantung pada influks kalsium.⁵⁷

Sejumlah penelitian menyebutkan ekspresi protein SYP terkait dengan *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). BDNF merupakan neurotrophin

yang berperan dalam plastisitas sinaps di otak dengan secara khusus terikat dengan *tropomyosin-related kinase receptor B* (TrkB). Ikatan BDNF-TrkB menyebabkan dimerisasi dan autofosforilasi dari reseptor TrkB, yang kemudian akan memicu aktivitas berbagai jaram sinyal intraseluler, termasuk jalur yang menghasilkan neurogenesis dan pertumbuhan spina.²⁴ BDNF yang berikatan dengan reseptornya TrkB dinyatakan dapat memicu peningkatan ekspresi protein SYP.^{58, 59}

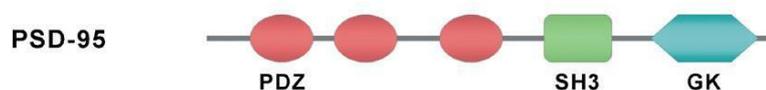
Penelitian lain menyebutkan bahwa mencit yang kekurangan SYP akan mengalami penurunan LTP. Mencit yang kehilangan SYP akan mengalami retardasi mental dan kesulitan dalam proses pembelajaran. Hal ini menunjukkan bahwa SYP berperan dalam meregulasi transmisi sinaps pada sirkuit saraf yang penting dalam pembelajaran dan memori.¹⁰

2.2.2 *Post synaptic density-95 (PSD-95)*

Densitas post-sinaps pada sinaps eksitatori glutamatergik merupakan suatu membran post-sinaps padat elektron yang mengandung kompleks protein makromolekul yang terletak berseberangan dengan daerah dimana vesikel sinaps melepaskan neurotransmitter di zona aktif presinaps.^{12, 14} Densitas post-sinaps ini mengumpulkan dan mengatur reseptor neurotransmitter dan molekul sinyal pada membran post-sinaps, mentransmisikan dan memproses sinyal sinaptik, serta mengalami perubahan struktural untuk mengkode dan menyimpan informasi. Terdapat dua jenis reseptor ionotropik glutamat pada densitas post-sinaps sinaps eksitatori yaitu reseptor AMPA (AMPA) dan reseptor NMDA (NMDAR).¹⁴ Komposisi densitas post-sinaps telah digambarkan dengan metode proteomik dan ditemukan mengandung lebih dari 1000 protein. Salah satu protein terbanyak dalam densitas post-sinaps yaitu protein *Post Synaptic Density 95 (PSD95)*.⁶⁰

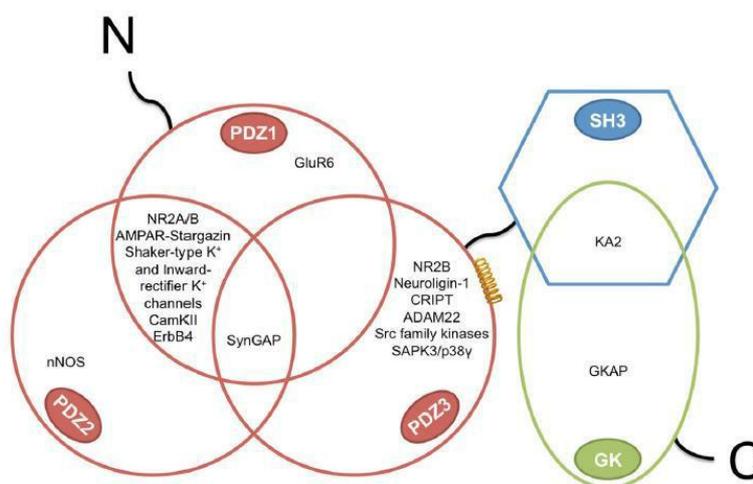
Post synaptic density (PSD-95) merupakan protein perancah utama pada densitas post-sinaps di sinaps eksitatori glutamatergik. PSD-95 termasuk dalam anggota *membrane-associated guanylate kinase (MAGUK)*.¹³ Anggota

protein MAGUK lainnya di antaranya PSD-93/chapsyn-110, SAP97 dan SAP102 yang merupakan protein homolog dari PSD 95.⁶¹ PSD-95 terdiri atas tiga domain PDZ (PSD-95, Dlg, ZO-1/Dlg-regio homolog), domain SH3 (Src-homologi-3) dan domain homolog *guanylate kinase* (GK).⁶²



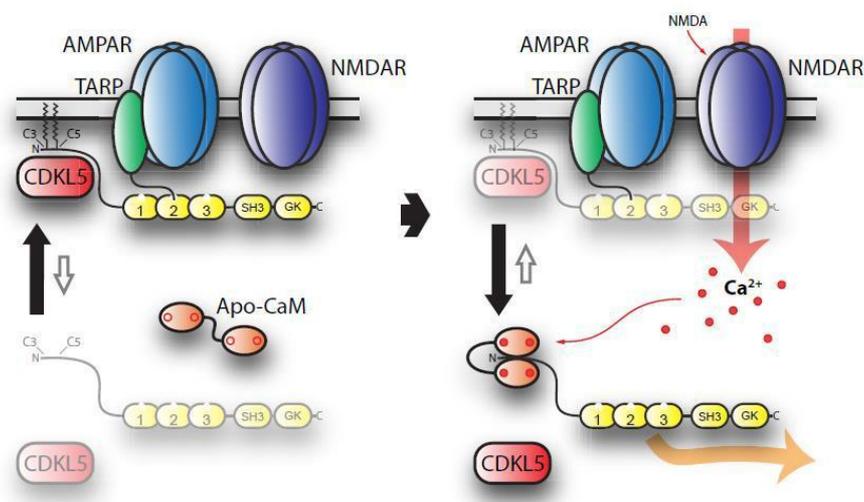
Gambar 2. 8 Diagram skematik dari struktur domain PSD-95, menunjukkan adanya tiga domain PDZ, yaitu domain PSD-95/Dlg/ZO-1, domain SH3, dan domain GK.¹²

Secara umum, PSD-95 berperan dalam mempertahankan dan memodulasi kekuatan sinaps.¹⁴ Fungsi lain PSD-95 antara lain (1) berinteraksi dengan protein membran dan meregulasi lokalisasi sinaps, (2) menstabilisasi protein membran yang sedang berinteraksi pada sinaps, (3) meregulasi sifat fungsional protein membran yang sedang berinteraksi seperti pada reseptor NMDA, (4) merupakan regulator kekuatan dan plastisitas sinaps dengan meregulasi reseptor AMPA (subunit GluR1),¹² serta (5) menjembatani influksi ion Ca^{2+} dengan kejadian jeram sinyal spesifik.⁶³ Selain itu, PSD-95 juga sering digunakan sebagai marker sinaps pada post-sinaps.¹⁵



Gambar 2. 9 Model konformasi domain PDZ pada PSD-95 dan interaksinya dengan molekul dan struktur lain.⁶⁴

PSD-95 memudahkan lokalisasi reseptor AMPA dan reseptor NMDA di post-sinaps yang berperan penting dalam plastisitas sinaps. Lokalisasi kedua reseptor di membran post-sinaps oleh PSD-95 terjadi sebagai respon terhadap influks ion Ca^{2+} melalui reseptor NMDA.⁶⁵ Reseptor NMDA terikat dengan PSD-95 melalui interaksi antara subunit GluN2 (NR2A dan NR2B) dengan PDZ1 dan PDZ2.⁶⁴ Adanya influks ion Ca^{2+} melalui reseptor NMDA membuat PSD-95 lepas dari membran post-sinaps kemudian melokalisasi reseptor AMPA (Gambar 2.10). Hal ini penting untuk restrukturisasi post-sinaps, memperbesar daerah post-sinaps dan meningkatkan reseptor AMPA di membran post-sinaps selama proses LTP.⁶⁵

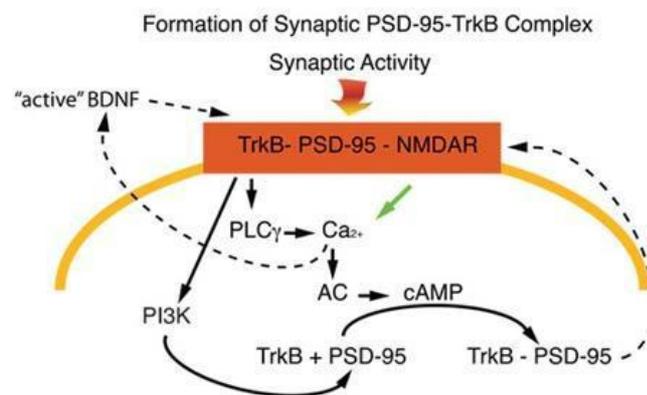


Gambar 2. 10 Influks ion Ca^{2+} melalui reseptor NMDA membuat PSD-95 terlepas dari membran post-sinaps dan bersiap melokalisasi reseptor AMPA melalui ikatan antara PDZ1 dan PDZ2 dengan TARP pada reseptor AMPA.⁶⁵

Mekanisme LTP di hipokampus juga dipengaruhi oleh pengantaran reseptor AMPA menuju membran post-sinaps. Reseptor AMPA merupakan reseptor tipe glutamat yang terdiri atas empat subunit yaitu GLUR 1 - 4 yang terdapat pada sinaps di hipokampus dan korteks. PSD-95 dapat mengontrol jumlah reseptor AMPA di sinaps. Selain itu, munculnya ekspresi PSD-95 di hipokampus dan sinaps kortikal sangat erat dengan munculnya sinaps reseptor glutamat 1 (GLUR1).⁶⁶ PSD-95 meregulasi reseptor AMPA melalui suatu mediator yaitu *stargazin* yang merupakan anggota dari *transmembran AMPA*

receptor regulatory protein (TARP). Stargazin berperan meregulasi maturasi, lalu lintas dan stabilisasi sinaps serta mengontrol sifat biofisika reseptor AMPA. Interaksi antara *stargazin* dengan PDZ1 dan PDZ2 dari PSD-95 akan melokalisasi sinaps Kompleks reseptor AMPA-*stargazin*.

Regulasi PSD-95 dipengaruhi oleh *brain derived neurotropic factor* (BDNF). Sinyal yang dihasilkan oleh ikatan BDNF-TrkB berperan penting dalam perkembangan sinaps dengan meregulasi PSD-95 melalui domain *guanylate kinase* (GK) pada protein PSD-95. PSD-95 disintesis di sitoplasma dan mengalami proses untuk dapat menempel pada membran post-sinaps. Proses tersebut diregulasi oleh sinyal BDNF-TrkB.⁶⁷



Gambar 2. 11 Regulasi PSD-95 oleh ikatan BDNF-TrkB.⁶⁸

Menempelnya BDNF pada reseptornya TrkB akan memunculkan jeram sinyal. Jeram sinyal tersebut antara lain jeram intraselular MAPK, PI3K, PLCγ. Menurut penelitian Yoshii dkk.,⁶⁸ ditemukan bahwa jeram sinyal PLCγ akan meningkatkan aktivitas *adenyl cyclase* (AC) yang sensitif terhadap ion Ca²⁺ penting dalam regulasi PSD-95 menuju membran post-sinaps. Selain itu, jeram sinyal PI3K-Akt juga meregulasi lalu lintas protein PSD-95.

Menurut penelitian disebutkan bahwa PSD-95 ditemukan disepanjang dendrit hipokampus tikus. Overekspresi PSD-95 di neuron hipokampus dapat meningkatkan maturasi sinaps, terutama maturasi sinaps glutamatergik.⁶⁹ Menurut penelitian *in vivo* pada mencit dilaporkan, menurunnya kadar PSD-

95 dapat menyebabkan gangguan proses belajar dan memori. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa mencit dengan bentuk mutasi PSD-95 dengan kehilangan domain PDZ mengalami gangguan proses belajar dan LTP.⁶² Prolong ekspresi PSD-95 diketahui dapat meningkatkan maturasi komponen pre dan post-sinaps pada sinaps eksitatori, meningkatkan jumlah spina dan meningkatkan transmisi glutamatergik.⁶⁶ Dengan demikian PSD-95 merupakan salah satu protein penting yang ikut terlibat dalam proses belajar dan memori.⁶²

2.3 *Centella asiatica*

Centella asiatica merupakan tanaman obat tropis dari famili Apiaceae yang berasal dari negara – negara Asia Tenggara seperti India, Sri Lanka, Cina, Indonesia, Malaysia, Afrika Selatan dan Madagaskar. *Centella asiatica* (CeA) merupakan tanaman tropis yang telah lama digunakan dalam pengobatan Ayurveda dan pengobatan tradisional Cina. Daun CeA ini berwarna hijau kekuningan, tipis, dengan tangkai daun yang panjang, dan memiliki bentuk yang khas yaitu berbentuk ginjal, tepi bergerigi, bundar, atau lonjong-elips dengan tujuh tulang daun. Tanaman ini tumbuh horizontal dengan geragih hijau kemerahan yang bergabung satu sama lain dan berakar di bawah tanah.¹⁷ Di Indonesia, CeA dikenal dengan nama pegagan atau antanan dan sering dijumpai di tempat terbuka, pada tanah yang lembab dan subur seperti di pematang sawah, di padang rumput, di pinggir parit dan di pinggir jalan.¹⁹



Gambar 2. 12 *Centella asiatica* (L.) Urban (Apiaceae).¹⁷

Selama ribuan tahun, CeA telah digunakan oleh banyak orang di seluruh dunia sebagai obat untuk berbagai penyakit. Dalam pengobatan Ayurveda, CeA digunakan untuk meremajakan tubuh, meningkatkan kecerdasan dan melawan gangguan kognisi. Dalam pengobatan tradisional Cina, CeA digunakan sebagai suplemen otak. Selain itu, CeA ini juga dimasukkan sebagai obat dalam praktik medis lainnya seperti *German Homeopathic Pharmacopoeia* (GHP) dan *European Pharmacopoeia*.⁷⁰ Dalam *European Pharmacopoeia*, komisi E di kementerian kesehatan di Jerman dan *World Health Organization* (WHO) terdapat karya ilmiah yang menyatakan CeA berfungsi dalam penyembuhan luka dan peningkatan memori.¹⁷ Di Indonesia sendiri CeA termasuk tanaman obat dan sering dijadikan lalapan dalam makanan sehari – hari.

Selain dari fungsinya dalam penyembuhan luka dan peningkatan memori, CeA juga dinyatakan memiliki sifat neuroprotektif.¹⁷ Penelitian lainnya juga menemukan bahwa CeA memiliki efek antiinflamasi, antimikroba, antifungal, antidepresan, antioksidan dan antikanker.⁷⁰ Berbagai manfaat CeA tersebut ditunjukkan oleh berbagai komponen kimia yang terkandung di dalam CeA. Dalam beberapa penelitian, dinyatakan dua komponen utama dalam CeA yaitu triterpenoid dan flavonoid.²¹

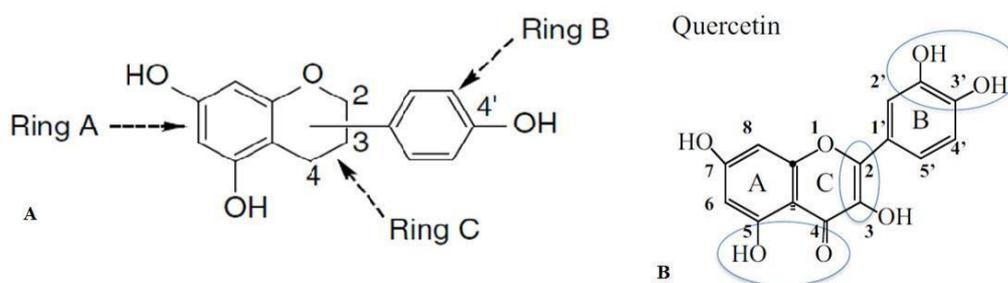
Triterpenoid terdiri atas komponen aktif yaitu asam asiatika dan asiatikosida. Kedua komponen aktif ini diketahui memiliki fungsi dalam penyembuhan luka, menstimulasi otak, perawatan hipertensi dan mikroangiopati, bekerja pada *gastric ulcer* dan memiliki aktivitas antioksidan dan antikanker.²¹

Menurut penelitian baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, dinyatakan bahwa asam asiatika dalam CeA memiliki aktivitas neuroprotektif. Penelitian *in vivo* menyatakan bahwa pemberian asam asiatika dosis 30 mg/kg.BB secara signifikan meningkatkan proses belajar dan memori pada tikus. Penelitian tersebut dilakukan dengan pemberian asam asiatika dosis 30 mg/kg.BB selama 14 dan 28 hari pada tikus jantan. Hasil penelitian tersebut menyatakan bahwa asam asiatika dapat meningkatkan memori kerja setelah pemberian 28 hari lebih efektif daripada pemberian selama 14 hari. Asam asiatika juga dinyatakan memiliki efek pada

memori kerja spasial dengan meregulasi reseptor *N-methyl-D-aspartate* (NMDA).¹⁸

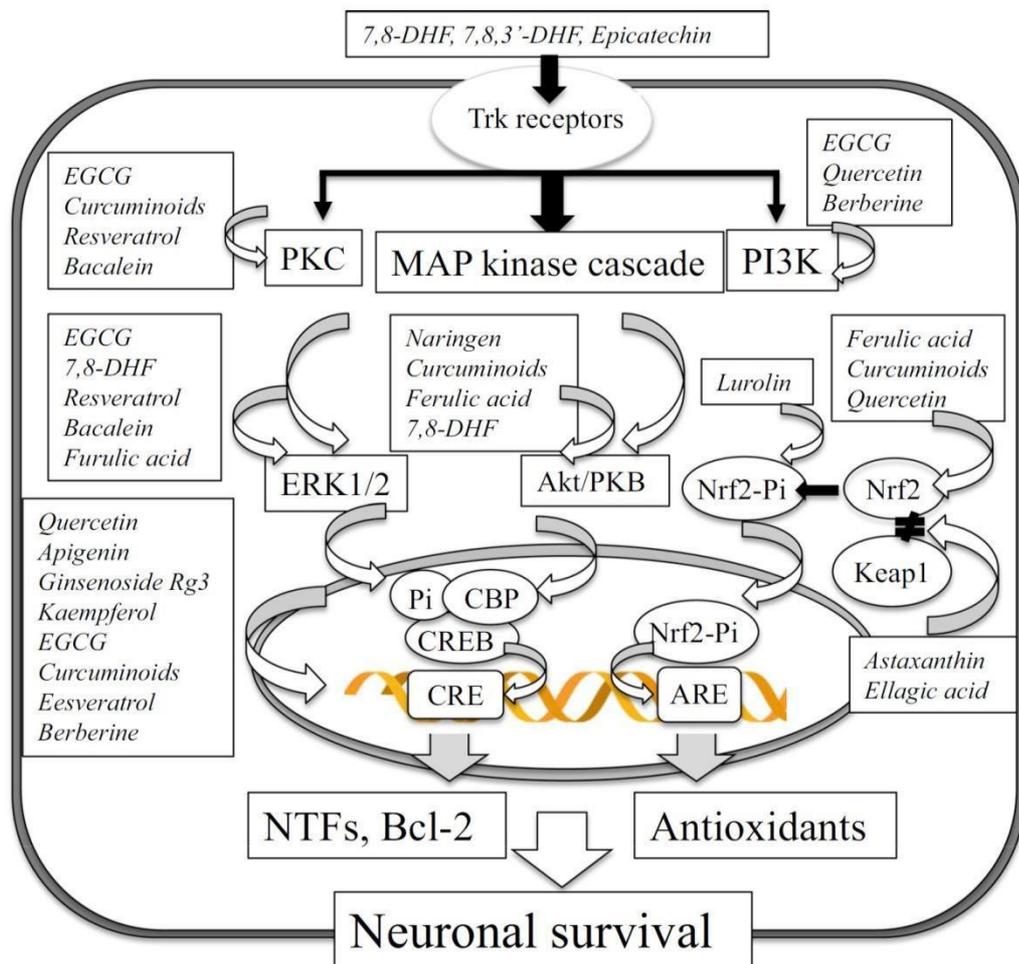
Asiatikosida dari CeA menghasilkan efek neuroprotektif melalui mekanisme antioksidan.¹⁷ Asiatikosida juga telah diketahui memiliki efek pemicu kognisi. Asiatikosida telah lama digunakan sebagai agen terapi demensia. Menurut Sari dkk,²¹ diketahui bahwa pemberian ekstrak etanol daun *Centella asiatica* pada dosis 600 mg/kg.BB dapat meningkatkan konsentrasi BDNF secara signifikan. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa pemberian asiatikosida selama empat minggu berturut – turut dapat meningkatkan ekspresi BDNF dan PSD-95 di hipokampus. Telah diketahui bahwa BDNF sangat erat kaitannya dengan fungsi sinaps dan meregulasi protein – protein dalam neuron di otak. Delesi gen BDNF menyebabkan penurunan ekspresi protein terkait sinaps, seperti protein post-sinaps PSD-95 di otak.⁷¹

23, 72
Flavonoid merupakan salah satu dari komponen polifenol. Flavonoid terdiri atas dua cincin aromatik C, benzopyran (cincin A dan C) dan benzene (cincin B). Flavonoid terbagi menjadi enam subkelompok yaitu flavonols, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones, dan anthocyanidins. Fungsi antioksidan dari flavonoid cincin aromatik A dan B serta adanya ikatan ganda C3, seperti yang ada pada quercetin, golongan flavonoid subkelompok flavonols.



Gambar 2. 13 Struktur flavonoid. A, struktur umum flavonoid. B, struktur quercetin, suatu flavonoid kelompok flavonol.^{23, 72}

Flavonoid harus dapat melewati sawar darah otak untuk dapat menghasilkan efek pada otak. Sejumlah penelitian telah menemukan bahwa flavonoid, termasuk quercetin dapat menembus sawar darah otak dan memiliki fungsi seperti faktor neurotropin di otak. Flavonoid kemudian akan terikat dengan reseptor TrkB, mengaktifkan jeram sinyal PI3K-Akt dan ERK, memfosforilasi CREB kemudian meningkatkan transkripsi gen target seperti BDNF. Flavonoid juga meningkatkan ketahanan sel neuron hipokampus dengan mengaktifkan jeram sinyal PKC-ERK1/2 sehingga mencegah penurunan produk anti apoptosis seperti Bcl-2.^{23, 24}



Gambar 2. 14 Fitokimia mengaktifkan jeram sinyal untuk neuroproteksi baik melalui ikatan dengan Trk maupun berinteraksi secara langsung.²³

Kandungan flavonoid dalam CeA memberikan efek proteksi terhadap neurotoksisitas melalui mekanisme antioksidan.¹⁷ Flavonoid akan mengaktifkan jalur sinyal Keap-Nrf2-ARE dan meningkatkan ekspresi enzim dan protein antioksidan.²³ Flavonoid juga menghasilkan berbagai aksi neuroprotektif dalam otak, melalui potensinya melindungi neuron terhadap cedera yang disebabkan oleh neurotoksin, kemampuan untuk menekan neuroinflamasi dan berpotensi untuk meningkatkan fungsi memori, pembelajaran dan fungsi kognisi.²² Efek flavonoid tersebut didasarkan pada dua proses utama. Pertama, flavonoid berinteraksi dengan protein penting dan jalur sinyal lipid kinase di otak untuk menghambat apoptosis yang dipicu oleh spesies neurotoksik dan untuk meningkatkan ketahanan neuron dan plastisitas sinaps. Proses kedua, flavonoid memicu efek positif pada sistem vaskuler sehingga terjadi perubahan dalam laju aliran darah serebrovaskular yang mampu menghasilkan angiogenesis, neurogenesis dan perubahan pada morfologi neuron. Dengan demikian, bila mengonsumsi makanan yang kaya akan flavonoid sepanjang hidup berpotensi menghambat neurodegenerasi dan mencegah berkurangnya performa kognisi seiring bertambahnya usia.²²

Bab 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan hewan coba tikus jantan galur Wistar usia 6 bulan yang dibagi secara acak menjadi tiga kelompok, terdiri atas (1) kelompok kontrol (K), (2) kelompok yang diberi perlakuan ekstrak etanol *Centella asiatica* dosis 300 mg/kg.BB (CA300), dan (3) kelompok yang diberi perlakuan ekstrak etanol *Centella asiatica* dosis 600 mg/kg.BB (CA600). Desain dan metode penelitian ini merupakan bagian dari satu penelitian besar yang telah lolos kaji etik oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI dengan nomor etik: 824/UN2.FI/ETIK/2016. Penelitian besar ini mencakup pemeriksaan fungsi memori dan pemeriksaan protein – protein terkait fungsi memori.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini diawali dengan perlakuan hewan coba di Laboratorium Departemen Patologi Anatomi FKUI pada bulan Oktober hingga November 2016, dilanjutkan dengan pemeriksaan protein di Laboratorium Imunologi Departemen Patologi Anatomi FKUI pada bulan Mei hingga September 2017. Analisis dan foto hasil pemeriksaan protein dilakukan di laboratorium yang sama pada bulan September hingga Oktober 2017.

3.3 Subjek dan Sampel Penelitian

Subjek penelitian ini yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar berusia 6 bulan dengan berat badan awal berkisar antara $\pm 300 - 400$ gram. Subjek penelitian dibiakkan di Biofarma-Bandung. Sebelum dan selama perlakuan, kesehatan hewan coba dijaga agar tidak sakit. Hewan coba diberi makanan standar dan minuman secara *ad libitum*. Hewan coba dipelihara di dalam kandang beralas sekam yang dilengkapi tempat pakan dan botol air minum. Kandang hewan coba dijaga kebersihannya serta diatur 12 jam terang dan 12 jam gelap. Suhu

lingkungan dipertahankan pada suhu $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Hal-hal lain dalam percobaan disesuaikan dengan kode etik komisi penanganan dan penggunaan hewan coba. Sampel penelitian ini yaitu jaringan hipokampus tikus Wistar jantan yang menjadi subjek penelitian.

3.3.1 Penetapan Jumlah Subjek dan Sampel Penelitian

Dalam menentukan jumlah sampel penelitian digunakan rumus Mead,⁷³ sebagai berikut:

$$\text{RUMUS MEAD : } E = N - B - T$$

Dengan :

E = derajat kebebasan komponen kesalahan, (10 – 20)

N = Jumlah sampel dalam penelitian (dikurangi 1)

B= *blocking component* menggambarkan pengaruh lingkungan yang diperbolehkan dalam penelitian (dikurangi 1)

T =Jumlah kelompok perlakuan (dikurangi 1)

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| • $E = N - B - T$ | $E = N - B - T$ |
| • $\geq 10 = (N - 1) - 0 - (3 - 1)$ | $\leq 20 = (N - 1) - 0 - (3 - 1)$ |
| • $\geq 10 = N - 1 - 2$ | $\leq 20 = N - 1 - 2$ |
| • $\geq 10 = N - 3$ | $\leq 20 = N - 3$ |
| • $N \geq 13$ | $N \leq 23$ |

Berdasarkan perhitungan MEAD, maka jumlah sampel yang digunakan adalah 6 sampel setiap kelompok dengan jumlah kelompok adalah 3 kelompok perlakuan sehingga didapatkan jumlah sampel secara keseluruhan adalah 18 sampel. Jumlah sampel berada di rentang 13 sampai 23, sesuai dengan rumus Mead.⁷³ Dalam penelitian ini digunakan rumus Mead karena memberikan hasil hitungan jumlah hewan coba yang lebih sedikit dan sesuai dengan anjuran dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

3.3.2 Kriteria Hewan Coba

Hewan coba yang menjadi subjek penelitian harus memenuhi kriteria yang telah ditentukan sebagai berikut:

- a. Kriteria inklusi: tikus (*Rattus novergicus*) jantan galur Wistar, berusia 6 bulan dengan berat badan awal 300 – 400 gram.
- b. Kriteria eksklusi: tikus yang sakit, tidak aktif atau mati sebelum percobaan dilakukan.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Variabel penelitian dan definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Cara Ukur	Skala
Variabel bebas				
Pemberian ekstrak <i>Centella asiatica</i>	Ekstrak etanol 70% dari daun <i>Centella asiatica</i> diberikan dengan dosis 300 dan 600 mg/kg.BB pada masing – masing kelompok perlakuan	miligram	Timbangan	Numerik
Variabel terikat				
<i>Synaptophysin</i> (SYP)	Protein vesikel sinaps pada presinaps dengan berat molekul 38 kDa dan merupakan <i>marker</i> presinaps. ¹⁰	Densitas optik IHK protein SYP pada area CA1 hipokampus tikus Wistar jantan.	Analisis dengan metode Imunohistokimia (IHK). Foto hasil	Rasio (numerik)
PSD-95	Protein perancah utama pada densitas post-sinaps di sinaps eksitatori glutamatergik, dan merupakan <i>marker</i> post-sinaps. ¹³	Densitas optik IHK protein PSD-95 pada area CA1 hipokampus tikus Wistar jantan.	IHK dianalisis menggunakan program <i>Image J</i> dengan <i>Plugin IHC Profiler</i> . Densitas optik dihitung menggunakan rumus.	Rasio (numerik)

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Bahan dan Alat Penelitian

3.5.1.1 Bahan Sampel Hewan

Bahan dari sampel hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah jaringan hipokampus tikus Wistar jantan.

3.5.1.2 Bahan Obat Uji

Bahan obat uji dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun *Centella asiatica*. Simplisia tanaman *Centella asiatica* didapatkan dari Pusat Studi Biofarmaka Institut Pertanian Bogor (IPB). Simplisia tanaman *Centella asiatica* diekstraksi dengan etanol 70% menggunakan metode maserasi. Ekstraksi bahan dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balittro) Bogor. Setelah bahan diekstraksi, kemudian dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif untuk mengetahui kandungan aktif dalam ekstrak *Centella asiatica*. Hasil analisis uji kualitatif dan kuantitatif tersebut terlampir. Dari hasil analisis diperoleh kadar rendemen sebesar 8,16%, sesuai dengan standar Farmakope Herbal Indonesia yaitu rendemen tidak kurang dari 7,2%. Kadar flavonoid sebesar 0,44%. Kadar asiatikosida ekstrak yang digunakan sebesar 0,65%, yakni masih di bawah standar penetapan kadar asiatikosida pada ekstrak *Centella asiatica* oleh Farmakope Herbal Indonesia yaitu sebesar 0,9%.⁷⁴

3.5.1.3 Alat Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan peralatan yaitu timbangan analitik, *microtome*, *slide* mikroskop *Aurora* (bermuatan positif), *cover glass*, *water bath*, oven pengering, *slide warmer*, *Biocare's Decloaking Chamber*, pH meter (Schoot), mikroskop (Olympus BX51) dengan kamera digital (Olympus).

3.5.1.4 Zat Kimia yang dipakai

Dalam penelitian ini digunakan zat kimia yaitu *xylene* (Merck), *ethanol* (Merck) (dengan konsentrasi absolut, 96%, 80% dan 70%), *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Biomatix) dengan pH 7,4, dapar sodium sitrat pH 6,0, Hidrogen peroksida (H₂O₂) 35%, antibodi primer anti-Synaptophysin antibody (Abcam),

antibodi primer anti-PSD95 *antibody* (Abcam), antibodi sekunder *Universal HRP Polimer* (Neopoly), detection kit (Biogear), Hematoxilin Meyer, Lithium karbonat jenuh (5%), entelan, *super PAP pen* (Biogear), dan air deionisasi.

3.5.2 Cara Kerja

3.5.2.1 Pemberian Ekstrak Bahan Obat Uji

Bahan obat uji diekstraksi dengan metode maserasi di Balitro Bogor. Simplisia *Centella asiatica* dihaluskan menggunakan grinder, sampai menjadi serbuk. Serbuk simplisia kemudian ditimbang dan dimasukkan kedalam wadah *stainless* dan dimasukkan pelarutnya yaitu etanol 70% diaduk dengan mixer selama 3 jam. Selanjutnya diendapkan selama 24 jam. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring. Hasil saringan tersebut dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* dengan suhu 50⁰C sampai penguapan selesai. Diperoleh ekstrak kental yang kemudian ditimbang dan dihitung sehingga diperoleh berat awal, berat akhir dan rendemennya. Hasil pemeriksaan diketahui kadar rendemen sebesar 8,16%, kadar air sebesar 17,39% dan kadar ekstrak sebesar 82,61%.

Setelah diekstraksi, dilakukan uji fitokimia dengan metode kualitatif dan didapatkan hasil yaitu ekstrak *Centella asiatica* mengandung alkaloid, saponin, tannin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, steroid, dan glikosida. Kemudian dilanjutkan dengan uji kuantitatif untuk mengetahui persentase kandungan aktif ekstrak *Centella asiatica*. Uji kualitatif dan kuantitatif juga dilakukan di Balitro Bogor. Dari uji kuantitatif, didapatkan hasil yaitu ekstrak CeA mengandung 0,22% kadar tanin, 0,44% flavonoid, 1,25% kadar saponin, dan 0,65% kadar asiatikosida. Metode dan hasil ekstraksi, kadar air dan fitokimia serta metode pengujian ekstrak etanol *Centella asiatica* terlampir.

Ekstrak etanol 70% *Centella asiatica* diberikan kepada hewan coba dengan dosis 300 mg/kg.BB/hari pada kelompok CA300 dan dosis 600 mg/kg.BB/hari pada kelompok CA600. Dengan kadar air sebesar 17,39% maka didapatkan kadar kemurnian ekstrak sebesar 82,61% sehingga perlu dilakukan penyesuaian dosis. Untuk dosis 300 mg/kg.BB penyesuaian dosis seharusnya 363,15 mg/kg.BB sedangkan untuk dosis 600 mg/kg.BB penyesuaian dosis seharusnya 726,30 mg/kg.BB. Pemberian ekstrak dilakukan setiap hari selama 28

hari, diberikan secara oral menggunakan sonde lambung. Hewan coba ditimbang berat tubuhnya untuk menentukan jumlah ekstrak yang akan diberikan sesuai dengan rentang dosisnya. Sediaan disiapkan untuk memenuhi kebutuhan pemberian ekstrak. Pengenceran sediaan ekstrak disiapkan untuk keperluan 3 hari perlakuan, dengan tujuan untuk menghindari kerusakan pada sediaan ekstrak bila sediaan ekstrak disimpan lebih dari 3 hari. Untuk dosis 300 mg/kg.BB, pengenceran dilakukan dengan mengambil ekstrak sebanyak 145,26 mg dilarutkan dengan aquades sampai 1,5 cc/ekor/hari. Untuk dosis 600 mg/kg.BB, pengenceran dilakukan dengan mengambil ekstrak sebanyak 290,52 mg dilarutkan dengan aquades sampai 1,5 cc/ekor/hari. Perhitungan sediaan yang disiapkan sesuai dengan kebutuhan harian terlampir. Setelah dilakukan pengenceran, sediaan disimpan di lemari pendingin dengan suhu 4⁰C. Setelah 3 hari, sediaan dibuat kembali untuk keperluan hari berikutnya. Sebelum diberikan kepada hewan coba, sediaan ekstrak dibiarkan sebentar dalam suhu ruangan, kemudian diaduk dengan baik agar tercampur dan tidak ada endapan sehingga memudahkan proses pemberian ekstrak pada hewan coba dengan sonde.

3.5.2.2 Perlakuan Subjek Penelitian

Sebelum dilakukan perlakuan pada hewan coba, didahului dengan periode aklimatisasi pada hewan coba selama 1 minggu yang bertujuan agar hewan coba dapat beradaptasi dengan suhu dan lingkungan penelitian. Pada periode aklimatisasi ini juga dilakukan pencampuran pakan yang dikonsumsi hewan coba dari Laboratorium Biofarma dengan pakan yang ada di Laboratorium Eksperimental Patologi Anatomi FKUI. Pada hewan coba juga dilakukan pengukuran berat badan 2 kali seminggu selama 4 minggu, ditimbang menggunakan timbangan digital dan dicatat dengan satuan gram.

Perlakuan terhadap hewan coba berlangsung selama 28 hari. Subjek penelitian dibagi secara acak menjadi tiga kelompok yaitu

1. kelompok kontrol (K)
2. kelompok yang diberikan ekstrak *Centella asiatica* dosis 300 mg/kg.BB/hari (CA300)

3. kelompok yang diberikan ekstrak *Centella asiatica* dosis 600 mg/kg.BB/hari (CA600)

Masing – masing perlakuan pada setiap kelompok diberikan satu kali sehari selama 28 hari berturut – turut dengan waktu yang sama di pagi hari. Penelitian yang merupakan bagian dari penelitian besar ini juga terkait dengan fungsi memori. Selama masa perlakuan, hewan coba juga menjalani tahap pembelajaran dan tahap uji memori menggunakan *Y-Maze* sebelum perlakuan dimulai (hari ke-0), selama perlakuan (hari ke-14) dan setelah perlakuan (hari ke-29). Tahap pembelajaran dan tahap uji memori ini dilakukan oleh peneliti lain dalam satu tim penelitian besar.

3.5.2.3 Prosedur Dekapitasi dan Tahap Isolasi Jaringan Hipokampus

Pada akhir masa perlakuan, subjek penelitian didekapitasi dengan cara dislokasi tulang servikal torakal.⁷⁵ Kemudian dilanjutkan dengan pengambilan jaringan hipokampus dari otak sesegera mungkin. Jaringan hipokampus yang sudah diisolasi dimasukkan ke dalam dapar formalin 10% selama 24 jam untuk kemudian dilakukan pembuatan blok parafin.

3.5.2.4 Prosedur Pembuatan Blok Parafin dari Jaringan Hipokampus

Tahap berikutnya setelah jaringan difiksasi dalam dapar formalin, adalah tahap pembuatan blok parafin. Jaringan kemudian direndam dalam alkohol 70% selama 24 jam. Esok harinya jaringan dipindahkan ke kaset untuk diproses lebih lanjut. Jaringan kemudian diproses dengan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat yaitu alkohol 95% dilanjutkan dengan alkohol absolut dan diulang sebanyak dua kali masing – masing selama 30 menit. Dehidrasi dilakukan untuk menghilangkan cairan dari dalam jaringan. Tahap berikutnya adalah proses *clearing*. *Clearing* dilakukan menggunakan xylol bertingkat yaitu xylol I dan xylol II masing – masing selama 15 menit. Proses *clearing* dilakukan untuk menghilangkan cairan dehidrasi, membuat komponen jaringan siap di medium infiltrasi. Tujuan infiltrasi yaitu untuk menyerap jaringan menggunakan medium pendukung. Setelah proses *clearing* selesai, kaset dimasukkan ke dalam *paraplart* selama 30 menit. Tahap terakhir adalah *embedding* dengan blok parafin. proses

embedding dilakukan untuk menempatkan jaringan ke medium yang lebih kaku dan kuat sehingga jaringan lebih mudah dipotong dan tidak mengalami kerusakan.⁷⁶

3.5.2.5 Prosedur Pulasan Hematoksilin Eosin (HE)

Untuk melihat morfologi dan histologi sel dilakukan pulasan HE. Pulasan HE diawali dengan deparafinisasi jaringan menggunakan xylol bertingkat masing – masing selama lima menit. Kemudian dilanjutkan dengan alkohol bertingkat (alkohol absolut, 90%, 70%, 50%) masing – masing selama dua menit, lalu jaringan dicuci dengan air mengalir selama dua menit. Jaringan dicelupkan ke dalam cairan *Mayer's Hematoxylin* selama lima menit, kemudian jaringan dicelupkan ke dalam eosin selama lima menit dan dicuci dengan air mengalir selama dua menit. Proses berikutnya yaitu proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (alkohol 70%, 90%, dan absolut) masing – masing selama dua menit dilanjutkan dengan proses *clearing* menggunakan xylol bertingkat masing – masing selama tiga menit. Proses terakhir dari proses pulasan HE adalah *mounting* dengan entelan dan tutup dengan *cover glass*.⁷⁷

3.5.2.6 Prosedur Pemeriksaan Protein SYP dan PSD-95 dengan Metode Imunohistokimia (IHK)

Sebelum melakukan prosedur imunohistokimia (IHK) terhadap kedua protein, blok parafin yang telah dibuat tadi dipotong dengan ketebalan 4 mikron dan diapungkan pada *water bath*. Kemudian potongan tersebut ditempatkan di atas *coated slide*. Cairan yang terdapat di *slide* dikeringkan, lalu *slide* dimasukkan ke dalam oven pengering selama 30 – 60 menit pada suhu 37⁰C.⁷⁸

Prosedur pulasan IHK yang digunakan dalam penelitian ini adalah prosedur *IHC Neopoly* yang merupakan prosedur standar kit antibodi *Biogear Polymer Neopoly Detection Kit*. Pulasan IHK dengan antibodi anti-SYP dan anti-PSD-95 diawali dengan optimasi konsentrasi antibodi primer pada jaringan kontrol positif. Optimasi antibodi dilakukan untuk mendapatkan hasil positif yang paling kuat dengan *background staining* yang paling lemah. Jaringan kontrol positif yang digunakan untuk kedua protein adalah otak tikus. Proses optimasi

dimulai dari pengenceran 1: 400, 1: 600, 1: 800 dan 1: 1200 untuk protein SYP dan pengenceran 1: 300, 1: 500, 1: 750 dan 1: 1000 untuk protein PSD-95. Hasil pengenceran antibodi pada konsentrasi 1:1200 dan 1:500 untuk masing – masing protein menunjukkan hasil yang paling optimal dalam pulasan antibodi primer anti-SYP dan anti-PSD-95.

Langkah pulasan IHK dimulai dengan pemanasan *slide* potongan jaringan hipokampus pada *slide warmer* selama 30 menit pada suhu 60⁰C dan dilakukan deparafinisasi jaringan untuk menghilangkan parafin dari jaringan. *Slide* yang telah dipanaskan tadi dicelupkan kedalam 3 wadah xylol (xylol I, II, III) masing – masing selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dengan konsentrasi alkohol absolut, 96%, 80%, dan 70%, masing – masing selama 4 menit. *Slide* diletakkan dalam wadah kemudian ditaruh di bawah air mengalir selama 5 menit. Diharapkan *slide* tidak kering pada tahap proses selanjutnya.⁷⁹

Tahap berikutnya adalah *pre-treatment* untuk membuka epitope dalam jaringan sehingga dapat menerima rangkaian reagen lain dan juga mempermudah pengikatan antigen-antibodi dengan membuka *methylene bridge* yang terbentuk pada saat fiksasi jaringan. Kedua protein mendapat perlakuan yang sama yaitu *slide* direndam dalam larutan dapar sodium sitrat pH 6,0 kemudian dipanaskan menggunakan *Biocare's decklocking chamber* selama 45 menit dengan suhu 95⁰C. Kemudian angkat dan dinginkan pada suhu kamar selama 20 menit. *Slide* direndam dalam PBS pH 7,4 selama 3 menit, untuk mempertahankan pH tetap netral dan mempertahankan osmolaritas sel.⁷⁹

Setelah *slide* direndam dengan PBS pH 7,4 cairan yang masih menempel pada *slide* dikeringkan kemudian dibuat pembatas hidrofobik di sekeliling jaringan dengan menggunakan *Super PAP pen*. Kemudian dilakukan *blocking background* pada jaringan dengan meneteskan cairan *proxy block* yang tersedia pada *detection kit* sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit untuk protein SYP dan 15 menit untuk protein PSD-95. *Proxy block* digunakan untuk memblok endogen peroksidase. Setelah inkubasi, cairan *blocking background* dari *slide* dibuang dan dicuci dalam wadah dengan PBS selama 5 menit. Kemudian angkat *slide* dan keringkan pada bagian *slide* diluar pembatas

hidrofobik, lalu ditetaskan cairan *masking block* untuk memblok protein non spesifik dan diinkubasi dalam suhu kamar selama 7 menit. Setelah inkubasi, cairan *masking block* dibuang dan *slide* dicuci dalam wadah berisi PBS pH 7,4 selama 5 menit. Kemudian angkat *slide* dan keringkan pada bagian slide diluar pembatas hidrofobik. Tahap berikutnya adalah meneteskan antibodi primer yang sudah diencerkan sesuai dengan hasil dari optimasi pada jaringan sampel dan kontrol positif sebanyak 100 µl dan inkubasi selama 60 menit. *Slide* kontrol negatif ditambahkan PBS pH 7,4 tanpa antibodi primer.

Setelah inkubasi selama 60 menit, *slide* dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 5 menit, diangkat dan dikeringkan kemudian ditambahkan *Universal HRP Polymer* dengan cara ditetaskan sebanyak 100 µl dan diinkubasi selama 30 menit. *Universal HRP Polymer* merupakan antibodi sekunder yang akan berikatan dengan antibodi primer. Setelah inkubasi, cairan dibuang dan dicuci dalam PBS 7,4 selama 5 menit. *Chromogen DAB* sebanyak 1 tetes dicampur dengan 1 ml substrat *buffer* dalam wadah kedap cahaya. *Chromogen DAB* kemudian ditetaskan ke jaringan secukupnya dan diinkubasi selama 15 detik atau sampai terlihat warna kecokelatan pada jaringan. *Chromogen DAB* merupakan substrat yang dapat bereaksi dengan enzim HRP dan memberikan warna kecokelatan pada jaringan.⁷⁹ Kemudian *slide* dicuci dengan air mengalir selama 5 menit.

Tahap berikutnya adalah *counterstain* dengan Hematoxylin Mayer's selama 3 – 5 detik, dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Dimasukkan kedalam wadah berisi litium karbonat jenuh selama 2 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Litium karbonat jenuh bertujuan untuk memberikan warna biru pada inti sel.⁷⁹ Tahap akhir adalah dehidrasi jaringan dengan alkohol bertingkat dimulai dari alkohol 80%, 96%, absolut masing – masing selama 5 menit. Dilanjutkan dengan proses *clearing* dengan merendam *slide* dalam wadah berisi xylol (xylol I, II, III) masing – masing selama 7 menit. Setelah itu, dilakukan *mounting* dengan entelan dan tutup slide dengan *cover glass*.

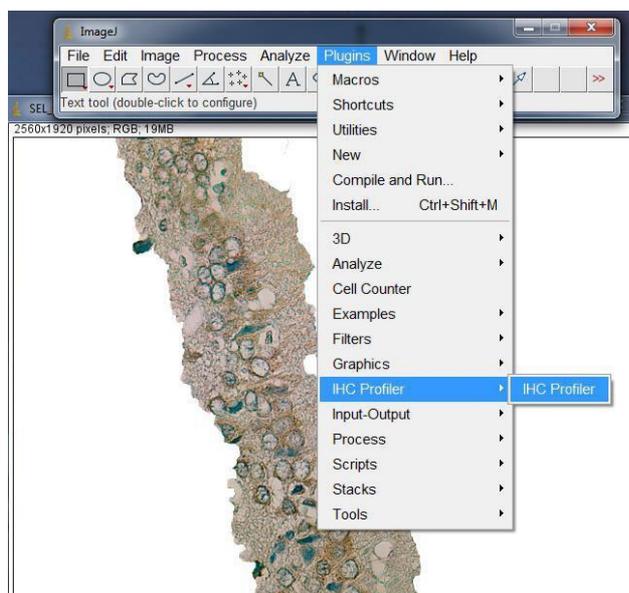
3.5.2.7 Pengukuran Parameter Penelitian

Pengukuran presentase ekspresi protein SYP dan PSD-95 diamati di bawah mikroskop cahaya binokuler (Olympus BX51) dengan pembesaran 400x

dan gambar diambil dengan kamera *built-in* (Olympus). Setiap slide diambil lima gambar untuk mewakili lima lapang pandang di area CA1 jaringan hipokampus tikus. Area ekspresi kedua protein tersebut kemudian dihitung menggunakan program ImageJ.

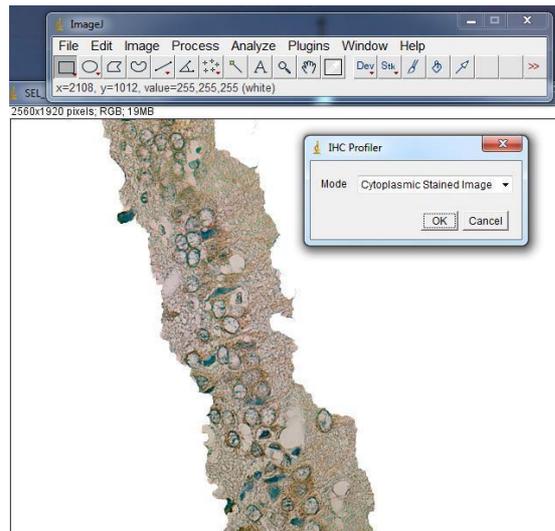
Gambar yang didapat dianalisis menggunakan sebuah program *freeware* yang dikembangkan oleh *National Institute of Health* yaitu program ImageJ. Sebuah *plugin* dalam program ImageJ yakni metode *IHC Profiler* digunakan untuk menganalisis hasil pulasan IHC menggunakan dekonvolusi warna (*color deconvolution*) dan intensitas terkomputerisasi sehingga menghasilkan nilai skor intensitas secara otomatis pada setiap gambar.⁸⁰

Penilaian densitas protein menggunakan menu *IHC Profiler* terdiri atas beberapa tahap yaitu diawali dengan membuka program ImageJ kemudian membuka gambar yang akan dinilai. Selanjutnya klik *Plugins-IHC profiler*, akan muncul pilihan, *Mode* (lihat Gambar 3.1).⁸⁰



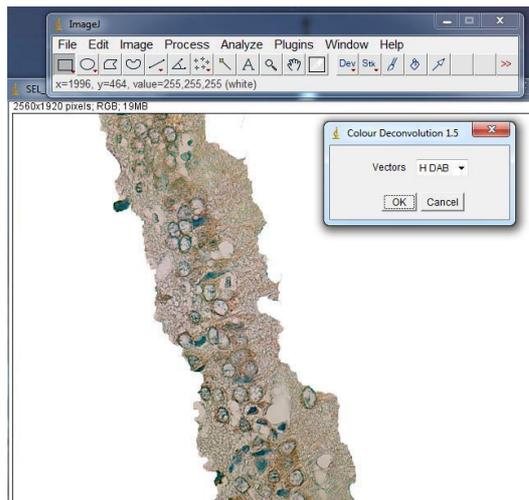
Gambar 3. 1 Tampilan jendela *IHC Profiler*

Pada *Mode*, terdapat dua pilihan pulasan IHC, yaitu *Cytoplasmic stained image* dan *Nuclear stained image*. Pada penelitian ini, protein yang dinilai berada pada sitoplasma maka, *Mode* yang dipilih adalah *Cytoplasmic stained image*, lalu klik *OK* (lihat Gambar 3.2).⁸⁰



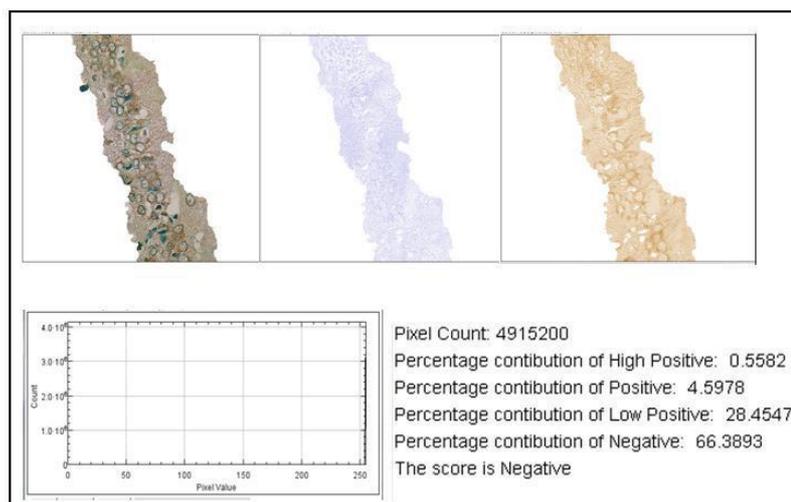
Gambar 3. 2 Tampilan jendela *Mode*

Selanjutnya, muncul pilihan *color deconvolution* dan *Vectors* yang dipilih adalah *H-DAB*, lalu klik *OK*, sehingga akan muncul dua gambar baru yaitu gambar *DAB stain* dan *Hematoxylin stain*, histogram, serta log yang menunjukkan persentase intensitas.⁸⁰



Gambar 3. 3 Tampilan jendela *color deconvolution*

Pada log, akan didapatkan persentase masing-masing sel berupa persentase sel positif kuat, sel positif, sel positif lemah dan sel negatif. Perhitungan *IHC Profiler* kemudian dilakukan untuk lima lapang pandang pada masing-masing sampel dan hasilnya direratakan untuk seluruh sampel per kelompok (lihat Gambar 3.4).^{80, 81}



Gambar 3. 4 Tampilan hasil *IHC Profiler*

3.5.2.8 Interpretasi Hasil Pulasan Imunohistokimia (IHK)

IHC profiler menghasilkan gambaran histogram dari gambar DAB, yang menilai intensitas piksel secara otomatis. Meskipun demikian, hasil analisis menggunakan *IHC profiler* hanya menunjukkan data semikuantitatif berupa kategori positif kuat, positif, positif lemah, atau negatif. Untuk memperoleh hasil analisis kuantitatif dilakukan perhitungan skoring menggunakan metode *IHC Optical Density*,⁸¹ yaitu

$$\text{IHC Optical Density} = \frac{HP + (P \times 2) + (LP \times 3) + (N \times 4)}{100}$$

Keterangan:

HP : Positif Kuat

P : Positif

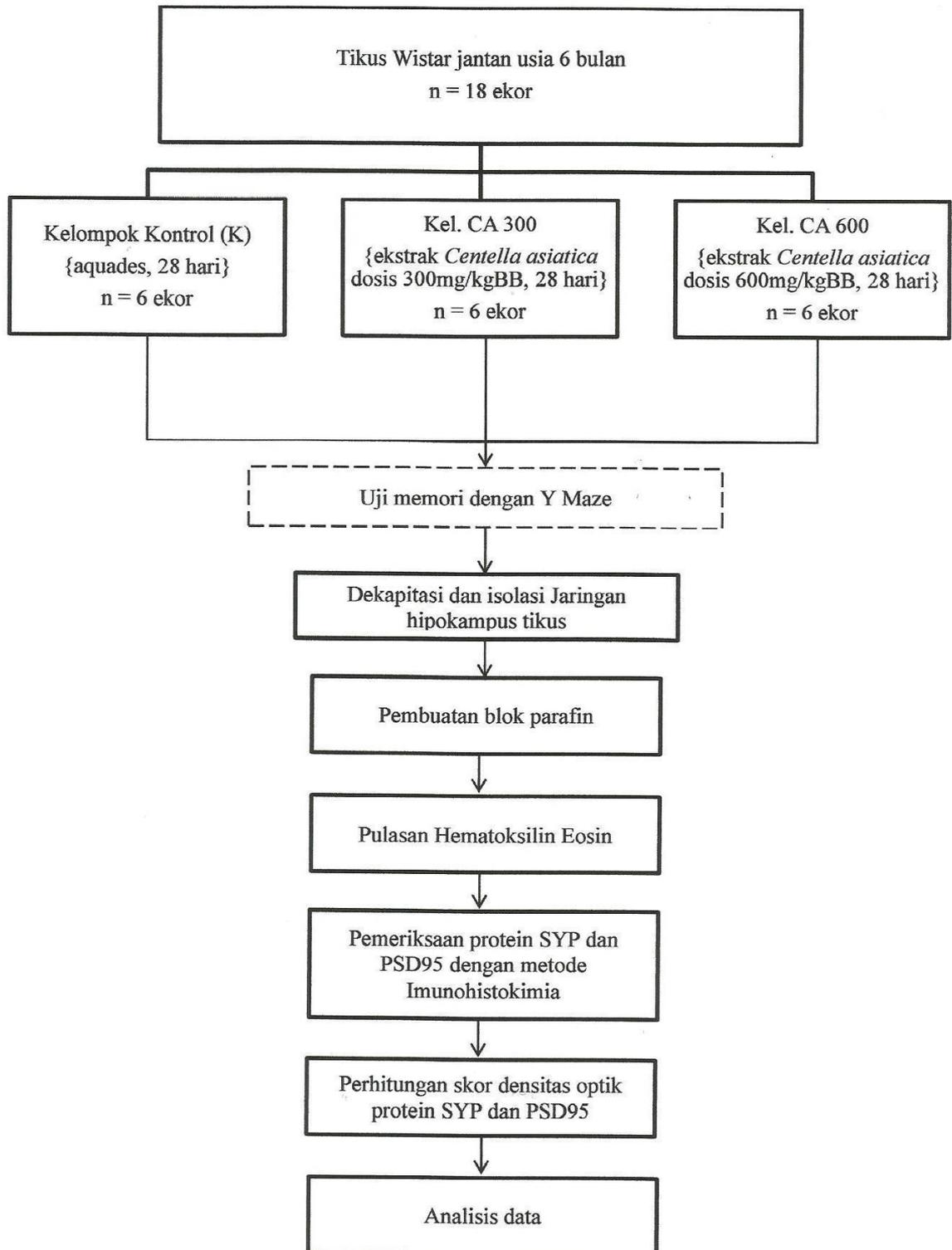
LP : Positif Lemah

N : Negatif

3.6 Analisis Data

Data densitas optik protein SYP dan PSD95 yang telah diperoleh kemudian dilakukan analisis statistik menggunakan program komputer SPSS 17.0. Diawali dengan uji normalitas data menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan uji homogenitas data. Uji normalitas pada densitas optik protein SYP menunjukkan data tidak berdistribusi normal, maka dilakukan transformasi data dan menunjukkan data tetap tidak berdistribusi normal. Langkah berikutnya dilakukan uji non parametrik yakni Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan Post-Hoc Mann-Whitney. Uji normalitas pada densitas optik protein PSD-95 menunjukkan data tidak berdistribusi normal, maka dilakukan transformasi data dan berhasil. Langkah berikutnya dilakukan uji parametrik yakni *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan *Post-Hoc Bonferroni*. Uji korelasi dilakukan untuk mengkorelasikan kedua ekspresi protein dengan fungsi memori. Uji korelasi antara ekspresi protein SYP dengan fungsi memori dilakukan dengan Uji Korelasi Pearson karena data berdistribusi normal. Uji korelasi antara ekspresi protein PSD-95 dengan fungsi memori dilakukan dengan Uji Korelasi Spearman karena data tidak berdistribusi normal. Batas kemaknaan yang digunakan sebesar 5%.

3.7 Alur Penelitian



Keterangan:



: Dilakukan oleh peneliti lain

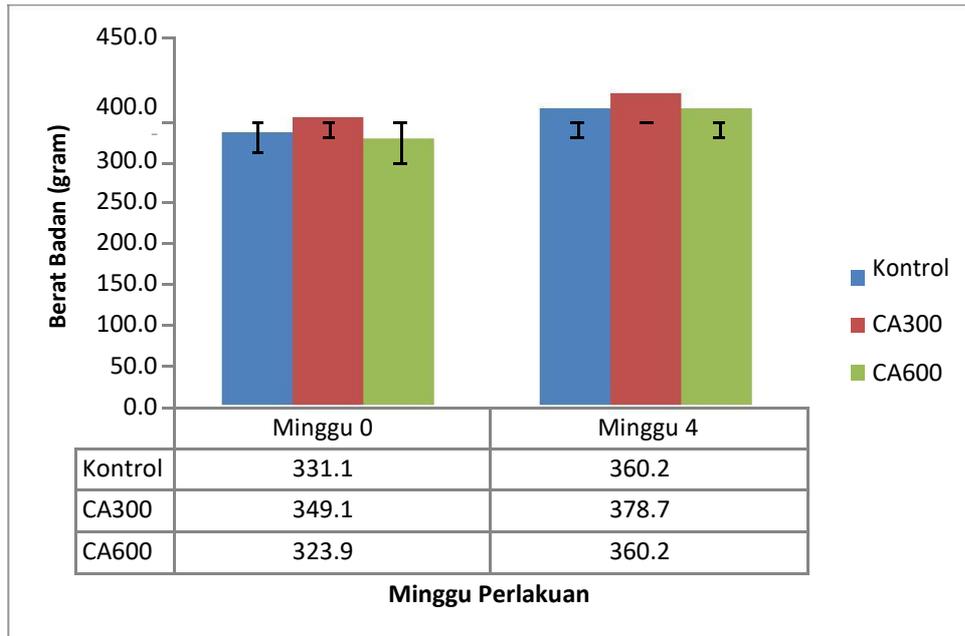
BAB 4

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* yang bertujuan untuk melihat pengaruh ekstrak *Centella asiatica* terhadap plastisitas sinaps di hipokampus melalui ekspresi protein SYP dan PSD-95. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian payung yang telah dinyatakan lolos kaji etik oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI dengan nomor: 824/UN2.FI/ETIK/2016. Data penelitian mencakup karakteristik subyek penelitian, hasil analisis ekspresi protein dan hubungan korelasi antara ekspresi protein dengan hasil pemeriksaan fungsi memori.

4.1 Karakteristik Subyek Penelitian

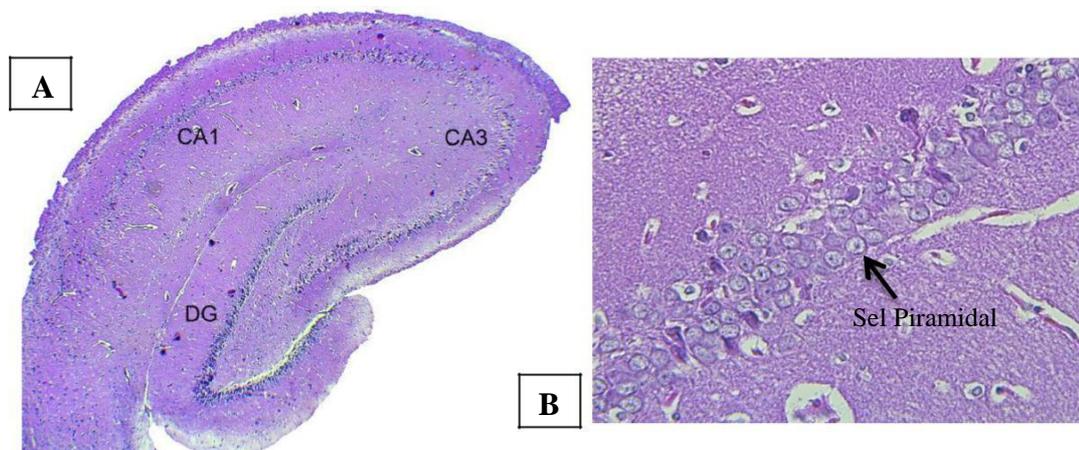
Subjek penelitian ini yaitu tikus (*Rattus novergicus*) jantan galur Wistar berusia 6 bulan dengan berat badan awal berkisar antara $\pm 300 - 400$ gram. Rerata berat badan subjek penelitian ketiga kelompok pada minggu awal sebelum perlakuan dan minggu keempat setelah perlakuan ditampilkan pada Gambar 4.1. Uji statistik menunjukkan rerata berat badan tikus pada awal dan akhir penelitian homogen dan tidak terdapat perbedaan bermakna antara ketiga kelompok.



Gambar 4. 1 Rerata berat badan subjek penelitian ketiga kelompok pada minggu awal sebelum perlakuan dan minggu keempat setelah perlakuan.

4.2 Hasil Analisis Protein dengan Metode IHK

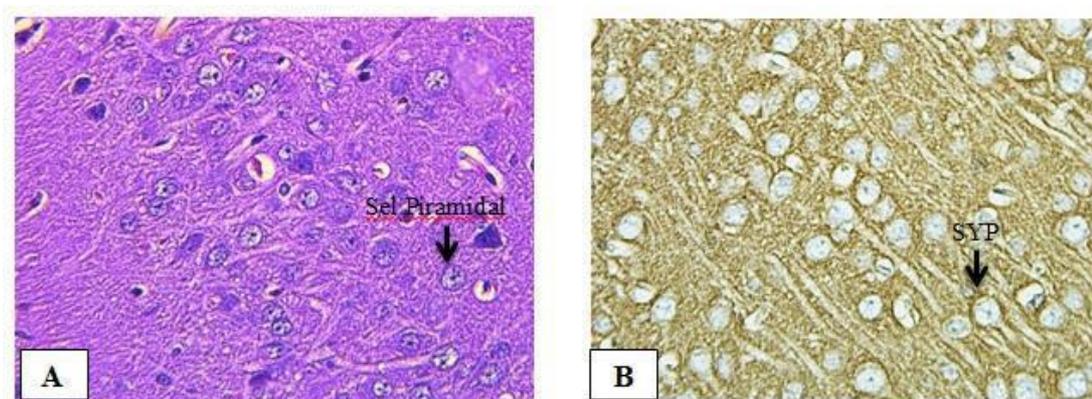
Sebelum dilakukan pulasan IHK, terlebih dahulu dilakukan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE). Pewarnaan HE yang dilakukan bertujuan untuk melihat morfologi dan histologi sel. Hasil pewarnaan HE yang dilakukan pada jaringan hipokampus tikus Wistar jantan ditampilkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4. 2 Hasil Pewarnaan HE. **A.** Jaringan hipokampus (perbesaran 40x), **B.** Area CA1 Hipokampus (perbesaran 400x). CA1-3: Cornu ammonis; DG: *dentate gyrus*.

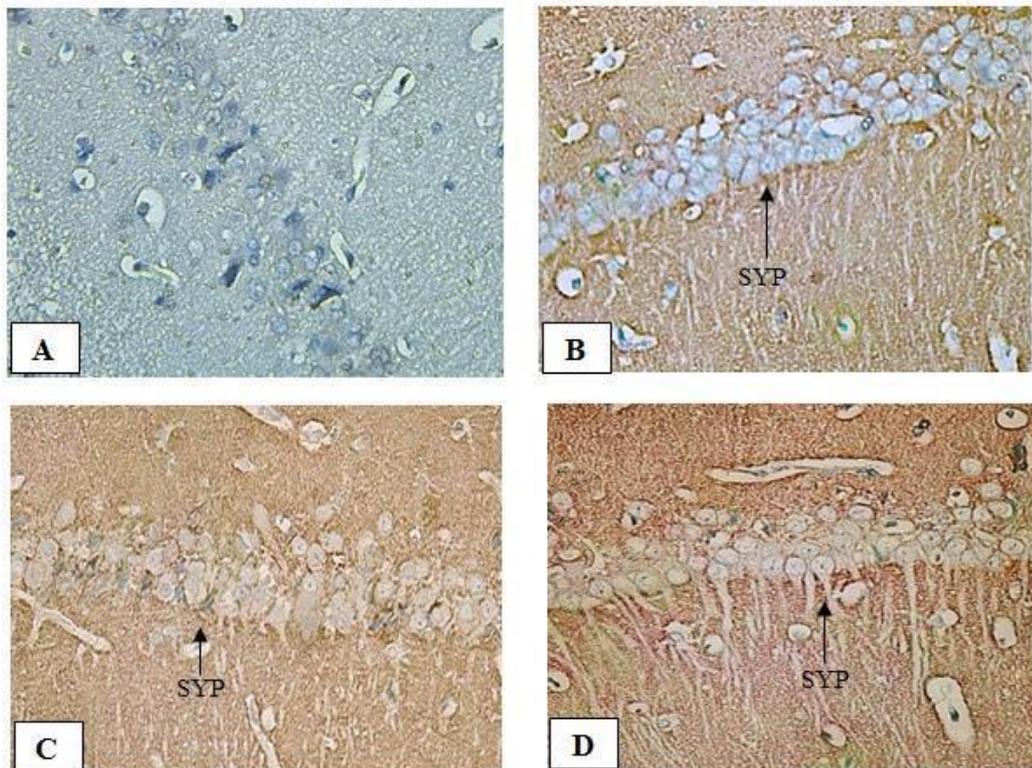
4.3 Pemeriksaan IHK protein SYP di Area CA1 Hipokampus

Pulasan IHK untuk protein SYP dilakukan pada otak besar tikus sebagai kontrol positif. Hasil pulasan HE dan pulasan IHK pada otak besar tikus untuk protein SYP tampak pada sel piramidal yang ditampilkan pada Gambar 4.3.



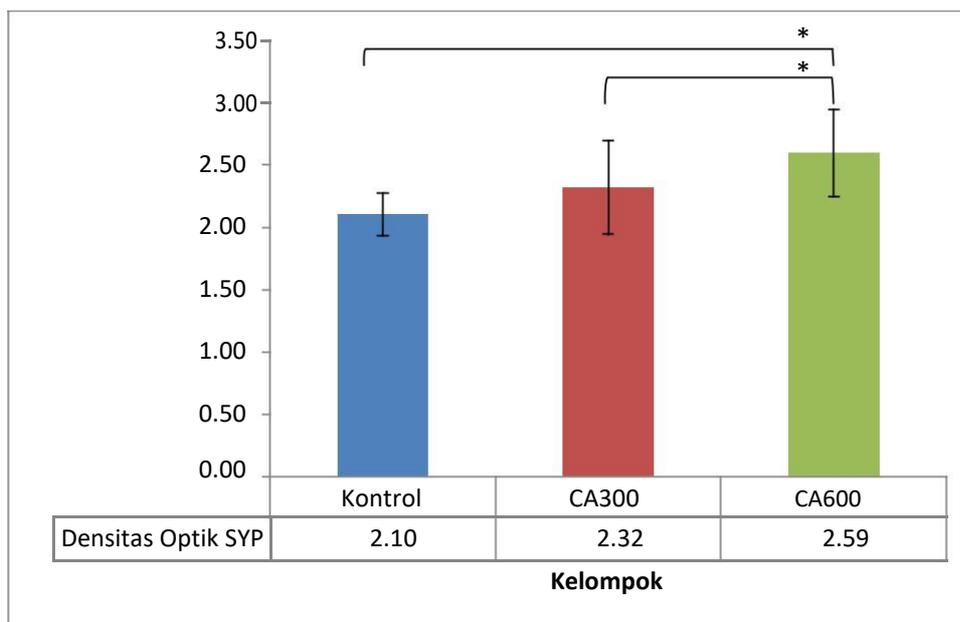
Gambar 4.3 Jaringan otak besar tikus. A. Pewarnaan Hematoksinilin Eosin, B. Pulasan IHK protein SYP (Perbesaran 400x).

Hasil pulasan IHK pada sitoplasma sel piramidal CA1 hipokampus kelompok kontrol, CA300 dan CA600 ditampilkan pada Gambar 4.4. Protein SYP merupakan protein transmembran,⁵⁷ sehingga pada sel piramidal protein SYP tampak terpusas pada sitoplasma neuron piramidal. Neuron piramidal dengan protein SYP memiliki ciri warna biru pada bagian inti sel dan warna cokelat pada sitoplasmanya (di sekeliling inti sel).



Gambar 4.4 Pulasan IHK protein SYP pada area CA1 jaringan hipokampus tikus Wistar jantan. A. Kontrol negatif. B. Kelompok kontrol. C. Kelompok CA300. D. Kelompok CA600. Perbesaran 400X.

Protein SYP terekspresi pada regio CA1 hipokampus tikus Wistar jantan dengan intensitas paling lemah pada kelompok kontrol (Gambar 4.4B) dan ekspresi protein SYP dengan intensitas paling kuat nampak pada kelompok CA600 (Gambar 4.4D). Dari ekspresi protein SYP tersebut kemudian dihitung rerata densitas optik protein SYP.

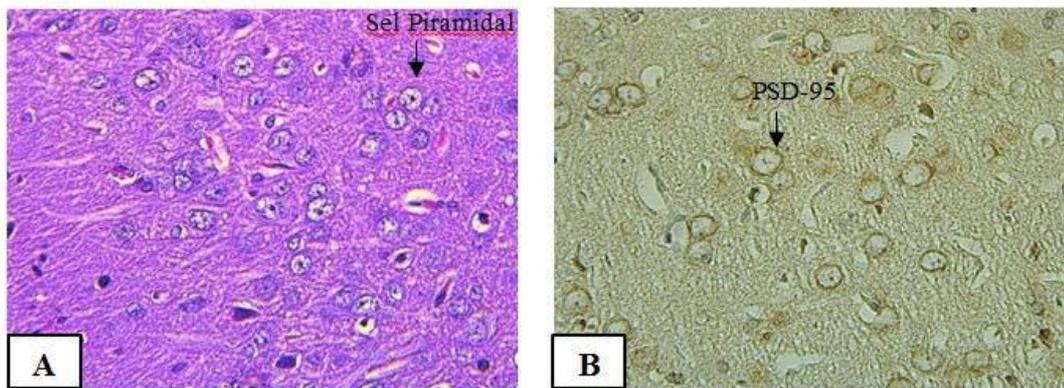


Gambar 4.5 Perbandingan rerata densitas optik imunohistokimia protein SYP di CA1 hipokampus pada ketiga kelompok. Uji *Post-Hoc Mann-Whitney*: *CA600 vs CA300 ($p=0.025$) dan kontrol ($p = 0.000$). Kebermaknaan: $p<0,05$.

Pada Gambar 4.5 ditampilkan perbandingan rerata densitas optik protein SYP pada ketiga kelompok. Nilai rerata tertinggi didapati pada kelompok CA600 (2.59 ± 0.35), diikuti dengan kelompok CA300 (2.32 ± 0.38) dan yang paling rendah yaitu kelompok kontrol (2.10 ± 0.17). Analisis statistik kemudian dilakukan, yakni uji normalitas data dengan Kolmogorov-Smirnov didapati bahwa data tidak berdistribusi normal. Kemudian dilakukan transformasi data dan menunjukkan data tetap tidak berdistribusi normal. Langkah berikutnya dilakukan uji non parametrik yakni Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan *Post-Hoc Mann-Whitney*. Berdasarkan hasil analisis statistik didapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok CA600 dengan kelompok kontrol ($p=0.000$) dan kelompok CA300 ($p=0.025$), sedangkan antara kelompok CA300 dan kelompok kontrol tidak berbeda bermakna ($p=0.098$), signifikansi $p<0.05$.

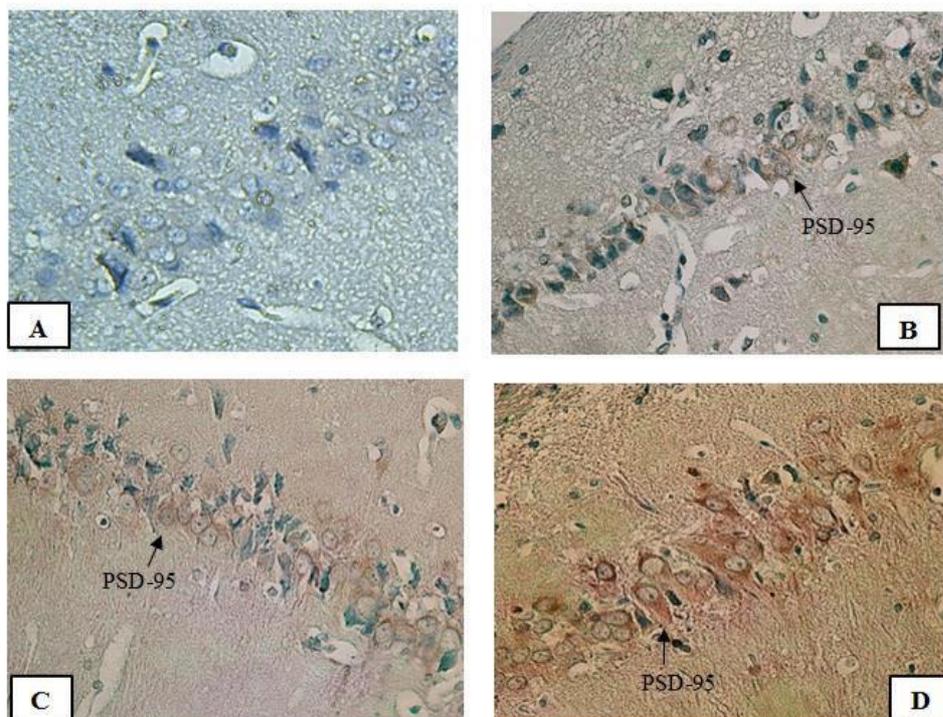
4.4 Pemeriksaan IHK protein PSD-95 di Area CA1 Hipokampus

Pulasan IHK untuk protein PSD-95 dilakukan pada otak besar tikus sebagai kontrol positif. Hasil pulasan HE dan pulasan IHK pada otak besar tikus protein PSD-95 tampak pada sel piramidal yang ditampilkan pada Gambar 4.6.



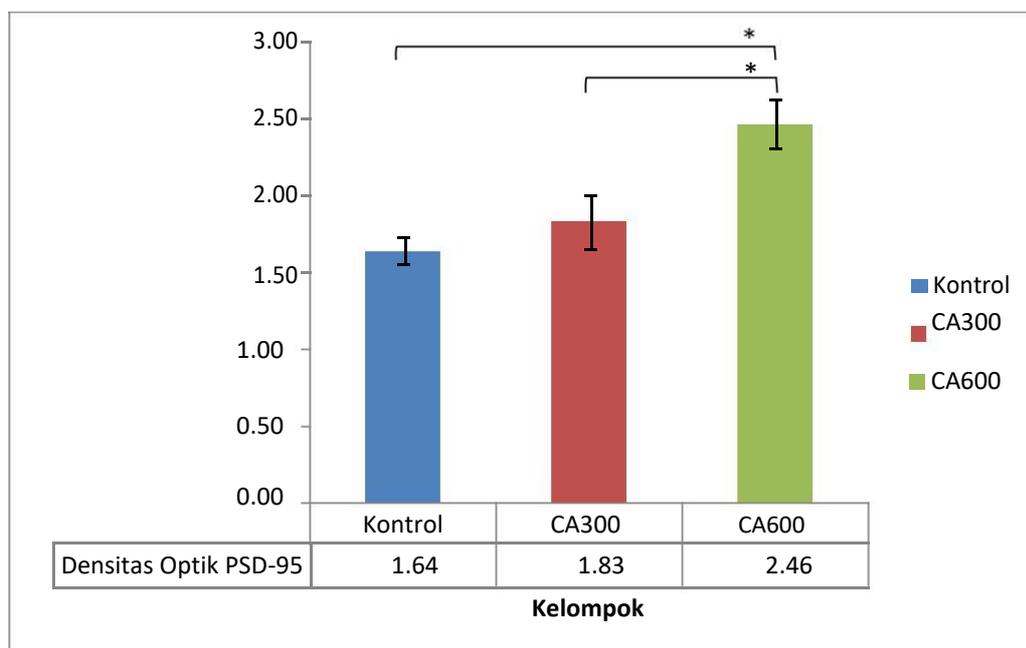
Gambar 4.6 Jaringan otak besar tikus. A. Pewarnaan Hematoksin Eosin, **B.** Pulasan IHK protein PSD-95 (Perbesaran 400x).

Hasil pulasan IHK pada sitoplasma sel piramidal CA1 hipokampus kelompok kontrol, CA300, dan CA600 ditampilkan pada Gambar 4.7. Nampak pada sel piramidal protein PSD-95 terpulas pada sitoplasma neuron piramidal. Neuron piramidal dengan protein PSD-95 memiliki ciri warna biru pada bagian inti sel dan warna cokelat pada sitoplasmanya (di sekeliling inti sel).



Gambar 4.7 Pulasan IHK protein PSD-95 pada area CA1 jaringan hipokampus tikus Wistar jantan. A. kontrol negatif ; **B.** kelompok kontrol; **C.** kelompok CA300; **D.** kelompok CA600. Perbesaran 400X.

Protein PSD-95 terekspresi pada regio CA1 hipokampus tikus Wistar jantan dengan intensitas paling lemah pada kelompok kontrol (Gambar 4.7B) dan ekspresi protein PSD-95 dengan intensitas paling kuat nampak pada kelompok CA600 (Gambar 4.7D). Dari hasil ekspresi protein PSD-95 tersebut kemudian dihitung rerata densitas optik protein PSD-95.



Gambar 4.8 Perbandingan rerata densitas optik protein PSD-95 pada ketiga kelompok. Uji *Post-Hoc Bonferroni*: *CA600 vs CA300 ($p=0.000$) dan kontrol ($p = 0.000$). Kebermaknaan: $p < 0,05$.

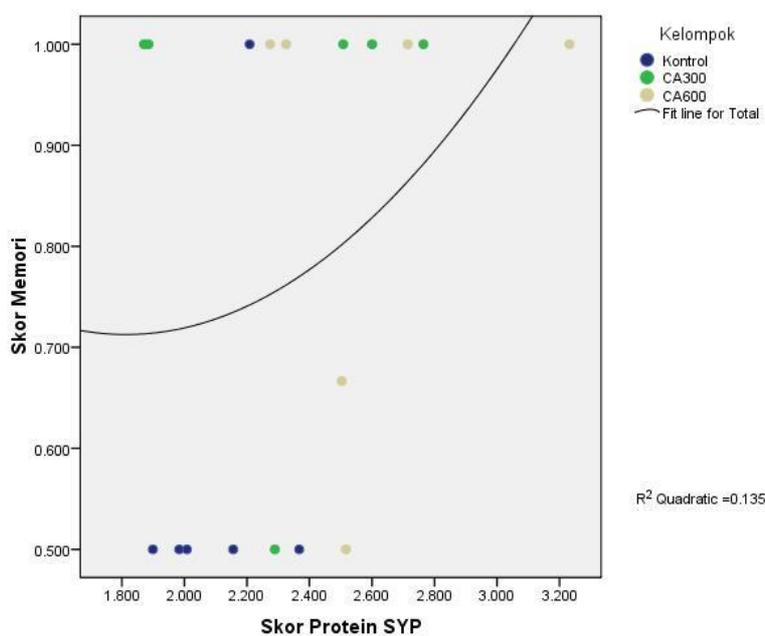
Pada Gambar 4.8 ditampilkan perbandingan rerata densitas optik protein PSD-95 pada ketiga kelompok. Nilai rerata tertinggi didapati pada kelompok CA600 (2.46 ± 0.16), diikuti dengan kelompok CA300 (1.83 ± 0.19) dan yang paling rendah yaitu kelompok kontrol (1.64 ± 0.09). Analisis statistik kemudian dilakukan, yakni uji normalitas data dengan Kolmogorov-Smirnov didapati bahwa data tidak berdistribusi normal. Kemudian dilakukan transformasi data dan berhasil, data berdistribusi normal. Langkah berikutnya dilakukan uji parametrik yakni *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan *Post-Hoc Bonferroni*. Berdasarkan hasil analisis statistik didapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok CA600 dengan kelompok kontrol ($p=0.000$) dan kelompok CA300

($p=0.000$), sedangkan antara kelompok CA300 dan kelompok kontrol tidak berbeda bermakna ($p=0.123$), signifikansi $p<0.05$.

4.5 Hasil Analisis Korelasi Ekspresi Protein dengan Fungsi Memori

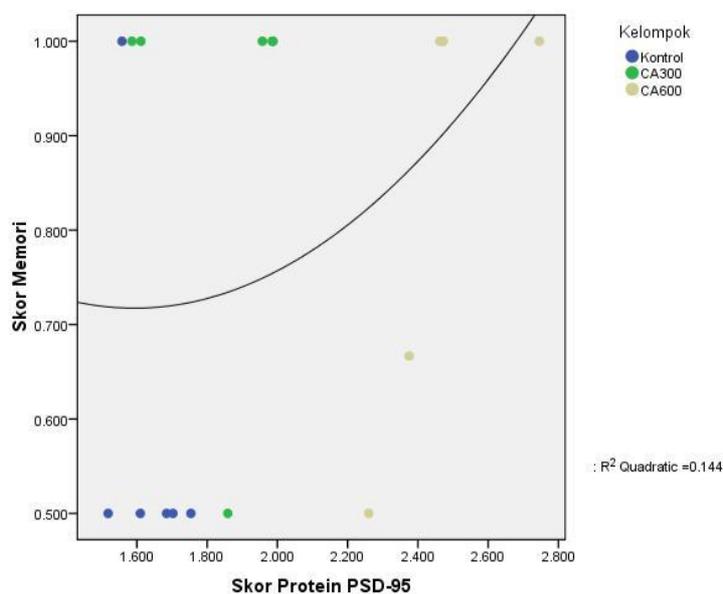
Selain dilakukan pemeriksaan protein dengan metode IHK, pada subyek penelitian juga dilakukan uji fungsi memori seperti yang telah dijelaskan dalam bab sebelumnya. Uji fungsi memori dikerjakan oleh peneliti lain dalam satu tim penelitian. Hasil pemeriksaan protein, baik ekspresi protein SYP maupun PSD-95 kemudian dikorelasikan dengan hasil uji fungsi memori.

Uji korelasi antara protein SYP dengan fungsi memori dilakukan dengan Uji Korelasi Pearson, karena data berdistribusi normal. Hasil uji korelasi menunjukkan nilai $p=0.160$, $r=0,346$ yang artinya korelasi antara protein SYP dan fungsi memori tidak bermakna.



Gambar 4. 9 Hubungan antara ekspresi protein SYP dengan fungsi memori

Uji korelasi antara protein PSD-95 dengan fungsi memori dilakukan dengan Uji Korelasi Spearman, karena data tidak berdistribusi normal. Hasil uji korelasi menunjukkan nilai $p=0.149$, $r=0.355$ yang artinya korelasi antara protein PSD-95 dengan fungsi memori tidak bermakna. Dari grafik pada Gambar 4.10 dapat dilihat bahwa peningkatan fungsi memori sudah nampak pada kelompok CA300, sedangkan ekspresi protein PSD-95 baru meningkat pada kelompok CA600.



Gambar 4. 10 Hubungan antara ekspresi protein PSD-95 dengan fungsi memori

BAB 5

PEMBAHASAN

5.1 Karakteristik subyek penelitian

Karakteristik subyek penelitian ini yakni berat badan dan usia tikus Wistar jantan. Berdasarkan kriteria inklusi yaitu kisaran berat badan awal hewan coba sebesar $\pm 300 - 400$ gram. Hal ini didasari pada berat rata – rata tikus Wistar jantan yang dikembangkan di Laboratorium Biofarma Bandung, dan juga berat tikus Wistar jantan usia 6 bulan pada umumnya.^{82, 83} Berat badan hewan coba telah dihitung sebelum perlakuan (minggu 0) dan didapatkan hasil rerata berat badan hewan coba berada di rentang 331.14 – 323.92 gram, sesuai dengan kriteria inklusi. Pada akhir masa perlakuan, didapati bahwa rerata berat badan tikus pada awal dan akhir penelitian homogen. Di antara ketiga kelompok, rerata berat badan pada awal dan akhir penelitian tidak terdapat perbedaan bermakna, sehingga meski berat badan tikus di antara ketiga kelompok bervariasi, namun semua kelompok memiliki berat badan yang cenderung sama. Adanya kenaikan berat badan dari awal perlakuan ke akhir perlakuan masih bersifat normal karena tikus Wistar jantan berada pada rentang usia menuju dewasa dimana terjadi kematangan muskuloskeletal yang menyebabkan berat badan bertambah.⁸²

Berdasarkan kriteria usia, ditetapkan bahwa usia tikus Wistar jantan sebagai subyek penelitian berusia 6 bulan. Berdasarkan pada penentuan usia tikus dengan metode yang umum digunakan, dan dari beberapa penelitian mengenai konversi usia tikus dengan usia manusia, didapatkan bahwa usia 6 bulan pada tikus setara dengan usia 18 tahun pada manusia.^{27, 82}

Proses perkembangan otak manusia, termasuk densitas sinaps dan sinaptogenesis telah dimulai sejak dalam kandungan. Sinaptogenesis diketahui telah terjadi sejak minggu ke 34 kehamilan dimana hampir 40.000 sinaps baru terbentuk setiap detiknya dan terus berlanjut hingga setelah lahir, dan mulai menurun ketika menginjak usia remaja.⁸⁴ Berbagai penelitian juga menemukan bahwa fungsi memori mulai mengalami penurunan setelah menginjak usia 20

tahun dan terus berlanjut hingga usia 80 tahun.²⁶ Berdasarkan pada teori tersebut maka ditetapkan usia hewan coba ini yakni 6 bulan yang setara dengan 18 tahun pada manusia. Hal ini sesuai dengan tujuan penelitian yaitu untuk menunjukkan adanya potensi perlakuan pemberian ekstrak *Centella asiatica* sebagai tindakan pencegahan terhadap penurunan fungsi memori.

5.2 Ekspresi protein

Salah satu karakteristik khas dari penuaan adalah penurunan fungsi memori terutama di hipokampus. Hal ini ditandai dengan penurunan ekspresi protein presinaps seperti *synaptophysin* dan post-sinaps seperti PSD-95, serta kehilangan densitas sinaps secara progresif.¹⁶ Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan ekspresi protein presinaps yaitu SYP dan protein post-sinaps yaitu PSD-95 di area CA1 hipokampus pada tikus Wistar jantan.

5.2.1 Ekspresi protein SYP di area CA1 hipokampus

Synaptophysin (SYP) merupakan protein vesikel sinaps terbanyak dan berperan dalam daur ulang vesikel sinaps di terminal presinaps.^{53,55} SYP juga berperan dalam eksositosis vesikel sinaps yaitu mempengaruhi pelepasan neurotransmitter sehingga dapat dikatakan bahwa meningkatnya ekspresi SYP menunjukkan adanya peningkatan fungsi sinaps. SYP paling sering digunakan sebagai marker protein plastisitas sinaps di terminal presinaps dan berperan penting dalam neurotransmisi di neuron hipokampus. Proses neurotransmisi akan merangsang terjadinya sinaptogenesis yang merupakan dasar pembentukan memori. Hal tersebut menunjukkan bahwa meningkatnya ekspresi protein SYP dapat meningkatkan pembentukan memori.⁹

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Gray dkk.,⁸⁵ menyatakan bahwa pemberian ekstrak CeA pada mencit dapat meningkatkan ekspresi gen SYP di hipokampus. Penelitian tersebut menyarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut pada tingkat protein. Hingga saat ini belum ada penelitian yang menyatakan pengaruh pemberian ekstrak CeA terhadap ekspresi protein SYP terkait fungsi memori. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh

pemberian ekstrak CeA terhadap ekspresi SYP pada tingkat protein di hipokampus.

Dalam penelitian ini didapatkan hasil bahwa terjadi peningkatan nilai rerata ekspresi protein SYP dengan pemberian ekstrak etanol CeA dosis 300 mg/kg.BB dan 600 mg/kg.BB dibandingkan dengan kelompok kontrol. Menurut analisis statistik terdapat perbedaan bermakna antara kelompok CA600 dengan kelompok CA300 ($p=0.025$) dan kelompok kontrol ($p=0.000$). Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi protein SYP tertinggi yakni dengan pemberian ekstrak etanol CeA dosis 600 mg/kg.BB.

Centella asiatica dikenal dapat meningkatkan fungsi memori karena mengandung komponen aktif yaitu triterpenoid yang terdiri atas asam asiatika dan asiatikosida, dan flavonoid.²¹ Komponen tersebut bekerja sebagai antioksidan dan neuroprotektif. Pemberian ekstrak CeA dinyatakan dapat meningkatkan fungsi memori.¹⁷ Asam asiatika merupakan komponen triterpenoid dalam CeA yang memiliki sifat neuroprotektif dan dapat meningkatkan fungsi memori melalui aktivitas neurogenesis di hipokampus.⁸⁶ Selain itu, asam asiatika juga memiliki efek antioksidan dan dapat menurunkan kadar *reactive oxygen species* (ROS). Terdapat penelitian yang menyatakan bahwa pemberian asam asiatika selama 28 hari berturut – turut dengan dosis 30 mg/kg.BB dinyatakan lebih baik dalam meningkatkan fungsi memori spasial dibandingkan dengan pemberian selama 14 hari.¹⁸ Penelitian selanjutnya yang dilakukan pada tikus pasca pemberian agen kemoterapi dengan pemberian asam asiatika dosis 30 mg/kg.BB berturut – turut selama 20 hari dinyatakan dapat meningkatkan memori kerja spasial melalui mekanisme ekspresi protein BDNF.⁸⁶ Asiatikosida merupakan komponen dalam CeA yang digunakan sebagai agen terapi demensia dan dapat meningkatkan kognisi.⁷ Asiatikosida dinyatakan dapat menghambat atau menurunkan kadar H_2O_2 yang menginduksi kematian sel dan menurunkan konsentrasi radikal bebas intraseluler.⁸⁷ Terdapat penelitian yang menyebutkan bahwa pemberian asiatikosida pada mencit yang stres selama empat minggu berturut – turut dapat meningkatkan ekspresi BDNF di hipokampus.⁷¹ Senyawa flavonoid dinyatakan dapat menembus sawar darah otak, kemudian akan terikat dengan reseptor TrkB, mengaktifkan jeram sinyal PI3K-Akt dan ERK, memfosforilasi CREB kemudian

meningkatkan transkripsi gen target seperti BDNF.^{23, 24} Dalam penelitian ini, kadar kemurnian ekstrak CeA sebesar 82,61% dengan kadar senyawa asiaticosida sebesar 0,65% dan kadar flavonoid sebesar 0,44%. Oleh karena itu, perlu dilakukan penyesuaian dosis seharusnya 363,15 mg/kg.BB untuk dosis 300 mg/kg.BB dan 726,30 mg/kg.BB untuk dosis 600 mg/kg.BB agar dapat memberikan efek yang lebih baik.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa regulasi ekspresi protein SYP erat kaitannya dengan BDNF. Meski mekanisme atau jalur sinyal yang terjadi belum dapat dijelaskan secara utuh, namun penelitian sebelumnya menyatakan bahwa BDNF dapat meningkatkan ekspresi protein SYP. Analisis yang dilakukan oleh penelitian tersebut pada sinaps di hipokampus mencit yang kehilangan BDNF akan mengalami tiga kelainan utama yakni; adanya gangguan respon sinaps terkait penurunan LTP, adanya penurunan SYP di sinaptosom, dan penurunan jumlah *docking* vesikel sinaps.⁵⁸ Ikatan BDNF dengan reseptornya yakni TrkB menyebabkan dimerisasi dan autofosforilasi dari reseptor TrkB, yang kemudian akan memicu aktivitas berbagai jalur sinyal intraseluler, termasuk jalur yang memicu pertumbuhan spina.²⁴ BDNF yang berikatan dengan reseptornya TrkB dinyatakan dapat memicu peningkatan ekspresi protein SYP, melalui aktivasi jalur sinyal MAPK, PI3K, dan PLC- β .^{58, 59}

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Handayani,⁹⁰ peneliti yang turut serta dalam payung penelitian menyatakan bahwa pemberian ekstrak etanol CeA dosis 600 mg/kgBB dapat meningkatkan ekspresi protein BDNF. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sari dkk.,²¹ yakni bahwa pemberian ekstrak etanol CeA pada dosis 600 mg/kgBB selama 28 hari dapat meningkatkan konsentrasi BDNF dalam serum secara signifikan, maka dilakukan uji korelasi untuk melihat adanya pengaruh pemberian CeA dalam meningkatkan ekspresi protein SYP melalui peningkatan ekspresi protein BDNF.

Analisis statistik korelasi dalam penelitian ini menunjukkan adanya korelasi bermakna yang positif dan sedang ($p=0.006$; $r=0.618$). antara ekspresi protein SYP dengan ekspresi protein BDNF di hipokampus tikus Wistar jantan. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi protein SYP pada pemberian ekstrak CeA dipengaruhi oleh peningkatan ekspresi protein BDNF.

Meski dinyatakan bahwa ekstrak etanol CeA dapat meningkatkan fungsi memori, namun hingga kini mekanisme dan keterkaitan antara pemberian ekstrak CeA dengan ekspresi protein terkait fungsi memori belum sepenuhnya terungkap. Dasar pembentukan memori yakni plastisitas sinaps dan sinaptogenesis bukan suatu proses yang sederhana. Proses pembentukan dan pemeliharaan sinaps yakni sinaptogenesis melibatkan banyak interaksi protein seperti Neureksin-Neurologin, BDNF-TrkB, SNARE, SYP, AMPAR, NMDAR, PSD-95, dan CAMKII.^{15, 44, 90} Dalam penelitian ini tidak semua protein yang terlibat dalam proses sinaptogenesis dan plastisitas sinaps diteliti.

Hasil analisis statistik korelasi antara ekspresi protein SYP dengan fungsi memori tidak bermakna ($p=0.160$, $r=0.346$). Hal ini disebabkan karena dalam pembentukan memori tidak hanya protein SYP yang berperan tetapi merupakan suatu proses yang melibatkan banyak faktor seperti lingkungan dan nutrisi. Merupakan suatu keterbatasan dalam penelitian ini tidak dilakukan penelitian pada semua protein sinaps maupun tahapan pembentukan memori. Meski demikian, protein SYP seringkali digunakan sebagai marker plastisitas sinaps yang mendasari proses pembentukan memori.⁹ Penelitian ini tidak melakukan pengukuran ekspresi protein SYP sebelum dilakukan perlakuan, yang merupakan keterbatasan penelitian ini. Oleh karena itu, digunakan kontrol sebagai perbandingan dengan kelompok perlakuan, dimana terjadi peningkatan yang signifikan antara kelompok CA600 dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini dapat dijadikan sebagai dasar atau acuan bahwa peningkatan fungsi memori pada pemberian ekstrak CeA juga dipengaruhi oleh peningkatan ekspresi protein SYP. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa mencit yang kehilangan protein SYP akan mengalami kesulitan dalam proses pembelajaran. Hasil penelitian ini juga selaras dengan teori bahwa SYP berperan dalam meregulasi transmisi sinaps pada sirkuit saraf yang penting dalam pembelajaran dan memori.¹⁰

5.2.2 Ekspresi protein PSD-95 di area CA1 hipokampus

Post synaptic density-95 (PSD-95) merupakan protein perancah utama pada densitas post-sinaps, dan berperan penting dalam mempertahankan dan memodulasi kekuatan sinaps.^{13,14} Selain itu, PSD-95 juga berperan dalam meregulasi reseptor post-sinaps seperti reseptor NMDA dan reseptor AMPA.¹² PSD-95 merupakan marker plastisitas sinaps pada post-sinaps.¹⁵ Mekanisme LTP di hipokampus dipengaruhi oleh pengantaran reseptor AMPA menuju membran post-sinaps, dan PSD-95 ini dapat mengontrol jumlah reseptor AMPA di membran post-sinaps.⁶⁶

Regulasi PSD-95 dipengaruhi oleh *brain derived neurotropic factor* (BDNF). Sinyal yang dihasilkan oleh ikatan BDNF-TrkB berperan penting dalam perkembangan sinaps dengan meregulasi PSD-95.⁶⁷ Menempelnya BDNF pada reseptornya TrkB akan memunculkan jeram sinyal. Salah satunya jeram sinyal PI3K-Akt yang meregulasi lalu lintas protein PSD-95.⁶⁸ Delesi gen *bdnf* menyebabkan penurunan ekspresi post-sinaps PSD-95 di otak.⁷¹ Telah diketahui sebelumnya bahwa ekstrak CeA mengandung senyawa asam asiatika, asiatikosida dan flavonoid.²¹ Terdapat penelitian yang menyatakan bahwa kandungan asiatikosida dalam CeA yang diberikan selama empat minggu berturut – turut dapat meningkatkan ekspresi BDNF dan PSD-95 di hipokampus.⁷¹ Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa pemberian ekstrak etanol CeA dosis 600 mg/kg.BB selama 28 hari pada tikus yang diinduksi stres kronik dapat meningkatkan konsentrasi BDNF dalam serum secara signifikan.²¹

Menurut Handayani,⁹⁰ dalam payung penelitian ini terjadi peningkatan ekspresi protein BDNF yang signifikan dengan pemberian ekstrak etanol CeA dosis 600 mg/kg.BB. Untuk mengetahui keterkaitan antara ekspresi protein PSD-95 dengan ekspresi protein BDNF, kemudian dilakukan uji korelasi dan hasilnya ditunjukkan bahwa korelasi antara ekspresi protein PSD-95 dengan protein BDNF bermakna ($p=0.000$, $r=0.797$) dengan korelasi yang positif dan kekuatan korelasi yang kuat. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi protein PSD-95 terkait pemberian ekstrak CeA dipengaruhi oleh peningkatan ekspresi protein BDNF di hipokampus.

Dari hasil uji fitokimia yang dilakukan pada ekstrak CeA yang digunakan dalam penelitian ini diketahui terdapat senyawa asiatikosida sebesar 0,65%. Meski kadar senyawa asiatikosida dalam ekstrak CeA yang digunakan masih dibawah standar Farmakope Herbal Indonesia yakni sebesar 0,90%, namun dalam penelitian ini ekstrak CeA sudah dapat meningkatkan ekspresi protein PSD-95 dengan dosis ekstrak 300 mg/kg.BB dan 600 mg/kg.BB. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Gray dkk.,⁸⁵ menunjukkan ekstrak CeA pada mencit dapat meningkatkan ekspresi gen sinaps PSD-95 di hipokampus. Meski demikian, untuk mendapatkan hasil penelitian yang optimal disarankan untuk menggunakan ekstrak CeA dengan kadar senyawa asiatikosida yang sesuai dengan standar Farmakope Herbal Indonesia yakni sebesar 0,90%.

Meningkatnya ekspresi protein PSD-95 dengan pemberian ekstrak CeA nampaknya juga dipengaruhi oleh adanya kandungan flavonoid dalam ekstrak CeA yang digunakan. Hasil uji fitokimia terhadap ekstrak CeA yang digunakan menunjukkan kadar senyawa flavonoid dalam bentuk quercetin sebesar 0,44%. Sejumlah penelitian telah menemukan bahwa flavonoid, termasuk quercetin dapat menembus sawar darah otak dan memiliki fungsi seperti faktor neurotropin di otak. Flavonoid kemudian akan terikat dengan reseptor TrkB, mengaktifkan jeram sinyal PI3K-Akt dan ERK, memfosforilasi CREB kemudian meningkatkan

transkripsi gen target seperti BDNF.^{23, 24} Telah diketahui sebelumnya bahwa ikatan BDNF-TrkB akan memicu jeram sinyal intraseluler yakni PLC γ akan meningkatkan aktivitas *adenyl cyclase* (AC) yang sensitif terhadap ion Ca²⁺ penting dalam regulasi PSD-95 menuju membran post-sinaps. Selain itu, jeram sinyal PI3K-Akt juga meregulasi lalu lintas protein PSD-95.⁶⁸ Terjadinya mobilisasi PSD-95 menuju membran post-sinaps berperan dalam pengantaran dan lokalisasi reseptor AMPA dan NMDA yang penting dalam plastisitas sinaps.⁶⁵

Hasil analisis statistik korelasi antara ekspresi protein PSD-95 dengan fungsi memori tidak bermakna ($p=0.149$, $r=0.355$). Hal ini mungkin terjadi karena pemberian ekstrak CeA tidak secara langsung mempengaruhi PSD-95 tetapi melalui jeram sinyal yang diawali dari peningkatan ekspresi protein BDNF.⁶⁷ Selain itu, dalam proses pembentukan memori tidak hanya protein PSD-95 yang

berperan, melainkan melewati berbagai tahap dan melibatkan banyak ekspresi

protein sinaps lainnya. ^{15, 44, 90} Hal tersebut menjadi keterbatasan dalam penelitian

ini dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memperjelas mekanisme ekspresi protein sinaps terkait pemberian ekstrak etanol CeA terhadap fungsi memori.

Dalam penelitian ini tidak diperiksa ekspresi protein PSD-95 sebelum perlakuan dan hal tersebut merupakan keterbatasan dalam penelitian ini. Meski demikian, penelitian ini menggunakan kelompok kontrol sebagai pembanding, yakni ekspresi protein PSD-95 dan fungsi memori lebih baik pada kelompok CA300 dan CA600 dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini dapat dijadikan dasar bahwa pemberian ekstrak etanol CeA dapat meningkatkan fungsi memori ditandai dengan peningkatan ekspresi protein PSD-95 sebagai marker plastisitas sinaps. Hasil penelitian ini selaras dengan penelitian yang dilakukan pada mencit bahwa menurunnya kadar PSD-95 dapat menyebabkan gangguan proses belajar dan memori. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa mencit dengan bentuk mutasi PSD-95 dengan kehilangan domain PDZ mengalami gangguan proses belajar.⁶²

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dan uraian yang telah dipaparkan pada bab pembahasan maka dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* dosis 600 mg/kg.BB dapat meningkatkan ekspresi protein SYP dan PSD-95 pada regio CA1 hipokampus tikus Wistar jantan secara signifikan dibandingkan dengan dosis 300 mg/kg.BB dan kontrol. Selain itu, penelitian ini menunjukkan bahwa tidak terdapat korelasi antara ekspresi protein SYP dan PSD-95 dengan fungsi memori.

6.2 Saran

Dari penelitian ini, dapat disarankan beberapa hal sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan pemeriksaan ekspresi protein SYP dan PSD-95 sebelum dilakukan perlakuan pada hewan coba sebagai acuan terhadap perubahan ekspresi protein setelah dilakukan perlakuan.
2. Perlu dilakukan penelitian selanjutnya yakni pemeriksaan ekspresi protein lainnya yang terkait dalam proses pembentukan memori seperti Neureksin-Neurologin, SNARE, NMDAR dan CAMKII mengingat bahwa proses pembentukan memori merupakan suatu proses yang multifaktorial.
3. Perlu dilakukan penyesuaian dosis pemberian ekstrak dengan penambahan sebesar 17,38% agar dapat memberikan efek yang optimal.
4. Perlu dilakukan penelitian selanjutnya untuk membandingkan pemberian ekstrak CeA dengan produk herbal lainnya seperti *Ginkgo biloba* atau *Bacopa monnieri* (L.) sebagai usaha pencegahan penurunan fungsi memori.

DAFTAR PUSTAKA

1. Shivarama SM, Sajikumar S. 'Tagging' along memories in aging: Synaptic tagging and capture mechanisms in the aged hippocampus. *Ageing Research Reviews*. 2017;35:22-35.
2. Bettio LEB, Rajendran L, Gil-Mohapel J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2017;79:66-86.
3. Muzamil MS, Afriwardi A, Martini RD. Hubungan antara tingkat aktivitas fisik dengan fungsi kognitif pada usia di kelurahan Jati kecamatan Padang Timur. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2014;3(2):202-5.
4. Stein LR, O'Dell KA, Funatsu M, Zorumski CF, Izumi Y. Short-term environmental enrichment enhances synaptic plasticity in hippocampal slices from aged rats. *Neuroscience*. 2016;329:294-305.
5. Leal G, Afonso PM, Salazar IL, Duarte CB. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Research*. 2015;1621:82-101.
6. Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiology of Learning and Memory*. 2008;89(3):312-23.
7. Kumar H, More SV, Han SD, Choi JY, Choi DK. Promising therapeutics with natural bioactive compounds for improving learning and memory--a review of randomized trials. *Molecules*. 2012;17(9):10503-39.
8. Jared SR. Enhancement of memory in rats with *Centella asiatica*. *Biomedical Research*. 2010;21(4):429-32
9. Hajjar T, Goh YM, Rajion MA, Vidyadaran S, Li TA, Ebrahimi M. Alterations in neuronal morphology and synaptophysin expression in the rat brain as a result of changes in dietary n-6: n-3 fatty acid ratios. *Lipids in Health and Disease*. 2013;12:113.
10. Kwon SE, Chapman ER. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron*. 2011;70(5):847-54.
11. Janz R, Südhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum SA, Bolshakov VY. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron*. 1999;24(3):687-700.
12. Han K, Kim E. Synaptic adhesion molecules and PSD-95. *Prog Neurobiol*. 2008;84(3):263-83.
13. Zhang J, Lewis SM, Kuhlman B, Lee AL. Supertertiary structure of the MAGUK core from PSD-95. *Structure*. 2013;21(3):402-13.
14. Chen X, Levy JM, Hou A, Winters C, Azzam R, Sousa AA, et al. PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(50):E6983-92.
15. Nelson TJ, Alkon DL. Molecular regulation of synaptogenesis during associative learning and memory. *Brain Research*. 2015;1621:239-51.
16. Ojo B, Rezaie P, Gabbott PL, Davies H, Colyer F, Cowley TR, et al. Age-related changes in the hippocampus (loss of synaptophysin and glial-synaptic interaction) are modified by systemic treatment with an NCAM-derived peptide, FGL. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2012;26(5):778-88.
17. Orhan IE. *Centella asiatica* (L.) Urban: From traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*. 2012;2012:946259.
18. Sirichoat A, Chaijaroonkhanarak W, Prachaney P, Pannangrong W, Leksomboon R, Chaichun A, et al. Effects of asiatic acid on spatial working memory and cell proliferation in the adult rat hippocampus. *Nutrients*. 2015;7(10):8413-23.
19. Ramadhan NS, Rasyid R, Syamsir E. Daya hambat ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) yang diambil di Batusangkar terhadap pertumbuhan kuman *Vibrio cholerae* secara *in vitro*. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2015;4(1):202-6.
20. Sari DCR, Aswin S, Susilowati R, Ar-Rochmah M, Prakosa D, Romi M, et al. Ethanol extracts of *Centella asiatica* leaf improves memory performance in rats after chronic

- stress via reducing nitric oxide and increasing Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Concentration. *GSTF Journal of Psychology (JPsych)*. 2014;1(1):61-7.
21. Sari DCR, Rochmah MA. The effects of ethanol extracts of *Centella asiatica* leaf on serial serum brain derived neurotrophin factor (bdnf) concentration of rats (Sprague Dawley) following chronic stress. *KnE Life Sciences*. 2015;2(1):159.
 22. Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JP. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes & Nutrition*. 2008;3(3-4):115-26.
 23. Naoi M, Inaba-Hasegawa K, Shamoto-Nagai M, Maruyama W. Neurotrophic function of phytochemicals for neuroprotection in aging and neurodegenerative disorders: Modulation of intracellular signaling and gene expression. *Journal of Neural Transmission*. 2017;124(12):1515-27.
 24. Stagni F, Giacomini A, Guidi S, Emili M, Uguagliati B, Salvalai ME, et al. A flavonoid agonist of the TrkB receptor for BDNF improves hippocampal neurogenesis and hippocampus-dependent memory in the Ts65Dn mouse model of DS. *Experimental Neurology*. 2017;298:79-96.
 25. Mirza I RH, Khomsan A, Marliyati SA, Damayanthi E, Winarto A. Pengaruh ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) urban) terhadap gambaran darah, aktivitas, dan fungsi kognitif tikus. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 2013;7.
 26. Marlatt MW, Potter MC, Lucassen PJ, van Praag H. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. *Developmental Neurobiology*. 2012;72(6):943-52.
 27. Andreollo NA, Santos EFd, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: What is the relationship? *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 2012;25(1):49-51.
 28. Sherwood L. *Human Physiology from Cell to Systems*. 9th ed. Boston: Cengage Learning; 2016.p.157-162.
 29. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neuroscience: Exploring the Brain*. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2016.p.824-9.
 30. Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* 13rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.p.746-7.
 31. Kim E. Barret SMB, Scott Boitano, Heddwen L Brooks. *Ganong's Review of Medical Physiology* 24th ed. New York: The McGraw-Hill Companies; 2012.p.283-7.
 32. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. *Principles of Neural Science*. 5th ed. New York: The McGraw Hill Company; 2013.p.1441-7.
 33. DE S. *Human physiology: an integrated approach* 6th ed. Boston: Pearson; 2013.p.315-6.
 34. Baddeley A. Working memory. *Current Biology : CB*. 2010;20(4):R136-40.
 35. Eriksson J, Vogel EK, Lansner A, Bergstrom F, Nyberg L. Neurocognitive architecture of working memory. *Neuron*. 2015;88(1):33-46.
 36. Leuner B, Gould E. Structural plasticity and hippocampal function. *Annual Review of Psychology*. 2010;61:111-40, C1-3.
 37. Anand KS, Dhikav V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2012;15(4):239.
 38. Bartsch T, Wulff P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*. 2015;309:1-16.
 39. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neuroscience : Exploring the brain*. Fourth ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2016.p.838-9
 40. Treuting PM, Dintzis SM, Liggitt D, Frevert CW, editors. *Comparative Anatomy and Histology: a Mouse and Human Atlas (expert consult)*. Academic Press; 2011.
 41. Bekkers JM. Pyramidal Neurons. *Current Biology*. 2011;21(24):R975.
 42. Amin SN, Younan SM, Youssef MF, Rashed LA, Mohamady I. A histological and functional study on hippocampal formation of normal and diabetic rats. *F1000Research*. 2013;2:151.
 43. Cobar LF, Yuan L, Tashiro A. Place cells and long-term potentiation in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2017;138:206-14.
 44. Korte M, Schmitz D. Cellular and system biology of memory: Timing, molecules, and beyond. *Physiological Reviews*. 2016;96(2):647-93.

45. Andersen P. *The Hippocampus Book*: Oxford University Press; 2007.
46. Martin SJ, Clark RE. The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. *Cellular and Molecular Life Sciences* : CMLS. 2007;64(4):401-31.
47. Salazar IL, Caldeira MV, Curcio M, Duarte CB. The role of proteases in hippocampal synaptic plasticity: putting together small pieces of a complex puzzle. *Neurochemical Research*. 2016;41(1-2):156-82.
48. Rosenberg T, Gal-Ben-Ari S, Dieterich DC, Kreutz MR, Ziv NE, Gundelfinger ED, et al. The roles of protein expression in synaptic plasticity and memory consolidation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2014;7:86.
49. Yang Y, Calakos N. Presynaptic long-term plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2013;5:8.
50. Ho VM, Lee JA, Martin KC. The cell biology of synaptic plasticity. *Science*. 2011;334(6056):623-8.
51. Sudhof TC, Rizo J. Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011;3(12).
52. Adams DJ, Arthur CP, Stowell MH. Architecture of the synaptophysin/synaptobrevin complex: Structural evidence for an entropic clustering function at the synapse. *Scientific Reports*. 2015;5:13659.
53. Ishibashi H. Increased synaptophysin expression through whisker stimulation in rat. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2002;22(2):191-5.
54. Frick KM, Fernandez SM. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiology of Aging*. 2003;24(4):615-26.
55. Evans GJ, Cousin MA. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochemical Society Transactions*. 2005;33(Pt 6):1350-3.
56. Abad-Rodríguez J, Díez-Revuelta N. Axon glycoprotein routing in nerve polarity, function, and repair. *Trends in Biochemical Sciences*. 2015;40(7):385-96.
57. Fletcher TL, Cameron P, De Camilli P, Banker G. The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *Journal of Neuroscience*. 1991;11(6):1617-26.
58. Tartaglia N, Du J, Tyler WJ, Neale E, Pozzo-Miller L, Lu B. Protein synthesis-dependent and independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(40):37585-93.
59. Coffey ET, Åkerman KE, Courtney MJ. Brain derived neurotrophic factor induces a rapid upregulation of synaptophysin and *tau* proteins via the neurotrophin receptor TrkB in rat cerebellar granule cells. *Neuroscience Letters*. 1997;227(3):177-80.
60. Broadhead MJ, Horrocks MH, Zhu F, Muresan L, Benavides-Piccione R, DeFelipe J, et al. PSD95 nanoclusters are postsynaptic building blocks in hippocampus circuits. *Scientific Reports*. 2016;6:24626.
61. Han K, Kim E. Synaptic adhesion molecules and PSD-95. *Progress in Neurobiology*. 2008;84(3):263-83.
62. Sultana R, Banks WA, Butterfield DA. Decreased levels of PSD95 and two associated proteins and increased levels of Bcl2 and caspase 3 in hippocampus from subjects with amnesic mild cognitive impairment: Insights into their potential roles for loss of synapses and memory, accumulation of Aβ, and neurodegeneration in a prodromal stage of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*. 2010;88(3):469-77.
63. Xu W. PSD-95-like membrane associated guanylate kinases (PSD-MAGUKs) and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*. 2011;21(2):306-12.
64. Vallejo D, Codocedo JF, Inestrosa NC. Posttranslational modifications regulate the postsynaptic localization of PSD-95. *Molecular Neurobiology*. 2016;54(3):1759-76.
65. Zhang Y, Matt L, Patriarchi T, Malik ZA, Chowdhury D, Park DK, et al. Capping of the N-terminus of PSD-95 by calmodulin triggers its postsynaptic release. *The EMBO Journal*. 2014;33(12):1341-53.
66. Ehrlich I, Malinow R. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(4):916-27.

67. Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic localization of PSD-95 is regulated by all three pathways downstream of TrkB signaling. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2014;6:6.
68. Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Developmental Neurobiology*. 2010;70(5):304-22.
69. Yan BC, Park JH, Ahn JH, Lee JC, Won MH, Kang IJ. Postsynaptic density protein (PSD)-95 expression is markedly decreased in the hippocampal CA1 region after experimental ischemia-reperfusion injury. *Journal of the Neurological Sciences*. 2013;330(1-2):111-6.
70. Lokanathan Y, Omar N, Puzi NNA, Saim A, Idrus RH. Recent updates in neuroprotective and neuroregenerative potential of *Centella asiatica*. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*. 2016;23(1):4.
71. Luo L, Liu XL, Mu RH, Wu YJ, Liu BB, Geng D, et al. Hippocampal BDNF signaling restored with chronic asiaticoside treatment in depression-like mice. *Brain Research Bulletin*. 2015;114:62-9.
72. Spencer JP. Food for thought: The role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2008;67(2):238-52.
73. Singh AS, Masuku MB. Sampling techniques & determination of sample size in applied statistics research: An overview. *International Journal of Economics, Commerce and Management*. 2014;2(11):1-22.
74. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Tentang Farmakope Herbal Indonesia Edisi Pertama. 2009:111-5.
75. Spijker S. Dissection of rodent brain regions. *Neuroproteomics*. 2011;57:13-26.
76. Spencer LT, Bancroft JD. Tissue processing. In: Gamble M, Bancroft JD. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2008. p. 83-92.
77. Gamble M, Wilson I. The hematoxylin and eosin. In: Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2008. p. 121-34.
78. Spencer LT, Bancroft JD. Microtomy: paraffin and frozen. In: Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2008. p. 93-104.
79. Jackson P, Blythe D. Immunohistochemical techniques. In: Bancroft JD, Gamble M. *The Theory and Practice of Histology Techniques*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2008. p. 433-72.
80. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*. 2014;9(5):e96801.
81. Jafari S, Morteza S, Hunger R. IHC optical density score: a new practical method for quantitative immunohistochemistry image analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017;25(1):e12-e3.
82. Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine*. 2013;4(6):624.
83. Kwekel JC, Desai VG, Moland CL, Branham WS, Fuscoe JC. Age and sex dependent changes in liver gene expression during the life cycle of the rat. *BMC Genomics*. 2010;11:675.
84. Tau GZ, Peterson BS. Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):147-68.
85. Gray NE, Harris CJ, Quinn JF, Soumyanath A. *Centella asiatica* modulates antioxidant and mitochondrial pathways and improves cognitive function in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;180:78-86.
86. Chaisawang P, Sirichoat A, Chaijaroonkhanarak W, Pannangrong W, Sripanidkulchai B, Wigmore P, et al. Asiatic acid protects against cognitive deficits and reductions in cell proliferation and survival in the rat hippocampus caused by 5-fluorouracil chemotherapy. *PLoS one*. 2017;12(7):e0180650.

87. Sampath U, Janardhanam VA. Asiaticoside, a trisaccharide triterpene induces biochemical and molecular variations in brain of mice with parkinsonism. *Translational Neurodegeneration*. 2013;2(1):23.
88. Handayani A. Peran ekstrak etanol *Centella asiatica* terhadap ekspresi protein brain-derived neurotrophic factor (BDNF) dan tyrosine receptor kinase b (trk-b) pada hipokampus tikus Wistar jantan. Jakarta: Universitas Indonesia; 2018.
89. Petzoldt AG, Sigrist SJ. Synaptogenesis. *Current Biology: CB*. 2014;24(22):R1076-80.

Lampiran

Lampiran 1. Keterangan Lolos Kaji Etik



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Gedung Fakultas Kedokteran UI
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430
PO Box 1358
T. 62.21.3912477, 31900371, 31900373,
3902972, 3907390, 3153236,
F. 62.21.3912472, 31900372, 3157388,
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id
fk.ui.ac.id

Nomor : 624 /UN2.F1/ETIK/2016

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

"Potensi Ekstrak *Centella asiatica* terhadap Plastisitas Sinaps dan Fungsi Memori Tikus Wistar Jantan".

Peneliti Utama : dr. Nurhadi Ibrahim, PhD.
Principal Investigator

Nama Institusi : Ilmu Biomedik/Fisiologi FKUI
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
and approved the above mentioned protocol.

2 6 SEP 2016
Ketua
Chairman
Rianto
Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK

* *Ethical approval* berlaku satu tahun dan tanggal peratapan.

** *Peneliti berkewajiban*

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical approval* harus diperpanjang.
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan.
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informal consent*.

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.
All procedure of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.

Lampiran 2. Sertifikat Pengujian *Centella asiatica*



Kementerian Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
 Jalan Tentara Pelajar No. 3 Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu, Bogor 16111
 Telepon : (0251) 8321879 Faximile : (0251) 8327010 E-mail : balitro@telkom.net

SERTIFIKAT PENGUJIAN
CERTIFICATE OF ANALYSIS
 No. Adm . : 482/T/LAB/VI/16

DF 5.10.1.2.

Kepada Yth
Dr. Nuhadi Ibrahim, Ph.D
 Universitas Indonesia

Kondisi / Identifikasi Contoh : Simplisia
 Tanggal Penerimaan : 15 Agustus 2016
 Tanggal Pengujian : 18 Agustus & 6 - 13 September 2016

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian / Pemeriksaan	Hasil Pengujian /Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
1.	Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	- Ekstrak Etanol 70% Rendemen (%) - Kadar Air (%) Uji Fitokimia : - Alkaloid - Saponin - Tanin - Fenolik - Flavonoid - Triterpenoid - Steroid - Glikosida	8,16 17,39 + + + + + + +	Maserasi Aufhauser Kualitatif

Bogor, 16 September 2016
 Manajer Teknis


Ma'mun, S.Si

- Laporan hasil uji ini berlaku selama 90 hari sejak diterbitkan. Surat menyurat agar mencantumkan nomor administrasi.
 - Hasil Pengujian / di atas hanya berdasarkan contoh uji yang bersangkutan. Laporan ini dilarang diperbanyak kecuali atas persetujuan tertulis dari Laboratorium Pengujian / Balitro.

Lembar kedua : disimpan oleh Manajer Administrasi

Lampiran 3. Sertifikat Pengujian *Centella asiatica*



Kementerian Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
 Jalan Tentara Pelajar No. 3 Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu, Bogor 16111
 Telepon : (0251) 8321879 Faximile : (0251) 8327010 E-mail: balitro@telkom.net

SERTIFIKAT PENGUJIAN
CERTIFICATE OF ANALYSIS
 No. Adm . :100/T/LAB/II/17

DF 5.10.1.2.

Kepada YthF
Astri Handayani

Kondisi / Identifikasi Contoh : Ekstrak
 Tanggal Penerimaan : 10 Februari 2017
 Tanggal Pengujian : 16 – 23 Februari 2017

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian / Pemeriksaan	Hasil Pengujian /Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
1.	Ekstrak Pegagan	- Kadar Tanin (%)	0,22	Spektrofootmetri
		- Kadar Flavonoid sebagai Quersetin (%)	0,44	Spektrofotometri
		- Kadar Saponin (%)	1,25	TLC Scanner
		- Kadar Asiaticosida (%)	0,65	TLC Scanner

Bogor, 14 Maret 2017
 Manajer Teknis



Ma'mun, S.Si

- Laporan hasil uji ini berlaku selama 90 hari sejak diterbitkan. Surat menyurat agar mencantumkan nomor administrasi.
 - Hasil Pengujian / di atas hanya berdasarkan contoh uji yang bersangkutan. Laporan ini dilarang diperbanyak kecuali atas persetujuan tertulis dari Laboratorium Pengujian / Balitro.

Lembar kedua : disimpan oleh Manajer Administrasi

Lampiran 4. Perhitungan Pemberian Ekstrak Etanol *Centella asiatica*

Diketahui:	
Kadar air : 17,39%	
Kadar kemurnian ekstrak : $100\% - 17,39\% = 82,61\%$	
Estimasi BB tikus per ekor : 400 gram	
Jumlah tikus per kelompok : 6 ekor	
<p>Dosis 300 mg/kg.BB</p> $\frac{100\%}{82,61\%} \cdot 300 / . = 363,15 / .$ <p>Dosis yang diberikan per ekor per hari (BB 400 gr) :</p> $\frac{363,15}{100} \cdot 400 = 145,26$ <p>Jumlah ekstrak yang ditimbang untuk 6 ekor:</p> $145,266 = 871,56$ <p>Volume sediaan yang diberikan per hari: = 1,5 cc per ekor. = $1,5 \times 6$ ekor = 9 cc/6 ekor/hari</p> <p>Maka untuk 6 ekor dibuat sediaan dengan mengambil ekstrak sebanyak 871,56 mg dilarutkan dengan aquades sampai 9 cc.</p>	<p>Dosis 600 mg/kg.BB</p> $\frac{100\%}{82,61\%} \cdot 600 / . = 726,30 / .$ <p>Dosis yang diberikan per ekor per hari (BB 400 gr) :</p> $\frac{726,30}{100} \cdot 400 = 290,52$ <p>Jumlah ekstrak yang ditimbang untuk 6 ekor:</p> $290,526 = 1743,12$ <p>Volume sediaan yang diberikan per hari: = 1,5 cc per ekor. = $1,5 \times 6$ ekor = 9 cc/6 ekor/hari</p> <p>Maka untuk 6 ekor dibuat sediaan dengan mengambil ekstrak sebanyak 1743,12 mg dilarutkan dengan aquades sampai 9 cc.</p>

Draft Artikel

THE EFFECT OF PEGAGAN (*Centella asiatica* (L.) Urban) ETHANOL EXTRACT ON HIPPOCAMPAL PSD-95 PROTEIN EXPRESSION IN MALE WISTAR RATS

PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN (*Centella asiatica* (L.) Urban) TERHADAP EKSPRESI PROTEIN PSD-95 PADA HIPOKAMPUS TIKUS WISTAR JANTAN

Adibah Ferhad¹, Auliyani Andam Suri¹, Astri Handayani¹, Sri Redjeki^{2*}, Ria Kodariah³

¹Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

²Bagian Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

³Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

*djeki.pras@gmail.com

ABSTRACT

One effort to overcome the decline in memory function is through herbal medicine. Pegagan plant (*Centella asiatica* (L.) Urban) contains the active components of triterpenoid and flavonoids, has been known to be able to improve memory function. Memory formation is based on synapse plasticity. Post Synaptic Density-95 (PSD-95) is a protein known as synaptic plasticity marker in the post synapse membrane and is closely related to memory formation. Loss of PSD-95 protein can cause memory function decline. This study aims to determine the effect of 70% pegagan ethanol extract toward PSD-95 protein expression on hippocampus of male Wistar rat. This study has received approval from the Ethics Committee of Health Research, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia. Eighteen male Wistar rats were randomly divided into 3 groups, each with 6 rats (1) group given ethanol extract of pegagan with dose 300mg / kgBW / day (CA300), (2) group given ethanol extract of pegagan with dose 600mg / kgBW / day (CA600), and (3) control group (K), given daily aquadest. All three groups were treated for 28 consecutive days. At the end of the treatment period, rats were decapitated and the hippocampus was isolated from the brain. Analysis of protein expression was done by immunohistochemical method (IHC). The results showed that there was no significant difference between group K and group CA300 ($P = 0.123$), whereas there were significant differences between CA600 group and K group and CA300 group ($P = 0.000$). From this research, it is concluded that giving 70% pegagan ethanol extract with dose 600mg / kgBW / day can increase expression of PSD-95 protein on hippocampus of male Wistar rat.

Keywords: *Post Synaptic Density-95*, memory function, flavonoids, *Centella asiatica* (L.) Urban.

ABSTRAK

Salah satu upaya dalam mengatasi penurunan fungsi memori yaitu melalui pengobatan herbal. Tanaman pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) mengandung komponen aktif yaitu triterpenoid dan flavonoid, sudah sejak lama dikenal dapat meningkatkan fungsi memori. Pembentukan memori didasari oleh plastisitas sinaps. *Post Synaptic Density-95* (PSD-95) merupakan protein yang dikenal sebagai marker plastisitas sinaps di membran postsinaps dan erat kaitannya dengan pembentukan memori. Kehilangan protein PSD-95 dapat menyebabkan penurunan fungsi memori. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 70% pegagan terhadap ekspresi protein PSD-95 pada hipokampus tikus Wistar jantan. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Delapan belas ekor tikus Wistar jantan dibagi secara acak menjadi 3 kelompok, masing – masing 6 ekor tikus yaitu (1) kelompok yang diberikan ekstrak etanol pegagan dosis 300mg/kgBB/hari (CA300), (2) kelompok yang diberikan ekstrak etanol pegagan dosis 600mg/kgBB/hari (CA600), dan (3) kelompok kontrol (K), diberikan akuades setiap hari. Ketiga kelompok mendapat perlakuan selama 28 hari. Pada akhir masa perlakuan, hewan coba di dekapitasi kemudian dilakukan pengambilan jaringan hipokampus dari otak. Analisis ekspresi protein dilakukan dengan metode imunohistokimia (IHK). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok K dengan kelompok CA300 ($P=0.123$), sedangkan terdapat perbedaan bermakna antara kelompok CA600 dengan kelompok K dan kelompok CA300 ($P=0.000$). Dari penelitian ini disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol 70% pegagan dosis 600mg/kgBB/hari dapat meningkatkan ekspresi protein PSD-95 pada hipokampus tikus Wistar jantan.

Kata kunci: *Post Synaptic Density-95*, fungsi memori, flavonoid, *Centella asiatica* (L.) Urban.

PENDAHULUAN

Penurunan fungsi memori terjadi seiring bertambahnya usia, meski tanpa disertai dengan penyakit degeneratif seperti demensia atau penyakit Alzheimer. Penurunan fungsi memori berdampak pada menurunnya kualitas hidup

seseorang (Stein et al., 2016). Salah satu upaya dalam mengatasi penurunan fungsi memori yaitu melalui pengobatan herbal. Tanaman pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) merupakan tanaman obat tropis dari family Apiaceae yang berasal dari Asia Tenggara termasuk Indonesia. Daun pegagan ini dapat
Universitas Indonesia

dimakan, berwarna hijau kekuningan, tipis, dengan tangkai daun yang panjang, dan memiliki bentuk yang khas yaitu berbentuk ginjal, tepi bergerigi, bundar, atau lonjong-elips dengan tujuh tulang

daun. Tanaman ini tumbuh horizontal dengan geragih hijau kemerahan yang bergabung satu sama lain dan berakar dibawah tanah (Orhan, 2012). Pegagan atau antanan sering dijumpai di tempat terbuka, pada tanah yang lembab dan subur seperti di pematang sawah, di padang rumput, di pinggir parit dan di pinggir jalan (Ramadhan et al., 2015). Terdapat dua komponen utama dalam pegagan yaitu triterpenoid dan flavonoid. Kedua komponen tersebut berfungsi sebagai antioksidan dan bersifat neuroprotektif (Sari and Rochmah, 2015, Orhan, 2012, Vauzour et al., 2008). Pegagan telah lama digunakan dalam pengobatan Ayurveda dan pengobatan tradisional cina untuk meningkatkan fungsi memori (Lokanathan et al., 2016). Memori merupakan kemampuan untuk merekam pengalaman hidup, sehingga mempengaruhi sikap atau kebiasaan seseorang sesuai dengan

kondisi lingkungannya (Jared, 2010). Proses pembentukan memori terjadi melalui mekanisme seluler yaitu adanya perubahan kekuatan sinaps atau disebut plastisitas sinaps (Lu et al., 2008, Leal et al., 2015).

Plastisitas pada sinaps eksitatorik dapat dimediasi pada tingkat presinaps maupun postsinaps (Leal et al., 2015). *Postsynaptic density-95* (PSD-95) merupakan protein perancah utama pada densitas postsinaps di sinaps eksitatori glutamatergik. PSD-95 termasuk dalam anggota *membrane-associated guanylate kinase* (MAGUK) (Zhang et al., 2013). PSD-95 berperan dalam mempertahankan dan memodulasi kekuatan sinaps (Chen et al., 2015). PSD-95 sering digunakan sebagai marker sinaps pada postsinaps dan erat kaitannya dengan fungsi memori (Nelson and Alkon, 2015). Kehilangan protein PSD-95 yang terjadi seiring dengan bertambahnya usia, erat kaitannya dengan penurunan fungsi memori (Ojo et al., 2012).

Penurunan fungsi memori pada manusia terjadi sejak awal usia dewasa yaitu sejak usia 20 tahun (Marlatt et al., 2012). Oleh karena

itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol pegagan dalam meningkatkan ekspresi protein PSD-95 sebagai bentuk pencegahan penurunan fungsi memori pada hipokampus tikus Wistar jantan usia 6 bulan, dimana usia tersebut bila dikonversi ke manusia setara dengan usia 18 tahun (Andreollo et al., 2012).

METODOLOGI

Bahan

a. Bahan obat uji

Simplisia tanaman pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) didapatkan dari Pusat Studi Biofarmaka Institut Pertanian Bogor (IPB). Ekstraksi bahan dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) Bogor. Pegagan di ekstraksi dengan etanol 70% menggunakan metode maserasi. Setelah bahan di ekstraksi, kemudian dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif untuk mengetahui kandungan aktif dalam ekstrak etanol pegagan. Desain dan metode penelitian ini merupakan bagian dari satu proyek penelitian besar yang telah lolos kaji etik oleh Komite Etik

Penelitian Kesehatan FKUI dengan nomor etik: 824/UN2.FI/ETIK/2016.

b. Subyek penelitian

Subjek penelitian ini yaitu hewan coba tikus (*Rattus novergicus*) jantan galur Wistar, berusia 6 bulan dengan berat badan awal 300 – 400 gram, sehat dan aktif. Subjek penelitian dibiakkan di Biofarma-Bandung. Perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Departemen Patologi Anatomi FKUI. Sebelum dan selama perlakuan, kesehatan hewan coba dijaga agar tidak sakit. Hewan coba diberi makanan standar dan minuman secara *ad libitum*. Hewan coba dipelihara di dalam kandang beralas sekam yang dilengkapi tempat pakan dan botol air minum. Kandang hewan coba dijaga kebersihannya serta diatur 12 jam terang dan 12 jam gelap. Suhu lingkungan dipertahankan pada suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Hal-hal lain dalam percobaan disesuaikan dengan kode etik komisi penanganan dan penggunaan hewan coba. Sampel penelitian ini yaitu jaringan hipokampus tikus Wistar jantan yang menjadi subjek penelitian.

c. Bahan dan alat dalam pemeriksaan protein

Prosedur pemeriksaan protein PSD-95 dilakukan di Laboratorium Imunologi Departemen Patologi Anatomi FKUI menggunakan metode imunohistokimia (IHK). Bahan dan alat yang digunakan antara lain *xylene* (Merck), *ethanol* (Merck) (dengan konsentrasi absolut, 96%, 80% dan 70%), *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Biomatix) dengan pH 7,4, dapar sodium sitrat pH 6.0, Hidrogen peroksida (H₂O₂) 35%, antibodi primer anti-PSD95 antibody (Abcam), antibodi sekunder *Universal HRP Polimer* (Neopoly), detection kit (Biogear), Hematoxilin Meyer, Lithium karbonat jenuh (5%), entelan, *super PAP pen* (Biogear), dan air deionisasi. Sedangkan alat yang digunakan antara lain yaitu timbangan analitik, *microtome*, slide mikroskop *Aurora* (bermuatan positif), *cover glass*, *water bath*, oven pengering, *slide warmer*, *Biocare's Decloaking Chamber*, pH meter (Schoot), mikroskop (Olympus BX51) dengan kamera digital (Olympus).

Metoda

a. Persiapan bahan obat uji

Simplisia pegagan di ekstraksi dengan metode maserasi. Simplisia pegagan sebanyak 5kg di haluskan menggunakan grinder, sampai menjadi serbuk. Serbuk pegagan kemudian ditimbang, didapatkan 4kg serbuk dan dimasukkan kedalam wadah stainless dan dimasukkan pelarutnya yaitu etanol 70% diaduk dengan mixer selama 3 jam. Selanjutnya diendapkan selama 24 jam. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring. Hasil saringan tersebut dipisahkan dengan alat rotary evaporator dengan suhu 50⁰C sampai penguapan selesai. Diperoleh ekstrak kental sebanyak 326.4gr dan rendemennya sebanyak 8.16% dengan kadar air 17.39%.

Setelah di ekstraksi, dilakukan uji fitokimia dengan metode kualitatif dan didapatkan hasil yaitu ekstrak pegagan mengandung alkaloid, saponin, tannin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, steroid, dan glikosida. Kemudian dilanjutkan dengan uji kuantitatif untuk mengetahui persentase kandungan aktif ekstrak

pegagan. Dari uji kuantitatif, didapatkan hasil yaitu ekstrak pegagan mengandung 22% kadar tanin, 44% flavonoid, 125% kadar saponin, dan 65% kadar asiatikosida.

b. Pemberian ekstrak pegagan

Hewan coba ditimbang berat tubuhnya untuk menentukan jumlah ekstrak yang akan diberikan sesuai dengan rentang dosisnya. Sediaan disiapkan untuk memenuhi kebutuhan pemberian ekstrak. Pengenceran sediaan ekstrak disiapkan untuk keperluan 7 hari perlakuan. Hal ini dilakukan untuk menghindari kerusakan jika sediaan disimpan lebih dari 7 hari. Setelah dilakukan pengenceran, sediaan disimpan di lemari pendingin dengan suhu 4⁰C. Setelah 7 hari, sediaan dibuat kembali untuk keperluan hari berikutnya. Sebelum diberikan kepada hewan coba, sediaan ekstrak dibiarkan sebentar dalam suhu ruangan, kemudian diaduk dengan baik agar tercampur dan tidak ada endapan sehingga memudahkan proses penyondean pada hewan coba.

Hewan coba dibagi secara acak menjadi tiga kelompok yaitu :
(1) kelompok kontrol (K) diberikan

aquades sebanyak 2mL, (2) kelompok yang diberikan ekstrak pegagan dosis 300mg/kgBB/hari (CA 300) sebanyak 1,2mL, (3) kelompok yang diberikan ekstrak pegagan dosis 600mg/kgBB/hari (CA 600) sebanyak 2,4mL. Masing – masing perlakuan pada setiap kelompok diberikan satu kali sehari selama 28 hari berturut – turut dengan waktu yang sama di pagi hari, diberikan secara oral menggunakan sonde lambung.

c. Serangkaian prosedur IHK dan pemeriksaan protein

Pada akhir masa perlakuan, subjek penelitian di dekapitasi, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan jaringan hipokampus dari otak sesegera mungkin. Jaringan hipokampus yang sudah diisolasi dimasukkan ke dalam dapar formalin 10% selama 24 jam untuk kemudian dilakukan pembuatan blok parafin. Sebelum melakukan prosedur imunohistokimia (IHK), blok parafin yang telah dibuat tadi dipotong dengan ketebalan 4 mikron dan diapungkan pada *water bath*. Kemudian potongan tersebut ditempatkan diatas *coated slide*.

Cairan yang terdapat di slide dikeringkan, lalu slide dimasukkan ke dalam oven pengering selama 30 – 60 menit dengan suhu 37⁰C (Spencer and Bancroft, 2008).

Prosedur pulasan IHC yang digunakan dalam penelitian ini adalah prosedur IHC Neopoly yang merupakan prosedur standar kit antibodi *Biogear Polymer Neopoly Detection Kit*. Dari hasil optimasi didapatkan pengenceran optimal untuk protein PSD-95 yaitu konsentrasi 1:500. Setelah prosedur IHC selesai, maka pengukuran presentase ekspresi protein PSD-95 dilakukan dengan mengamati slide dibawah mikroskop cahaya binokuler (Olympus BX51) dengan pembesaran 400x dan gambar diambil dengan kamera *built-in* (Olympus) pada mikroskop tersebut. Hasil pengambilan gambar kemudian dihitung menggunakan program ImageJ dengan plugin IHC Profiler sehingga menghasilkan nilai skor intensitas secara otomatis pada setiap gambar. Setelah itu, hasil dihitung menggunakan metode *IHC Optical Density Score*.

Data skor densitas optik protein PSD-95 yang telah diperoleh kemudian dilakukan analisis statistik menggunakan program komputer SPSS 17.0. Data dianalisis menggunakan uji *one way ANOVA* kemudian uji *post hoc Bonferroni* dengan taraf kepercayaan 95%.

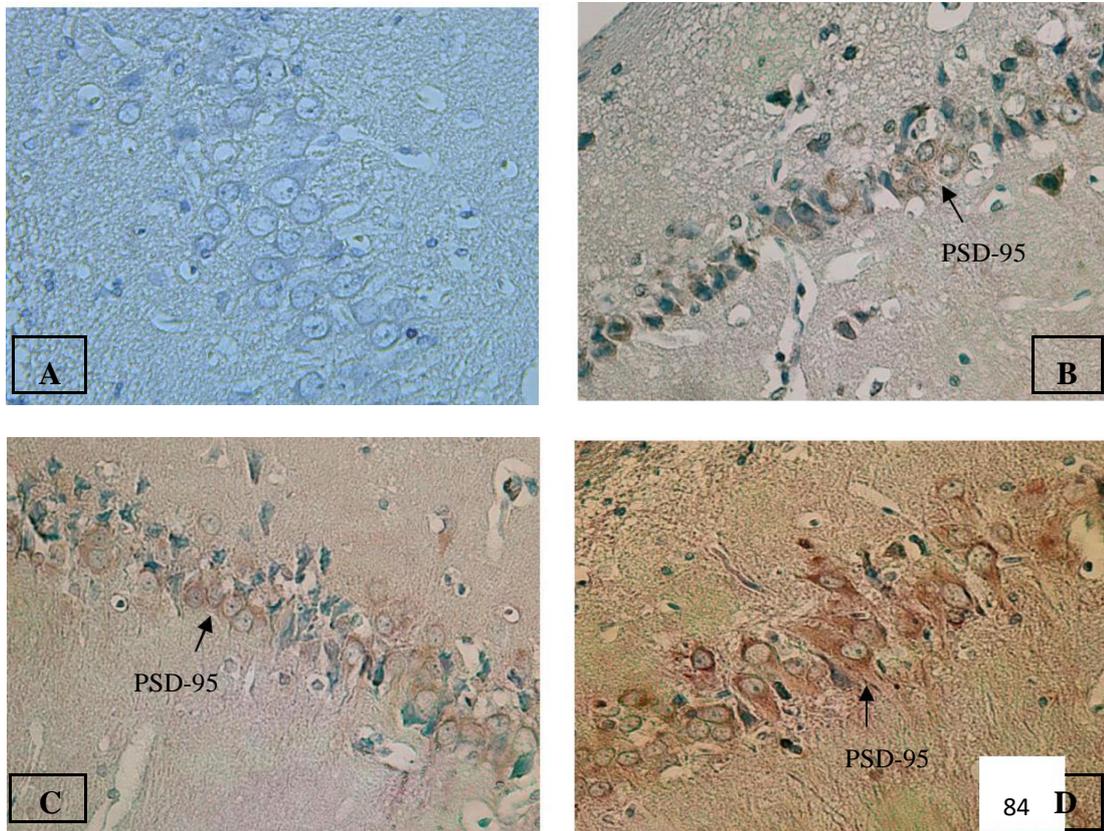
HASIL DAN PEMBAHASAN

Salah satu karakteristik khas dari penuaan adalah kehilangan fungsi memori terutama di hipokampus. Hal ini terkait dengan perubahan morfologi sinaps termasuk juga kehilangan protein presinaps dan postsinaps, serta kehilangan densitas sinaps secara progresif. (Ojo et al., 2012) Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan ekspresi protein postsinaps yaitu PSD-95 di area CA1 hipokampus pada tikus Wistar jantan.

Pada gambar 1 ditampilkan hasil pulasan IHC pada jaringan sampel kelompok kontrol, CA300, dan CA600. Gambar 1A menunjukkan kontrol negatif dimana ekspresi protein PSD-95 tidak muncul. Ekspresi protein PSD-95 pada regio CA1 hipokampus tikus Wistar jantan terlihat paling lemah

pada kelompok kontrol (gambar 1B) dan ekspresi protein PSD-95 yang

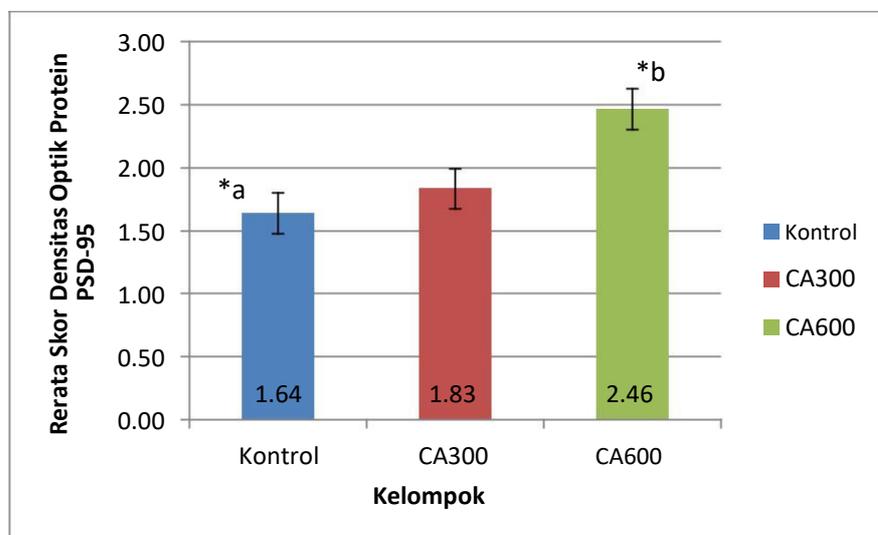
paling kuat nampak pada kelompok CA600 (gambar 1D).



Gambar 1 Pulasan IHK protein PSD-95 pada area CA1 jaringan hipokampus tikus Wistar jantan. Perbandingan rerata skor
A. kontrol negatif ; **B.** kelompok kontrol; **C.** kelompok CA300; **D.** kelompok CA600. Perbesaran 400X.

densitas optik protein PSD-95 pada ketiga kelompok ditampilkan pada gambar 2. Nilai rerata tertinggi didapati pada kelompok CA600 (2.46 ± 0.16), diikuti dengan kelompok CA300 (1.83 ± 0.19) dan yang paling rendah yaitu kelompok kontrol (1.64 ± 0.09). Analisis statistik kemudian dilakukan, dengan uji parametrik yaitu uji One Way Anova

diikuti dengan uji Post Hoc Bonferroni. Berdasarkan hasil analisis statistik didapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok CA600 dengan kelompok kontrol ($p=0.000$) dan kelompok CA300 ($p=0.000$), sedangkan antara kelompok CA300 dan kelompok kontrol tidak berbeda bermakna ($p=0.123$).



Gambar 2 Perbandingan rerata skor OD protein PSD-95 pada ketiga kelompok. *Hasil analisis statistik dengan uji One Way Anova diikuti uji Post Hoc Bonferroni; ^a tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan CA300 ($p=0.123$); ^b terdapat perbedaan bermakna antara CA600 dengan kelompok kontrol ($p=0.000$) dan kelompok CA300 ($p=0.000$). Signifikansi $*p<0.05$. Data dalam nilai rerata, *error bars* menunjukkan simpangan baku (Keterangan: hasil uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan data tidak terdistribusi normal, namun transformasi berhasil).

Dari hasil penelitian ini dinyatakan bahwa pemberian ekstrak etanol 70% pegagan dapat meningkatkan ekspresi protein PSD-95 di area CA1 hipokampus tikus Wistar jantan. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Gray dkk., bahwa pemberian ekstrak CA pada mencit dapat meningkatkan ekspresi gen sinaps PSD-95 di hipokampus (Gray et al., 2016).

Tanaman pegagan memiliki banyak manfaat diantaranya antiinflamasi, antimikroba, antifungal, antidepresan, antioksidan dan antikanker (Lokanathan et al., 2016) termasuk dalam meningkatkan fungsi memori dan bersifat neuroprotektif (Orhan, 2012). Dua komponen utama dalam pegagan yaitu triterpenoid dan flavonoid. Triterpenoid terdiri dari komponen aktif yaitu asam asiatika dan asiatikosida (Sari and Rochmah, 2015).

Menurut penelitian baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, dinyatakan bahwa asam asiatika dalam pegagan memiliki aktivitas neuroprotektif. Penelitian *in vivo* menyatakan bahwa pemberian asam asiatika dosis 30mg/kgBB selama 28 hari secara signifikan meningkatkan proses belajar dan memori pada tikus jantan (Sirichoat et al., 2015). Asiatikosida dari pegagan

menghasilkan efek neuroprotektif melalui mekanisme antioksidan. (Orhan, 2012) Asiatikosida juga diketahui memiliki efek meningkatkan kognisi dan digunakan sebagai agen terapi demensia (Sari and Rochmah, 2015). Dalam penelitian ini dinyatakan bahwa pemberian ekstrak etanol pegagan yang mengandung asiatikosida selama 28 hari berturut – turut dapat meningkatkan ekspresi PSD-95 di hipokampus tikus Wistar jantan. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa pemberian asiatikosida selama empat minggu berturut – turut dapat meningkatkan ekspresi PSD-95 di hipokampus (Luo et al., 2015).

Kandungan flavonoid dalam pegagan memberikan efek proteksi terhadap neurotoksisitas melalui mekanisme antioksidan.(Orhan, 2012). Selain itu, flavonoid dalam pegagan juga dapat bekerja secara langsung melewati sawar darah otak kemudian terikat dengan reseptor TrkB, sehingga dapat mengaktifkan jeram sinyal intraseluler dan meningkatkan transkripsi gen target seperti BDNF (Naoi et al., 2017, Stagni et al., 2017). Flavonoid juga memicu efek positif pada sistem vaskuler sehingga terjadi perubahan dalam laju aliran darah serebrovaskular yang mampu menghasilkan

angiogenesis, neurogenesis dan perubahan pada morfologi neuron (Vauzour et al., 2008).

Dalam penelitian ini hewan coba diberikan ekstrak etanol pegagan dengan dosis bervariasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi protein PSD-95 memiliki skor densitas optik protein tertinggi pada kelompok yang diberikan ekstrak pegagan dengan dosis 600mg/kgBB dibandingkan dosis 300mg/kgBB. Hal ini didukung oleh hasil analisis statistik yang menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok yang diberikan dosis 600mg/kgBB (CA600) dengan kelompok yang diberikan dosis 300mg/kgBB (CA300) dan kelompok kontrol ($p=0.000$). Hingga saat ini belum ada penelitian yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak pegagan dosis 600mg/kgBB dapat mempengaruhi ekspresi protein PSD-95. Meskipun demikian, terdapat penelitian yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak etanol pegagan dosis 600mg/kgBB selama 28 hari dapat meningkatkan konsentrasi BDNF dalam serum darah (Sari and Rochmah, 2015).

Regulasi PSD-95 dipengaruhi oleh *brain derived neurotropic factor* (BDNF). Sinyal yang dihasilkan oleh ikatan BDNF-

TrkB berperan penting dalam perkembangan sinaps dengan meregulasi PSD-95. (Yoshii and Constantine-Paton, 2014) Menempelnya BDNF pada reseptornya TrkB akan memunculkan jeram sinyal. Salah satunya jeram sinyal PI3K-Akt yang meregulasi lalu lintas protein PSD-95. (Yoshii and Constantine-Paton, 2010) Delesi gen *Bdnf* menyebabkan penurunan ekspresi postsinaps PSD-95 di otak. (Luo et al., 2015).

Berdasarkan pada teori bahwa protein PSD-95 diregulasi oleh BDNF, diduga peningkatan ekspresi protein PSD-95 dalam penelitian ini juga dipengaruhi oleh jeram sinyal yang ditimbulkan oleh interaksi antara komponen aktif pegagan dengan BDNF-TrkB. Penelitian selanjutnya diperlukan untuk menentukan bagaimana mekanisme jeram sinyal peningkatan ekspresi protein PSD-95 yang dipengaruhi oleh ekstrak pegagan terkait dengan peningkatan fungsi memori.

KESIMPULAN

Pengaruh pemberian ekstrak etanol 70% pegagan (dosis 600mg/kgBB) lebih baik dalam meningkatkan ekspresi protein PSD-95 di hipokampus tikus Wistar jantan.

ACKNOWLEDGEMENT

Penelitian ini didukung oleh Beasiswa Tesis dan Disertasi Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) 2017, Kementerian Keuangan Republik Indonesia.

- Andreollo, N. A., Santos, E. F. d., Araújo, M. R. & Lopes, L. R. 2012. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 25, 49-51.
- Chen, X., Levy, J. M., Hou, A., Winters, C., Azzam, R., Sousa, A. A., Leapman, R. D., Nicoll, R. A. & Reese, T. S. 2015. PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E6983-92.
- Gray, N. E., Harris, C. J., Quinn, J. F. & Soumyanath, A. 2016. Centella asiatica modulates antioxidant and mitochondrial pathways and improves cognitive function in mice. *J Ethnopharmacol*, 180, 78-86.
- Jared, S. R. 2010. Enhancement of memory in rats with Centella asiatica. *Biomedical Research*, 21.
- Leal, G., Afonso, P. M., Salazar, I. L. & Duarte, C. B. 2015. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res*, 1621, 82-101.
- Lokanathan, Y., Omar, N., Puzi, N. N. A., Saim, A. & Idrus, R. H. 2016. Recent updates in neuroprotective and neuroregenerative potential of Centella asiatica. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 23, 4.
- Lu, Y., Christian, K. & Lu, B. 2008. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem*, 89, 312-23.
- Luo, L., Liu, X. L., Mu, R. H., Wu, Y. J., Liu, B. B., Geng, D., Liu, Q. & Yi, L. T. 2015. Hippocampal BDNF signaling restored with chronic asiaticoside treatment in depression-like mice. *Brain Res Bull*, 114, 62-9.
- Marlatt, M. W., Potter, M. C., Lucassen, P. J. & van Praag, H. 2012. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. *Dev Neurobiol*, 72, 943-52.
- Naoi, M., Inaba-Hasegawa, K., Shamoto-Nagai, M. & Maruyama, W. 2017. Neurotrophic function of phytochemicals for neuroprotection in aging and neurodegenerative disorders: modulation of intracellular signaling and gene expression. *J Neural Transm (Vienna)*, 124, 1515-1527.
- Nelson, T. J. & Alkon, D. L. 2015. Molecular regulation of synaptogenesis during associative learning and memory. *Brain Res*, 1621, 239-51.
- Ojo, B., Rezaie, P., Gabbott, P. L., Davies, H., Colyer, F., Cowley, T. R., Lynch, M. & Stewart, M. G. 2012. Age-related changes in the hippocampus (loss of synaptophysin and glial-synaptic interaction) are modified by systemic treatment with an NCAM-derived peptide, FGL. *Brain Behav Immun*, 26, 778-88.
- Orhan, I. E. 2012. Centella asiatica (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 946259.
- Ramadhan, N. S., Rasyid, R. & Syamsir, E. 2015. Daya Hambat Ekstrak Daun Pegagan (Centella asiatica) yang Diambil di Batusangkar terhadap Pertumbuhan Kuman *Vibrio cholerae* secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 4.

- Sari, D. C. R. & Rochmah, M. A. 2015. The effects of ethanol extracts of centella asiatica leaf on serial serum brain derived neurotrophin factor (bdnf) concentration of rats (sprague dawley) following chronic stress. *KnE Life Sciences*, 2, 159.
- Sirichoat, A., Chaijaroonkhanarak, W., Prachaney, P., Pannangrong, W., Leksomboon, R., Chaichun, A., Wigmore, P. & Welbat, J. U. 2015. Effects of Asiatic Acid on Spatial Working Memory and Cell Proliferation in the Adult Rat Hippocampus. *Nutrients*, 7, 8413-23.
- Spencer, L. T. & Bancroft, J. D. 2008. Microtomy: paraffin and frozen. Dalam: Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier.
- Stagni, F., Giacomini, A., Guidi, S., Emili, M., Uguagliati, B., Salvalai, M. E., Bortolotto, V., Grilli, M., Rimondini, R. & Bartesaghi, R. 2017. A flavonoid agonist of the TrkB receptor for BDNF improves hippocampal neurogenesis and hippocampus-dependent memory in the Ts65Dn mouse model of DS. *Experimental neurology*, 298, 79-96.
- Stein, L. R., O'Dell, K. A., Funatsu, M., Zorumski, C. F. & Izumi, Y. 2016. Short-term environmental enrichment enhances synaptic plasticity in hippocampal slices from aged rats. *Neuroscience*, 329, 294-305.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rodriguez-Mateos, A., Rendeiro, C. & Spencer, J. P. 2008. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr*, 3, 115-26.
- Yoshii, A. & Constantine-Paton, M. 2010. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*, 70, 304-22.
- Yoshii, A. & Constantine-Paton, M. 2014. Postsynaptic localization of PSD-95 is regulated by all three pathways downstream of TrkB signaling. *Front Synaptic Neurosci*, 6, 6.
- Zhang, J., Lewis, S. M., Kuhlman, B. & Lee, A. L. 2013. Supertertiary structure of the MAGUK core from PSD-95. *Structure*, 21, 402-13.

RIWAYAT HIDUP

Nama lengkap : Adibah
 NPM : 1506768431
 Alamat : Jl. Bukit Duri Tanjakan No.44 Rt013/008
 Tebet Jakarta Selatan 12840
 Umur/Jenis Kelamin/Agama : 30 Tahun/ Perempuan/ Islam
 Tempat dan tanggal lahir : Cirebon, 23 Maret 1988
 Status : Menikah
 Email : drg.adibah@gmail.com
 Nomor kontak : 087877491779
 Riwayat Pendidikan

- SDN 01 Pagi Bukit Duri (1993 – 1999)
- SLTPIT Nurul Fikri Cimanggis Depok (1999 – 2002)
- SMUN 8 Jakarta (2002 – 2005)
- S1 Profesi Dokter Gigi FKG UPDM(B) Jakarta(2005 – 2012)

 Pengalaman penelitian : -
 Publikasi :
 Dana Penelitian : Pribadi dan Beasiswa tesis LPDP
 Kemenkeu 2017

Jakarta, 8 Juni 2018

Adibah