

**TESIS**

**PENGARUH PEMBERIAN GULA TREHALOSA TERHADAP  
BIOMARKER INFLAMASI MAKROVASKULAR PADA TIKUS TUA  
DENGAN MENILAI EKSPRESI NFκB-P65**

***THE EFFECT OF TREHALOSE SUGAR SUPPLEMENTATION ON  
MACROVASCULAR INFLAMMATION BIOMARKER IN OLD RATS BY  
ASSESSING NFκB-P65 EXPRESSION***

**INGGRID**

**P062192005**



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
KONSENTRASI AGING AND REGENERATIVE MEDICINE  
SEKOLAH PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**PENGARUH PEMBERIAN GULA TREHALOSA TERHADAP  
BIOMARKER INFLAMASI MAKROVASKULAR PADA TIKUS TUA  
DENGAN MENILAI EKSPRESI NFκB-P65**

**Tesis  
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister**

**Program Studi  
Ilmu Biomedik**

**Disusun dan diajukan oleh**

**INGGRID**

**Kepada**

**SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

## LEMBAR PENGESAHAN TESIS

### PENGARUH PEMBERIAN GULA TREHALOSA TERHADAP BIOMARKER INFLAMASI MAKROVASKULAR PADA TIKUS TUA DENGAN MENILAI EKSPRESI NFκB-P65

Disusun dan diajukan oleh:

**INGGRID**

**Nomor Pokok : P062192005**

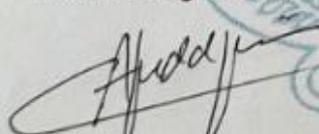
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Magister Program Studi Ilmu Biomedik Sekolah  
Pascasarjana Universitas Hasanuddin pada tanggal 29 November 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

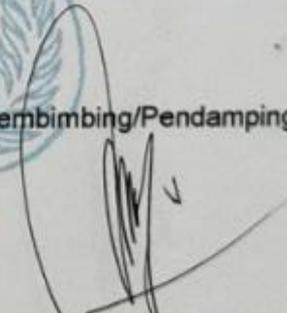
Menyetujui,

Komisi Penasehat

Pembimbing Utama,

Pembimbing/Pendamping,

  
dr. Aminuddin, M.Nutr. & Diet., PhD.  
NIP. 1976 0704 2002 12 1003

  
dr. Arif Santoso, Sp.P(K), Ph.D., FAPSR  
NIP. 1977 0715 2006 04 1012

Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Biomedik

  
Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc  
NIP. 1977 0121 2003 12 2003

Dekan Sekolah Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin

  
Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc  
NIP. 1967-0308 1990 03 1001

## PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Ingrid  
NIM : P062192005  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul:

**PENGARUH PEMBERIAN GULA TREHALOSA TERHADAP BIOMARKER  
INFLAMASI MAKROVASKULAR PADA TIKUS TUA DENGAN MENILAI  
EKSPRESI NFκB-P65**

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilalihan tulisan orang lain bahwa Tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Tesis ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Demikian pernyataan ini saya nyatakan secara benar dengan penuh tanggung jawab dan integritas.

Makassar, 30 November 2021

Yang menyatakan,



Ingrid

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan berkat, rahmat serta kasih karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis ini dengan judul: **“PENGARUH PEMBERIAN GULA TREHALOSA TERHADAP BIOMARKER INFLAMASI MAKROVASKULAR PADA TIKUS TUA DENGAN MENILAI EKSPRESI NFκB-P65”**. Penulisan tesis ini disusun sebagai salah satu tugas akhir dalam rangka memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelas Magister Biomedik di Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.

Penulis menyadari bahwa tesis ini dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan tesis ini. Dengan penuh rasa hormat penulis menyampaikan banyak terima kasih kepada **dr. Aminuddin, M.Nutr. & Diet., PhD** selaku pembimbing pertama dan **dr. Arif Santoso, Sp.P (K), Ph.D, FAPSR** selaku pembimbing kedua, yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran, memberi masukan, dan semangat kepada penulis dalam penyusunan tesis ini hingga dapat terselesaikan dengan baik. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada **Prof. Dr. dr. Nurpudji Astuti Taslim, MSc, Sp.GK(K), Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc** , dan **Dr. dr. Irfan Idris, M.Sc** sebagai tim penguji yang telah memberikan masukan dan pertanyaan sehingga membantu penulis menganalisis lebih dalam tentang penelitian ini.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada:

1. Dekan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc; Ketua Program Studi Ilmu Biomedik Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc;

seluruh staf pengajar Program Studi Ilmu Biomedik yang telah memberikan arahan, dukungan dan motivasi kepada penulis selama pendidikan.

2. Orang tua penulis yang telah mendukung secara materil maupun moril, terima kasih atas dukungannya sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis ini.
3. Teman-teman kelompok penelitian trehalosa dr.Shafira Ridha Khaerati, dr.Rabiatul Aminah, dan Desya Faradila Ismi, S.Si., Apt. yang telah berjuang bersama dari awal hingga akhir penelitian, saling mendukung serta selalu memotivasi satu sama lain dan terima kasih untuk waktu bersama kalian selama menjalankan perkuliahan S2.
4. Bapak dan Ibu Staf Akademik Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang dengan sabar memberikan pelayanan berkaitan dengan pelaksanaan seminar, ujian, dan administrasi lainnya.

Semoga tesis ini dapat bermanfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan khususnya bidang Ilmu Anti Aging di Universitas Hasanuddin serta bermanfaat bagi para pembaca.

Makassar, 30 November 2021

Penulis,

**Inggrid**

## ABSTRAK

**Inggrid.** Pengaruh Pemberian Gula Trehalosa Terhadap Biomarker Inflamasi Makrovaskular Pada Tikus Tua dengan menilai ekspresi NFκB-p65

(Dibimbing oleh **dr. Aminuddin** dan **dr. Arif Santoso**)

Inflamasi vaskular merupakan salah satu faktor penyebab terjadinya patogenesis penuaan vaskular. Aktivasi faktor nuklear-κB (NF-κB) akan menginduksi molekul-molekul adhesi seperti VCAM-1 dan ICAM-1 yang akan menyebabkan migrasi dan adhesi sel monositik ke sel endotel vaskular, yang berperan penting selama proses inflamasi vaskular. Trehalosa merupakan *non-reducing* disakarida yang memiliki beberapa fungsi yaitu protektif terhadap stressor (salah satunya ROS) dan mencegah respon inflamasi yang diinduksi oleh syok endotoksik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian gula trehalosa terhadap proses inflamasi makrovaskular terkait proses penuaan. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan sebanyak 28 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol tikus muda (Kelompok A), kelompok kontrol tikus tua (Kelompok B), kelompok tikus tua yang diberikan larutan sukrosa 2% (Kelompok C), dan kelompok tikus tua yang diberikan larutan trehalosa 2% (Kelompok D); yang kemudian diamati selama 8 minggu. Pemeriksaan imunohistokimia (IHC) ekspresi NFκB-p65 jaringan aorta digunakan untuk menilai proses inflamasi makrovaskular pada penelitian ini. Hasil penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara ekspresi NFκB-p65 jaringan aorta pada kelompok kontrol tikus muda dan kontrol tikus tua ( $p=0,247$ ). Kelompok trehalosa 2% memiliki ekspresi NFκB-p65 jaringan aorta lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol tua ( $p=0,012$ ); sedangkan pada kelompok yang diberikan larutan sukrosa 2% memiliki ekspresi NFκB-p65 jaringan aorta lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok trehalosa ( $p=0,018$ ).

**Kesimpulan:** Trehalosa memiliki efek positif terhadap proses inflamasi vaskular terkait penuaan yang dapat dilihat dari rendahnya ekspresi NFκB-p65 jaringan aorta pada tikus tua.

**Kata Kunci:** Trehalosa, Inflamasi makrovaskular, ekspresi NFκB-p65, penuaan

## **ABSTRACT**

**Inggrid.** *The effect of trehalose sugar supplementation on macrovascular inflammation biomarker in old rats by assessing NFκB-p65 expression*  
(Supervised by **dr. Aminuddin** and **dr. Arif Santoso**)

Vascular inflammation is one of contributing factor for the pathogenesis of arterial ageing. Activation of nuclear factor-κB (NF-κB) will induce adhesion molecules such as VCAM-1 and ICAM-1 which will cause migration and adhesion of monocytic cells to vascular endothelial cells, which play an important role during vascular inflammation processes. Trehalose is a non-reducing disaccharide that has several functions, protecting against stressors (one of them is reactive oxygen species/ROS) and preventing the inflammatory responses induced by endotoxic shock. The purpose of this study was to determine the effect of trehalose sugar supplementation on macrovascular inflammatory processes related to the aging process. This study used 28 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) as experimental animals which were divided into 4 groups, control group of young rats (Group A), control group of old rats (Group B), group of old rats that given 2% sucrose solution (Group C), and group of old rats that given 2% trehalose solution (Group D); were then observed for 8 weeks. Immunohistochemical examination (IHC) of aortic tissue NFκB-p65 expression was used to assess the macrovascular inflamsmatory process in this study. The results showed that there were no significant differences in aortic tissue NFκB-p65 expression between old and young subjects ( $p=0,247$ ). The 2% trehalose group had lower aortic tissue NFκB-p65 expression compared to the old control group ( $p=0,012$ ); while the group given 2% sucrose solution had a higher aortic tissue NFκB-p65 expression compared to the trehalose group ( $p=0,018$ ).

**Conclusion:** *Trehalose has a positive effect on aging-associated vascular inflammatory processes that can be seen from the low aortic tissue NFκB-p65 expression in old rats.*

**Keywords:** *Trehalose, Macrovascular inflammation, NFκB-p65 expression, aging*

## DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN TESIS.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I: PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	5
1. Tujuan Umum.....	5
2. Tujuan Khusus.....	5
D. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II: TINJAUAN PUSTAKA.....	7
A. Penuaan ( <i>Aging</i> ).....	7
B. Penuaan Vaskular ( <i>Vascular Aging</i> ).....	8
C. Inflamasi Vaskular.....	10
D. Trehalosa.....	13
E. Sukrosa.....	19
F. Glukosa.....	20
G. Tikus Wistar Jantan ( <i>Rattus novergicus</i> ).....	22
H. Imunohistokimia (IHK).....	25
I. <i>Nuclear factor-κB</i> (NF-κB).....	26
BAB III: KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS PENELITIAN.....	28
A. Kerangka Teori.....	28
B. Kerangka Konsep.....	28
C. Hipotesis.....	29
BAB IV: METODE PENELITIAN.....	30

A. Desain Penelitian.....	30
B. Tempat dan Waktu Penelitian.....	30
1. Tempat Penelitian.....	30
2. Waktu Penelitian.....	30
C. Subyek Penelitian.....	31
1. Sampel Penelitian.....	31
2. Perkiraan Besar Sampel.....	31
3. Kriteria Inklusi.....	32
4. Kriteria Eksklusi.....	32
D. Izin Subjek Penelitian.....	33
E. Prosedur Kerja.....	34
1. Persiapan hewan coba.....	34
2. Pembuatan larutan sukrosa (gula pasir).....	34
3. Pembuatan larutan trehalosa.....	35
4. Intervensi.....	36
5. Pasca intervensi (Koleksi sampel).....	37
6. Pemeriksaan imunohistokimia.....	38
F. Definisi Operasional dan Kriteria Objektif.....	39
G. Metode Analisis.....	41
H. Alur Penelitian.....	42
BAB V:HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
A. Hasil Penelitian.....	43
B. Pembahasan.....	49
C. Keterbatasan Penelitian.....	57
D. Ringkasan Hasil Penelitian.....	58
BAB VI:PENUTUP.....	60
A. Kesimpulan.....	60
B. Saran.....	60
DAFTAR PUSTAKA.....	62

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Penggunaan dan absorpsi gula yang umum di Amerika Serikat.....	14
Tabel 2. Sifat trehalosa.....	15
Tabel 3. Perbandingan usia relatif tikus dengan usia manusia.....	23
Tabel 4. Data fisiologis tikus Wistar ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	23
Tabel 5. Karakteristik subyek penelitian.....	43
Tabel 6. Tabel rerata perubahan berat badan selama 8 minggu.....	44
Tabel 7. Tabel deskriptif dan uji F pada variabel Usia, $\Delta$ Berat Badan, dan IHC....	45
Tabel 8. Perbandingan hasil IHC antara kontrol muda dan kontrol tua.....	46
Tabel 9. Perbandingan hasil IHC antara kelompok Trehalosa dan kontrol tua....	47
Tabel 10. Perbandingan hasil IHC antara kelompok Trehalosa dan Sukrosa.....	47
Tabel 11. Hubungan pemberian gula Trehalosa dengan hasil IHC tikus tua.....	48
Tabel 12. Hubungan pemberian gula Sukrosa dengan hasil IHC tikus tua.....	48
Tabel 13. Korelasi antara usia dan ekspresi NF $\kappa$ B-p65 jaringan aorta.....	49
Tabel 14. Korelasi antara $\Delta$ BB akhir dan ekspresi NF $\kappa$ B-p65 jaringan aorta.....	49

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Mekanisme dan konsekuensi yang terlibat dalam inflamasi vaskular	11
Gambar 2. Efek menguntungkan dari pemberian trehalosa terhadap infeksi <i>S. Typhimurium</i> (ST) pada caecum pada ayam ras.....	16
Gambar 3. Asupan makanan pada tikus Wistar jantan ( <i>Rattus norvegicus</i> ) berdasarkan usia.....	24
Gambar 4. Asupan air pada tikus Wistar jantan ( <i>Rattus norvegicus</i> ) berdasarkan usia.....	24
Gambar 5. Grafik berat badan awal dan akhir subyek penelitian.....	45

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: Rekomendasi Persetujuan Etik.....	67
Lampiran 2: Data Dasar Penelitian.....	68
Lampiran 3: Data Hasil Analisis Statistik.....	69
Lampiran 4: Gambar hasil IHC.....	74

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Penyebab mortalitas tertinggi secara global yaitu penyakit kardiovaskular (CVD), yang menyebabkan sekitar 17,9 juta kematian setiap tahunnya. Serangan jantung dan stroke merupakan penyebab empat dari lima kematian yang disebabkan oleh CVD. (American Heart Association, 2020)

Angka kematian tertinggi akibat CVD pada tahun 2017 berada di Eropa Timur dan Asia Tengah. Dan prevalensi CVD tinggi di Amerika Serikat, Eropa Tengah, Afrika Utara, dan Timur Tengah. (American Heart Association, 2020)

Di Indonesia, CVD merupakan penyebab morbiditas dan mortalitas pada lansia; dan bertanggung jawab terhadap sepertiga kematian di Indonesia. (Maharani *et al.*, 2019)

Faktor risiko CVD dibagi menjadi 4, yaitu: (World Health Organization, 2013, 2021)

- Faktor utama yang dapat dimodifikasi: hipertensi, lipid darah abnormal, merokok, kurang beraktivitas, obesitas, diet yang tidak sehat, diabetes mellitus.
- Faktor risiko lain yang dapat dimodifikasi: status sosial-ekonomi yang rendah, depresi, stres psikososial, alkohol,

penggunaan obat-obatan tertentu seperti kontrasepsi oral dan terapi penggantian hormon.

- Faktor yang tidak dapat dimodifikasi: usia tua (setelah usia 55 tahun), keturunan atau riwayat keluarga, jenis kelamin (penyakit jantung koroner (PJK) lebih sering mengenai pria dibandingkan dengan wanita (usia pramenopause)), etnis atau ras.
- Faktor risiko "baru": homosistein dalam darah yang berlebihan (kadar yang tinggi dikaitkan dengan peningkatan risiko kardiovaskular), inflamasi, pembekuan darah abnormal (peningkatan kadar fibrinogen darah dan penanda pembekuan darah lainnya meningkatkan risiko komplikasi kardiovaskular).

CVD merupakan kontributor utama morbiditas dan mortalitas pada lansia dan berkorelasi erat dengan bertambahnya usia karena fenomena "*vascular aging*", yang mencakup semua perubahan terkait usia pada vaskular atau pembuluh darah. Karena vaskular yang menua lebih rentan mengalami lesi aterosklerotik, cedera vaskular, angiogenesis terganggu, dan kalsifikasi; sangat jelas bahwa endotel yang menua tidak mampu meregulasi semua tugasnya, yang bermanifestasi sebagai gangguan relaksasi yang bergantung pada endotel (disfungsi endotel) pada orang tua. Secara mekanis, otot polos maupun sel endotel terlibat dalam proses penuaan vaskular

karena penuaan menyebabkan kekakuan arteri dan disfungsi endotel, keduanya diketahui berkorelasi dengan kejadian kardiovaskular.(Steven *et al.*, 2019)

Peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) dan inflamasi vaskular merupakan salah satu tanda penuaan vaskular yang akan menyebabkan terjadinya disfungsi endotel (yang ditandai dengan penurunan dilatasi endotel yang dimediasi oleh nitrat oksida (NO)). Sehingga, terapi yang menghambat oksidatif dan pensinyalan inflamasi pada usia lanjut memiliki potensi untuk meningkatkan fungsi arteri dan menurunkan risiko CVD.(Kaplon *et al.*, 2016)

Trehalosa merupakan *non-reducing* disakarida di mana dua unit glukosa dihubungkan oleh ikatan  $\alpha$ -1-1-glikosidik. Trehalosa memiliki beberapa fungsi yaitu protektif terhadap stressor (salah satunya ROS) dan mencegah respon inflamasi yang diinduksi oleh syok endotoksik.(Echigo *et al.*, 2012)

Penelitian oleh Echigo dkk (Echigo *et al.*, 2012), menemukan bahwa trehalosa menghambat produksi beberapa mediator inflamasi dan degradasi inhibitor NF- $\kappa$ B, serta menekan peroksidasi lipid dan ROS. Dan pada penelitian yang dilakukan pada model kelinci, trehalosa menghasilkan efek inhibitor terhadap vasospasme. Pada beberapa penelitian (Svenkrtova, 2017; Seo *et al.*, 2018) juga didapatkan efek trehalosa dalam memperpanjang usia ragi dan cacing (*C.elegans*). Oleh karena itu, trehalosa muncul sebagai terapi baru

yang dapat menghambat stres oksidatif dan inflamasi, serta mengembalikan fungsi vaskular.(Kaplon *et al.*, 2016)

Sukrosa atau yang biasa dikenal pada kehidupan sehari-hari dalam bentuk gula pasir merupakan golongan disakarida yang terdiri dari 2 monosakarida (glukosa dan fruktosa). Jika dikonsumsi berlebihan, sukrosa berkontribusi pada perkembangan beberapa penyakit metabolik, seperti risiko diabetes mellitus tipe 2 dan obesitas.(Spencer, 2005; Malik *et al.*, 2013)

Dari beberapa teori dan penelitian sebelumnya, dapat dilihat bahwa trehalosa mempunyai efek perlindungan yang jauh lebih besar daripada disakarida lain (seperti sukrosa); sehingga dapat dipertimbangkan sebagai pengganti gula yang sering dikonsumsi sehari-hari.

Dari beberapa penelitian terdahulu, belum pernah dilakukan penelitian mengenai peran trehalosa terhadap inflamasi makrovaskular. Sehingga peneliti tertarik melakukan penelitian untuk mengetahui bagaimana pengaruh pemberian trehalosa terhadap proses inflamasi makrovaskular terkait dengan proses penuaan.

## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah penelitian ini adalah: “Bagaimana pengaruh pemberian trehalosa terhadap proses inflamasi makrovaskular terkait proses penuaan pada tikus tua?”

## **C. Tujuan Penelitian**

### **1. Tujuan Umum**

Untuk mengetahui pengaruh trehalosa terhadap proses inflamasi makrovaskular terkait proses penuaan pada tikus tua.

### **2. Tujuan Khusus**

- a. Untuk mengetahui perbedaan gambaran imunohistokimia inflamasi makrovaskular antara tikus muda dan tikus tua dengan pemberian diet *ad libitum*.
- b. Untuk mengetahui gambaran imunohistokimia inflamasi makrovaskular pada tikus tua dengan pemberian sukrosa.
- c. Untuk mengetahui gambaran imunohistokimia inflamasi makrovaskular pada tikus tua dengan pemberian trehalosa.
- d. Membandingkan gambaran imunohistokimia inflamasi makrovaskular pada tikus tua antara pemberian diet *ad libitum*, sukrosa, dan trehalosa.

## **D. Manfaat Penelitian**

1. Dapat memberikan informasi ilmiah mengenai efek trehalosa terhadap inflamasi makrovaskular terkait proses penuaan.
2. Dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut mengenai peran trehalosa sebagai anti inflamasi yang berperan dalam proses penuaan.

3. Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi acuan pemilihan diet sehat khususnya gula pada individu lansia untuk mengurangi efek buruk inflamasi makrovaskular yang dapat terjadi seiring bertambahnya usia.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Penuaan (*Aging*)**

Istilah “lansia” digunakan pada individu yang berusia 60 tahun ke atas, yang mewakili segmen populasi yang tumbuh paling cepat di seluruh dunia.(Amarya, Singh and Sabharwal, 2018) Persentase populasi nasional yang berusia di atas 65 tahun telah meningkat dalam 10 tahun terakhir dan akan terus meningkat selama 20 tahun berikutnya karena peningkatan harapan hidup. Mulai tahun 2030, jumlah orang dewasa usia >85 tahun akan meningkat dengan cepat. Pada tahun 2050, jumlah orang dewasa usia >80 tahun di seluruh dunia akan naik tiga kali lipat dari tahun 2015.(Jaul and Barron, 2017)

Penuaan (*aging*) merupakan proses normal yang terjadi pada manusia dimana terjadi kehilangan kemampuan suatu jaringan untuk memperbaiki diri dan mempertahankan struktur serta fungsi normalnya. Proses penuaan meliputi beberapa proses perubahan antara lain perubahan fisik, psikologi, dan sosial.(Yudiarto and Sjahrir, 2011)

Penuaan terjadi karena akumulasi kerusakan molekul, sel dan jaringan, yang mengakibatkan hilangnya fungsi dan meningkatkan risiko kematian. Penuaan merupakan faktor risiko utama penyakit mematikan yang dominan di negara maju, termasuk demensia, penyakit kardiovaskular, dan kanker.(Partridge, 2009)

Penuaan pada satu sistem dapat menyebabkan perubahan pada banyak sistem lainnya. Misalnya, penuaan sistem kardiovaskular dapat menyebabkan degenerasi saraf dan gangguan kognitif, penyakit hati dan ginjal.(Rattan, 2019)

Mekanisme molekuler penuaan sebagian besar dapat dikelompokkan menjadi tiga kategori yang saling tumpang tindih, yaitu akumulasi kerusakan (pada DNA, protein, dan organel), penurunan kemampuan untuk memperbaiki kerusakan, dan pleiotropi antagonis.(Burch *et al.*, 2014)

## **B. Penuaan Vaskular (*Vascular Aging*)**

Penuaan vaskular ditandai dengan terjadinya degenerasi dan sklerosis pada lapisan media pembuluh darah terkait usia. Namun, selain penuaan, kondisi klinis yang meningkatkan stres oksidatif dan inflamasi berperan dalam mempercepat terjadinya penuaan vaskular.(Lee and Park, 2013)

Perubahan fungsional utama yang terjadi pada penuaan vaskular adalah hilangnya distensibilitas. Mekanisme fungsional dan struktural menyebabkan penurunan distensibilitas dan peningkatan kekakuan pembuluh darah. Kerusakan fungsional arteri yang menua ditandai dengan disfungsi endotel disertai penurunan yang signifikan pada vasodilatasi tergantung nitrat oksida yang diinduksi asetilkolin.(Lee and Park, 2013)

Karena disfungsi endotel meningkatkan aktivasi trombosit, vasokonstriksi, aktivasi/infiltrasi leukosit, dan proliferasi sel otot polos di dinding vaskular; maka disfungsi endotel merupakan prediktor awal perkembangan aterosklerosis, hipertensi, dan kejadian kardiovaskular. Ada tiga penyebab kunci yang saling bergantung pada proses penuaan vaskular yang dapat memicu disfungsi endotel, yaitu: gangguan pensinyalan nitrat oksida, stres oksidatif, dan inflamasi.(Steven *et al.*, 2019)

Teori penuaan radikal bebas menunjukkan bahwa kerusakan makromolekul seluler yang disebabkan oleh akumulasi spesies oksigen reaktif (ROS) merupakan penyebab utama penuaan dan aterosklerosis. Selain itu, inflamasi tingkat rendah yang terkait dengan aktivasi faktor transkripsi *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) di dinding pembuluh darah terkait dengan patogenesis penuaan vaskular, aterosklerosis dan stres oksidatif.(Kitada, Ogura and Koya, 2016)

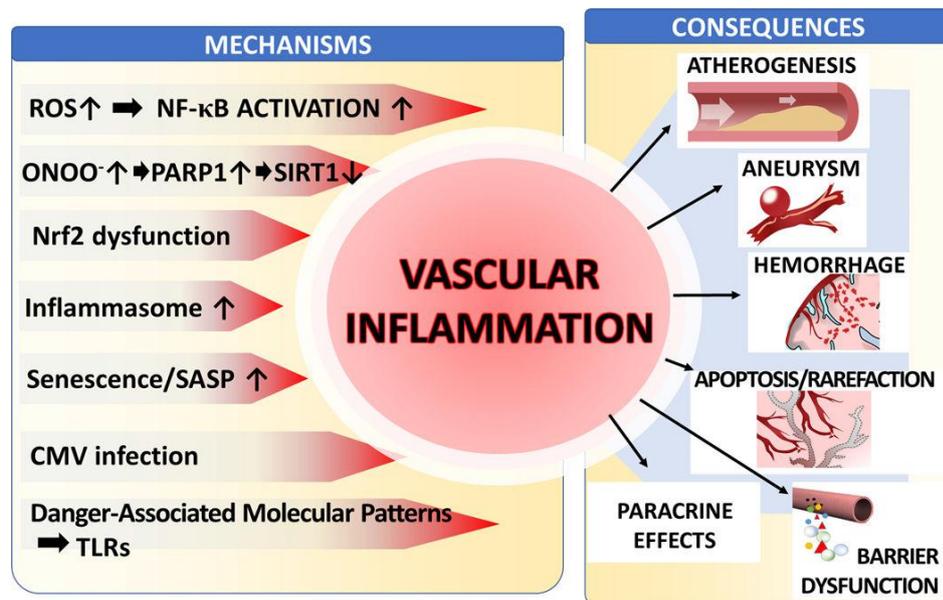
Adanya stres oksidatif dan disfungsi endotel pada lansia tidak hanya terkait dengan CVD tetapi juga dengan gangguan lain yang terkait dengan penuaan, seperti disfungsi ereksi, disfungsi ginjal, penyakit Alzheimer, atau retinopati.(Steven *et al.*, 2019)

Menyoroti hal ini, penelitian oleh Mayhan dkk menunjukkan bahwa disfungsi endotel telah dibuktikan dalam penuaan pembuluh darah retinal dan juga terlibat sebagai penyumbang penyakit neurodegeneratif.(Steven *et al.*, 2019)

### C. Inflamasi Vaskular

Inflamasi vaskular merupakan salah satu faktor penyebab terjadinya patogenesis penuaan vaskular.(Lee and Park, 2013) Penuaan vaskular memainkan peran sentral terhadap morbiditas dan mortalitas pada lansia. Pada “*normal aging*” dikaitkan dengan perubahan pada inflamasi dan respon tubuh terhadap perubahan itu. Ada bukti eksperimental dan klinis bahwa inflamasi tingkat rendah yang kronis merupakan salah satu ciri proses penuaan (yang dikenal dengan istilah *inflammaging*). Aktivasi proses inflamasi terkait usia memainkan peran penting dalam berbagai patologi makro dan mikrovaskuler, mulai dari aterosclerosis dan pembentukan aneurisma hingga disfungsi mikrovaskuler, gangguan sawar darah otak, dan patologi Alzheimer.(Lopez-candales *et al.*, 2017; Biwas and Rezaie, 2018; Ungvari *et al.*, 2018)

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa terdapat pergeseran pro-inflamasi dalam profil ekspresi gen dari sel-sel endotel vaskular dan otot polos, termasuk induksi sitokin inflamasi (misalnya IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), kemokin, molekul adhesi, iNOS dan mediator pro-inflamasi lainnya. Lingkungan mikro pro-inflamasi yang dihasilkan di dinding vaskular meningkatkan terjadinya disfungsi vaskular, merusak metabolisme sel, meningkatkan apoptosis dan berkontribusi pada patogenesis penyakit vaskular.(Ungvari *et al.*, 2018)



**Gambar 1.** Mekanisme dan konsekuensi yang terlibat dalam inflamasi vaskular(Ungvari *et al.*, 2018)

Mekanisme yang berkontribusi terhadap inflamasi vaskular pada penuaan memiliki banyak aspek, yaitu adanya peningkatan stres oksidatif dan aktivasi proses inflamasi di dinding pembuluh darah yang tua. Pertama, ROS bertindak sebagai molekul pensinyalan yang mengaktifkan jalur pensinyalan pro-inflamasi, termasuk NF-κB, yang mengatur aktivasi endotel dan ekspresi mediator parakrin pro-inflamasi dan mendorong aterosclerosis. Sel-sel endotel dan otot polos yang menua menunjukkan aktivasi NF-κB yang signifikan dan penghambatan selektif NF-κB di pembuluh darah terbukti meningkatkan regulasi aliran darah, mengurangi inflamasi sistemik, memberikan efek metabolisme yang bermanfaat dan memperpanjang rentang kesehatan. Kedua, mediator inflamasi merupakan penginduksi

kuat dari stres oksidatif seluler (misalnya TNF- $\alpha$  mengaktifkan oksidase NAD(P)H).(Ungvari *et al.*, 2018)

SIRT1 memberikan efek anti-inflamasi yang kuat dan penurunan aktivitas SIRT1 kemungkinan besar berkontribusi pada inflamasi vaskular pada penuaan. Penuaan endotel dikaitkan dengan peningkatan yang signifikan dalam produksi/pelepasan berbagai sitokin inflamasi dan kemokin, yang disebut “*senescence-associated secretory phenotype (SASP)*”. Induksi SASP dimediasi oleh aktivasi NF- $\kappa$ B, p38MAPK, jalur respon kerusakan DNA dan GATA4. Ada bukti yang berkembang bahwa adanya sel-sel senescent berkontribusi secara signifikan terhadap peningkatan status inflamasi pembuluh darah yang menua.(Ungvari *et al.*, 2018)

Defisiensi SIRT1 pada sel endotel, sel otot polos vaskular (VSMC) dan monosit/makrofag berkontribusi pada peningkatan stres oksidatif, inflamasi, pembentukan sel *foam*, penuaan yang mengganggu produksi nitrat oksida dan autofagi, sehingga meningkatkan penuaan vaskular dan aterosklerosis. Disfungsi endotel, aktivasi monosit/makrofag, dan plastisitas fungsional dan fenotip dari VSMC terlibat dalam patogenesis aterosklerosis melalui berbagai mekanisme.(Kitada, Ogura and Koya, 2016)

Inflamasi steril di dinding pembuluh darah juga diperburuk oleh *danger-associated molecular patterns (DAMP)*, yang mengaktifkan efektor sistem imun bawaan, termasuk *toll-like receptors (TLR)* dan

kompleks inflammasome NLRP3. TLR diaktivasi oleh berbagai ligan DAMP (misalnya molekul dilepaskan ke matriks ekstraseluler dari sel nekrotik, produk pemecahan ekstraseluler, matriks dan/atau produk pemecahan bakteri yang bocor melalui barrier usus yang rusak) dan mengontrol sekresi sejumlah mediator parakrin pro-inflamasi (misalnya IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ). (Ungvari *et al.*, 2018)

#### **D. Trehalosa**

Trehalosa merupakan disakarida non-*reducing* di mana dua unit glukosa dihubungkan oleh ikatan  $\alpha$ ,  $\alpha$ -1, 1-glikosidik. (Echigo *et al.*, 2012; Yoshizane *et al.*, 2020) Trehalosa yang tertelan dimetabolisme oleh enzim trehalase di usus kecil, yang memecah disakarida menjadi 2 molekul glukosa yang siap diabsorpsi. Namun, sejumlah trehalosa masih dapat melewati barrier usus dan menumpuk di organ perifer setelah asupan oral, sehingga memberikan efek menguntungkan secara langsung. Oleh karena itu, trehalosa memiliki nilai energi fisiologis yang sama dengan glukosa atau maltosa. Jalur metabolisme trehalosa dan maltosa (atau pati setelah dicerna oleh amilase) bergabung setelah dicerna menjadi glukosa di perbatasan mukosa usus. (Bar, 2000; Hosseinpour-Moghaddam, Caraglia and Sahebkar, 2018; Yoshizane *et al.*, 2020)

Trehalosa didistribusikan secara luas, dan ditemukan dalam kacang-kacangan, rumput laut, jamur, dan ragi. (Yoshizane *et al.*, 2020)

Sebaliknya, trehalosa tidak dapat disintesis oleh mamalia, termasuk manusia, karena kurangnya gen biosintesis. (Hosseinpour-Moghaddam, Caraglia and Sahebkar, 2018) Selain itu, trehalosa memiliki rasa manis yang rendah, hasil akhir yang bersih, dan sifat fisik yang sangat baik, termasuk efek anti-penuaan pada pati dan stabilisasi protein. (Yoshizane *et al.*, 2020)

**Tabel 1.** Penggunaan dan absorpsi gula dan pemanis makanan yang umum di Amerika Serikat (Di Rienzi and Britton, 2020)

Sugar/sweetener	Date first approved for use in the US	Single-serving amount	Daily consumption per kilogram body weight	Percentage (%) absorbed or consumed in small intestine	Percentage (%) absorbed or consumed in large intestine	Percentage (%) in feces
Sucrose	NA	35 g	1–2 g	>95	<5	<1
High-fructose corn syrup-55	1970	30 g	1–2 g	See fructose and glucose; fructose absorption increases with glucose co-consumption	See fructose and glucose	See fructose and glucose
Glucose	NA	25 g	1–2 g	>95	<5	<1
Fructose	NA	25 g	1–2 g	90	10	<1
Trehalose	2000	3 g	0.5 g	>20	Not reported	Not reported
Sorbitol	1972	2–90 g	<1 g	25	75	<1
Erythritol	1996	500 mg–10 g	<1 g	90	10	<7
Xylitol	1960	300 mg–1 g	<1 g	50	50	1
Mannitol	1950	40 mg	35 mg	25	75	<3
Stevia (Rebaudioside A)	2008	30 mg	2 mg	60% between the small and large intestine	60% between the small and large intestine	5% as steviol
Aspartame	1981	120 mg	8.7 mg	70% of methanol; 85% of phenylalanine; >95% of aspartic acid	30% of methanol; 13% of phenylalanine; <3% of aspartic acid	0% of methanol; 2% of phenylalanine; 2% of aspartic acid
Saccharin (benzoic sulfimide)	1959; usage limited 1972–1977	30 mg	<5 mg	95	Not reported	3
Sucralose	1998	40 mg	1.6 mg	10–30	Not reported	70–90
Acesulfame potassium	1988	30 mg	5 mg	95	Not reported	Not reported

Sebagian besar gula dan pemanis diabsorpsi secara aktif di usus kecil melalui transporter gula, sehingga hanya 5-30% gula yang mencapai usus besar. Dapat dilihat dari **Tabel 1**, bahwa trehalosa diabsorpsi di usus kecil sebanyak >20% saja, sehingga sisanya kemungkinan besar akan masuk ke usus besar. (Di Rienzi and Britton, 2020)

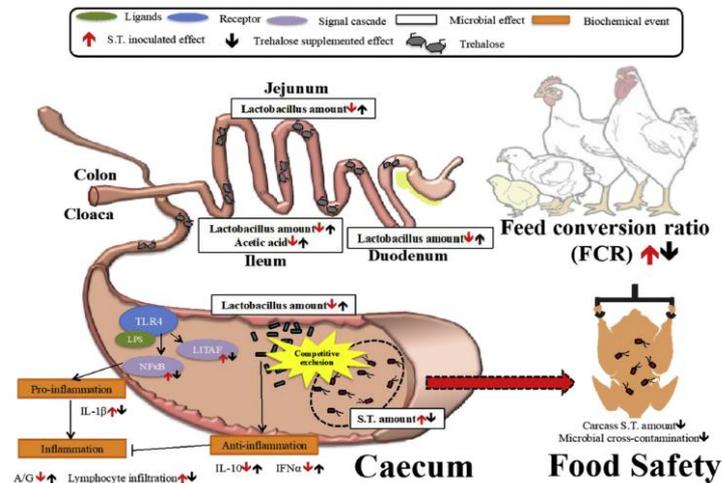
**Tabel 2.** Sifat trehalosa (Higashiyama, 2002)

Titik leleh	Dihidrat	97,0°C
	Anhidrat	210,5°C
Kalor peleburan	Dihidrat	57,8 kJ mol <sup>-1</sup>
	Anhidrat	53,4 kJ mol <sup>-1</sup>
Kelarutan	68,9 g/100 H <sub>2</sub> O pada 20°C	
Tingkat kemanisan relatif	45% dari sukrosa	
Digestibilitas	Dicerna dan diabsorpsi di usus halus	
Kestabilan pH larutan	>99% (pH 3,5-10, pada 100°C selama 24 jam)	
Kestabilan panas larutan	>99% (pada 120°C selama 90 menit)	

Perhatian ilmiah terhadap gula ini meningkat selama bertahun-tahun karena sintesis trehalosa meningkatkan *life span* organisme yang lebih rendah dan melindunginya dari cedera yang disebabkan oleh pengeringan, suhu ekstrim, spesies oksigen reaktif, dan akumulasi protein *misfolded*. Pemberian trehalosa eksogen juga terbukti melindungi sel mamalia sebagai respons terhadap stres. Menariknya, Sarkar dkk (Sarkar *et al.*, 2007) mendemonstrasikan bahwa trehalosa memiliki kemampuan yang hebat untuk meningkatkan autofagi secara independen dari pensinyalan mTOR (*mammalian target of rapamycin*). (Hosseinpour-Moghaddam, Caraglia and Sahebkar, 2018)

Berdasarkan studi oleh (Chen *et al.*, 2007) didapatkan bahwa trehalosa memiliki efek yang sama dengan prebiotik, yaitu dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri asam laktat penghasil bakteriosin, khususnya *Lactococcus lactis spp.* dan *Lactococcus sp.*, serta

menghasilkan bakteriosin dari *Lactobacillus animalis*, *E. durans*, *Lactococcus lactis* spp., dan *Lactococcus* sp.



**Gambar 2.** Efek menguntungkan dari pemberian trehalosa terhadap infeksi *S. Typhimurium* (ST) pada caecum pada ayam ras. (Wu *et al.*, 2020)

Pada penelitian oleh (Wu *et al.*, 2020), penambahan trehalosa 3% meningkatkan banyak lactobacilli di usus kecil, caecum, dan feses, yang menunjukkan bahwa pemberian trehalosa dapat bertindak sebagai prebiotik untuk secara selektif mendorong pertumbuhan bakteri yang menguntungkan dan menghambat multiplikasi patogen di usus halus. Didapatkan juga bahwa dengan penambahan trehalosa dapat menekan ekspresi gen sitokin terkait inflamasi dan secara bersamaan meningkatkan ekspresi gen sitokin anti-inflamasi.

Oleh karena itu, diperkirakan bahwa pemberian trehalosa dapat mengurangi efek inflamasi yang dihasilkan dari peningkatan pertumbuhan lactobacilli dan meningkatkan regulasi ekspresi sitokin anti-inflamasi (IL-10 dan IFN- $\alpha$ ), sehingga menekan sitokin pro-inflamasi. Selain itu, dengan pemberian trehalosa juga berkontribusi

terhadap jumlah lipopolisakarida (LPS) yang lebih sedikit di caecum, sehingga tidak cukup untuk mengaktifkan jalur NF-kB.(Wu *et al.*, 2020)

Trehalosa memiliki beberapa fungsi yang membedakannya dari disakarida umum lainnya, yaitu perlindungan terhadap stres salah satunya spesies oksigen reaktif (ROS). Trehalosa dapat mencegah respon inflamasi yang disebabkan oleh syok endotoksik baik secara *in vivo* dan *in vitro*. Dengan demikian, trehalosa dianggap sebagai agen terapeutik yang berpotensi kuat untuk berbagai penyakit, yang melibatkan stres oksidatif, kondisi pengeringan, dan inflamasi kronis. Trehalosa juga dianggap memiliki profil keamanan yang tinggi karena larutan pengawet organ yang mengandung trehalosa digunakan dalam transplantasi paru klinis.(Echigo *et al.*, 2012) Pemberian trehalosa mengarah pada peningkatan umur dan peningkatan rentang kesehatan. Mekanisme yang berpotensi terlibat dalam efek menguntungkan trehalosa tampaknya bergantung pada aktivasi jalur NRF2 yang menyebabkan peningkatan pertahanan antioksidan serta modulasi autofagi yang baik. (Berry *et al.*, 2020)

Dalam penelitian sebelumnya, telah didapatkan bahwa konsumsi harian 2,5 dan 0,3% (berat/volume; w/v) trehalosa mengurangi hipertrofi adiposit dan memperbaiki resistensi insulin pada tikus yang diberi HFD. Asupan harian 2,5% (w/v) trehalosa setara dengan 1,6 gram/kgBB/hari pada tikus dan 10 gram/hari pada orang dengan berat 60 kg menurut pedoman FDA.(Yoshizane *et al.*, 2020)

Dari penelitian yang dilakukan oleh Echigo dkk menunjukkan bahwa trehalosa menekan respon inflamasi yang diinduksi hemolysate termasuk aktivasi kaskade asam arakidonat dan produksi iNOS, sitokin pro-inflamasi, dan endotelin-1 dalam sel kultur; trehalosa menekan aktivasi jalur NF- $\kappa$ B dalam sel kultur yang diobati dengan hemolisat; trehalosa melindungi sel dari peroksidasi lipid yang diinduksi oleh hemolysate dan ROS dalam sel yang dikultur; pemberian tunggal trehalosa setelah onset eksperimental SAH menekan vasospasme yang diinduksi darah pada model kelinci; dan trehalosa menekan perkembangan vasospasme, serta respon inflamasi dan peroksidasi lipid dengan adanya darah pada model arteri femoralis tikus. Sehingga diambil kesimpulan bahwa pengobatan dengan trehalosa dapat menghasilkan tindakan pleiotropik termasuk menghambat respon inflamasi, peroksidasi lipid, dan vasospasme. (Echigo *et al.*, 2012)

Trehalosa juga berpotensi untuk mengobati penyakit manusia. Pemberian disakarida ini secara oral mampu secara dramatis mengurangi perkembangan dan progresi gangguan neurodegeneratif, steatosis hati, cedera ginjal, resistensi insulin, dan pankreatitis, sebagian besar melalui stimulasi autofagi. (Hosseinpour-Moghaddam, Caraglia and Sahebkar, 2018)

Trehalosa juga memberikan efek menguntungkan dalam sistem kardiovaskular. Trehalosa mengurangi kematian kardiomyosit sebagai

respons terhadap tekanan energi pada kardiomyosit secara *in vitro*. Pemberian trehalosa oral secara signifikan mengurangi *remodelling*, disfungsi, dan gagal jantung pada model tikus infark miokard kronis melalui aktivasi autofagi. (Sciarretta *et al.*, 2018) Faktanya, pemberian trehalosa secara signifikan mengaktifkan autofagi dan mitofagi dalam kardiomyosit. Menariknya, Sergin dkk (Sergin *et al.*, 2017) baru-baru ini menunjukkan bahwa pemberian trehalosa juga mampu menurunkan perkembangan aterosklerosis pada mencit ApoE<sup>-/-</sup> (apolipoprotein E) yang diberi pakan tinggi lemak. Pemberian trehalosa mengaktifkan autofagi di makrofag mencit ini sehingga mengurangi produksi sitokin dan inflamasi vaskular. Secara mekanis, trehalosa merangsang autofagi melalui aktivasi TFEB (faktor transkripsi EB). Trehalosa mengaktifkan TFEB dalam kardiomyosit, dan *knockdown* faktor transkripsi ini melemahkan efek proautofagik trehalosa. (Hosseinpour-Moghaddam, Caraglia and Sahebkar, 2018; Sciarretta *et al.*, 2018)

## E. Sukrosa

Sukrosa (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) merupakan gula non-pereduksi, mengandung glukosa dan fruktosa; dan merupakan gula yang bisa didapatkan dari tumbuhan. Tebu dan bit merupakan tumbuhan yang sering dimanfaatkan karena kandungan sukrosanya.

Sukrosa dihidrolisis oleh sukrase menjadi fruktosa dan glukosa. Konsumsi sukrosa yang berlebihan dikaitkan dengan sindrom

metabolik seperti diabetes mellitus. Sebuah penelitian yang dilakukan pada tikus yang diberi diet yang mengandung dua pertiga sukrosa, pada awalnya kadar trigliserida meningkat dan kemudian berkembang menjadi resistensi insulin. Dalam penelitian lain tikus diberi diet tinggi sukrosa, yang menyebabkan tikus menjadi hipertrigliseridemia, hiperglikemia dan resistensi insulin.(Jørgensen, 2009)

## **F. Glukosa**

Gula terdapat secara alami dalam berbagai macam buah-buahan, sayuran, susu, dan makanan olahan susu. Selain itu, gula diproduksi secara komersial dan ditambahkan ke dalam makanan karena rasa manisnya maupun fungsi lainnya sebagai tekstur makanan. Saat dimetabolisme, gula memiliki sekitar 4 kalori per gram.(Schorin *et al.*, 2012)

Glukosa merupakan monosakarida yang memiliki rumus molekul  $C_6H_{12}O_6$  dan bersirkulasi dalam darah, dan merupakan sumber energi utama tubuh dan satu-satunya bahan bakar yang digunakan oleh sel otak. (Shendurse and Khedkar, 2015) (Schorin *et al.*, 2012) Glukosa juga terdiri dari glikogen, yang merupakan cadangan karbohidrat di sebagian besar sel hewan vertebrata dan invertebrata, serta berbagai jamur dan protozoa.(Shendurse and Khedkar, 2015) Glikogen disimpan di otot skeletal dan hati. Jika asupan glukosa melebihi dari yang digunakan dalam tubuh, maka akan diubah menjadi lemak.

Glikogen hati mempertahankan kadar glukosa darah sedangkan glikogen otot tidak mempertahankan glukosa darah. (Jørgensen, 2009)

Glukosa yang tinggi akan menginduksi stres oksidatif yang mengakibatkan kerusakan vaskular, karena masuknya glukosa berlebih ke dalam sel yang menyebabkan produksi berlebih dari anion superoksida di mitokondria. (Peiró *et al.*, 2016)

Glukosa yang tinggi mengaktifkan faktor nuklear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), yang merupakan salah satu faktor transkripsi untuk gen pro-inflamasi. NF- $\kappa$ B terdapat dalam sitoplasma sebagai bentuk tidak aktif yang terikat pada molekul penghambatnya, faktor penghambat NF- $\kappa$ B- $\alpha$  (I $\kappa$ B- $\alpha$ ). Translokasi NF- $\kappa$ B dari sitoplasma ke nukleus didahului oleh proses fosforilasi, ubiquitinasi, dan degradasi proteolitik I $\kappa$ B- $\alpha$ . Diasumsikan bahwa ekspresi molekul adhesif sel yang diinduksi glukosa bergantung pada aktivasi NF- $\kappa$ B. Di bawah stres oksidatif, sel endotel menghasilkan ROS, seperti superoksida dan peroksinitrit, yang menyebabkan oksidasi lipo protein densitas rendah (LDL). Pembentukan ROS bersama dengan faktor inflamasi termasuk kemokin, sitokin, dan molekul adhesi terbukti meningkat pada lesi aterosklerotik. Respon inflamasi, termasuk transkripsi gen inflamasi, melibatkan radikal bebas atau stres oksidatif, sehingga *scavenger* radikal bebas dapat menekan ekspresi gen inflamasi. (Jayakumar *et al.*, 2014)

### **G. Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*)**

Model hewan digunakan dalam penelitian eksperimental untuk meningkatkan pengetahuan manusia dan berkontribusi dalam menemukan solusi untuk pertanyaan-pertanyaan biologis dan biomedis. (Andersen and Winter, 2019) Saat ini tikus Wistar dan tikus Sprague-Dawley yang paling banyak digunakan di laboratorium di seluruh dunia. (Andreollo *et al.*, 2012)

Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) memiliki struktur anatomi (sistem sirkulasi, otot, dan struktur tulang) yang hampir sama dengan manusia, sehingga sering digunakan sebagai hewan percobaan. (Suckow., 2016)

Masa kanak-kanak tikus relatif singkat dan cepat jika dibandingkan dengan manusia, dan mengalami pubertas pada usia  $\pm 6$  minggu. Pada masa dewasa, usia tikus setiap bulannya setara dengan usia manusia 2,5 tahun. Untuk tikus betina, mengalami menopause pada usia 15-18 bulan, sedangkan manusia mengalami menopause pada usia 48-55 tahun. (Andreollo *et al.*, 2012) Tabel di bawah ini menunjukkan perbandingan usia relatif tikus dengan usia manusia: (Andreollo *et al.*, 2012)

**Tabel 3.** Perbandingan usia relatif tikus dengan usia manusia (Andreollo *et al.*, 2012)

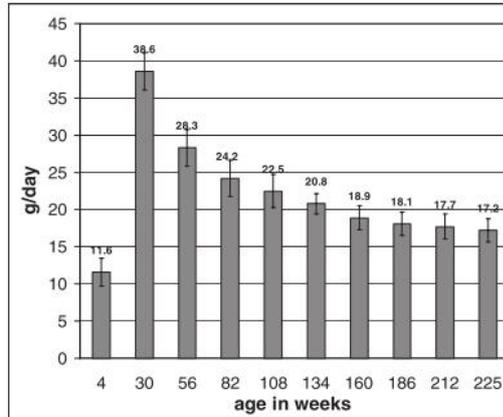
Usia Tikus (Bulan)	Usia Manusia (Tahun)
1,5 Bulan (Pubertas)	12,5 Tahun
6 Bulan ( <i>Social maturity</i> )	18 Tahun
12 Bulan	30 Tahun
18 Bulan	45 Tahun
24 Bulan	60 Tahun
30 Bulan	75 Tahun
36 Bulan	90 Tahun
42 Bulan	105 Tahun
45 Bulan	113 Tahun
48 Bulan	120 Tahun

Adapun data fisiologis tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) sebagai berikut:

**Tabel 4.** Data fisiologis tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) (Hansen Kornerup, 2011)

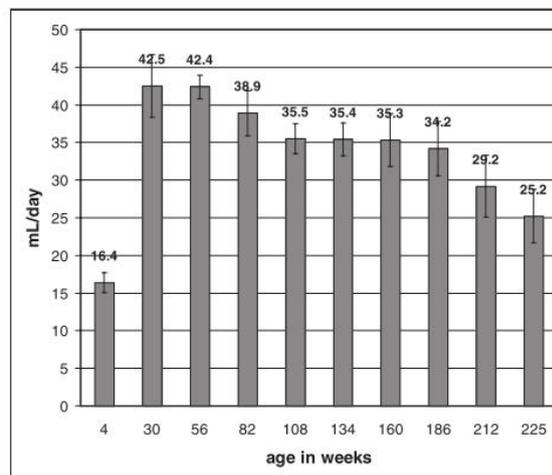
Kriteria	Nilai
Berat badan dewasa	Jantan : 300 – 400 gram Betina : 250 – 300 gram
Kebutuhan makan	5 – 10 gr/100gr berat badan
Kebutuhan minum	10 ml/100gr berat badan
Lama Hidup	3 – 4 tahun
Detak Jantung	250 – 450 kali/menit
Tekanan Darah	
Sistol	84 – 134 mmHg
Diastol	60 mmHg
Laju pernapasan	70 – 115 kali/penit
Serum protein (g/dl)	5,6 – 7,6
Albumin (g/dl)	3,8 – 4,8
Globulin (g/dl)	1,8 – 3
Glukosa (mg/dl)	50 – 135

Asupan makanan pada tikus usia sampai minggu ke-30 adalah 38,6 gram/tikus/hari) tercatat peningkatan yang signifikan pada asupan makanan, yang kemudian menurun secara signifikan hingga minggu ke-56 (yaitu 28,3 gram/tikus/hari). Dari minggu ke-56 sampai minggu ke-108 asupan makanan secara bertahap menurun menjadi 22,5 gram/tikus/hari dan sejak itu secara bertahap menurun. (Nistiar *et al.*, 2012)



**Gambar 3.** Asupan makanan pada tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*) berdasarkan usia.(Nistiar *et al.*, 2012)

Asupan air pada tikus meningkat sampai minggu ke-30 (sampai 42,5 mL/hari/tikus), kemudian menurun secara bertahap sampai akhir periode pengamatan pada minggu ke-225 menjadi sekitar 25,2mL/hari/ekor. Dinamika asupan air sangat mirip dengan dinamika asupan makanan pada tikus.(Nistiar *et al.*, 2012)



**Gambar 4.** Asupan air pada tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*) berdasarkan usia.(Nistiar *et al.*, 2012)

## H. Imunohistokimia (IHK)

Metode imunohistokimia (IHK) digunakan secara luas untuk mendiagnosis sel yang abnormal misalnya sel kanker, mendeteksi kematian sel (apoptosis), dan metode ini juga sudah digunakan secara luas pada bidang penelitian untuk mempelajari lokalisasi biomarker, antigen, dan lain-lain. Menggunakan prinsip reaksi antara antigen dan antibodi, metode IHK dapat mendeteksi protein atau karbohidrat pada sel dari jaringan. (Adi, 2013)

Metode ini memanfaatkan terbentuknya kompleks antigen-antibodi pada sediaan jaringan atau permukaan sel yang nantinya dapat dideteksi dengan antibodi sekunder yang dilabel. Bahan yang digunakan untuk melabel antibodi ini banyak jenisnya, namun yang umum digunakan adalah enzim, isotop, *fluoropore*, atau *colloidal gel*.(Adi, 2013) Saat ini sudah tersedia antibodi sekunder berlabel misalnya antibodi berlabel *horse radish peroksidase* (HRP) seperti *antichicken IgGHRP*, *antiduck IgGHRP*, *antipig IgGHRP* yang sudah umum digunakan dalam metode imunohistokimia. Selain itu untuk beberapa kepentingan juga banyak tersedia antibodi yang dilabel dengan fluorophore seperti *fluorescin* atau *rhodamin*.(Adi, 2013)

Imunohistokimia sering digunakan untuk mengetahui distribusi dan lokasi biomarker atau protein tereksresi pada jaringan tubuh, dan juga untuk mengidentifikasi karakteristik proses proliferasi maupun

apoptosis sel. Teknik IHK merupakan teknik yang sensitif, spesifik, aman dan cepat. (Adi, 2013)

#### I. ***Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)***

*Nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) pada dasarnya adalah faktor transkripsi yang sangat terkonservasi dan terinduksi, yang mengatur ekspresi lebih dari 200 gen yang terlibat dalam berbagai proses fisiologis dan patologis, termasuk proliferasi dan diferensiasi sel, respon inflamasi dan imun, kelangsungan hidup sel dan apoptosis, reaksi stres seluler dan tumorigenesis.(Yu, Wan and Huang, 2009; Singh and Gupta, 2015)

Normalnya, faktor transkripsi NF- $\kappa$ B terikat ke inhibitor kappa B (I $\kappa$ B) dan terletak di sitoplasma. NF- $\kappa$ B diaktifkan oleh banyak stimulus melalui berbagai reseptor atau jalur aktivasi intrinsik lainnya. Aktivasi NF- $\kappa$ B yang abnormal terjadi pada beberapa penyakit manusia, seperti pada kanker dan penyakit inflamasi.(Singh and Gupta, 2015)

NF- $\kappa$ B merupakan keluarga faktor transkripsi yang terdiri dari lima anggota dalam sel mamalia, yaitu NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65), RelB dan c-Rel.(Yu, Wan and Huang, 2009) Heterodimer p50 dan p65 merupakan heterodimer yang paling umum di jalur pensinyalan NF- $\kappa$ B, karena terdapat di sebagian besar jenis sel.(Napetschnig and Wu, 2013)

Homodimer p50 terbukti memiliki fungsi penting sebagai faktor transkripsi anti-inflamasi melalui penekanan ekspresi gen pro-inflamasi sekaligus meningkatkan ekspresi gen anti-inflamasi. Selain perannya yang sangat penting dalam inflamasi dan kanker, NFkB1 juga dapat mengatur penuaan dan senescence. Peningkatan penuaan/senescence disebabkan oleh penurunan kadar homodimer p50 yang dikombinasikan dengan pergeseran ke arah pembentukan heterodimer p50:RelA.(Cartwright, Perkins and L Wilson, 2016)

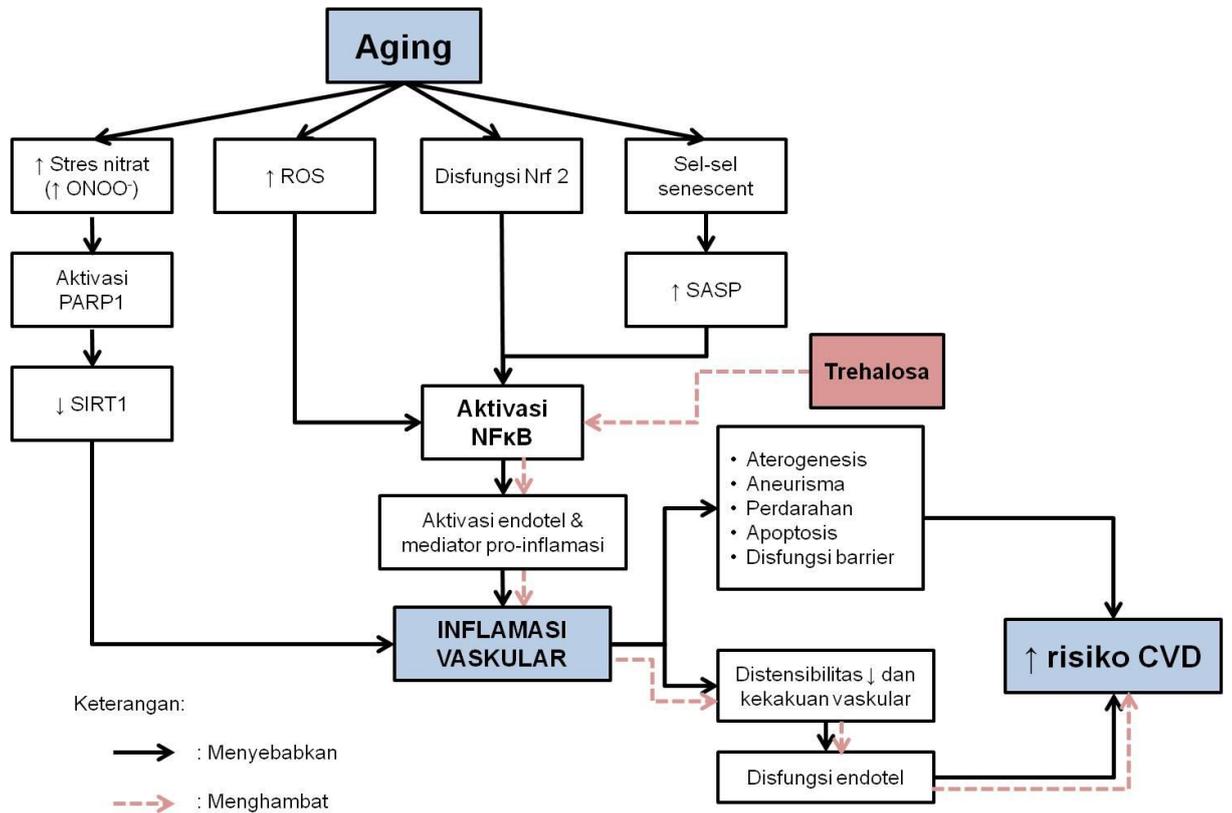
Hal ini dapat dilihat pada model tikus *Nfkb1<sup>-/-</sup>*, di mana inflamasi kronis yang terlihat pada model ini meningkatkan kerusakan telomer dan menciptakan lingkungan sel-sel tua, melalui fenotipe sekretori terkait penuaan pro-inflamasi, yang memperburuk kondisi inflamasi dan mempercepat penuaan.(Cartwright, Perkins and L Wilson, 2016)

Sebagai bagian dari jalur pensinyalan NF- $\kappa$ B, p65 biasanya terlibat dalam respons inflamasi tubuh. Jalur ini dapat diinduksi oleh rangsangan stres, termasuk radikal bebas, iradiasi ultraviolet, interleukin 1-beta ( $IL-1\beta$ ), *tumor necrosis factor- $\alpha$*  ( $TNF\alpha$ ), *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), atau lipopolisakarida bakteri (LPS).(Gutierrez and Davies, 2011)

### BAB III

## KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS PENELITIAN

### A. Kerangka Teori



### B. Kerangka Konsep



Keterangan:

- : Variabel independent
- : Variabel antara
- : Variabel dependent

### **C. Hipotesis**

Berdasarkan uraian di atas, maka diajukan hipotesis pada penelitian ini, yaitu:

1. Biomarker inflamasi makrovaskular pada kelompok kontrol tikus muda lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol tikus tua.
2. Biomarker inflamasi makrovaskular pada kelompok dengan perlakuan trehalosa lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol tikus tua.
3. Biomarker inflamasi makrovaskular pada kelompok dengan perlakuan trehalosa lebih rendah dibandingkan kelompok dengan perlakuan sukrosa (gula pasir).
4. Terdapat hubungan antara pemberian gula trehalosa dengan biomarker inflamasi makrovaskular pada tikus tua.

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental terhadap hewan coba dengan design *post-test with control group design*. Hewan coba yang digunakan adalah tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan usia 3-6 bulan untuk tikus muda dan usia 12-18 bulan untuk tikus tua sebanyak 28 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol muda (A), kelompok kontrol tua (B), kelompok tikus tua yang diberikan larutan sukrosa (C), dan kelompok tikus tua yang diberikan larutan trehalosa (D); dan diamati selama 8 minggu.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **1. Tempat Penelitian**

Pemeliharaan hewan coba dan pengambilan sampel dilakukan di Laboratorium Entomologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Pemeriksaan imunohistokimia dengan pewarnaan NFkB p65 dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar.

##### **2. Waktu Penelitian**

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Maret - Mei 2021.