

TESIS

**PENGARUH EFEK PEMBERIAN GULA TREHALOSA TERHADAP PENCEGAHAN
PENURUNAN FUNGSI GINJAL DENGAN MENILAI KADAR CYSTATIN-C DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL PADA TIKUS PUTIH TUA
(*RATTUS NORVEGICUS STRAIN WISTAR*)**

**Diajukan oleh
SHAFIRA RIDHA KHAERATI
P062192009**



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

**PENGARUH EFEK PEMBERIAN GULA TREHALOSA TERHADAP PENCEGAHAN
PENURUNAN FUNGSI GINJAL DENGAN MENILAI KADAR CYSTATIN-C DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL PADA TIKUS PUTIH TUA
(*RATTUS NORVEGICUS STRAIN WISTAR*)**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister

**Program Studi
Ilmu Biomedik**

Disusun dan diajukan oleh

SHAFIRA RIDHA KHAERATI

Kepada

**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2021

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

**PENGARUH EFEK PEMBERIAN GULA TREHALOSA TERHADAP PENCEGAHAN
PENURUNAN FUNGSI GINJAL DENGAN MENILAI KADAR CYSTATIN-C DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL PADA TIKUS PUTIH TUA
(*RATTUS NORVEGICUS STRAIN WISTAR*)**

Disusun dan Diajukan Oleh

SHAFIRA RIDHA KHAERATI

Nomor Pokok : P062192009

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Biomedik
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
pada tanggal 16 September 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,
Komisi Penasihat,

Pembimbing Utama,



dr. Gita Vita Soraya, Ph.D

NIP. 1989 0609 2014 04 2001

Pembimbing Pendamping,



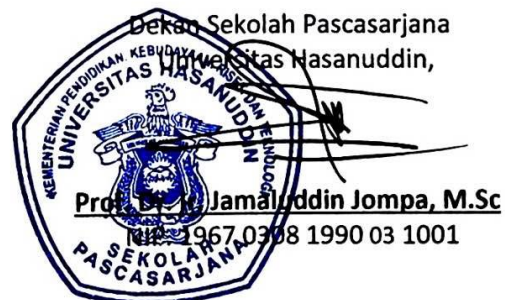
dr. Arif Santoso, Sp.P(K), Ph.D, FAPSR

NIP. 1977 0715 2006 04 1012

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik,



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



PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Shafira Ridha Khaerati

NIM : P062192009

Program Studi : Ilmu Biomedik

Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

**PENGARUH EFEK PEMBERIAN GULA TREHALOSA TERHADAP PENCEGAHAN
PENURUNAN FUNGSI GINJAL DENGAN MENILAI KADAR CYSTATIN-C DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI GINJAL PADA TIKUS PUTIH TUA (*RATTUS NORVEGICUS STRAIN
WISTAR*)**

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilalihan tulisan orang lain bahwa Tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri. Apabila dikemudian 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, 16 September 2021

Yang menyatakan



Shafira Ridha Khaerati

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan dan menyusun tesis yang berjudul “Pengaruh Efek Pemberian Gula Trehalosa Terhadap Pencegahan Penurunan Fungsi Ginjal Dengan Menilai Kadar Cystatin-C Dan Gambaran Histopatologi Ginjal Pada Tikus Putih Tua (*Rattus Norvegicus Strain Wistar*)” sebagai persyaratan meraih gelar Magister Biomedik pada program studi Ilmu Biomedik, Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Penulis tidak akan mampu berada di posisi dan situasi saat ini tanpa bimbingan Ayahanda Ir. H. Osman Nagga serta Ibunda tercinta Prof. Dr. Ir. Hj. Sitti Bulkis M.S yang senantiasa memberikan dukungan moril maupun materil yang tak terbatas kepada penulis mulai dari awal hingga detik tesis ini diselesaikan. Suamiku tercinta dr. Muhammad Ramdhan Hidayat dengan segala ketulusan yang diberikan di tengah kesibukannya serta tidak henti-hentinya memberikan dukungan kepada saya, serta anak-anakku yang saya cintai Alesha Nahla Shakira dan Aghnia Nayyara Shakila yang menjadi motivasi saya menyelesaikan tesis ini. Penulis juga sadar sepenuhnya bahwa dalam penyusunan tesis ini, tentu saja tidak lepas dari bantuan berbagai pihak dari awal hingga akhir penelitian. Oleh karena itu, penulis ingin memberikan apresiasi dan penghargaan serta menghaturkan ucapan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, MSc selaku Dekan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin dan Dr. dr. Ika Yustisia, MSc selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik yang telah menerima penulis sebagai mahasiswa untuk menempuh pendidikan magister.

2. dr. Gita Vita Soraya, PhD selaku ketua komisi penasihat tesis, serta dr. Arif Santoso, Sp. P, Ph. D, FAPSR selaku anggota komisi penasihat tesis yang telah meluangkan waktu dan pemikiran dalam membimbing penulis hingga tesis ini dapat terselesaikan.
3. Prof. Dr. dr. Nurpudji Astuti Taslim, M. Sc, Sp. G (K), Dr. dr. Irfan Idris., M. Sc, dan dr. Endy Adnan., Sp. PD, Ph. D, selaku tim penguji yang telah memberikan saran dan bimbingan demi kelancaran penelitian.
4. Seluruh dosen pengampuh yang telah mendidik, membimbing, serta membagikan ilmu dan pengalaman mereka selama penulis menempuh pendidikan magister Ilmu Biomedik konsentrasi *Anti-Aging Medicine* di Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
5. Seluruh staf dan jajaran tenaga kependidikan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang telah banyak membantu penulis dalam memenuhi kebutuhan administrasi selama menempuh proses pendidikan.
6. Ayah dan ibu mertua yang saya cintai Dr. H. Abdul Karim, M. Si, dan Ir. Hj. Nur Ina, M.P, beserta saudara – saudaraku, Muh. Arief Rahman S.T., Muh. Ardiansyah S.E., MM, Muh. Ridha Aslam S.T., Khadijah Makki S.E., Adya Utami S.E., M.Si., Amila Rezky Mufidah S.E., yang selalu memberikan dukungan dan semangat kepada penulis hingga penyelesaian tesis ini.

7. Rekan-rekan penelitian penulis, saudari dr. Inggrid, Desya Faradila Ismi S.Si., Apt. dan dr. Rabiatul Aminah atas bantuan dan jasa yang tak terhingga dalam membantu dan mengawal proses penelitian dari awal hingga akhir.
8. Semua pihak yang tak sempat penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu penulis menyelesaikan tesis ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

Tiada lain harapan penulis, semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi penulis sendiri maupun bagi para pembaca demi pengembangan ilmu pengetahuan. Wassalam.

Makassar, September 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGANTAR	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	Error! Bookmark not defined.
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GRAFIK	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4. Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Penuaan	7
2.1.1 Definisi Penuaan.....	7
2.1.2 Faktor-Faktor Penuaan.....	7
2.1.3 Jenis-Jenis Usia	8
2.1.4 Teori Penuaan	8
2.2. Penurunan Fungsi Ginjal Pada Penuaan	11
2.2.1 Definisi.....	11
2.2.2 Mekanisme Biologi Molekular.....	11
2.2.3 Perubahan struktural	12
2.2.4 Perubahan Fungsional	13
2.3. Trehalosa.....	14
2.3.1. Definisi Trehalosa	14
2.3.2. Sejarah Trehalosa	14

2.3.3.	Fungsi Trehalosa.....	15
2.4.	Cystatin C.....	17
2.4.1.	Defenisi Cystatin-C.....	17
2.4.2.	Sejarah Cystatin C.....	17
2.4.3.	Fungsi Fisiologis Cystatin-C.....	18
2.4.4.	Struktur Cystatin-C.....	19
2.4.5.	Metabolisme dan Ekskresi Cystatin-C.....	19
2.4.6.	Pemeriksaan Laboratorium Cystatin-C.....	20
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA PENELITIAN, HIPOTESIS		22
3.1.	Kerangka Teori.....	22
3.2.	Kerangka Penelitian	22
3.3.	Hipotesis.....	23
BAB IV METODE PENELITIAN.....		24
4.1.	Desain Penelitian	24
4.2.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	24
4.3.	Subjek Penelitian	25
4.3.1.	Sampel Penelitian.....	25
4.3.2.	Perkiraan Besar Sampel.....	25
4.3.3.	Kriteria Inklusi.....	26
4.3.4.	Kriteria Eksklusi	26
4.4.	Prosedur Kerja.....	26
4.4.1.	Persiapan hewan coba	26
4.4.2.	Pre Intervensi (koleksi sampel).....	27
4.4.3.	Pembuatan larutan sukrosa	27
4.4.4.	Pembuatan larutan trehalosa.....	28
4.4.5.	Intervensi	28
4.4.6.	Pasca intervensi (koleksi sampel)	29
4.5.	Definisi Operasional dan Kriteria Objektif	30
4.6.	Metode Analisis.....	31
4.7.	Etik Penelitian.....	32
4.8.	Alur Penelitian	33

BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	34
5.1. Hasil Penelitian.....	34
5.2. Pembahasan	38
5.3 Keterbatasan Penelitian	45
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	46
6.1. Kesimpulan	46
6.2. Saran	46
DAFTAR PUSTAKA.....	48
LAMPIRAN.....	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Perubahan Struktural Pada Penuaan Ginjal	13
Gambar 2. Struktur Kimia Trehalosa.....	14
Gambar 3. Glomeruli Normal pada Tikus	45
Gambar 4. Glomerulosklerosis pada Tikus	45

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Karakteristik hewan coba penelitian berdasarkan kelompok perlakuan 35

DAFTAR GRAFIK

Grafik 1 Perbandingan Kadar Cystatin-C (mg/mL), antara Pre dan Post Intervensi.....	36
Grafik 2 Perbandingan Peresentase Sklerosis pada Ketiga Kelompok	38

ABSTRAK

Shafira Ridha Khaerati. Pengaruh Efek Pemberian Gula Trehalosa Terhadap Pencegahan Penurunan Fungsi Ginjal Dengan Menilai Kadar Cystatin-C Dan Gambaran Histopatologi Ginjal Pada Tikus Putih Tua (*Rattus Norvegicus Strain Wistar*) (Dibimbing oleh **Arif Santoso dan Gita Vita Soraya**).

Penuaan disertai dengan penurunan fungsi semua organ, termasuk ginjal, penurunan fungsi ginjal pada penuaan adalah proses multifaktorial salah satunya stress oksidatif. Trehalosa merupakan gula alami dan telah banyak digunakan untuk mengobati penyakit medis karena kemampuannya untuk meningkatkan autofagi dan fungsi mikrovaskular, memberikan efek sitoprotektif serta menghambat stress oksidatif. Penelitian ini menganalisis efek pemberian gula trehalosa terhadap pencegahan penurunan fungsi ginjal pada penuaan dengan menilai kadar Cystatin-C dan gambaran histopatologi ginjal pada tikus tua.

Penelitian eksperimental dengan design *pretest-posttest with control group design* menggunakan hewan coba tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan usia 12-18 bulan sebanyak 27 ekor yang dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol, trehalosa 2% dan sukrosa 2%. Sampel darah diambil sebelum dan sesudah intervensi selama 8 minggu untuk menilai kadar Cystatin-C menggunakan teknik ELISA. Hewan coba diterminasi untuk pengambilan sampel organ ginjal dan dilakukan pemeriksaan histologis untuk menilai persentase glomerulosklerosis.

Terdapat perbedaan bermakna dari kadar Cystatin-C antara kontrol dengan sukrosa 2% dan trehalosa 2% dengan sukrosa 2% ($p < 0.05$), namun tidak ada perbedaan bermakna antara kontrol dan trehalosa 2% ($p > 0.05$). Persentase glomerulosklerosis antara kelompok kontrol, trehalosa 2%, dan sukrosa 2% tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0.05$).

Penelitian ini menyimpulkan trehalosa efektif menekan peningkatan kadar Cystatin-C sebagai indikator penurunan fungsi ginjal dibandingkan pemberian sukrosa, namun tidak dapat menghambat terjadinya glomerulosklerosis.

Kata kunci. Trehalosa, Cystatin-C, Glomerulosklerosis

ABSTRACT

Shafira Ridha Khaerati. *The Effect of Administration Trehalose Sugar on Renal Impairment Prevention by Assessing Cystatin-C Level and Histopathology Finding on Old White Rat (Rattus Norvegicus Strain Wistar) (Supervised by Gita Vita Soraya, Arif Santoso).*

Aging is accompanied by a decrease in the function of all organs, including the renal. Renal impairment in aging is a multifactorial process, one of which is oxidative stress. Trehalose is a natural sugar and has been widely used to treat medical diseases because of its ability to increase autophagy, improve microvascular function, provide cytoprotective effects and inhibit oxidative stress. This study analyzed the effect of administration of trehalose sugar on the prevention of decreased renal function in aging by assessing Cystatin-C levels and histopathological features of the kidneys in elderly rats.

Experimental research with pretest-posttest design with control group design using Wistar rats (Rattus norvegicus) aged 12-18 months, a total of 27 rats were divided into 3 groups, namely the control group, 2% trehalose and 2% sucrose. Blood samples were taken before and after the intervention for 8 weeks to assess Cystatin-C levels using the ELISA technique. Experimental animals were terminated for kidney organ sampling and histological examination was performed to assess the percentage of glomerulosclerosis.

There was a significant difference in Cystatin-C levels between the control with 2% sucrose and 2% trehalose and 2% sucrose ($p < 0.05$), but there was no significant difference between the control and 2% trehalose ($p > 0.05$). The percentage of glomerulosclerosis between the control group, 2% trehalose, and 2% sucrose was not significantly different ($p > 0.05$).

This study concluded that trehalose was effective in suppressing the increase in Cystatin-C levels as an indicator of decreased renal function compared to sucrose, but could not inhibit the occurrence of glomerulosclerosis.

Keywords. *Trehalose, Cystatin-C, Glomerulosclerosis*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penuaan adalah proses biologis yang alami, progresif, dan tak terelakkan, proses yang ditandai dengan penurunan fungsi seluler secara bertahap dan perubahan struktural progresif pada sistem organ (Denic, Glassock, and Rule 2016). Penuaan ditandai dengan hilangnya kemampuan fisiologis secara progresif, yang menyebabkan gangguan fungsi dan meningkatnya kerentanan terhadap kematian (López-Otín et al. 2013). Penuaan merupakan faktor risiko utama untuk sebagian besar penyakit kronis dan gangguan fungsional. Telah banyak teori yang telah diajukan untuk menjelaskan fenomena penuaan, namun belum ada yang bisa sepenuhnya menjelaskan mekanisme yang mendorong proses yang mendasari penuaan (Wagner et al. 2016).

Penelitian mengenai proses penuaan telah mengalami kemajuan yang belum pernah terjadi sebelumnya beberapa tahun terakhir, terutama dengan penemuan bahwa laju penuaan dapat dikendalikan, setidaknya untuk beberapa tahap oleh jalur genetik dan proses biokimia yang dikembangkan (López-Otín et al. 2013). Beberapa penelitian menyebutkan ada sembilan ciri tentatif yang mewakili tanda umum penuaan di berbagai organisme, dengan penekanan khusus pada penuaan mamalia yaitu, ketidakstabilan genom, pemendekan telomer, perubahan epigenetik, hilangnya proteostasis, deregulasi penginderaan nutrisi, disfungsi mitokondria, sel senesens, kelelahan sel punca, dan perubahan komunikasi interseluler. (López-Otín et al. 2013).

Pada dasarnya penyebab penuaan dikelompokkan menjadi faktor internal dan eksternal. Beberapa faktor internal ialah radikal bebas, hormon, proses glikosilasi, metilasi, apoptosis, sistem kekebalan dan genetik. Faktor eksternal yang utama ialah gaya hidup tidak sehat, diet tidak sehat, kebiasaan buruk seperti merokok, polusi lingkungan, stres dan kemiskinan (Pangkahila, 2007).

Penuaan disertai dengan penurunan fungsi semua organ, termasuk ginjal (Li and Wang 2018). Penuaan ginjal adalah proses multifaktorial dimana jenis kelamin, ras dan latar belakang genetik dan beberapa mediator kunci seperti peradangan kronis, stres oksidatif, sistem renin-angiotensin-aldosterone, penurunan kapasitas perbaikan ginjal dan latar belakang penyakit kardiovaskular memainkan peran penting (Bolignano et al. 2014). Penurunan fungsi ginjal, biasanya dimulai setelah usia 30 tahun proses ini terjadi karena hilangnya nefron dari global glomerulosklerosis sebagai akibat dari degenerasi viseral podosit glomerulus dan perbaikan yang tidak adekuat (Glassock and Rule 2016).

Proses penuaan ginjal selalu disertai dengan perubahan struktural dan fungsional (Li and Wang 2018). Ada beberapa perubahan histologis pada penuaan ginjal yang terjadi seiring pertumbuhan pada pasien yang lebih tua (Baldea 2015). Perubahan utama terkait penuaan pada ginjal yang dapat diamati pada gambaran mikroskopis meliputi nefrosklerosis dan hipertrofi nefron. Gambaran utama nefrosklerosis yang dapat ditemukan pada biopsi ginjal meliputi glomerulosklerosis (fokal dan global, tetapi tidak segmental), atrofi tubular, fibrosis interstitial dan arteriosklerosis (penebalan fibrointimal).

Penanda histopatologi pada penurunan fungsi ginjal penelitian ini adalah glomerulosklerosis (Denic, Glassock, and Rule 2016)

Perubahan struktural pada penuaan ginjal disertai dengan perubahan fisiologis fungsi ginjal, seperti penurunan kemampuan autoregulasi aliran darah ginjal, berkurang kapasitas untuk mempertahankan homeostasis air dan elektrolit, dan meningkatnya kepekaan terhadap perubahan aliran darah ginjal (Baldea 2015).

Penuaan memengaruhi struktur dasar dan fungsi sel ginjal, penuaan menyebabkan penurunan Laju Filtrasi Glomerulus (LFG), perubahan permeabilitas dinding kapiler pada glomerulus, peningkatan kerentanan terhadap cedera podosit, apoptosis, perubahan pada tubulus reabsorpsi dan kapasitas sekretori, perubahan konsentrasi urin dan produksi hormon turunan ginjal dan molekul bioaktif (Denic, Glassock, and Rule 2016). Perubahan fisiologis ini ditandai dengan penurunan LFG diperkirakan dengan klirens kreatinin urin, turun sekitar 0,75 ml / menit per tahun (Denic, Glassock, and Rule 2016)

Cystatin-C merupakan protein berat molekul rendah (13,34 kD) yang disintesis oleh semua sel berinti dan ditemukan diberbagai cairan tubuh manusia. Cystatin-C difiltrasi bebas oleh glomerulus dan tidak disekresi, kemudian direabsorpsi tetapi mengalami katabolisme hampir lengkap oleh sel epitel tubulus proksimal ginjal, sehingga tidak ada yang kembali ke darah, dengan demikian kadarnya dalam darah menggambarkan LFG, sehingga dapat dikatakan Cystatin-C merupakan penanda endogen yang mendekati ideal (Woo et al. 2014). Penanda penurunan fungsi ginjal pada penelitian ini adalah Cystatin-C.

Trehalosa merupakan non-reduksi disakarida yang tersusun dari dua molekul α -glukosa yang dihubungkan oleh α , α -1,1-ikatan glikosidik, gula ini ditemukan di berbagai organisme, termasuk bakteri, ragi, jamur, serangga, invertebrata, dan tumbuhan tingkat rendah maupun tinggi, dan dapat berfungsi sebagai sumber energi dan karbon (Elbein et al. 2003). Trehalose awalnya diidentifikasi sebagai agen itu menginduksi makroautofagi seluler yang merupakan pemecahan dan daur ulang makromolekul tua atau rusak yang terjadi sebagai respon terhadap stress seluler (Zhang and DeBosch 2019). Selanjutnya, trehalosa telah banyak digunakan untuk mengobati penyakit medis karena kemampuannya untuk meningkatkan autofagi, meningkatkan fungsi mikrovaskular dan memberikan efek sitoprotektif (Chou et al. 2019).

Penelitian baru-baru ini telah melaporkan bahwa trehalosa mencegah perkembangan osteoarthritis, dan pemberian trehalose pada tikus osteoarthritis dapat memperbaiki stress oksidatif yang dimediasi oleh disfungsi mitokondria dan stress Retikulum Endoplasma (RE), melalui stimulasi autofagi selektif dan pemulihan fluks autofagi (Tang et al. 2017). Selain itu, trehalosa dapat menggerakkan sistem makrofag autophagy-lisosom untuk mencegah terjadinya aterosklerosis dengan mengaktifkan *Transcription Factor EB* (TFEB) (Evans et al. 2018). Trehalosa mengurangi beban penyakit kardiometabolik pada model aterosklerosis yang diinduksi oleh diet dan genetik, dislipidemia, steatosis hati, toleransi insulin dan toleransi glukosa (Zhang and DeBosch 2019). Suplemen trehalosa oral (100 g / hari) meningkatkan fungsi mikrovaskuler dengan meningkatkan oksida nitrat endotel, efek perlindungan trehalosa sebagian besar telah ditunjukkan pada gangguan neurodegeneratif,

termasuk penyakit Alzheimer, penyakit Parkinson, dan penyakit Huntington (Chou et al. 2019)

Pemberian trehalosa dapat menurunkan disfungsi ginjal pada tikus dengan gagal ginjal akut yang diinduksi cisplatin dengan mengaktifkan autofagi yang dimediasi TFEB, mengurangi disfungsi mitokondria dan cedera ginjal pada tikus gagal ginjal akut (Zhu et al. 2020). Efek perlindungan dari trehalosa pada model penyakit ginjal yang berbeda, termasuk cedera podosit, penyakit ginjal polikistik, dan nefropati diabetik, telah dikonfirmasi oleh beberapa penelitian sebelumnya (Suwen Liu 2020). Namun, efek dari trehalosa pada ginjal tikus yang mengalami penuaan secara alami belum pernah diuji. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji apakah pemberian trehalosa bisa memperlambat ataupun menurunkan disfungsi ginjal pada tikus tua.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka dapat diketahui rumusan masalah sebagai berikut:

Apakah pemberian gula trehalosa dapat mencegah penurunan fungsi ginjal pada proses penuaan dengan menilai kadar Cystatin-C dan gambaran histopatologi ginjal pada tikus tua ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menilai efek pemberian gula trehalosa terhadap pencegahan penurunan fungsi ginjal pada proses penuaan

dengan menilai kadar Cystatin-C dan gambaran histopatologi ginjal pada tikus tua.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui perbedaan kadar Cystatin-C antara kelompok tikus tua yang diberikan trehalosa dengan kelompok tikus putih tua lainnya yang diberikan sukrosa
2. Mengetahui perbedaan gambaran histopatologi ginjal antara kelompok tikus tua yang diberikan trehalosa dengan kelompok tikus putih tua lainnya yang diberikan sukrosa.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh intervensi diet gula berupa penggunaan gula alami yaitu trehalosa terhadap kadar Cystatin-C dan histopatologi ginjal pada tikus tua.
2. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut tentang pengaruh gula trehalosa terhadap pencegahan penurunan fungsi ginjal pada penuaan ginjal.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Penuaan

2.1.1 Definisi Penuaan

Penuaan adalah fenomena alam dan multi-faktorial yang ditandai dengan akumulasi proses degeneratif yang pada akhirnya diiringi oleh berbagai perubahan dan kerusakan pada jalur molekuler. Perubahan dan kerusakan pada akhirnya mengganggu fungsi sel dan jaringan (Wagner et al. 2016)

Penuaan ditandai dengan hilangnya integritas fisiologis secara progresif, yang menyebabkan gangguan fungsi dan meningkatkan kerentanan terhadap kematian. Kerusakan ini merupakan faktor risiko utama terjadinya penyakit pada manusia seperti kanker, diabetes, gangguan kardiovaskular, dan penyakit neurodegeneratif (López-Otín et al. 2013).

2.1.2 Faktor-Faktor Penuaan

Pada dasarnya penyebab penuaan dikelompokkan menjadi faktor internal dan eksternal. Beberapa faktor internal ialah radikal bebas, hormon, proses glikosilasi, metilasi, apoptosis, sistem kekebalan dan genetik. Faktor eksternal yang utama ialah gaya hidup tidak sehat, diet tidak sehat, kebiasaan buruk seperti merokok, polusi lingkungan, stres dan kemiskinan (Pangkahila, 2007).

2.1.3 Jenis-Jenis Usia

1. Usia biologis seseorang dapat didefinisikan sebagai perkiraan usia individu tersebut pada saat sekarang sehubungan dengan rentang hidupnya yang potensial.
2. Usia psikologis, menurut definisi, mengacu pada kapasitas adaptif individu, yaitu seberapa baik mereka beradaptasi terhadap perubahan lingkungan dibandingkan dengan rata-rata.
3. Usia fungsional sangat erat kaitannya untuk usia psikologis. Usia fungsional adalah tingkat kapasitas relative individu terhadap orang lain pada usianya yang berfungsi dalam kehidupan masyarakat.
4. Usia sosial mengacu pada peran dan kebiasaan seseorang sehubungan dengan anggota masyarakat lainnya (Pathath 2017).

2.1.4 Teori Penuaan

1. *Stochastic Theories*

Stochastic Theories juga dikenal sebagai teori *wear and tear* pada penuaan, menyebutkan bahwa kita menjadi tua karena kerusakan kumulatif pada tubuh kita dari sumber eksternal dan internal. Karena kerusakan seperti itu sama sekali tidak diperbaiki, dan akan "aus" seiring waktu, kerusakan ini menumpuk dari waktu ke waktu, sehingga menghasilkan penurunan yang terkait dengan penuaan (Pathath 2017).

2. *Programmed Theories*

Kelompok teori kedua menghubungkan penuaan fisik terutama dengan pemrograman genetik. Menurut teori penuaan yang diprogram

ini, setiap organisme hidup mengandung sejenis jam biologis bawaan yang mengatur proses penuaan. Temuan terbaru menunjukkan bahwa itu mungkin melibatkan, setidaknya sebagian, strip DNA yang menutupi ujung teleomer kromosom kita (Gladwell, 1996).

3. *The Neuroendocrine Theory*

Teori neuroendokrin. Teori ini mengusulkan itu penuaan disebabkan oleh perubahan fungsi saraf dan endokrin yang penting untuk 1) mengoordinasikan komunikasi dan daya tanggap semua sistem tubuh dengan lingkungan luar; 2) pemrograman fisiologis tanggapan terhadap rangsangan lingkungan; dan 3) mempertahankan keadaan fungsional yang optimal untuk reproduksi dan kelangsungan hidup sambil menanggapi tuntutan lingkungan (Weinert and Timiras 2003).

4. *The Membrane Theory of Aging*

The Membrane Theory of Aging pertama kali dijelaskan oleh Profesor ImreZs-Nagy dari Universitas Debrecen, Hongaria. Menurut teori ini, perubahan terkait usia dari kemampuan sel untuk mentransfer bahan kimia, panas, dan proses listrik yang merusaknya. Seiring bertambahnya usia, lipid pada membran sel menjadi lebih sedikit (kurang berair dan lebih padat). Hal ini menghalangi efisiensinya untuk menjalankan fungsi normal dan khususnya ada akumulasi racun (Pathath 2017).

5. The Hayflick Limit Theory

The Hayflick Limit Theory of Aging (disebut demikian karena menurut penemunya Dr. Leonard Hayflick) Bersama dengan Dr. Moorehead pada tahun 1961, Dr. Hayflick berteori bahwa kemampuan sel manusia untuk membelah dibatasi sekitar 50 kali, setelah itu mereka berhenti membelah dan karenanya mati (López-Otín et al. 2013).

6. The Mitochondrial Decline Theory

Perubahan mitokondria terkait usia dikaitkan dengan penurunan fungsi mitokondria. Dengan usia lanjut, Volume DNA mitokondria, integritas dan fungsionalitas menurun karena akumulasi mutasi dan kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh Reaktif Oksigen Spesies (ROS). Pada subjek lanjut usia, mitokondria ditandai dengan gangguan fungsi seperti penurunan kapasitas oksidatif, mengurangi fosforilasi oksidatif, penurunan produksi ATP, peningkatan produksi ROS yang signifikan, dan penurunan pertahanan antioksidan (Chistiakov et al. 2014)..

7. The Cross-Linking Theory

The Cross-Linking Theory pada Penuaan juga disebut sebagai Teori Glikosilasi Penuaan. Menurut teori hubungan silang penuaan yang dikemukakan oleh Johan Björkstein pada tahun 1942, penuaan hasil dari akumulasi ikatan kovalen intra dan antarmolekul antar molekul, disebut "ikatan silang." Seiring waktu, hubungan silang ini menghasilkan perubahan sifat kimia dan biologis sel. Meskipun perubahan ini terjadi pada tingkat sel individu, perubahan sel ini dapat

menyebabkan disfungsi sistem tubuh yang signifikan (Bjorksten 1968).

2.2. Penurunan Fungsi Ginjal Pada Penuaan

2.2.1 Definisi

Penurunan fungsi ginjal, biasanya dimulai setelah usia 30 tahun proses ini terjadi karena hilangnya nefron dari global glomerulosklerosis sebagai akibat dari degenerasi viseral podosit glomerulus dan perbaikan yang tidak adekuat (Glassock and Rule 2016). Terdapat bukti bahwa stres oksidatif dan peradangan pada tingkat sel dapat menyebabkan perubahan sel normal ini dan jika berlebihan dapat menyebabkan penyakit ginjal kronis (Cefalu 2011).

Penuaan ginjal adalah proses multifaktorial dimana jenis kelamin, ras dan latar belakang genetik dan beberapa mediator kunci seperti peradangan kronis, stres oksidatif, sistem renin-angiotensin-aldosterone (RAAS), penurunan kapasitas perbaikan ginjal dan latar belakang penyakit kardiovaskular memainkan peran penting (Bolignano et al. 2014).

Pada penuaan normal, sistem ginjal dikaitkan dengan perubahan struktural dan fisiologis. Perubahan sel dengan penuaan normal termasuk berkurangnya cadangan proliferasi, peningkatan kecenderungan apoptosis, perubahan dalam profil faktor pertumbuhan, dan perubahan dalam progenitor potensial dan fungsi sel kekebalan (Cefalu 2011).

2.2.2 Mekanisme Biologi Molekular

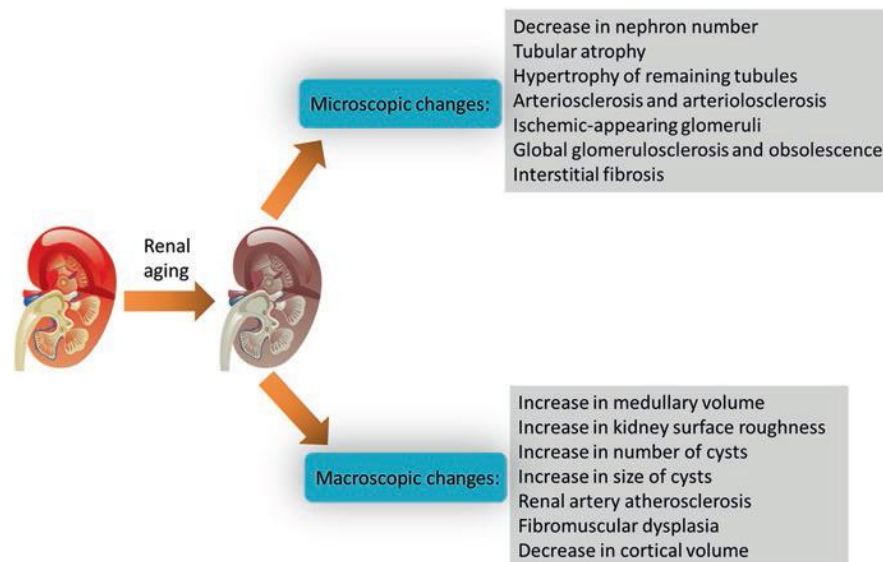
Akumulasi stres oksidatif yang diinduksi radikal bebas dan kerusakan pada tingkat sel adalah penyebab utama penuaan dan penentu utama umur.

Teori yang disederhanakan ini telah menjadi salah satu penjelasan paling populer tentang penuaan. Baru-baru ini telah ada peningkatan dalam teori penuaan mitokondria, termasuk stres oksidatif mitokondria, kerusakan mitokondria dan pengaruhnya selanjutnya pada penuaan dan kesehatan. Terlepas dari mekanisme molekuler penuaan yang tepat, penurunan pada tingkat sel secara universal menyebabkan kerusakan secara bertahap dari banyak jaringan dan organ yang berbeda termasuk ginjal (Denic, Glassock, and Rule 2016).

Perubahan molekuler, termasuk Klotho dan Sirtuins, adalah penyebab dasar fenotipe perubahan. Sel senesens dan sel autofagi memainkan peran mendasar dalam proses penuaan ginjal. Intervensi efektif penuaan ginjal bisa bermakna bagi kesehatan keadaan seluruh tubuh (Li and Wang 2018)

2.2.3 Perubahan struktural

Proses penuaan ginjal selalu disertai dengan perubahan struktural dan fungsional (Li and Wang 2018). Perubahan struktural ginjal bisa jadi diklasifikasikan menjadi dua cara. Pertama, pada tingkat mikroskopis, jumlah nefron menurun secara signifikan dan beberapa tubulus atrofi, sementara beberapa di antaranya hipertrofi. Arteriosklerosis dan interstitial fibrosis sering terjadi pada ginjal yang menua. Sklerosis dan keusangan muncul di glomerulus. Kedua, pada tingkat makroskopik, volume meduler, kekasaran permukaan ginjal, dan angka dan ukuran kista semuanya meningkat pada ginjal yang menua, sedangkan volume kortikal menurun. Selain itu, aterosklerosis aretri ginjal dan displasia fibromuskular adalah ciri khas ginjal yang menua (Li and Wang 2018).



Gambar 1. Perubahan Struktural Pada Penuaan Ginjal

2.2.4 Perubahan Fungsional

Perubahan struktural pada penuaan ginjal disertai dengan perubahan fisiologis fungsi ginjal, seperti penurunan kemampuan autoregulasi aliran darah ginjal, berkurang kapasitas untuk mempertahankan homeostasis air dan elektrolit, dan meningkatnya kepekaan terhadap perubahan aliran darah ginjal (Baldea 2015). Penurunan Laju Filtrasi Glomerulus (LFG), Penurunan LFG diperkirakan dengan klirens kreatinin urin, turun sekitar 0,75 ml / menit per tahun (Denic, Glassock, and Rule 2016), atau sekitar 8–10 ml / menit / dekade setelah umur 30 tahun (Li and Wang 2018).

Perubahan permeabilitas dinding kapiler pada glomerulus, peningkatan kerentanan terhadap cedera podosit, apoptosis, perubahan pada tubulus reabsorpsi dan kapasitas sekretori, perubahan konsentrasi urin dan produksi hormon turunan ginjal dan molekul bioaktif (Denic, Glassock, and Rule 2016).

2.3. Trehalosa

2.3.1. Definisi Trehalosa

Trehalosa adalah non-reduksi disakarida yang terdiri dari dua molekul glukosa yang dihubungkan oleh ikatan α , α -1,1-glukosidik; ditemukan pada tumbuhan, serangga, mikroorganisme, dan invertebrata, tetapi tidak pada mamalia. (Chou et al. 2019). Trehalosa adalah disakarida yang dimanfaatkan oleh berbagai macam industri, komersial dan biomedis (Zhang and Debosch 2019).

Trehalosa memiliki sifat fisik yang stabil dan dapat melindungi integritas sel terhadap berbagai cedera, seperti dingin, panas, dehidrasi, oksidasi, dan hipoksia, dengan mengurangi denaturasi protein melalui interaksi protein-trehalosa. (Chou et al. 2019)

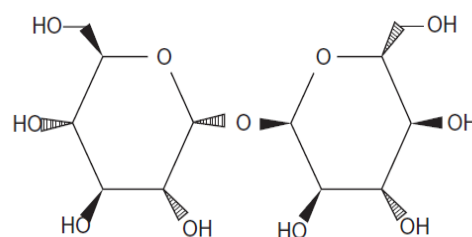


Figure 1 Structure of trehalose. Registry number: 99-20-7; Molar mass: 342.296 g/mol (anhydrous); 378.33 g/mol (dihydrate); molecular structure: α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside (α,α -trehalose).

Gambar 2. Struktur Kimia Trehalosa

2.3.2. Sejarah Trehalosa

Trehalosa pertama kali ditemukan pada tahun 1832 dalam studi tentang *ergot rye* dan pertama kali diisolasi pada tahun 1858 dari kepompong kumbang parasit *Trehala manna*, dan diberi nama trehalosa (Chiu, Kelly, and Walz 2011)

Pada tahun 1974, trehalosa berfungsi sebagai sumber glukosa untuk energi dan / atau untuk sintesis komponen seluler. Sejak itu, pengetahuan tentang berbagai fungsi sederhana disakarida ini telah berkembang pesat dan lebih dari sekadar senyawa penyimpanan (Elbein et al. 2003).

2.3.3. Fungsi Trehalosa

Trehalosa telah banyak digunakan dalam pengawetan makanan, dan juga telah digunakan untuk mengobati penyakit medis karena kemampuannya untuk meningkatkan autofagi (Chou et al. 2019). Autofagi adalah proses degradasi diri di mana sel menghilangkan protein yang salah lipatan, organel yang rusak, tetesan lipid, dan DNA yang rusak untuk mempertahankan homeostasis seluler (Zhu et al. 2020). Bukti terbaru menunjukkan bahwa penekanan autofagi dapat berkontribusi pada patogenesis penyakit ginjal polikistik dominan autosomal, sedangkan peningkatan kimiawi autofagi mungkin memiliki manfaat terapeutik. Sebuah studi menunjukkan bahwa aktivasi autofagi melalui berbagai penginduksi autofagi dapat mengurangi sistogenesis pada model penyakit ginjal polikistik ikan zebra, menunjukkan bahwa aktivasi autofagi mungkin merupakan strategi pengobatan baru untuk penyakit ginjal polikistik dominan autosomal (Chou et al. 2019).

Trehalosa memiliki kemampuan untuk melindungi membran sel dan protein labil terhadap kerusakan dan denaturasi akibat pengeringan dan stres oksidatif (Luyckx and Baudouin 2011). Pada orang dewasa paruh baya dan orang tua yang sehat, suplementasi trehalosa oral (100 g / hari) meningkatkan fungsi mikrovaskuler dengan meningkatkan oksida nitrat endotel. Efek perlindungan trehalosa sebagian besar telah ditunjukkan pada gangguan

neurodegeneratif, termasuk penyakit Alzheimer, penyakit Parkinson, dan penyakit Huntington (Chou et al. 2019).

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa trehalosa juga dapat mencegah kerusakan pada mata mamalia yang disebabkan oleh pengeringan dan kerusakan oksidatif. Sifat unik trehalosa ini telah mendorong penelitiannya sebagai komponen dalam pengobatan sindrom mata kering (Luyckx and Baudouin 2011). Trehalosa disintesis sebagai faktor responsif stres saat sel berada terkena tekanan lingkungan seperti panas, dingin, oksidasi, pengeringan, dan lain sebagainya. Ketika organisme uniseluler terpapar stres, mereka beradaptasi dengan mensintesis sejumlah besar trehalosa, yang membantu mereka dalam mempertahankan integritas seluler (Jain and Roy 2009).

Dalam beberapa tahun terakhir, trehalosa juga terbukti bermanfaat di kriopreservasi sperma dan sel induk serta dalam pengembangan organ yang sangat andal sebagai solusi pengawetan.(Jain and Roy 2009).

Trehalosa juga memiliki aktivitas antioksidan dan dapat meangkal radikal bebas (Oku et al., 2005). Perlu dicatat bahwa kerusakan oksidatif adalah salah satu pendorong potensial kematian sel pada berbagai penyakit manusia seperti gangguan yang terkait dengan penuaan dan penyakit neurodegeneratif (Gandhi & Abramov, 2012). Trehalosa memberikan efek stabilisasi pada struktur dan fungsi membran (Elbein, Pan, Pastuszak, & Carroll, 2003).

2.4. Cystatin C

2.4.1. Defenisi Cystatin-C

Cystatin-C adalah sistein protease yang diproduksi oleh hampir semua sel tubuh manusia, karena berat molekul yang rendah dan *isoelektrikpoint* positif, Cystatin-C mudah difiltrasi oleh glomeruli ginjal dan dapat digunakan sebagai pemeriksaan LFG (Onopiuk, Tokarzewicz, and Gorodkiewicz 2015).

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa Cystatin-C mungkin lebih sensitif dalam mengidentifikasi pengurangan ringan pada gangguan fungsi ginjal yang ringan, dibandingkan kreatinin serum. Cystatin-C diproduksi secara stabil, dan tidak terpengaruh oleh proses inflamasi, jenis kelamin, usia, diet, dan status gizi (Woo et al. 2014). Cystatin-C terbukti menjadi penanda yang unggul untuk deteksi dini gangguan ginjal (Filler et al. 2005).

Jika fungsi ginjal dan laju filtrasi glomerulus menurun, kadar cystatin C dalam darah meningkat. Tingkat serum cystatin C adalah tes fungsi ginjal yang lebih tepat (seperti yang ditunjukkan oleh GFR) dibandingkan kreatinin serum level (Di Somma and Marino 2019)

2.4.2. Sejarah Cystatin C

Cystatin-C ditemukan pertama kali pada tahun 1961 oleh Jorgen Clausen dalam cairan serebrospinal manusia dinamakan γ *trace* (γ -CSF/cerebrospinal fluid), Butler dan Flynn pada tahun yang sama menemukannya pada urin. Tahun 1981 Barrett memperkenalkan penamaan cystatin yang termasuk kedalam kelompok *inhibitor protease sistein*. Cystatin-C secara formal diidentifikasi tahun 1984 (Grubb 2011).

Cystatin-C diduga sebagai penanda baru LFG pada tahun 1979, ketika didapatkan kadar plasma cystatin-C meningkat 13 kali lebih tinggi pada pasien hemodialisis dibandingkan orang sehat. Cystatin-C dilaporkan pertama kali sebagai penanda LFG pada tahun 1985 oleh Simonsen *et al.*, yang mendapatkan bahwa kadar Cystatin-C serum berkorelasi negatif kuat dengan LFG (Grubb 2011).

2.4.3. Fungsi Fisiologis Cystatin-C

Cystatin-C termasuk dalam kelompok protein yang memiliki struktur karakteristik tersier dan kapasitas untuk mengikat situs aktif sistein dengan erat tetapi secara reversible protease (katepsin) dan dengan demikian menghambat aktivitas mereka. Ini merupakan kompetitif inhibitor sangat penting untuk mengendalikan aktivitas protease dalam sistem kekebalan modulasi, antivirus, dan aktivitas antibakteri dan berpartisipasi dalam respon tubuh terhadap cedera otak. Ketidakseimbangan fisiologis Cystatin dan protease aktivitas mungkin menjadi dasar dari banyak kondisi patologis (Onopiuk, Tokarzewicz, and Gorodkiewicz 2015).

Cystatin-C saat ini sedang dikembangkan sebagai pengganti serum kreatinin untuk memprediksi laju filtrasi glomerulus. Setelah difiltrasi, cystatin-C direabsorpsi seluruhnya dan dikatabolisme oleh sel epitel tubulus. Oleh karena itu, ditemukan cystatin-C didalam urin dapat digunakan sebagai penanda kerusakan dari sel epitel tubulus proksimal ginjal. Pembentukan cystatin-C tidak terlalu bervariasi antara satu individu ke individu lainnya bila dibandingkan dengan kreatinin. Laju produksi cystatin-C tidak dipengaruhi oleh faktor massa otot, jenis kelamin dan juga ras (Lydia A. 1015).

2.4.4. Struktur Cystatin-C

Cystatin-C adalah suatu asam amino dengan 13,36 kDa, dengan umus molekul $C_{22}H_{40}N_8O_5$, Cystatin-C adalah molekul biokimia yang berbeda dengan spesifisitas yang bervariasi, Cystatin-C dicirikan oleh domain cystatin umum yang terdiri dari sekitar 100 residu asam amino dan adanya disulfida yang menstabilkan obligasi. Variasi dalam cystatins didistribusikan ke dalam tiga keluarga: stefins, cystatins kompeten, dan kininogen. Cystatin C (cysC), juga disebut cystatin 3, disintesis secara terus menerus oleh sel berinti. Cystatin-C distribusi di seluruh jaringan manusia juga cairan tubuh. Ini terdiri dari 120 residu asam amino dan memiliki dua disulfide bligasi. Titik isoelektrik fisiologis (Iso) Cystatin- C adalah pH 9,3. Dengan demikian, ia memiliki jarring muatan positif dalam cairan tubuh (Onopiuk, Tokarzewicz, and Gorodkiewicz 2015).

2.4.5. Metabolisme dan Ekskresi Cystatin-C

Cystatin-C disintesis oleh semua sel berinti. Cystatin-C dengan bebas disaring di glomerulus karena ukurannya yang kecil dan pH basa. Setelah filtrasi sekitar 99% cystatin-C yang disaring diserap kembali dan dikatabolisme oleh sel tubular proksimal. Ada beberapa bukti adanya sekresi tubular juga eliminasi ekstrarenal, yang diperkirakan mencapai 15% hingga 21% klirens ginjal (Inker and Levey 2013).

Karena cystatin-C tidak diekskresikan dalam urin, maka sulit untuk mempelajari pembentukan dan penanganan ginjalnya. Jadi, memahami determinan cystatin-C selain GFR bergantung pada asosiasi epidemiologi.

Dalam dua studi, faktor yang menyebabkan tingkat cystatin-C lebih tinggi setelah penyesuaian klirens kreatinin atau pengukuran GFR pada usia yang lebih tua, jenis kelamin laki-laki, massa lemak, ras kulit putih, diabetes, protein C-reaktif yang lebih tinggi dan jumlah sel darah putih, dan serum albumin yang lebih rendah. Penelitian lain menunjukkan bahwa peradangan, adipositas, penyakit tiroid, keganasan tertentu, merokok, dan penggunaan glukokortikoid dapat meningkatkan kadar cystatin C (Inker and Levey 2013).

2.4.6. Pemeriksaan Laboratorium Cystatin-C

Pemeriksaan imunologi pertama untuk mengukur cystatin-C ditemukan oleh Loberg dan Grubb pada tahun 1979 dengan metode *enzyme-amplified single radial immunodiffusion*. Metode lainnya untuk mendeteksi Cystatin-C adalah radioimmunoassay, *enzyme immunoassay* (EIA), atau *enzymelinked immunosorbent assay* (ELISA), EIA dikembangkan pada tahun 1993 (Onopiuk, Tokarzewicz, and Gorodkiewicz 2015). Nilai normal cystatin-C menurut NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) adalah 0,54-1,21 mg/L (Yaswir and Maiyesi 2012).

Baru-baru ini, immunoassay homogen otomatis yang menggunakan lateks atau partikel polistiren yang dilapisi Antibodi spesifik Cystatin- C dikembangkan, dan beberapa di antaranya disetujui oleh Food and Drug Administration untuk penggunaan klinis. Ada dua versi berbeda dari immunoassay lateks untuk Cystatin-C, yang didasarkan pada turbidimetri [*Particle-Enhanced Turbidimetric Immunoassay* (PETIA)] dan lainnya berdasarkan nefelometri [*Partikel-Enhanced Nephelometric Immunoassay* (PENIA)]. Tes ini umumnya lebih tepat daripada metode sebelumnya, dan

interval referensi tampak lebih konsisten daripada yang dilaporkan dari pengujian sebelumnya (Dhume et al. 2012).