

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Depresi merupakan gangguan suasana perasaan (*mood*) yang mempunyai gejala utama berupa sindrom depresi meliputi perasaan sedih berkepanjangan, cemas, kehilangan minat dan kegembiraan, dan kekurangan energi, sehingga timbul keadaan mudah lelah dan menurunnya aktivitas. Dengan jumlah penderita mencapai ±350 juta orang di seluruh dunia, depresi berdampak besar terhadap beban kesehatan global. Depresi tidak hanya menurunkan produktivitas kerja dan kualitas hidup penderitanya, tetapi juga, pada kasus yang parah, berpotensi menyebabkan kematian. Tercatat lebih dari 800 ribu jiwa hilang setiap tahunnya akibat bunuh diri, dengan depresi sebagai salah satu pemicunya (*World Health Organization* (WHO) 2015). Di Indonesia, jumlah persis penderita depresi belum pernah di data secara terperinci. Namun, berdasarkan Riset kesehatan dasar (Riskesda) 2018 yang dilakukan oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Balitbangkes) dengan teknik *Mini International Neuropsychiatric Interview* (MINI), diketahui penduduk Indonesia yang menderita depresi diperkirakan mencapai 6,1% dari total penduduk usia ≥15 tahun atau sekitar 14 juta orang. Sebanyak 91% dari penderita depresi tersebut belum mendapatkan bantuan medis maupun mengonsumsi antidepresan, salah satunya pasien depresi banyak mengalami resistensi antidepresan (Balitbankes, 2019).

Pada pasien depresi hipokampus berperan penting dalam fungsi kognitif dan regulasi *mood*, karena memiliki kepekaan yang tinggi terhadap reseptor glukokortikoid, sehingga lebih rentan terhadap kondisi stres kronis dan terlibat dalam berbagai kelainan mental dari pada bagian otak lainnya. Pengaruh yang ditimbulkan oleh glukokortikoid menyebabkan kondisi patologis pada *central nervous system* (CNS). Huerta et al., (2010) Neuroglia bertugas sebagai modulator neurosekretory neuron akan membantu mempertahankan fungsi neuron melalui proses neurogenesis. Gangguan neurogenesis pada pasien depresi melbert,et.al (2003) dengan pemberian antidepresan jangka panjang mampu meningkatkan jumlah sel terlabel BrdU di gyrus dentatus hipokampus yang menandai peningkatan neurogenesis di daerah tersebut.

Perubahan mikrobiota usus atau sering disebut dengan disbiosis. Selama disbiosis jalur ini akan mengalami perubahan permeabilitas *blood brain barrier* (BBB) dan peradangan saraf. Rutsch,et. al 2020 meyebutkan bahwa bakteri usus mempengaruhi fisiologis dan CNS. Sistem saraf dan saluran pencernaan berkomunikasi melalui jaringan jalur pensiyalan dua arah yang disebut dengan *gut brain axis* (GBA). Mikrobiota usus mampu menghasilkan sebagian neurotransmiter, mempengaruhi neurokimia dan perilaku melalui GBA. Banyaknya kasus masalah kejiwaan terkait depresi dengan gangguan pencernaan mendukung hubungan antara perubahan mikrobiota usus. Beberapa tahun terakhir telah ditemukan pengaruh perubahan komposisi bakteri usus pada pasien depresi dan yang sehat. Diet makanan seperti probiotik dan makanan yang mengandung mikrobiota dapat

mempengaruhi GBA secara signifikan. Melalui jalur GBA, probiotik dapat berperan dalam penatalaksanaan depresi.

Dangke merupakan salah satu produk olahan susu yang dibuat melalui proses koagulasi dengan menggunakan getah pepaya dan suhu pemanasan dapat digunakan sebagai probiotik. Dalam penelitian Irfan, M (2018) dangke mengandung bakteri asam laktat (BAL). *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* merupakan jenis bakteri BAL sangat mempengaruhi sumbu otak (Dinan et al., 2013; Zhou dan Foster, 2015), induksi probiotik mikrobiota dapat meningkatkan sistem imun dan fisiologis inang.

Berdasarkan permasalahan ini, peneliti tertarik melakukan telaah ilmiah dalam bentuk penelitian mengenai pemanfaatan dangke untuk mikrobiota usus dan histopatologi neuroglia hipokampus secara in-vivo mencit (*Mus Musculus*) yang diinduksi depresi dengan metode Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) yang digunakan oleh Berger, et al. (2010), Peng, et al. (2012), Nollet et al. (2013) dan Frisbee, et al. (2015).

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian dangke terhadap mikrobiota usus dan histopatologi neuroglia hipokampus pada mencit (*Mus Musculus*) depresi?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengevaluasi efek pemberian dangke terhadap mikrobiota usus dan neuroglia hipokampus pada mencit (*Mus Musculus*) model depresi.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis hasil behaviour test (*Sucrosa Preference Test* (SPT) *Forced Swim Test* (FST).
2. Menganalisis perbedaan mikrobiota usus pada mencit (*Mus Musculus*) yang sehat, model depresi, dan efek pemberian dangke.
3. Menganalisis perbaikan histopatologi neuroglia pada mencit (*Mus Musculus*) model depresi setelah pemberian dangke.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Praktis

1. Memberikan bukti ilmiah mengenai dangke dapat digunakan untuk pasien depresi.
2. Memberikan bukti ilmiah mengenai pengaruh terapi dangke terhadap mikrobiota usus dan histopatologi neuroglia hipokampus pada pasien yang mengalami depresi.

1.4.2 Manfaat Ilmiah

1. Memberikan Informasi kepada pemerintah bahwa pangan lokal dangke merupakan makanan yang memiliki dampak positif terhadap Kesehatan, dapat digunakan sebagai probiotik untuk pasien depresi.
2. Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat kesehatan yang dimiliki oleh dangke, sehingga diharapkan adanya peningkatan konsumsi dangke di kalangan masyarakat.

1.5 Landasan Teori

1.5.1 Depresi

Depresi didefinisikan sebagai gangguan mental dengan gejala kemurungan, anhedonia atau kehilangan minat terhadap kesenangan, penurunan energi, perasaan rendah diri, gangguan makan dan tidur, serta penurunan kemampuan berkonsentrasi, (Ardiyanti V, 2020).

Depresi merupakan gangguan mood yang menyebabkan perasaan sedih dan kehilangan minat yang terjadi secara terus-menerus. Hingga saat ini hal yang mendasari terjadinya depresi belum didefinisikan secara jelas, pada depresi ditunjukkan terjadi interaksi kompleks antara ketersediaan neurotransmitter dengan regulasi dan sensitivitas reseptor, (Atmaja, dkk 2022).

Depresi digambarkan sebagai keadaan yang ditandai dengan suasana hati yang rendah dan keengganan untuk beraktivitas, dianggap sebagai salah satu gangguan mental dan perilaku yang paling umum di seluruh dunia. yang terutama disebabkan oleh kombinasi berbagai faktor, termasuk riwayat keluarga, obat-obatan tertentu, penyalahgunaan zat, masalah kesehatan kronis, dan perubahan besar dalam hidup, Depresi diklasifikasikan sebagai gangguan mood umum yang menurut survei global terjadi pada lebih dari 264 juta orang tanpa memandang jenis kelamin atau usia. Depresi sering terjadi ketika orang mengalami kehidupan yang penuh tekanan atau perubahan yang menghancurkan. Memang penyakit jiwa yang sulit disembuhkan ini memiliki berbagai gejala efek negatif, antara lain perasaan sedih, kehilangan minat, kehilangan ingatan, dan mencela diri sendiri; itu juga memiliki efek buruk pada kehidupan normal pasien dan orang-orang di sekitar mereka (Fang Yuan Zhu,et.al 2021).

1.5.2 Neuroglia Hipokampus

Hubungan stres pada periode prenatal dengan sistem maternal dapat dijelaskan melalui mekanisme Hipotalamus Pituitary Adrenal Axis (HPA-Axis) (Atkinson and Waddell, 1995). Hipotalamus sebagai pusat kendali mekanisme hormon di dalam tubuh akan memproduksi hormon *corticotropin releasing factor* dan *adrenocorticotropic hormon* (ACTH) yang diangkut ke kelenjar adrenal untuk mensekresikan hormon adrenalin. Kelenjar adrenal selain mensekresikan hormon adrenalin juga meningkatkan sekresi glukokortikoid (kortisol), kemudian kortisol tersebut akan memulai

serangkaian efek metabolik melalui umpan balik negatif (Tollenaar et al., 2011). Hipokampus memiliki kepekaan yang tinggi terhadap reseptor glukokortikoid, hal ini menyebabkan hipokampus lebih rentan terhadap kondisi stres dari pada bagian otak lainnya (Rodriguez et.,al 2002). Pengaruh yang ditimbulkan oleh glukokortikoid menyebabkan kondisi patologis pada CNS. Barros et.al, 2006 Neuroglia yang bertugas sebagai modulator neurosekretory neuron akan membantu mempertahankan fungsi neuron melalui proses neurogenesis (Huerta et al., 2010).

Dalam penelitian Yustinari R L, et.al (2017) Neuroglia terlihat bertumpuk-tumpuk dengan persebaran yang rata pada seluruh area hitung (Gambar. 1B), sedangkan gambar 1A tampak berbentuk bulat padat tetapi jarak antar sel cukup renggang sehingga tingkat densitasnya menjadi rendah. Hal ini erat kaitannya dengan konsentrasi kortisol yaitu hormon yang bertanggung jawab untuk merespon kondisi stres yang tinggi dalam SSP, sehingga neurotransmitter akan mensekresikan glutamat, apabila glutamat dalam jumlah berlebih dapat menjadi *glutamate excitotoxicity*. Aktivasi glutamate-reseptor NMDA akan memobilisasi *calcium cytosolic* menuju neuron, karena kondisi stress maka konsentrasi *calcium cytosolic* juga meningkat. Aktivitas dari receptor-glutamat akan menstimulasi ion Ca^{2+} ke sitoplasma, sehingga jumlah ion Ca^{2+} berlebihan. Ketidakseimbangan jumlah *glutamate excitotoxicity* pada kondisi stres dapat memicu kematian sel, hal tersebut dapat menyebabkan penurunan jumlah sel (Lipton, 1999). Hasil pengamatan terhadap aktivitas antar neuroglia berdasarkan sistem skoring menunjukkan perbedaan nyata. Hal ini tampak neuroglia yang mengelilingi neuron menunjukkan tingkat aktivitas neuroglia tampak tinggi (Gambar 2B). Akan mempengaruhi aktivasi neuroglia terutama astrosit dan mikroglia stres yang berjalan dalam waktu lama menyebabkan kerusakan neuron yang mengaktifkan astrosit yang berperan penting dalam fungsi *synaptogenesis* melalui *glial transporter* dan kemudian mengubahnya menjadi glutamin melalui aktivitas enzim glutamin sintetase. Proses ini diharapkan mampu mencegah kerusakan pada neuron (Huerta, et. al 2010). Mikroglia akan diaktifkan ketika otak mengalami cedera. Mikroglia akan bermigrasi ke sel target dan menghasilkan *proinflammatory molecules* *neurtropic factor*, dan neurotransmitter untuk membentuk aktivitas synaptik dengan neuron lain, sehingga dapat di ketahui aktivitas antar neuroglia disebabkan oleh aktivitas astosit dan mikroglia yang mempertahankan kondisi normal neuron (Huerta, et. al 2010).

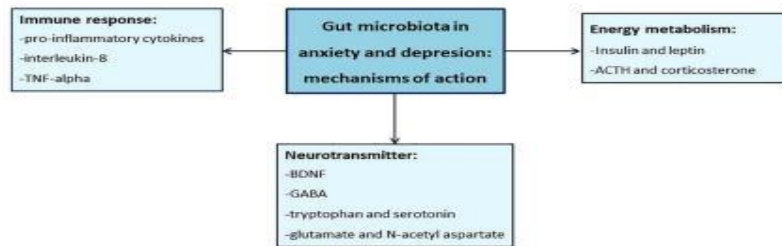
1.5.3 Mikrobiota Usus

Mikrobiota usus mamalia terdiri dari bakteri, virus, jamur, ragi, dan bakteriofag. Komunitas ini mulai berkembang sejak lahir dan berlanjut selama dua-tiga tahun, pada manusia, hingga mencapai komposisi yang stabil. Namun, itu terus dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan gaya hidup yang berbeda sepanjang hidup. Oleh karena itu, komposisi mikrobiota sangat berbeda bahkan di antara individu yang sehat. Dalam kondisi sehat,

mikrobiota mempengaruhi banyak proses fisiologis di dalam inang, seperti perlindungan terhadap patogen, pencernaan dan penyerapan nutrisi, perkembangan, dan pendidikan berbagai organ inang dan sistem kekebalan tubuh, (Rutsch, et.al 2020).

Mikrobiota manusia memiliki peran mendasar dalam fisiologi dan patologi inang. Perubahan mikroba usus, juga dikenal sebagai dysbiosis, adalah suatu kondisi yang tidak hanya terkait dengan gangguan gastrointestinal tetapi juga dengan penyakit yang mempengaruhi organ distal lainnya. Baru-baru ini menjadi jelas bahwa bakteri usus dapat mempengaruhi fisiologi dan peradangan sistem saraf pusat (SSP). Sistem saraf dan saluran pencernaan berkomunikasi melalui jaringan jalur pensinyalan dua arah yang disebut sumbu otak-gut, yang terdiri dari banyak koneksi, termasuk saraf vagus, sistem kekebalan, dan metabolit dan produk bakteri. Selama disbiosis, jalur ini mengalami disregulasi dan berhubungan dengan perubahan permeabilitas sawar darah-otak (BBB) dan peradangan saraf. Namun, banyak mekanisme di balik dampak mikrobiota usus dalam perkembangan saraf dan patogenesis masih kurang dipahami. Ada beberapa jalur kekebalan yang terlibat dalam homeostasis dan peradangan SSP. Di antara mereka, jalur inflamasi telah dikaitkan dengan kondisi peradangan saraf seperti multiple sclerosis, penyakit Alzheimer dan Parkinson, tetapi juga gangguan kecemasan dan depresi, (Rutsch, et.al 2020).

Peran patofisiologis mikrobiota usus, pengembangan terapi inovatif untuk gangguan ini dapat dihipotesiskan. Mikroba usus mampu menghasilkan sebagian besar neurotransmitter, memengaruhi neurokimia dan perilaku melalui yang disebut "sumbu usus-otak". Selain itu, tingginya prevalensi gejala kejiwaan terkait stres pada pasien dengan gangguan pencernaan mendukung hubungan antara perubahan mikrobiota usus dan gangguan kejiwaan (2010). Crosstalk fungsional antara mikroorganisme enterik, usus dan otak dapat terjadi melalui berbagai mekanisme, termasuk jalur metabolisme dan neuroimunologis. Terakhir, mengembangkan strategi farmasi atau nutraceutical untuk memodifikasi komposisi mikrobiota usus dapat menawarkan alat terapi baru dan personal untuk melawan kecemasan dan depresi, (Stephen Bibbò, et al 222).



Gambar1.1 Peran Mikrobiota Usus dalam perkembangan gangguan mood

Beberapa mekanisme patofisiologis yang mendasari perkembangan kecemasan dan depresi telah diusulkan, khususnya keseimbangan mekanisme imunologi, neurotransmitter dan hormonal, Sumber: Stephen Bibbò, et al 2022.

1.5.4 Dangka

Dangka adalah produk dari susu, digumpalkan (menjadi dadih) oleh getah pepaya (mengandung enzim papain), terbuat dari tempurung kelapa, dan dikemas dengan daun pisang. Nama dangka berasal dari "dank u wel", yaitu Bahasa Belanda artinya terima kasih banyak, menurut cerita setempat, penduduk asli mempersembahkan produk ini kepada Belanda pada kunjungan pertama mereka ke Sulawesi Selatan dan kemudian mengatakan "dank je", kependekan dari "dank u wel", yang sekarang disebut dangka. Batang, daun dan buah pepaya mengandung getah berwarna putih, di dalam getah pepaya terdapat lebih dari 50 asam amino diantaranya aspartat, treonin, asam glutamat, prolin, glisin, alanin, valin, isoleusin, leusin, tirosin, fenilalanin, histidin, lisin, arginin, tritofan, dan sistein. Selain itu, getahnya juga mengandung enzim pemecah protein atau enzim proteolitik yang disebut papain. enzim papain yang merupakan faktor koagulasi protein susu dalam pembuatan dangka daun pisang menjadi bahan yang potensial untuk membungkus makanan (Zakariah M, et.al 2021).

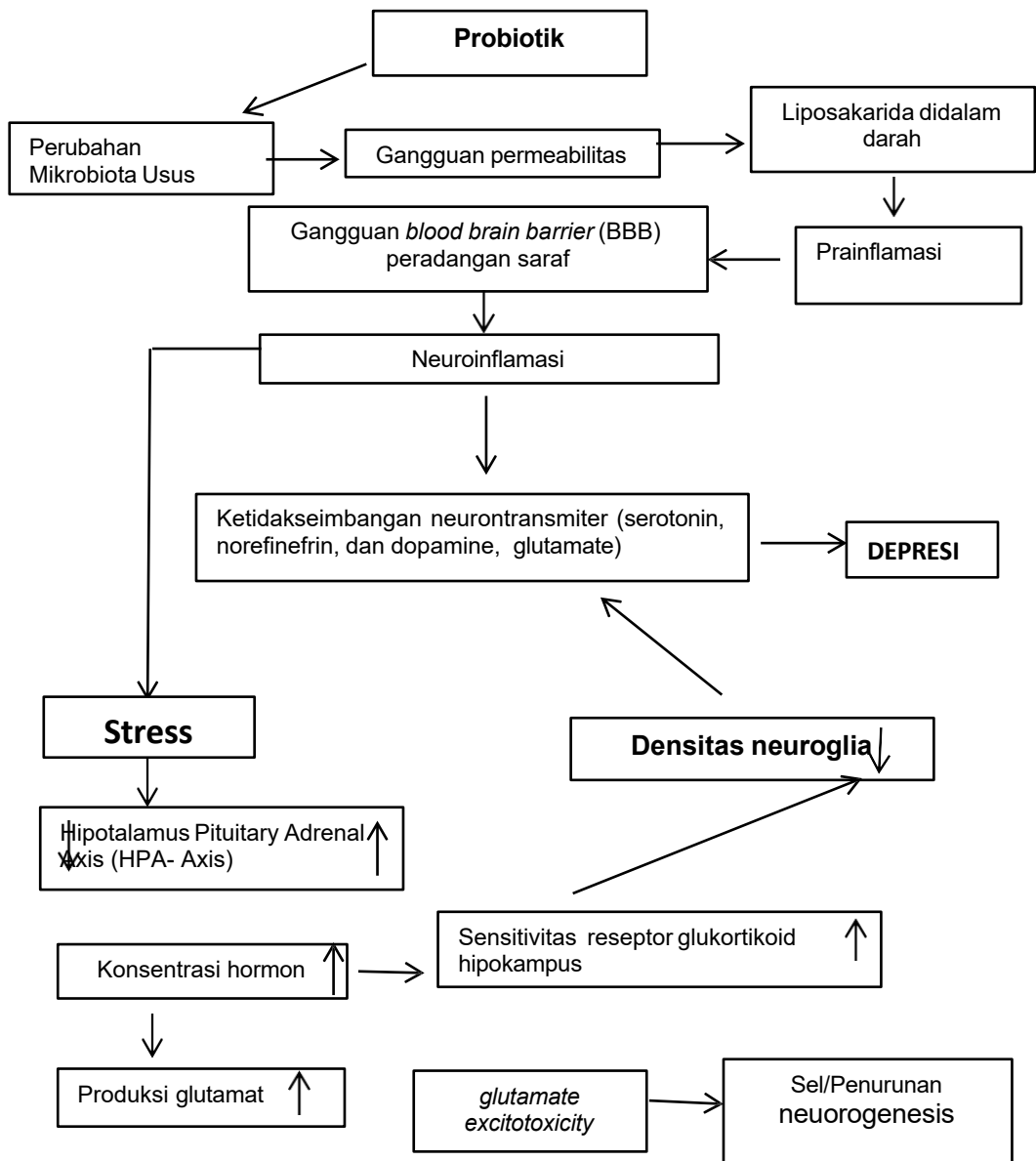
Dangka merupakan produk olahan susu dan makanan khas dari kabupaten Enrekang, Sulawesi Selatan. Dangka dikelompokkan ke dalam jenis keju lunak dari penggumpalan susu menggunakan enzim papain yang diperoleh dari getah buah pepaya (S. Sulmiyati & Said, 2018).

Dangka adalah produk semacam keju tanpa pemeraman, dan tidak dikoagulasi dengan rennet melainkan dengan papain (getah buah pepaya). Dangka yang diproduksi di Enrekang, Sulawesi Selatan umumnya dikonsumsi sebagai lauk pauk. Dangka asli berwarna putih dan bersifat elastis sedangkan dangka campuran (palsu) warnanya agak kuning kusam dan tidak elastis (Marzoeki, 1978). Dangka merupakan bahan pangan dengan nilai gizi yang tinggi. Dangka merupakan makanan khas tradisional masyarakat di Kabupaten Enrekang, sehingga karakteristik produk perlu dipertahankan. Karakteristik produk yang dimaksud bukan hanya pada komposisi produk dan daya simpan, produk, tetapi juga pada mikrostuktur produk, serta kualitas mikrobiologi produk harus diperhatikan.

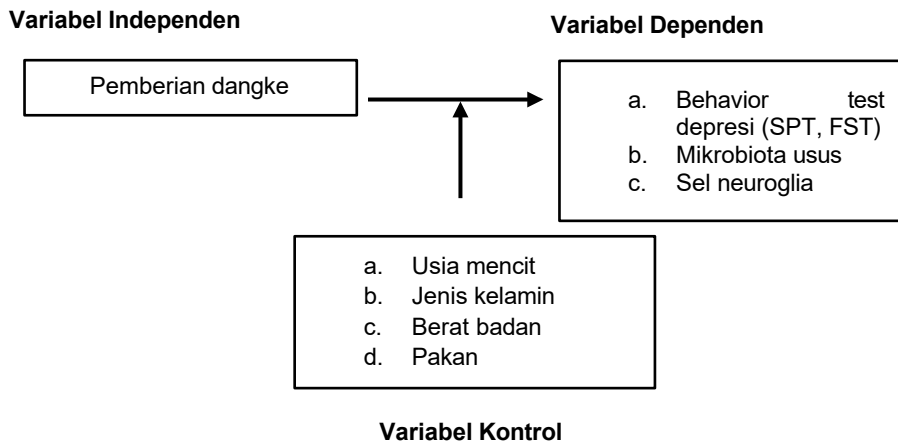
Perubahan-perubahan pada produk seperti pada kandungan mikrobiologis serta mikrostruktur akan menyebabkan kualitas dangke selalu berubah sehingga produk sulit untuk dijadikan dasar untuk pembuatan skala industri. Kondisi produk masyarakat yang masih bervariasi diakibatkan karena tidak berkembangnya inovasi teknologi pada proses pembuatan dangke, sehingga proses produksi masih dilakukan secara tradisional, (Irfan, M 2018).

Menurut Syaikal, komposisi dangke dengan kandungan air 45,75%, lemak 32,81%, protein 17,20% dan mineral 2,32%. Proses pengolahan susu sapi segar 1–1,5 iter bisa menghasilkan dangke 1–2 buah, dan sisa cairan (air dadik/whey) tersisa sekitar 88-85%. Proses pengolahan susu sapi menjadi Dangke menyisahkan sisa cairan yang disebut dadih (whey) yang masih mengandung air 82,4%, protein 7,06%, lemak 8,17% dan mineral. Air dadih (whey) ini masih belum dimanfaatkan oleh pengrajin Dangke di kelompok Tani Matawai.

1.6 Kerangka Teori



1.7 Kerangka Konsep



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

2.1.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2023 s.d. Desember 2023.

2.1.2 Lokasi Penelitian

1. Laboratorium farmakologi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar untuk persiapan, perlakuan induksi stressor, SPT, FST, pengambilan feses dan ekstraksi otak.
2. Laboratorium Hasanuddin University *Medical Research Centre (HUM-RC)* Makassar untuk identifikasi mikrobiota usus dengan RT-PCR.
3. Laboratorium terpadu Program Studi Kedokteran Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, untuk pemeriksaan hispatologi neuroglia hipokampus pada mencit model depresi.

2.2 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Dari rancangan tersebut didapatkan 5 kelompok perlakuan bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian dangke terhadap mikrobiota usus dan histopatologi neuroglia hipokampus pada mencit depresi.

2.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi pada penelitian ini dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang ditetapkan sebagai berikut:

2.3.1 Kriteria Inklusi

1. Berjenis kelamin Jantan
2. Berusia 3 bulan
3. Berat awal 27-30 gram
4. Selama perlakuan pemberian induksi stressor dan terapi dangke mencit dalam keadaan hidup hingga waktu terminasi (pemeriksaan mikrobiota usus dan analisis dan histopatologi).

2.3.2 Kriteria Eksklusi

1. Mencit yang sakit selama penelitian berlangsung
2. Mencit mati selama penelitian.

Penentuan sampel pada penelitian ini dilakukan dengan membagi ke dalam 5 kelompok perlakuan. Penentuan besar sampel dengan menggunakan rumus federer:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Dimana: t = banyaknya kelompok perlakuan = 5

n = jumlah subjek per kelompok perlakuan

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$(n-1) 4 \geq 15$$

$$(n-1) \geq 3.75$$

$$n \geq 4.75 = 5$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka dengan adanya 5 kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan kurang lebih 5 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 25 ekor hewan coba.

Tabel 2. 1 Kelompok eksperimen

Kelompok	Intervensi
KS (Kontrol Sehat)	Tanpa perlakuan
KD (Kontrol Depresi)	Induksi stressor
P1 (Perlakuan 1) +Induksi stressor	Dangke 1,8 g/ml
P2 (Perlakuan 2) +Induksi stressor	Dangke 2,8 g/ml
P3 (Perlakuan 3) + Induksi stressor	Dangke 3,8 g/ml

2.4 Alat dan Bahan Penelitian

2.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu botol semprot, gelas beaker, kain hitam untuk merekayasa kondisi gelap-terang, kandang mencit, kandang transit, kain pengering, lampu, meja, pengganjal untuk memiringkan kandang, pensil, stopwatch, telepon genggam.

2.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah dangke, mencit jantan, pakan, es batu, air ledeng, sukrosa.

2.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Pemeliharaan Hewan Coba

- 1) Sebelum memulai percobaan, mencit jantan diadaptasikan di dalam kandang selama 7 hari untuk menyeragamkan cara hidup dan makannya.
- 2) Setiap hari mencit jantan dipantau kesehatannya dengan mengganti pakan 3 kali dalam sepekan, kemudian ditimbang setiap 1 minggu.
- 3) Menjaga lingkungan mencit jantan agar tidak lembab, dibersihkan setiap hari dan diatur suhu ruangan berkisar 28 atau 30°C.
- 4) Diberi penyinaran yang cukup.

2.5.2 Induksi *Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS)*

Pada tahap ini mencit jantan diberikan beberapa rangkaian jenis stressor secara acak selama 5 minggu antara lain sebagai berikut.

Tabel 2. 2 Varian UCMS pada sampel mencit

Waktu	Stressor	Keterangan
08.00 - 09.30	Gangguan sirkadian	Selang seling/ gelap terang
07.00-16.00 (9 jam)	Gangguan sirkadian	Gelap
08.00-17.00 (9 jam)	Gangguan sirkadian	Terang
08.30-13.30	Bedding Basah	Penambahan 125 ml air pada bedding
12.00-14.00	Kandang kosong	Penempatan dalam kandang tanpa bedding
11.00-15.00	Kandang miring	Penempatan dalam kandang tanpa bedding
5 menit	Pemberian air dingin	Perendaman dengan air es

2.5.3 Behavior Test

1) *Sucrosa preference Test (SPT)*

Pada tahap ini mencit pertama-tama tidak berikan pakan dan air selama 24 jam. Hewan model yang telah diberikan perlakuan CUMS selanjutnya ditempatkan secara individual dalam kandang pengamatan, kemudian diberikan dua botol arutan sukrosa sebanyak 60 ml dihari pertama. Pada hari kedua (tahap pengujian) 1 botol sukrosa diganti 1 botol air ledeng dengan volume yang sama.

Rao I, 2021 Rasio preferensi sukrosa ditentukan dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Rasio preferensi sukrosa (\%)} = \frac{\text{Asupan sukrosa (ml)}}{\text{Asupan sukrosa (ml)} + \text{Asupan air ledeng (ml)}} \times 100\%$$

2) *Forced Swimming Test (FST)*

FST dilakukan sesuai metode yang dijelaskan oleh Castagné et al. (2009) dan Yankelevitch-Yahav et al. (2015). Peneliti memodifikas alat silinder Plexiglas menjadi plastic mika bening (tinggi 45 cm, diameter 25 cm) berisi air (24 ±1°C) setinggi 35 cm.

Pada hari pertama, mencit secara individual dipaksa untuk berenang selama 15 menit dalam plastic mika bening. Hari kedua mencit dipaksa untuk berenang kembali selama 5 menit. Sesi ini direkam dengan video untuk melihat immobility time menggunakan stopwatch. Mencit dianggap tidak bergerak jika mengambang atau melakukan sedikit gerakan untuk menjaga kepalanya tetap di atas air. (Rao I, 2021)

2.5.4 Pemberian sediaan Dangke

Dangke merupakan produk olahan susu khas Kab. Enrekang Sulawesi Selatan. Zaman dahulu masyarakat Enrekang tidak terbiasa mengonsumsi susu segar sehingga penduduk setempat membuat produk olahan, dangke sudah terkenal sejak tahun 1900-an.

Prinsip kerja pembuatan dangke oleh Laboratorium Peternakan Universitas Hasanuddin adalah berasal dari susu sapi segar yang dipasteurisasi kemudian diberi penambahan enzim papain yang berasal dari getah pepaya & garam yang berfungsi sebagai penggumpal (koagulan). Enzim *papain* memecah protein susu, khususnya kasein dalam susu sapi atau susu lainnya, menyebabkan susu menggumpal dan memisah antara dadih (curd) dan cairan (whey). Kemudian curdnya yang diambil untuk menjadi dangke namun harus melalui proses ripening lebih dahulu agar rasa pahit dari getah pepaya dapat berkurang.

a) Pemanasan

Susu segar yang telah disaring selanjutnya dipanaskan dengan menggunakan suhu pasteurisasi 50-60°C dengan pH 5-7.

b) Penambahan getah Pepaya

Penambahan enzim papain dari getah pepaya kemudian diencerkan dengan air yang sudah dimasak kemudian sebanyak setengah sendok teh ditambahkan pada susu yang mendidih.

c) Pemisahan curd dengan whey

Selanjutnya susu panas yang telah ditambahkan getah pepaya yang telah diencerkan pada tahap b) maka akan terbentuk curd. Curd merupakan koagulan dari kasein yang dipisahkan dari whey (cairan) dengan cara dituang dalam cetakan.

d) Pencetakan dan pengepresan

Pencetakan dapat disertai pengepresan dengan cara menekan-nekan koagulan /curd sehingga whey dapat keluar lebih banyak.

e) Pengemasan

Produk hasil cetakan sebaiknya dikemas sehingga terhidar dari pencemaran.

2.5.5 Penentuan Dosis

Dosis pemberian dangke merujuk pada sebanyak 100 gram per hari pada manusia setelah dikonversi untuk dosis mencit menjadi: $0,018 \times 100 \text{ g} = 1,8 \text{ gram/30b BB mencit}$ (Riyandani et.al.,2020; Samad et.al.,2018).

2.5.6 Pengambilan Feses pada Mencit

Hewan model mencit jantan setelah di berikan dangke secara individual ditempatkan masing-masing pada kandang pengamatan. Selanjutnya ditunggu selama 2 jam kemudian dilakukan pengambilan feses menggunakan pot sampel steril. Setelah pemberian dangke selama 28 hari di lakukan hal yang sama pada proses pengambilan feses kemudian disimpan di freezer -20°C

2.5.7 Identifikasi Mikrobiota Usus: *Lactobacillus Sp*

1. Instrument : RT-PCR Bio Rad
2. Metode : Amplifikasi DNA
3. Merk kit : SensiFAST™ SYBR^R No-ROX Kit
4. Rentang deteksi : Spesifik dan sensitif
5. Reaktivitas : Hewan
6. Alat dan bahan

a) Alat

Rak tub centrifuge 1,5 ml, Centrifuge, vortex, mikropipet, water bath RT-PCR.

b) Bahan

Feses fresh, tissue, ST1 Buffer, ST2 Buffer, ST3 Buffer, Wash Buffer, Elution buffer, Tube centrifuge 2 ml, tube collection 2 ml, tip 500, tip 1000, tip 100, tip 50, tip 10.

7. Komponen kit insert

2x SensiFAST™ SYBR^R No-ROX Kit, primer *lactobacillus* F: 5'-AGC AGT AGG GAA TCT TCC A-3' dan Primer *lactobacillus* R: 5'-CAC CGC TAC ACA TGG AG-3' dan H₂O.

8. Prosedur Kerja

a) Ekstraksi Feses Fresh

1) Sampel lisis

Dimasukkan feses fresh sebanyak 200 mg ke dalam tube beadbeating yang berisi manik-manik keramik, kemudian di tambahkan buffer ST1 800 µ, selanjutnya di vortex sebentar dan inkubasi pada suhu 70°C selama 5 menit. Kemudian pasang tube beadbeating secara horizontal. Vortex dengan kecepatan maksimum selama 10 menit pada suhu ruangan. Kemudian di sentrifugasi pada kecepatan 800 xg selama 2 menit. Di pindahkan supernatan ke dalam tabung sentrifugasi 1,5 ml yang baru.

2) PCR inhibitor Removal

Ditambahkan 150 µ buffer ST2 lalu di vortex 5 detik. Inkubasi pada suhu 4° C selama 5 menit. centrifuge 16,000 xg selama 3 menit di suhu ruangan untuk mengendapkan partikel yang tidak larut pada inhibitor PCR. Tempatkan inhibitor removal column (purple ring) dalam tube centrifuge 2 ml. pindahkan 500 µ supernatan pada inhibitor removal column. Centrifuge 16,000 xg selama 1 menit pada suhu tube centrifuge 2 ml untuk DNA binding.

3) DNA Binding

Ditambahkan 800 µ Buffer ST3 ke-dalam flow - troug kemudian di mix dan homogenkan dengan cepat selama 5 detik. Tempatkan di dalam GD column (green ring) ke dalam tube 2 ml. Sampel yang telah di homogenkan di Transfer sebanyak 700 µl ke column GD. Centrifuge pada 16.000 xg selama 1 menit pada suhu ruang kemudian buang alirannya.

b) Mix PCR

Siapkan campuran master PCR. Volume yang diberikan di bawah ini berdasarkan campuran reaksi akhir standar 20 µl antara lain sebagai berikut.

Reagents	Volume	Final concentration
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix	10 µl	1x
10 µM forward primer	0.8 µl	400 nm
10 µM reverse primer	0.8 µl	400 nm
Template	8.4 µl	
H ₂ O	-	
Total	20 µl L	

Adapun siklus pada tahap PCR antara lain sebagai berikut :

Cycles	Temp.	Time	Notes
1	45°C	10 min	Reverse transcription
1	95°C	2 m	Polymerase activation
40	95°C	5 s	Denaturation
	60°C	10 s	Annealing
	72°C	5 s	Extension

2.5.8 Histopatologi *Neuroglia* Hipokampus

Sebanyak 15 sampel yang digunakan pada penelitian ini, masing-masing 3 mencit perkelompok. Kemudian sebelum dibedah, mencit dieuthanasia dengan dislokasi leher. Dimana ekor mencit dipegang dan ditempatkan pada tempat yang bisa dijangkau, biarkan mencit merenggangkan badannya. Saat mencit merenggangkan badannya, pada tengkuk ditempatkan suatu penahan seperti pensil atau batang logam lainnya yang dipegang pada bagian kiri, lalu ekornya ditarik menggunakan tangan kanan dengan keras, sehingga lehernya akan terdislokasi dan mencit akan mati. Kemudian lakukan pembedahan pada tengkorak kepala mencit. Setelah otak mencit diambil, organ mencit yang lainnya diperbaiki dan hewan dibungkus dengan baik untuk selanjutnya dikuburkan di dalam tanah.

1. Fiksasi

Sampel otak yang telah dibedah selanjutnya ditempatkan dalam fiksatif, formalin buffer fosfat 10% (pH 7). Senyawa yang menempel harus pada otak yang terkalsifikasi untuk menjaga integritas arsitektur otak selama pembedahan.

2. Pembedahan

Pembedahan dengan ketebalan 5 hingga 20 μm , dipotong menggunakan mikrotom khusus yang dilengkapi dengan pisau bermata tungsten karbida atau dengan pisau. Bagian juga dapat diperoleh dengan memoles. Pisau-pisau ini harus diasah dengan sempurna untuk mendapatkan bagian-bagian yang berkualitas baik. Direkomendasikan untuk mendapatkan dua atau tiga set bagian di bagian tengah sampel, dengan jarak 200-300 μm untuk menghindari pengambilan sampel berulang pada satu permukaan.

3. Pewarnaan

Pewarnaan preparat histologi diawali dengan proses deparafinasi ke dalam larutan silol sebanyak 2x celupan selama 30 menit. Proses rehidrasi untuk menghilangkan silol dengan memasukkan preparat ke dalam larutan alkohol absolut selama 2 menit, kemudian dimasukkan lagi ke dalam larutan alkohol 95% hingga 70% selama 1 menit. Selesai rehidrasi, dilanjutkan pencucian preparat dengan air mengalir. Selanjutnya pewarnaan hematoxylin selama 8 menit. Tahap selanjutnya adalah pencucian lagi dengan air mengalir selama 2 menit. Proses pewarnaan eosin selama 2 menit, kemudian preparat dicuci dengan air mengalir. Setelah pewarnaan eosin selesai, preparat histologi didehidrasi ke dalam larutan alkohol 95% dan alkohol absolut sebanyak 2 kali selama 2 menit. Lalu perendaman preparat menggunakan silol sebanyak 2 kali selama 2 menit, kemudian preparat ditutup dengan kaca penutup menggunakan bahan perekat permount, dan diberi label.

4. Pengamatan Histopatologi *Neuroglia* Hipokampus pada mencit (*Mus-musculus*)

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop Olympus® CX-41 dengan perbesaran 400x yang dilengkapi dengan optilab mikroskop digital camera. Pengamatan dilakukan sebanyak lima lapangan pandang berbeda yang masing-masing memiliki luas area 10.000 μm^2 (100 μm kx 100 μm).

Jumlah sel glia nekrotik dihitung dengan menggunakan software image raster.

4.1 Analisis data

Analisis yang digunakan pada penelitian ini adalah uji One Way Anova untuk menentukan perbedaan di antara 5 kelompok, kemudian dilanjutkan dengan analisis Tukey HSD Post-hoc untuk mengidentifikasi secara spesifik pasangan kelompok mana yang memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan secara statistik.

2.7 Alur Penelitian

