

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Alzheimer merupakan penyakit yang mengganggu *neurodegenerative* progresif yang dimana menjadi salah satu penyebab utama demensia di dunia (Husodo, 2020). Pada tahun 2020 ada lebih dari 55 juta orang terkena demensia dan angka ini terus berlipat ganda tiap 20 tahun dan diperkirakan mencapai 78 juta di tahun 2030 dan 139 juta di tahun 2050 (ADI). Hal ini ditandai dengan penurunan daya ingat, kemampuan berbahasa, pemecahan masalah dan keterampilan kognitif lain yang dapat mempengaruhi seseorang dalam aktivitas keseharian. Penurunan ini diakibatkan karena sel (neuron) di bagian otak terlibat dalam fungsi kognitif telah rusak. Otak dengan penyakit Alzheimer yang sudah parah menunjukkan adanya peradangan, penyusutan yang signifikan akibat hilangnya sel, dan seriphan-serpihan yang tersebar luas dari neuron yang mati (Husodo, 2020). Alzheimer disebut sebagai penyakit multifaktoral, ada dua hipotesis utama yang diajukan sebagai penyebab Alzheimer yakni hipotesis kolinergik dan amyloid. Alzheimer ini menyerang *cerebral cortex* dan *Hippocampus* (Breijyeh dan Karaman, 2020). Alzheimer berpengaruh pada kerugian ekonomi yang dimana pada tahun 2020 total kerugian diperkirakan mencapai 305 miliar dollar Amerika. Instansi Kesehatan menanggung proporsi terbesar dari biaya yang dikeluarkan tiap tahun dan diperkirakan sekitar 206 miliar dollar Amerika (Wong, 2020).

Penelitian ini melibatkan hewan sebagai subjek percobaan. Oleh karena itu, diperlukan model hewan yang dapat merepresentasikan kondisi penyakit manusia secara serupa. Beberapa jenis penyakit tertentu dapat menyebabkan perubahan spesifik pada organ tertentu. Penyakit *neurodegenerative* sudah banyak menggunakan hewan coba dan ikut andil dalam memaparkan konsep biologis hingga prognosis (Pakaya dan Susilowati, 2020). Mencit merupakan hewan yang paling banyak digunakan sebagai hewan model laboratorium dengan kisaran penggunaan antara 40–80%. Mencit banyak digunakan sebagai hewan laboratorium (Suckow et al., 2001).

Aspek kesejahteraan hewan perlu diperhatikan, penelitian yang melibatkan hewan sebagai subjek harus memegang prinsip dari 3Rs' *replacement*, *reduction*, dan *refinement* (Grundy et al., 2015). *Replacement* merupakan upaya menghindari penggunaan hewan di dalam penelitian, *reduction* atau pengurangan merupakan strategi penggunaan hewan dalam jumlah yang minimal untuk menghasilkan data serua yang diharapkan dari penelitian, dan yang terakhir ada *refinement* yang merupakan upaya kodifikasi dalam manajemen pemeliharaan juga prosedur penelitian sehingga dapat meningkatkan kesejahteraan hewan ataupun mengurangi juga menghilangkan rasa sakit dan stress pada hewan yang menjadi subjek penelitian (Mutiarahmi et al., 2021). Disamping itu penggunaan hewan coba harus memperhatikan aspek perlakuan yang sesuai dengan prinsip *Five Freedom* yang terdiri dari bebas dari rasa lapar dan haus, bebas dari rasa tidak nyaman, bebas dari stress jangka Panjang, bebas dari rasa sakit atau trauma dan bebas

mengekspresikan tingkah laku alami (Yurista et al., 2016).

Ikan medaka (*Oryzias celebensis*) merupakan salah satu spesies ikan air tawar yang endemic di Sulawesi selatan. Ikan medaka ini seringkali digunakan sebagai jenis ikan biomonitoring karena mudah dijadikan untuk pemantauan limbah dan memiliki karakter biologis khusus seperti ukuran tubuhnya yang kecil, waktu regenerasi yang pendek, embrionya yang transparan dan informasi mengenai genomiknya telah tersedia cukup lengkap. Ikan dengan genus *Oryzias* pada saat ini menjadi ekonomis karena ikan ini banyak digunakan untuk mempelajari banyak penyakit manusia dan memiliki ukuran genom yang telah terpetakan (Damayani et al., 2022). Tingginya jumlah spesies ikan dipandang sebagai keuntungan dalam pemanfaatan ikan sebagai hewan percobaan (Cengizler, 2022). Penelitian telah mengungkapkan bahwa otak pada ikan zebra memang memiliki tingkat konservasi struktur dasar yang wajar jika dibandingkan dengan mamalia serta jalur neuroanatomi dan neurokimia serupa dengan jalur yang berperan dalam penyakit pada manusia, terutama pada Alzheimer (Newman, 2014). Oleh karena itu penelitian dengan topik Tinjauan Histomorfometri Pada Otak Ikan Medaka (*Oryzias celebensis*) Sebagai Hewan Model Penyakit Alzheimer pada ikan medaka perlu dilakukan, dalam studi awal mencari *baseline* morfologi otak normal untuk alternatif model screening obat penyakit Alzheimer.

1.2 Teori

1.2.1 Penyakit Alzheimer

Penyakit Alzheimer merupakan jenis demensia paling umum dan dapat didefinisikan sebagai penyakit *neurodegenerative* progresif yang menyerang *cerebral cortex* dan *hippocampus* pada otak. Alzheimer sendiri menyebabkan penderita mengalami gangguan aktivitas kehidupan sehari-hari, kehilangan memori progresif, gangguan bahasa dan keterampilan motorik (Breijyeh dan Karaman, 2020). Sebagian besar kasus Alzheimer terjadi setelah usia 60 tahun dan hampir 3% pada kasus termasuk pria dan Wanita terjadi pada usia 65-75 tahun (Arfina, 2021).

Pada tingkat makroskopik terjadi atrofi *hippocampus* dan *cortex cerebral*, dimana dapat diamati pembentukan *plaque* amyloid atau *plaque senilis* yang merupakan struktur dari *amorphous* Abeta dan akumulasi dari tau protein yang mengalami hiperfosforilasi dan menyiratkan pembentukan *neurofibrillary tangles* dan hilangnya neuron secara luas (Dos Santos., 2018). Terdapat dua jenis perubahan neuropatologis yang terlihat pada Alzheimer yaitu lesi positif (diakibatkan oleh akumulasi) dan lesi negatif (diakibatkan kehilangan) termasuk kekusutan neurofibrilar, *amyloid plaque*, dan kehilangan sinapstik. *Senile plaques* merupakan edapan ekstraseluler protein beta-amiloid (A β) dengan bermacam bentuk, mulai dari plak neuritik, difus, berinti padat, atau plak tipe klasik dan kompak. Enzim pembelahan yakni β -sekretase dan γ -sekretase akan bertanggung jawab atas endapan dari A β yang berasal dari *amyloid precursor protein* (APP). A β memainkan peran penting dalam nefrotoksisitas dan fungsi dari saraf, maka demikian akumulasi dari *plaque* yang lebih padat di *hippocampus*, *amygdala*, dan korteks serebral dapat menyebabkan stimulasi astrosit dan mikroglia (Breijyeh dan Karaman, 2020).

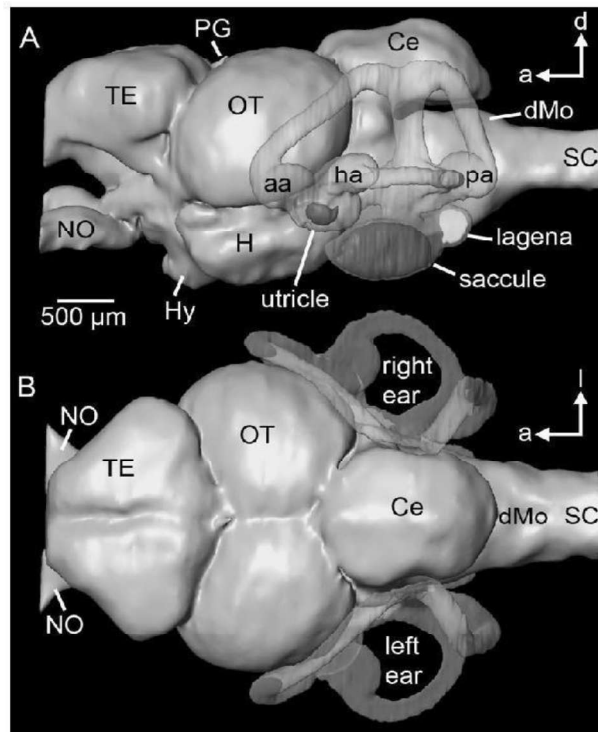
dan Shimada, 2010). Ikan Medaka telah dipilih sebagai model hewan alternatif untuk berbagai penyakit termasuk penyakit Alzheimer (Akmal et al., 2023).

1.2.3 Otak Ikan

Sistem saraf pusat (SSP) vertebrata termasuk ikan, terdiri atas otak dan sumsum tulang belakang. Dimana hal ini terhubung dengan reseptor dan organ aferen melalui saraf motorik dan sensorik (Kotrschal dan Kotrschal, 2020). Otak pada ikan berukuran kecil namun Sebagian mempunyai otak yang besar seperti ikan hiu. Ada beberapa bagian otak ikan dan yang paling depan adalah *Olfactory lobes* yang dimana bagian ini berfungsi untuk menerima dan memproses sinyal dari *nostril* melalui dua syaraf *olfactory* (Achyani, 2011). Pada umumnya terdapat empat lapisan yang dikenali dari superfisial hingga bagian dalam yakni lapisan saraf olfaktorius, lapisan glomerulus, lapisan sel mitral dan lapisan sel granular atau internal. Terdapat sejumlah sel ganglion besar yang tersebar meluas diantara dua berkas tersebut sering bersilangan sebelum mencapai bulbus olfaktorius sehingga serat-serat dari masing-masing berkas mencapai semua bagian bulbus. (Hara, 2011). bertemu satu sama lain dan *corpus cerebellum caudal* tanpa membentuk *Sulcus*. Pada ikan, *telencephalon* banyak terkait dengan *olfaction* dimana bersamaan membentuk otak bagian depan. Yang menghubungkan otak bagian depan dengan otak tengah adalah *Diencephalon* yang terletak dibawah *optic lobes*. *Diencephalon* mempunyai fungsi dimana dapat berasosiasi dengan hormon dan homeostasis. Berbentuk kerucut yang berada dibawah *diencephalon*. Struktur ini mendeteksi sinar dan mengelola *circadian rhythms* juga mengontrol kemampuan berenang dan penyeimbangan (Achyani, 2011). Terbagi menjadi epithalamus dorsal, thalamus, *hypothalamus* pada bagian ventral dan saccus dorsalis, atau tela choroidea yang dimana terletak pada dorsorostrali di *diencephalon*. Thalamus ditemukan di bagian tengah, dan terletak pada bagian bawah ventrikel ketiga antara hipotalamus dan tegmentum (Mokhtar, 2020). Diketahui bahwa talamus tersusun atas *thalamus proper*, habenula, dan pretalamus (Hussen dan Cao, 2018). *Mesencephalon* sangat besar sehingga dapat menggabungkan dua lobus optik yang terbentuk dari tegmentum ventral dan OT dorsal. TL (*Torus longitudinalis*) mengandung pusat yang berperan dalam integrasi antara indera penglihatan dan indera keseimbangan. Lebih jauh, konektivitas TL menunjukkan bahwa ia merupakan bagian dari jalur multisinaptik yang turun dari telensefalon ke batang otak. (Mokhtar, 2020). sehingga adalah ujung dari otak atau biasa disebut dengan batang otak yang mengontrol otot dan tubuh organ serta respirasi juga osmoregulasi (Achyani, 2011).

Metencephalon, khususnya, berperan dalam pengaturan gerakan berenang dan keseimbangan tubuh. CR merupakan struktur berlobus tunggal yang umumnya merupakan bagian terbesar dari otak. CR pada teleostean berkembang dengan baik dan terbagi menjadi tiga bagian utama yakni *valvula cerebelli*, *corpus cerebelli*, dan CR *vestibulo-lateral*, yang mencakup *eminentia granulares* serta lobus *caudal*. *Eminentia granulares* terdiri dari badan sel sel granular yang terletak di *cerebelum*, dengan akson yang memanjang ke arah *caudal* menuju krista *cerebelli*, membentuk lapisan molekuler di atas wilayah *oktavo lateralis*. (Mokhtar, 2020).

Myelencephalon terutama terdiri dari medula oblongata, sebagai batang otak, dan sepasang lobus vagal. Ada banyak penanda yang dapat digunakan untuk mendeteksi proliferasi sel seperti *bromodeoxyuridine* (BrdU), *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) dan beberapa lainnya (Hussen dan Cao, 2018).



Gambar 3. Otak Ikan Tampak Dorsal dan Lateral (Krischbaum dan Formicki, 2020)

Sebelumnya telah dilakukan penelitian serupa mengenai alzheimer dengan menggunakan ikan zebra sebagai hewan coba. Ikan zebra dikenal dengan kemampuannya yang dapat meregenerasi sel-sel saraf dan memiliki mekanisme yang serupa dengan manusia di dalam hal mengatur fungsi dari neurologisnya, sehingga menjadi model yang ideal dan bermanfaat. Otak ikan zebra dapat memperlihatkan gejala atau pertanda yang khas dimana menyerupai gangguan pada otak manusia, seperti agregasi protein amyloid-beta pada penyakit Alzheimer (Cahyani dan Rahayu, 2023).

Penelitian serupa mengenai Alzheimer yang dimana merupakan penyakit otak dan penyebab utama dari demensia. Penelitian ini menggunakan mencit sebagai hewan uji demensia. Dimana mencit ini akan diinjeksikan Diazepam dengan dosis tertentu sebagai penginduksi merusak otak sehingga dapat memperlambat kinerja dari memori hewan uji. Setelah dilihat histopatologi dari otak mencit yang diinjeksi Diazepam menunjukkan adanya sel neuron normal yang masih memiliki inti tetapi terlihat juga adanya nekrosis (kematian sel) otak yang ditandai dengan bentuk sel yang tidak beraturan, inti sel yang memadat dan tidak memiliki inti sel. Kerusakan sel dapat dilihat dengan tidak tampaknya inti sel dan hilangnya salah satu lengan

dendrit neuron atau pengerutan dari suatu sel. Hal ini dapat menghambat kerja dari *hippocampus* dan persinyalan system sinaps yang dimana dapat mengganggu kinerja otak dalam aktivitas sehari-hari (Amelia et al., 2020).

1.3 Tujuan dan Manfaat

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran histomorfologi otak ikan medaka (*Oryzias celebensis*) sebagai *baseline* pendekatan awal pengembangan hewan model penyakit Alzheimer. Hasil dari penelitian ini merupakan deskriptif kuantitatif yang dimana diharapkan dapat memberikan manfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan dengan menambah referensi dan pemahaman mengenai gambaran serta ukuran histomorfometrik otak ikan medaka (*Oryzias celebensis*). Selain itu, dapat melatih kemampuan peneliti dalam melakukan penelitian serta menjadi bahan rujukan bagi penelitian selanjutnya, dengan tetap memperhatikan kesejahteraan hewan melalui penerapan prinsip 3R (*replacement, reduction, dan refinement*) guna meminimalkan penggunaan hewan serta mengurangi rasa sakit dan stres selama penelitian.

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2024 – Maret 2025 di Laboratorium Patologi di Rumah Sakit Hewan Pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif - kuantitatif dengan memperlihatkan gambaran dan ukuran dari histomorfometrik otak ikan medaka (*Oryzias celebensis*) sebagai pendekatan awal hewan model penyakit Alzheimer pada manusia.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah akuarium, *casset*, cawan petri, cetakan *basemold*, *cover glass*, *object glass*, mikrotom, mikroskop stereo, mikroskop cahaya, pisau bedah, wadah anestesi. Adapun bahan yang digunakan adalah 2-*phenoxyethanol*, *aquades* Waterone™, alkohol bertingkat Onehealth, formalin Zuche Medical Co, larutan bouin's, parafin, pewarna cresyl violet Solarbio® dan hematoksin-eosin ScyTeK Laboratories inc, dan xylol Supleco®.

2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif - kuantitatif dengan memperlihatkan gambaran dan ukuran dari histomorfometrik otak ikan medaka (*Oryzias celebensis*) sebagai pendekatan awal hewan model penyakit Alzheimer.

2.4 Pelaksanaan Penelitian

2.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel ikan medaka (*Oryzias celebensis*) yang diambil, berasal dari Sungai Kampung Karst Rammang-Rammang, Maros, Sulawesi Selatan. Sebanyak 15 ekor ikan dengan ukuran $\pm 2-4$ cm dengan kondisi tubuh normal, proposional, warna tubuh cerah, sirip yang utuh, gerakan aktif dan responsif. Ikan medaka dikoleksi berdasarkan pedoman etik hewan coba dan telah memiliki persetujuan etik 032/UN4.1.RSHUH/B/PP36/2025 dari Komisi Etik Hewan dan Penelitian Rumah Sakit Hewan Universitas Hasanuddin. Akuarium yang dimana sudah dicuci bersih lalu diisi dengan air yang diaerasi sehari sebelum pengambilan. Dalam satu minggu sampel akan diaklimatisasi dengan tujuan untuk membuat sampel beradaptasi dengan lingkungan barunya sebelum dilakukannya pembuatan preparat histologi.



Gambar 4. Lokasi pengambilan sampel ikan medaka (*Oryzias celebensis*)

2.4.2 Preparasi Sampel

Sebelum memulai sampel penelitian akan di anastesi menggunakan anestesi dengan suhu yang dimana merupakan air bersuhu 7°C - 8°C dan penambahan 2-*phenoxyethanol* sehingga menunjukkan efek samping yang dimana ikan tersebut pingsan (Hermawan., 2014). Setelah itu, akan dilakukan nekropsi pada bagian kepala hingga otaknya terlihat dengan bantuan mikroskop stereo. Kemudian akan diamati dari segi morfologi, sebelum diamati dan dihitung dari segi histomorfometrik. Sampel ikan medaka (*Oryzias celebensis*) kemudian diawetkan dengan cara difiksasi menggunakan larutan fiksatif Bouin's selama 24 jam untuk mempertahankan jaringan pada sampel. Menurut Rusmiatik (2019), fiksasi dengan menggunakan larutan bouin dapat menyediakan tampilan dari sediaan jaringan dengan resolusi tinggi, dengan latar sediaan berwarna merah gelap yang kontras dengan bagian-bagian lain dari jaringan lainnya.

2.4.3 Pembuatan Preparat

Jaringan sampel yang sudah difiksasi kemudian dipotong menggunakan pisau bedah yang tajam dan juga steril. Potongan jaringan tersebut akan dimasukkan kedalam *tissue cassette* dan direndam dengan menggunakan akuades, setelah proses perendaman selesai, jaringan kemudian akan didehidrasi untuk menghilangkan sisa-sisa cairan fiksasi dengan cara menggunakan alkohol bertingkat dan juga dilakukan tahapan *clearing* yang dimana menggunakan *xytol*.

Blok jaringan akan dibuat dengan mencetak parafin cair pada cetakan basemold di suhu 70°C untuk membentuk blok parafin. Setelah blok parafin terbentuk, selanjutnya merupakan proses pemotongan blok jaringan dengan menggunakan mikrotom untuk menghasilkan irisan yang tipis. Irisan yang tipis ini akan diberikan pewarnaan dengan menggunakan hematoksilin-eosin (HE), yang akan memberikan warna pada inti sel, sitoplasma, dan jaringan-jaringan ikat yang ada. Menurut Pratiwi dan Manan (2015), jaringan yang sudah dibuat menjadi blok berfungsi untuk menjaga bentuk awal dari jaringan tersebut. Pewarnaan menggunakan hematoksilin-eosin (HE) berfungsi untuk mewarnai inti sel dengan warna biru (basofilik), sementara eosin, yang bertindak sebagai pewarna kontra, memberikan warna merah muda (asidofilik) pada sitoplasma sel dan jaringan ikat.

Selain itu, pewarnaan juga dilakukan dengan menggunakan pewarnaan *cresyl violet* yang pewarnaan ini digunakan untuk mewarnai selubung mielin dan juga sel saraf. Menurut Meystre et al. (2024), pewarnaan *cresyl violet* merupakan sebuah pewarna yang secara khusus menargetkan badan sel, termasuk retikulum endoplasma, juga dikenal sebagai zat Nissl atau badan Nissl.

Preparat yang telah disiapkan kemudian diamati menggunakan mikroskop. Mikroskop yang digunakan adalah mikroskop cahaya, dengan jaringan yang diamati berupa otak ikan medaka (*Oryzias celebensis*). Perbesaran yang digunakan adalah 10x dan 40x untuk memeriksa struktur histologi dari berbagai bagian otak yang akan dianalisis.

2.5 Analisis Data

Pengamatan hasil gambar sampel histomorfometrik akan dianalisis secara deksriptif - kuantitatif dengan mempresentasikan gambaran dan ukuran dari histomorfometri otak ikan medaka (*Oryzias celebensis*) seperti ketebalan dari otak dan sel-sel neuron seperti *astrocyte*, *oligodendrocyte*, *microglia*, *Pyramidal cell*. Pengamatan ini histomorfometrik dianalisis secara kuantitatif dengan melihat ukuran otak ikan medaka (*Oryzias celebensis*) dengan menggunakan software khusus yaitu *ImageJ*, dengan cara kalibrasi terlebih dahulu. Kalibrasi dilakukan menggunakan fitur *Set Scale* pada *ImageJ* dengan acuan skala pada gambar. Panjang skala yang diketahui dimasukkan sesuai ukuran sebenarnya sehingga hasil pengukuran ditampilkan dalam satuan mikrometer. Kemudian data yang didapat akan digunakan sebagai *baseline* histomorfometrik juga sebagai prasyarat awal pengembangan model.