



**ALPHA LIPOIC ACID MENINGKATKAN KADAR ASETILKOLIN
DAN MENURUNKAN KADAR NF κ B TIKUS YANG DIINDUKSI
DIABETES MELLITUS TIPE 2**

SKRIPSI

Oleh

**Ahmad Syaikudin
NIM 152010101031**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**ALPHA LIPOIC ACID MENINGKATKAN KADAR ASETILKOLIN
DAN MENURUNKAN KADAR NF κ B TIKUS YANG DIINDUKSI
DIABETES MELLITUS TIPE 2**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**Ahmad Syaikudin
NIM 152010101031**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas rahmat, hidayah, anugerah, dan kesempatan yang diberikan kepada saya;
2. Nabi Muhammad SAW sebagai junjungan dan tauladan;
3. Orang tua saya tercinta, Ayah Imam Syafii dan Ibu Tuminatun yang selalu memberikan bimbingan, perhatian, kasih sayang, dan doa setulus hati, serta pengorbanan yang tak ternilai;
4. Kakak saya Eni Dwi Lestari beserta Kakak Ipar saya Muhammad Umar yang selalu memberikan semangat dan dukungan penuh terhadap cita-cita saya, serta Adik saya Firna Nahwa Firdausi Hasanah yang saya sayangi;
5. Para guru saya yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadikan manusia yang berilmu dan bertakwa;
6. Keluarga besar angkatan 2015 Cocyx Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
7. Keluarga besar *Student Research Center Revolution* dan *Islamic Medical Student Association* Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
8. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTTO

Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu
dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.

(terjemahan Surat Al-Mujadalah ayat 11)*)



*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. Al-Qur'an dan Terjemahannya.
CV. Pustaka Agung Harapan

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ahmad Syaikudin

NIM : 152010101031

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “*Alpha Lipoic Acid* Meningkatkan Kadar Asetilkolin dan Menurunkan Kadar NF κ B Tikus yang Diinduksi Diabetes Mellitus Tipe2” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 4 Januari 2019

Yang menyatakan,

Ahmad Syaikudin
NIM 152010101031

SKRIPSI

***ALPHA LIPOIC ACID* MENINGKATKAN KADAR ASETILKOLIN
DAN MENURUNKAN KADAR NF κ B TIKUS YANG DIINDUKSI
DIABETES MELLITUS TIPE 2**

Oleh

Ahmad Syaikudin
NIM 152010101031

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Angga Mardro Raharjo, Sp.P.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul ”*Alpha Lipoic Acid* Meningkatkan Kadar Asetilkolin dan Menurunkan Kadar NF κ β Tikus yang Diinduksi Diabetes Mellitus Tipe2” karya Ahmad Syaikudin telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : 4 Januari 2019

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech.
NIP 198408192009122003

dr. Yuli Hermansyah, Sp.PD.
NIP 196607111996011001

Anggota II,

Anggota III,

dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D.
NIP 196909011999031003

dr. Angga Mardro Raharjo, Sp.P.
NIP 198003052008121002

Mengesahkan
Dekan,

dr. Supangat, M.Kes., Ph.D., Sp.BA
NIP 197002141999032001

RINGKASAN

Alpha Lipoic Acid Meningkatkan Kadar Asetilkolin dan Menurunkan Kadar NF κ B Tikus yang Diinduksi Diabetes Mellitus Tipe 2; Ahmad Syaikudin, 152010101031; 2018: 79 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Alpha lipoic acid (ALA) adalah asam lemak rantai pendek dengan molekul disulfida alami yang memiliki berbagai fungsi biologis. ALA mampu menurunkan kadar glukosa dalam darah pada diabetes mellitus tipe 2 (DMT2) dan pada pasien alzheimer pemberian ALA memperbaiki fungsi kognitif. Penelitian menunjukkan bahwa DMT2 meningkatkan risiko terjadinya alzheimer melalui berbagai mekanisme, diantaranya penurunan kadar asetilkolin dan peningkatan kadar *nuclear factor kappa beta*. ALA mampu menurunkan kadar NF κ B karena sifat antioksidan yang mengikat dan menghilangkan ROS. Selain itu ALA juga menghambat aktivasi NF κ B melalui penghambatan terhadap aktivasi IKK2, sehingga *I κ B* tetap berikatan dengan NF κ B, menyebabkan NF κ B tetap dalam kondisi tidak aktif. ALA memiliki efek positif dalam metabolisme glukosa sehingga jumlah Acetyl-CoA meningkat. Hal tersebut mengakibatkan peningkatan sintesis asetilkolin. ALA juga mampu mengaktifasi enzim ChAT sehingga bisa meningkatkan sintesis asetilkolin.

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) secara *in vivo* dengan rancangan *post test only control group design*. Sampel penelitian ini ialah tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*). Jumlah sampel penelitian sebanyak 28 ekor dibagi menjadi tujuh kelompok. Kelompok pertama merupakan kelompok normal tanpa perlakuan; kelompok kedua merupakan kontrol negatif dengan perlakuan induksi diabetes mellitus tipe 2 dan aquades; kelompok ketiga merupakan kontrol positif dengan perlakuan induksi diabetes mellitus tipe 2 dan terapi glimepirid 0,09 mg; dan kelompok A sampai D diberikan perlakuan induksi diabetes mellitus tipe 2 dan *alpha lipoic acid* dengan dosis berturut-turut 0,3375 mg; 1,35 mg; 5,4 mg; dan 21,6 mg.

Data kadar asetilkolin dan NF κ B didapat dengan menggunakan metode elisa sampel jaringan otak tikus. Hasil rata-rata kadar asetilkolin kontrol normal (kelompok tanpa perlakuan) sebesar $103 \pm 14,41$; kontrol negatif (kelompok yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2) sebesar $75,67 \pm 35,16$; dan kontrol positif (kelompok yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2 dan terapi glimepirid) sebesar $107,58 \pm 36,28$. Hasil rata-rata kadar asetilkolin kelompok perlakuan *alpha lipoic acid* dengan dosis 0,3375 mg sebesar $157,5 \pm 41,17$, dosis 1,35 mg sebesar $152,58 \pm 21,24$, dosis 5,4 mg sebesar $160,17 \pm 95,47$, dan dosis 21,6 mg sebesar $201,5 \pm 17,76$. Hasil rata-rata kadar NF κ B kontrol normal sebesar $95,56 \pm 10,57$; kontrol negatif sebesar $125,87 \pm 10,75$; dan kontrol positif sebesar $98,75 \pm 48,9$. Hasil rata-rata kadar NF κ B kelompok perlakuan *alpha lipoic acid* dengan dosis 0,3375 mg sebesar $108,87 \pm 48,52$; dosis 1,35 mg sebesar $108,56 \pm 10,87$; dosis 5,4 mg sebesar $78,81 \pm 33,72$; dan dosis 21,6 mg sebesar $122,31 \pm 20,36$.

Hasil uji normalitas dan homogenitas menggunakan *Saphiro-Wilk* dan *Levene's test* pada kadar asetilkolin menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen. Hasil uji *Saphiro-Wilk* pada kadar NF κ B menunjukkan data terdistribusi normal sedangkan hasil *Levene's test* data tidak homogen. Hasil rata-rata kadar asetilkolin dan NF κ B dianalisis dengan *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar kelompok dan didapatkan hasil yang signifikan pada kadar asetilkolin dengan nilai $p=0,013$ dan hasil yang tidak signifikan pada kadar NF κ B dengan nilai $p=0,392$. Uji lanjutan LSD digunakan pada kadar asetilkolin untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji LSD menunjukkan semua kelompok perlakuan *alpha lipoic acid* berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol negatif yang hanya diberi perlakuan aquades. Uji lanjutan *Tamhane's* digunakan pada hasil kadar NF κ B didapatkan hanya kelompok perlakuan *alpha lipoic acid* dengan dosis 5,4 mg yang memiliki perbedaan signifikan terhadap kelompok kontrol negatif yang hanya diberi perlakuan aquades.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul ”*Alpha Lipoic Acid* Meningkatkan Kadar Asetilkolin dan Menurunkan Kadar NFκβ Tikus yang Diinduksi Diabetes Mellitus Tipe 2”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Supangat, M.Kes., Ph.D., Sp.BA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan teladan yang memotivasi saya;
2. dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Angga Mardro Raharjo, Sp.P. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga dalam proses penyusunan skripsi ini;
3. dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech. selaku penguji I dan dr. Yuli Hermansyah, Sp.PD. selaku penguji II yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga dalam proses penyusunan skripsi ini;
4. dr. Ali Santoso, Sp.PD. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
5. Orang tua saya tercinta, Ayah Imam Syafii dan Ibu Tuminatun yang selalu memberikan bimbingan, perhatian, kasih sayang, dan do'a tiada henti, serta pengorbanan yang tak ternilai;
6. Kakak saya Eni Dwi Lestari dan Kakak Ipar saya Mohammad Umar yang selalu memberikan semangat dan dukungan penuh terhadap cita-cita saya serta Adik saya Firna Nahwa Firdausi Hasanah yang saya sayangi;
7. Sahabat-sahabat saya Achmad Dana Firmanjaya, Cahyo Bagaskoro, Muhmmad Rosyid Ridho, Rangga Okta Sadewa, Miftahul Huda, Achmad Noval Rilo Pambudi, Rudy Gunawan, Muhammad Yuda Nugraha, Arista Prima Nugrahani

dan Maghfiroh Arif yang telah memberikan dukungan dan motivasi dalam penyelesaian skripsi ini;

8. Keluarga Ashaabul Jannah yang saya cintai karena Allah SWT;
9. Analis Laboratorium Farmakologi dan Fisiologi Sumadi, Amd., Lilik Maslian, Amd. dan Analis Laboratorium Biokimia Nurul Istinaroh, Amd.;
10. Keluarga besar angkatan 2015 Coccyx Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
11. Keluarga besar *Student Research Center Revolution* dan *Islamic Medical Student Association* Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
12. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 4 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMBUNG	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Diabetes Mellitus Tipe 2	4
2.2 Alzheimer	8
2.3 Hubungan Diabetes Mellitus Tipe 2 dengan Alzheimer	10
2.4 Pengukuran Kadar Asetilkolin dan NFκβ pada Tikus	14
2.5 Alpha Lipoic Acid	15
2.6 Hubungan ALA terhadap Kadar NFκβ dan Asetilkolin	16
2.7 Kerangka Konsep Penelitian	18
2.8 Hipotesis	20
BAB 3. METODE PENELITIAN	21
3.1 Jenis Penelitian	21
3.2 Rancangan Penelitian	21
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	23
3.4 Populasi Penelitian	23
3.5 Sampel Penelitian	23
3.6 Variabel Penelitian	24
3.6.1 Variabel Bebas.....	24
3.6.2 Variabel Terikat.....	24
3.6.3 Variabel Luar.....	24
3.7 Definisi Operasional	24
3.7.1 Tikus Diabetes Mellitus Tipe 2 (DMT2).....	24

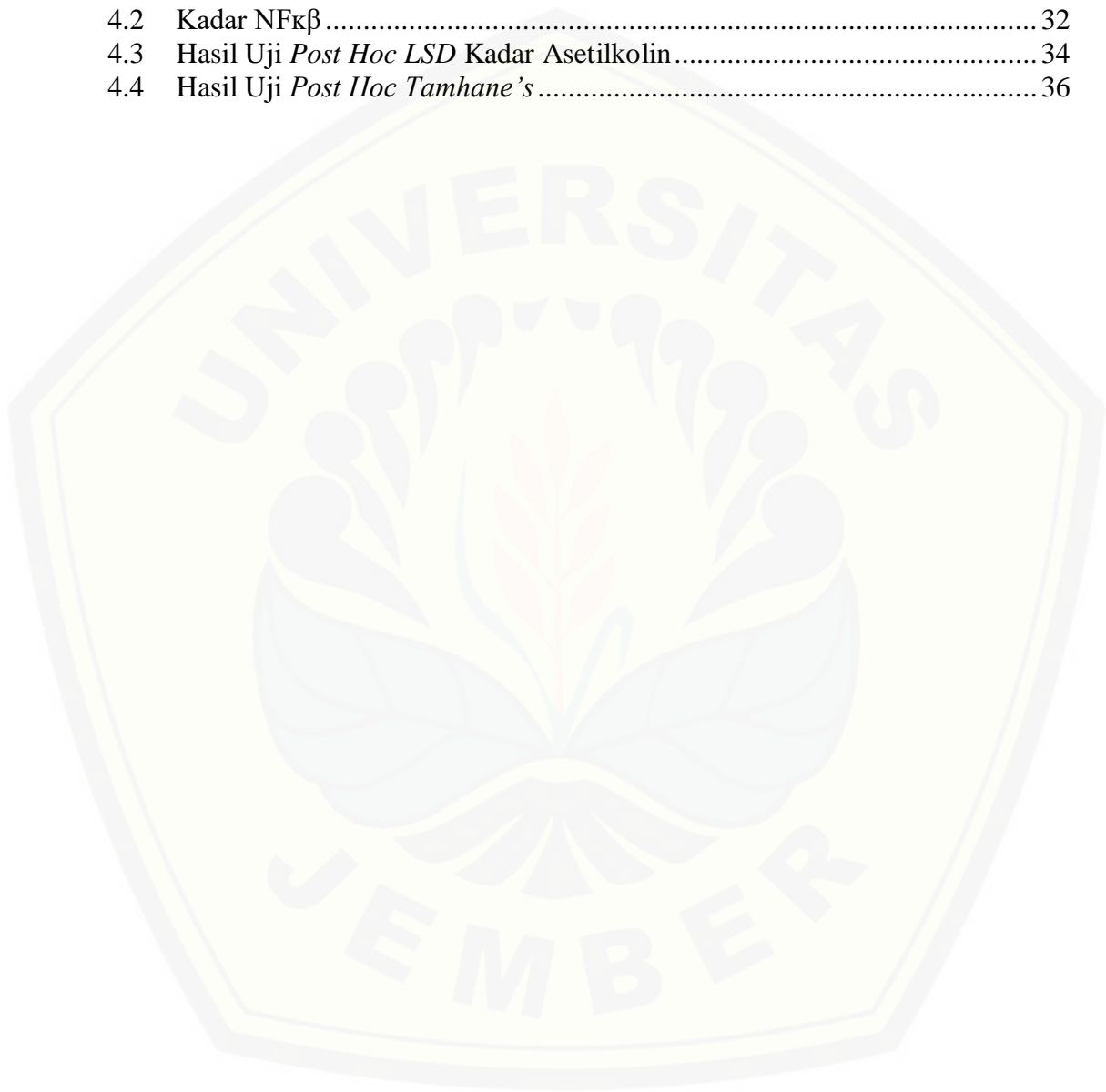
3.7.2	Sulfonilurea	25
3.7.3	<i>Alpha Lipoic Acid</i> (ALA).....	25
3.7.4	Kadar asetilkolin.....	26
3.7.5	Kadar NFκβ.....	26
3.8	Alat dan Bahan Penelitian	26
3.9	Prosedur Penelitian	26
3.9.1	<i>Ethical Clearence</i>	26
3.9.2	Adaptasi dan Perawatan	27
3.9.3	Perlakuan Diabetes Mellitus tipe 2.....	27
3.9.4	Pemberian <i>Alpha Lipoic Acid</i> dan Sulfonilurea	27
3.9.5	Pengukuran Kadar Asetilkolin dan NFκβ	27
3.10	Analisis Data	30
3.11	Alur Penelitian.....	31
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1	Hasil	32
4.1.1	Analisis Hasil Kadar Asetilkolin	33
4.1.2	Analisis Hasil Kadar NFκβ	34
4.2	Pembahasan.....	36
4.2.1	Pembahasan Hasil Analisis Kadar Asetilkolin.....	36
4.2.2	Pembahasan Hasil Analisis Kadar NFκβ	38
BAB 5.	PENUTUP	32
5.1	Kesimpulan	32
5.2	Saran	32
DAFTAR PUSTAKA.....		42
LAMPIRAN.....		49

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Resistensi Insulin dan GLUT-4	5
2.2 <i>The Ominous Octet</i>	6
2.3 Mekanisme Komplikasi DM	6
2.4 Aktivasi NF κ β	7
2.5 Sintesis Asetilkolin	8
2.6 Tren Kenaikan Insidensi Alzheimer Berdasarkan Durasi DM.....	11
2.7 Penelitian Hubungan DMT2 dan Alzheimer.....	12
2.8 NF κ β Meningkatkan Ekspresi APP dan BACE1	13
2.9 Struktur Kimia ALA dan DHLA	15
2.10 Hubungan ALA terhadap NF κ β	17
2.11 Kerangka Penelitian.....	18
3.1 Rancangan Penelitian.....	21
3.2 Alur Penelitian.....	31
4.1 Grafik Rerata Kadar Asetilkolin.....	33
4.2 Grafik Rerata Kadar NF κ β	35

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Tabel Perlakuan	22
4.1 Kadar Asetilkolin.....	32
4.2 Kadar NF κ B.....	32
4.3 Hasil Uji <i>Post Hoc</i> LSD Kadar Asetilkolin.....	34
4.4 Hasil Uji <i>Post Hoc</i> Tamhane's	36



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 <i>Ethical Clearence</i>	49
3.2 Perhitungan Dosis Hewan Coba	51
3.3 Dokumentasi Penelitian.....	52
4.1 Data Penelitian.....	54
4.1.1 Data Berat Badan Tikus (gram)	54
4.1.2 Hasil Tes Gula Darah Puasa (mg/dL)	54
4.1.3 Nilai Absorbansi Asetilkolin	54
4.1.4 Nilai Absorbansi NFκβ	54
4.1.5 Persamaan Garis Fungsi dan Kadar Asetilkolin.....	55
4.1.6 Persamaan Garis Fungsi dan Kadar NFκβ.....	55
4.1.7 Kadar Asetilkolin (ng/mL).....	55
4.1.8 Kadar NFκβ (ng/mL)	56
4.2 Analisis Data.....	57
4.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas	57
4.2.2 Uji <i>One Way Anova</i>	58
4.2.3 Uji <i>Post Hoc</i>	58
4.3. Rekomendasi Bebas Plagiasi	62

DAFTAR SINGKATAN

<i>Acetyl-CoA</i>	:	<i>Acetyl Coenzim A</i>
ALA	:	<i>Alpha lipoic acid</i>
ApoE	:	<i>Apolipoprotein E</i>
APP	:	<i>Amiloid Precursor Protein</i>
BACE 1	:	<i>Beta-Site App-Cleaving Enzyme 1</i>
Bappenas	:	Badan Perencanaan dan Pembangunan Nasional
BCCAO	:	<i>Bilateral Commoncarotid Arteries Occlusion</i>
BCKDH	:	<i>Branched Chain Alpha-Keto Acid Dehydrogenase</i>
ChAT	:	<i>Choline Acetyltransferase</i>
DHLA	:	<i>Dihydrolipoic Acid</i>
DMT2	:	Diabetes Mellitus Tipe 2
ELISA	:	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	:	<i>Food and Drug Administration</i>
FFA	:	<i>Free Fatty Acid</i>
GDP	:	Gula Darah Puasa
GLUT-4	:	<i>Glucose Transporter-4</i>
GSH-Reductase	:	<i>Glutathione-Reduktase</i>
HFD-STZ	:	<i>High Fat Diet-Streptozotozin</i>
IDF	:	<i>International Diabetes Federation</i>
IGF1	:	<i>Insulin Like Growth Factor-1</i>
IKKs	:	<i>IκB Kinase</i>
I κ B	:	<i>Inhibitor of kappa beta</i>
Na-CMC	:	<i>Natrium-Carboxyl Methyl Cellulose</i>
NADPH	:	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF κ B	:	<i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
NO	:	<i>Nitrite Oxide</i>
NOS-2	:	<i>Nitric Oxide Synthase 2</i>
NOX-2	:	<i>NADPH oxidase 2</i>
Nrf2	:	<i>Nuclear Erythroid 2-Related Factor</i>
PBS	:	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDH	:	<i>Pyruvate Dehydrogenase</i>
Perdossi	:	Perhimpunan Dokter Spesialis Saraf Indonesia
Perkeni	:	Perkumpulan Endokrinologi Indonesia
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i>
WHO	:	<i>World Health Organization</i>
α -KGDH	:	<i>Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase</i>
β -amiloid	:	<i>Beta-Amiloid</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Alpha lipoic acid (ALA) adalah asam lemak rantai pendek dengan molekul disulfida alami yang memiliki berbagai fungsi biologis (Kim *et al.*, 2011). ALA disintesis dalam tubuh manusia oleh mitokondria dari asam oktanoat dan sistein yang menjadi bagian penting dari proses metabolisme oksidatif mitokondria (Najafi *et al.*, 2014). ALA juga disintesis dalam jumlah kecil oleh tanaman seperti bayam, brokoli, tomat, dan juga terdapat pada hati hewan (Gomes *et al.*, 2014). ALA memiliki fungsi sebagai pengikat radikal bebas, regenerasi dan perbaikan antioksidan lain (antioksidan poten) serta antiinflamasi. Selain itu ALA juga memiliki efek positif dalam metabolisme glukosa dan regulasi insulin (Fava *et al.*, 2013). Berdasarkan sifat tersebut ALA menjadi subyek dari berbagai penelitian sebagai agen terapi potensial untuk penyakit kronis, seperti diabetes mellitus dan alzheimer (Gomes *et al.*, 2014).

ALA mampu menurunkan kadar glukosa dalam darah pada diabetes mellitus tipe 2 (DMT2) dan pada pasien alzheimer pemberian ALA memperbaiki fungsi kognitif (Fava *et al.*, 2013). Penelitian menunjukkan bahwa DMT2 meningkatkan risiko terjadinya alzheimer melalui berbagai mekanisme, diantaranya penurunan kadar asetilkolin dan peningkatan kadar *nuclear factor kappa beta* (NFκβ) (Akter *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2014). Belum ada bukti apakah pemberian ALA pada pasien DMT2 mampu meningkatkan kadar asetilkolin dan menurunkan kadar NFκβ sehingga bisa mencegah terjadinya alzheimer.

DMT2 adalah penyakit metabolik progresif dengan karakteristik peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) yang diakibatkan oleh resistensi insulin dan penurunan insulin (Perkeni, 2015). Pada DMT2 terjadi peningkatan stres oksidatif sehingga mengaktifkan NFκβ yang memicu terjadinya proses inflamasi yang bisa mengakibatkan degenerasi neuron (Evans *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 2013). NFκβ juga memicu terbentuknya *β-amiloid*. Degenerasi neuron dan

β-amiloid merupakan tanda histopatologi alzheimer (Kaur *et al.*, 2015). Kondisi resistensi insulin dan kekurangan insulin juga menurunkan sintesis asetilkolin akibat penurunan dari ekspresi enzim *choline acetyltransferase* (ChAT) dan *Acetyl-CoA* yang merupakan unsur penting dalam sintesis asetilkolin (Rivera *et al.*, 2005; Holmquist *et al.*, 2007; Akter *et al.*, 2011). Penurunan kadar asetilkolin mengakibatkan penurunan fungsi kognitif dan juga mengakibatkan terjadinya degenerasi neuron kolinergik, pembentukan *β-amiloid* dan hiperfosforilasi protein *tau* yang merupakan tanda histopatologis dari alzheimer (Tata *et al.*, 2014). Pengobatan DMT2 yang digunakan saat ini yaitu metformin, sulfonilurea, dan thiazolidinedion tidak berhasil menurunkan risiko terjadinya alzheimer dan dalam penggunaan jangka panjang mengakibatkan efek samping (Hsu *et al.*, 2010; Butterfield *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2014). Oleh karena itu dibutuhkan obat alternatif untuk mencegah terjadinya alzheimer pada pasien DMT2.

Penelitian secara *in vitro* oleh Haugaard dan Levin tahun 2000 menunjukkan bahwa ALA mampu meningkatkan kadar enzim ChAT. Penelitian oleh Zhao *et al.*, (2015) juga menyatakan ALA mampu meningkatkan kadar asetilkolin dan enzim ChAT pada model tikus demensia vaskuler. Pemberian ALA yang dikombinasi dengan fidarestat pada model tikus diabetes mellitus mampu menurunkan kadar *NADPH oxidase 2* (NOX-2), *nitric oxide synthase 2* (NOS-2), dan NFκβ di sumsum tulang (Dominguez *et al.*, 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Thakurta *et al.*, (2012) menyebutkan pemberian suplemen antioksidan yaitu *n-acetyl cysteine*, *a-tocopherol* dan *alpha lipoic acid* pada tikus usia tua (22-24 bulan) mampu menurunkan aktifitas inflamasi pada otak tikus seperti penurunan interleukin-1β, interleukin-6, dan NFκβ dibandingkan dengan tikus usia tua tanpa pemberian suplemen antioksidan. Kadar NFκβ juga menurun pada pemberian ALA terhadap kondisi inflamasi seperti *acute lung injury* dan *ulcerative colitis* (Cadirci *et al.*, 2010; Trivedi dan Jena, 2013).

Pada penelitian ini peneliti berupaya membuktikan apakah ALA mampu meningkatkan kadar asetilkolin dan menurunkan kadar NFκβ pada sampel jaringan otak tikus yang diinduksi DMT2 dan selanjutnya penelitian ini bisa

dijadikan dasar teori untuk penelitian yang membuktikan apakah ALA mampu menghambat terjadinya alzheimer pada tikus yang diinduksi DMT2.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di dalam latar belakang, rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah *alpha lipoic acid* mampu meningkatkan kadar asetilkolin pada jaringan otak tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2?
2. Apakah *alpha lipoic acid* mampu menurunkan kadar NFκβ pada jaringan otak tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut. Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Membuktikan efektivitas *alpha lipoic acid* dalam meningkatkan kadar asetilkolin pada jaringan otak tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2.
2. Membuktikan efektivitas *alpha lipoic acid* dalam menurunkan kadar NFκβ pada jaringan otak tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat kepada beberapa pihak, antara lain:.

1. Bagi Institusi Pendidikan, menambah bahan kepustakaan mengenai potensi pemanfaatan ALA dan sebagai bahan acuan untuk penelitian selanjutnya.
2. Bagi masyarakat, menambah wawasan mengenai manfaat penggunaan ALA.
3. Bagi Pelayan Kesehatan, menjadi bahan acuan penggunaan ALA sebagai terapi utama maupun terapi tambahan.

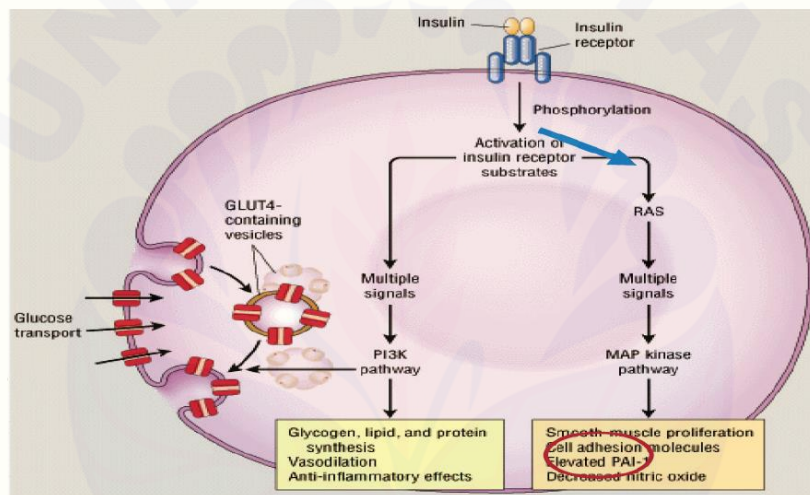
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus Tipe 2

Diabetes mellitus tipe 2 (DMT2) adalah penyakit metabolik progresif dengan karakteristik peningkatan kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia) yang terjadi karena penurunan kerja insulin dan fungsi sel β pankreas. Prevalensi penderita DM di dunia sangat tinggi mencapai 422 juta penderita pada tahun 2014 dan diprediksi mengalami peningkatan setiap tahun. WHO memprediksi kenaikan jumlah penderita DM di Indonesia dari 8,4 juta pada tahun 2000 menjadi sekitar 21,3 juta pada tahun 2030. Sedangkan *International Diabetes Federation (IDF)* memprediksi adanya kenaikan jumlah penderita DM di Indonesia dari 9,1 juta pada tahun 2014 menjadi 14,1 juta pada tahun 2035 (Perkeni, 2015). Prevalensi DMT2 sebesar 90-95% kasus dari kasus DM yang terdiagnosis (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2003). DMT2 lebih banyak diderita oleh orang dengan usia >40 tahun dan obesitas (WHO, 2014). Ada berbagai faktor risiko untuk DMT2, termasuk riwayat diabetes keluarga, riwayat diabetes gestasional, gangguan metabolisme glukosa, pola makan yang buruk, obesitas dan aktivitas fisik (Jakicic *et al.*, 2009). Genetika dan gaya hidup memiliki peran signifikan pada terjadinya penyakit ini (Mozaffarian *et al.*, 2009).

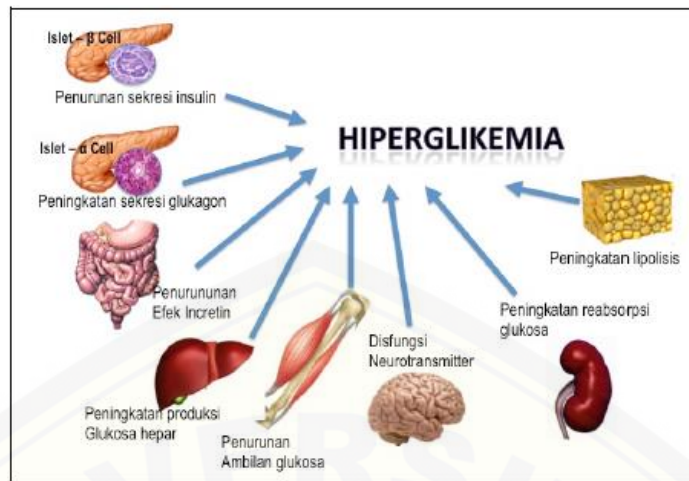
Hiperglikemia pada DMT2 disebabkan oleh berbagai faktor, dimulai dengan terjadinya resistensi insulin. Resistensi insulin otot dan liver serta kegagalan sel β pankreas dikenal sebagai patofisiologi kerusakan sentral DMT2 (Perkeni, 2015). Pasien yang mengalami resistensi insulin terjadi kegagalan metabolisme glukosa, hal tersebut disebabkan gagalnya pengiriman sinyal reseptor insulin menuju sel karena terganggunya pembentukan dan translokasi GLUT-4, sehingga glukosa tidak bisa dibawa ke dalam sel dan glukosa darah menjadi tinggi (Gambar 2.1). Kejadian tersebut dikompensasi dengan produksi insulin sel β pankreas yang disebut sebagai hiperinsulinemia. Seiring waktu, sensitivitas terhadap insulin secara bertahap berkurang dan akhirnya kondisi pensinyalan insulin tidak bekerja meskipun tubuh memproduksi banyak insulin.

Ketika resistensi insulin mencapai tahap berat, sel β pankreas tidak mampu menghasilkan insulin yang cukup sehingga tubuh dalam kondisi kekurangan insulin. Kegagalan metabolisme glukosa dan kurangnya insulin tersebut pada akhirnya meningkatkan kadar glukosa darah. Resistensi insulin pada jaringan hepar menurunkan efek inhibisi insulin terhadap proses glukogenesis dan glikogenolisis sehingga meningkatkan kadar glukosa darah puasa (Medicinus, 2014). Selain hal tersebut, DeFronzo (2009) menyampaikan bahwa terdapat organ lain yang berperan dalam terjadinya kondisi hiperglikemia karena berkurangnya insulin yang disebut sebagai *the ominous octet* (Gambar 2.2).



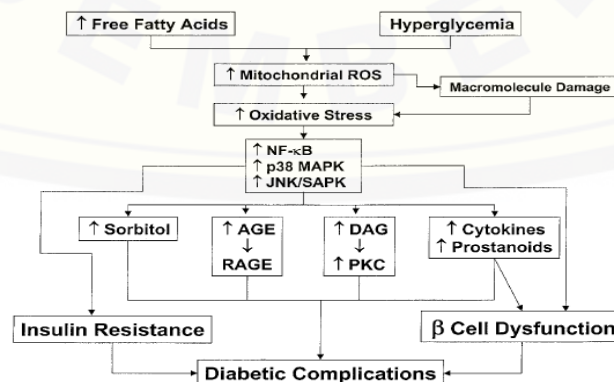
Gambar 2.1 Resistensi insulin dan hambatan pembentukan dan translokasi GLUT 4 (Sumber: Medicinus, 2014).

Berdasarkan teori *the ominous octet* dari DeFronzo (2009), sel lemak yang resisten terhadap efek antilipolisis dari insulin menyebabkan peningkatan proses lipolisis dan kadar asam lemak bebas (*Free Fatty Acid* = FFA). Kondisi hiperglikemia, peningkatan FFA, resistensi insulin, kekurangan insulin, dan kegagalan metabolisme glukosa tersebut menyebabkan berbagai komplikasi pada pasien diabetes mellitus tipe 2.

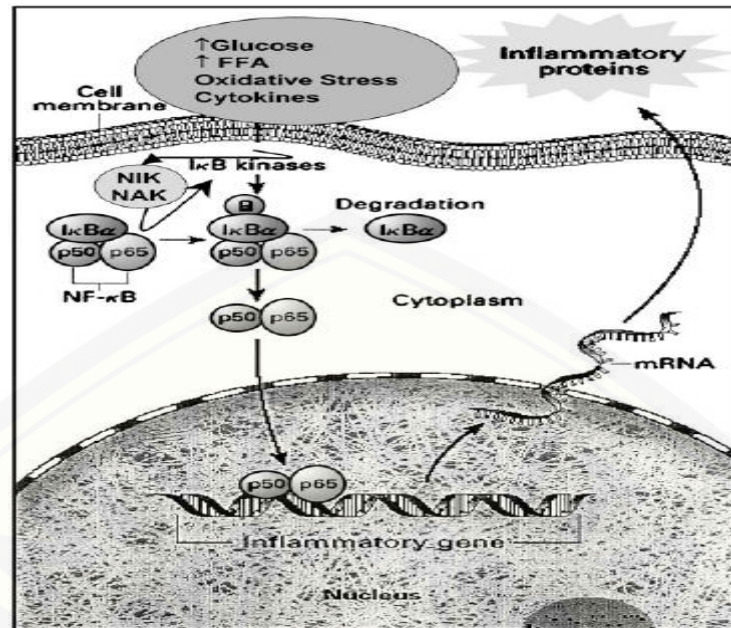


Gambar 2.2 *The Ominous Octet* (Sumber: DeFronzo, 2009).

Hiperglikemia, peningkatan FFA, dan kegagalan metabolisme glukosa menyebabkan stres oksidatif berbagai jaringan dengan meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) mitokondria. Pada tahap selanjutnya stres oksidatif akan mengaktifasi *nuclear factor kappa beta* (NF κ B) yang merupakan salah satu aktivator *stress-sensitive signaling pathways* (Gambar 2.3). NF κ B dalam kondisi inaktif disimpan di sitoplasma dengan berikatan pada (*Inhibitor of kappa beta*) I κ B. Aktifitas I κ B dikendalikan oleh *I κ B kinase* (IKKs). Stres oksidatif akan mengaktifkan IKKs sehingga menyebabkan fosforilasi dan degradasi I κ B, yang mengakibatkan terlepasnya ikatan dengan NF κ B dan NF κ B menjadi teraktivasi. NF κ B memainkan peran penting dalam proses terjadinya respon inflamasi dan apoptosis sel (Gambar 2.3 dan Gambar 2.4) (Evans *et al.*, 2002).



Gambar 2.3 Mekanisme komplikasi DM (Sumber: Evans *et al.*, 2002).

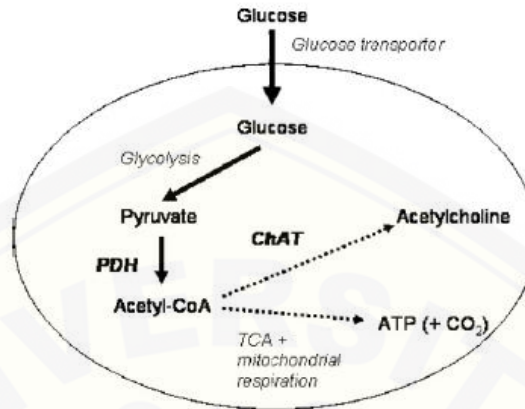


Gambar 2.4 Aktivasi NFκβ (Sumber: Evans *et al.*, 2002).

Stres oksidatif juga menyebabkan resistensi insulin dan disfungsi sel β pankreas. Disfungsi sel β pankreas ini yang menyebabkan pasien DMT2 mengalami kekurangan insulin tahap lanjut. Komplikasi DMT2 karena kegagalan metabolisme glukosa akibat kekurangan insulin atau resistensi insulin selain menyebabkan disfungsi mitokondria, juga menyebabkan berkurangnya sintesis asetilkolin karena produksi *Acetyl-CoA* berkurang (Holmquist *et al.*, 2007). Menurunnya jumlah insulin juga mengakibatkan penurunan ekspresi enzim *choline acetyltransferase* (ChAT), enzim yang dibutuhkan dalam sintesis asetilkolin (Akter *et al.*, 2011). Hal tersebut menjadi salah satu penyebab terjadinya komplikasi dari DMT2 yang berkaitan dengan fungsi asetilkolin seperti fungsi memori dan kognitif (Gambar 2.5).

Sekitar 60-70% penderita diabetes menunjukkan kerusakan sistem saraf dari ringan hingga berat (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2003). Hal tersebut bermanifestasi klinis sebagai gangguan sensasi atau rasa sakit di kaki atau tangan (diabetes neuropati), memperlambat pencernaan makanan, *carpal tunnel syndrome*, disfungsi ereksi dan masalah saraf perifer lainnya. Komplikasi sistem

saraf pusat dapat berupa stroke dan kemungkinan gangguan kognitif (Lin *et al.*, 2010).



Gambar 2.5 Sintesis asetilkolin (Sumber: Holmquist *et al.*, 2007).

Tujuan penatalaksanaan DM saat ini adalah untuk meningkatkan kualitas hidup pasien DM, menghilangkan keluhan DM, mengurangi risiko komplikasi, serta mencegah dan menghambat progresivitas mikroangiopati dan makroangiopati. Akan tetapi beberapa obat diabetes mellitus memiliki efek samping penggunaan jangka panjang. Penggunaan metformin mengakibatkan gejala neuropati karena penurunan kadar vitamin B 12 (Moreira *et al.*, 2014). Sedangkan penggunaan sulfonilurea jangka panjang mengakibatkan infark miokard, gagal jantung, dan penyebab kematian lainnya (Hsu *et al.*, 2010). Pengobatan DMT2 menggunakan metformin, sulfonilurea, dan *thiazolidinedione* juga tidak berhasil menurunkan risiko terjadinya alzheimer atau perbaikan fungsi memori dan kognitif karena degradasi obat yang cepat, lemah dalam melewati sawar darah otak, dan berdasarkan penelitian *in vivo* gagal mengurangi resistensi insulin (Huang *et al.*, 2014; Butterfield *et al.*, 2014).

2.2 Alzheimer

Alzheimer adalah penyakit neurodegeneratif dengan karakteristik klinik berupa penurunan progresif memori episodik dan fungsi kortikal lain (Perdossi 2015). Alzheimer bukan bagian dari proses normal penuaan. Alzheimer dapat memburuk seiring dengan bertambahnya waktu (*Alzheimer's Association*, 2018).

Faktor risiko terbesar untuk alzheimer adalah bertambahnya usia. Penyakit alzheimer banyak terjadi pada usia tua (>65 tahun) meskipun bisa ditemukan juga pada usia yang lebih muda. Kelangsungan hidup rata-rata setelah timbulnya gejala adalah 8 tahun (rentang waktu sekitar 3–20 tahun). Pada saat terdiagnosis, harapan hidup penderita menjadi sekitar setengah dari yang tidak menderita alzheimer (Larson *et al.*, 2004). Menurut Bappenas tahun 2013 angka harapan hidup di Indonesia mengalami peningkatan dari 70,1 tahun pada periode 2010-2015 menjadi 72,2 tahun pada periode 2030-2035 dan jumlah penduduk juga mengalami peningkatan dari 238,5 juta pada tahun 2010 menjadi 305,8 juta pada tahun 2035, sehingga akan terjadi peningkatan jumlah penduduk berusia 65 tahun dari 5,0% menjadi 10,8% pada tahun 2035. Akibatnya faktor risiko terjadinya alzheimer semakin besar dan penting untuk dicegah (Bappenas, 2013).

Masih banyak kontroversi permulaan terjadinya defek patologi alzheimer, akan tetapi hampir semua penelitian menyatakan alzheimer ditandai deposisi ekstraseluler oleh β -amiloid ($A\beta$) yang membentuk *senile plaques*, akumulasi intraseluler mikrotubulus dalam akson neuron oleh *neurofibrillary tangles* yang tersusun dari hiperfosforilasi protein tau, serta degenerasi neuron kolinergik (Cardoso *et al.*, 2017). Beberapa proses mekanisme terjadinya alzheimer telah dijelaskan melalui teori, seperti alzheimer yang muncul dengan onset cepat berhubungan dengan mutasi pada kromosom 1, 14, dan 21, hal ini menunjukkan bahwa ada komposisi genetik atau faktor predisposisi yang berperan. Alzheimer yang muncul dengan onset lambat berhubungan dengan gen kromosom 19 yang mengkode protein transporter kolesterol apolipoprotein E (apoE). Faktor lingkungan juga disebutkan memiliki peran kunci dalam proses terjadinya alzheimer, diantaranya seperti kolesterol tinggi, hipertensi dan obesitas, serta diabetes mellitus tipe 2 (Kivipelto *et al.*, 2005; Akter *et al.*, 2011).

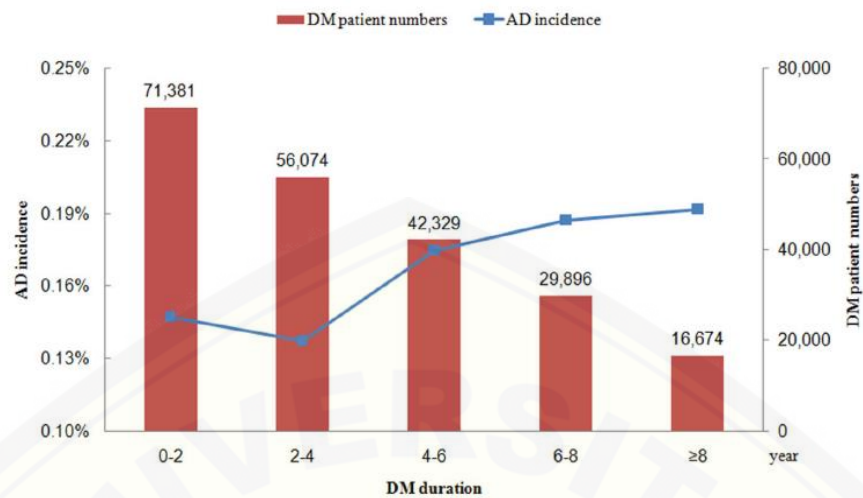
Diagnosis demensia dilakukan dengan mengidentifikasi gejala klinis akan tetapi diagnosis pasti demensia akibat alzheimer tetap membutuhkan biopsi otak untuk pemeriksaan neuropatologi (Perdossi, 2015). Oleh karena itu diharapkan suatu saat nanti ditemukan marker deteksi dini dan menilai derajat keparahan penyakit. Gambaran kelainan neuropatologi penyakit alzheimer berupa

neurofibrillary tangles, senile plaques, degenerasi neuron kolinergik, perubahan vakuoler, dan lewy body (Japardi, 2002; Jafed *et al.*, 2012).

Pengobatan yang menghambat proses patologi pada otak belum ada. Obat-obatan alzheimer yang tersedia hanya mampu memperlambat perburukan gejala selama 6–12 bulan, dan hanya efektif untuk setengah populasi yang diobati (Lanctot *et al.*, 2009). Oleh karena itu pencegahan alzheimer merupakan tindakan yang tepat dilakukan. Untuk mengatasi gejala kognitif ada tiga jenis obat yang saat ini disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA). Yang pertama, inhibitor kolinesterase, mencegah pemecahan asetilkolin, pembawa pesan kimia yang penting untuk memori dan pembelajaran. Dengan menjaga kadar asetilkolin tinggi, obat-obat ini mendukung komunikasi antar sel-sel saraf. Contohnya adalah donepezil, rivastigmin, dan galantamine. Jenis obat kedua bekerja mengatur aktivitas glutamat, zat kimia pembawa pesan berbeda yang terlibat dalam pemrosesan informasi. Contohnya memantine. Jenis ketiga adalah kombinasi inhibitor kolinesterase dan regulator glutamat, yakni donepezil bersama memantine, digunakan untuk tahap sedang hingga berat (*Alzheimer's Association*, 2018).

2.3 Hubungan Diabetes Mellitus Tipe 2 dengan Alzheimer

Fakta epidemiologi dan teori-teori dasar menunjukkan ada kemungkinan hubungan patofisiologi antara DMT2 dan alzheimer (Akter *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2014). Berdasarkan penelitian dari Huang *et al.*, menunjukkan insidensi alzheimer semakin meningkat seiring bertambahnya durasi DM (Gambar 2.6).



Gambar 2.6 Tren kenaikan insidensi alzheimer berdasarkan durasi DM (Sumber: Huang *et al.*, 2014)

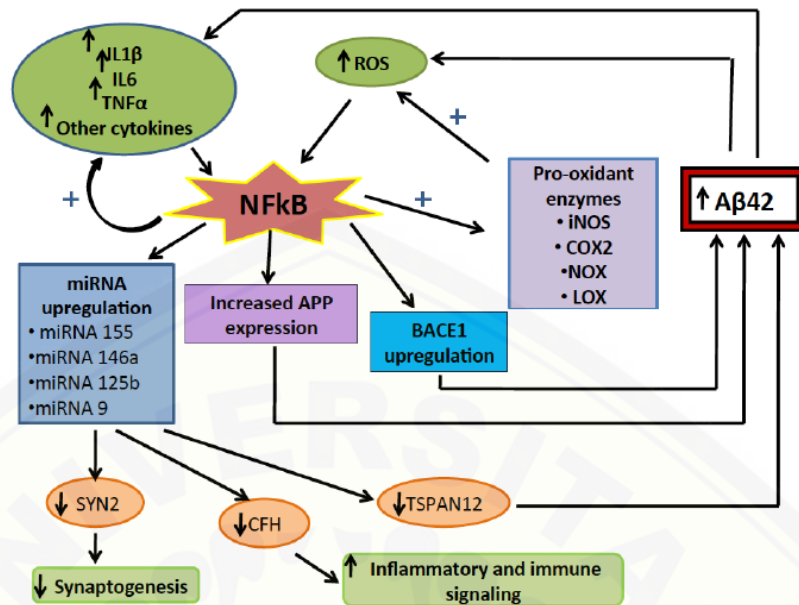
Mekanisme biokimia hubungan DMT2 dan alzheimer masih belum jelas dan dalam proses penelitian (Akter *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016). Banyak faktor diperkirakan mempengaruhi hubungan antara DMT2 dan Alzheimer, diantaranya obesitas, sindrom metabolik, inflamasi neuron, disfungsi mitokondria dan stress oksidatif, peningkatan produk akhir glikasi, resistensi insulin, peningkatan kadar glukosa darah, penurunan kadar asetilkolin, pembentukan dislipidemia ApoE- ϵ 4, degenerasi protein tau, dan degenerasi protein A β (Gambar 2.7) (Akter *et al.*, 2011).

Berdasarkan tinjauan pustaka mengenai DMT2 yang sudah dijelaskan, DMT2 dimulai dengan hiperinsulinemia akibat resistensi insulin, terjadi pada fase awal penyakit sebagai akibat dari kompensasi kegagalan pemanfaatan glukosa oleh sel (Perkeni, 2015). Hiperinsulinemia menyebabkan *down regulation* reseptor insulin pada sawar darah otak. Kondisi tersebut menyebabkan berkurangnya pasokan insulin di otak pada fase awal DMT2. Sel-sel otak (neuron) membutuhkan glukosa dalam menjalankan aktivitasnya. Reseptor insulin jumlah banyak ditemukan pada regio hipokampus, yang berkontribusi dalam proses belajar, memori, dan kognitif (Farooqui *et al.*, 2018).

Reference	Mechanism	Synopsis
Munch <i>et al.</i> , 1998 [135]	AGE	In diabetes, accelerated AGE formation is caused primarily by a higher level of plasma glucose.
Janson <i>et al.</i> , 2004 [89]	Amyloid deposition in islet and brain cells	More islet amyloid in AD patients than control subjects. No greater brain amyloid in diabetic patients compared with control subjects. In cases of T2DM patients with brain amyloid, the extent of amyloid increased with longer duration of diabetes.
Rivera <i>et al.</i> , 2005 [75]	Low insulin and a decrease in ChAT	Low insulin levels and low insulin sensitivity can contribute to a decrease in acetylcholine synthesis, leading to AD.
Razay <i>et al.</i> , 2007 [128]	Metabolic syndrome	AD patients, compared with healthy, normal patients, had a greater waist circumference, higher triglyceride and glucose levels, and lower HDL cholesterol.
Beydoun <i>et al.</i> , 2008 [126]	Weight gain and obesity	Baltimore Longitudinal Study of Aging. Obesity, central obesity and weight loss among women seem to play a role in AD, while underweight and weight gain among men increase the risk.
Vilalta-Franch <i>et al.</i> , 2008 [129]	Metabolic syndrome	Patients with metabolic syndrome are diagnosed with AD at a younger age than AD patients without metabolic syndrome.
Miklossy <i>et al.</i> , 2010 [87]	Amyloid and hyperphosphorylated tau	Islet amyloid polypeptide and hyperphosphorylated tau were found in islet cells of the pancreas in T2DM patients (on autopsy).
Beeler <i>et al.</i> , 2009 [84]	JNK, IB1 and hyperphosphorylated tau with amyloid deposits	Both DM and AD involve co-localization of JNK, IB1 and hyperphosphorylated tau with amyloid deposits.

Gambar 2.7 Penelitian yang menunjukkan hubungan antara DMT2 dan Alzheimer (Sumber: Akter *et al.*, 2011)

Hiperglikemia, peningkatan asam lemak bebas, gagalnya metabolisme glukosa, resistensi insulin, dan kekurangan insulin mempunyai peran dalam proses terjadinya alzheimer pasien DMT2. Disfungsi mitokondria dan stres oksidatif memainkan peran kunci patogenesis hubungan alzheimer dan DMT2 (Moreira; 2007; Akter *et al.*, 2011; Yarchoan *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2017). Disfungsi mitokondria disebabkan oleh hiperglikemia, peningkatan asam lemak bebas, dan gagalnya metabolisme glukosa, menyebabkan peningkatan ROS dan pada tahap selanjutnya menyebabkan stres oksidatif (Evans *et al.*, 2002). Peningkatan stres oksidatif mengaktifkan NF κ B, selanjutnya mengaktifkan rangkaian proses inflamasi dan menyebabkan cedera neuronal, degenerasi saraf, dan kehilangan kontrol metabolik, karena mitokondria tempat produksi ATP sebagai 90% energi tubuh (Gloire *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2011; Luchsinger, 2012; Hsieh *et al.*, 2013). NF κ B memicu sel menghasilkan *amiloid precursor protein* (APP) dan *beta-site APP-cleaving enzyme 1* (BACE 1), yang menginisiasi pembentukan β amiloid ($A\beta$), salah satu penyebab dan ciri histopatologi pada alzheimer (Gambar 2.8) (Kaur *et al.*, 2015).



Gambar 2.8 NFκβ meningkatkan ekspresi APP dan BACE1 (Sumber: Kaur *et al.* 2015)

Gagalnya metabolisme glukosa, resistensi insulin, dan kekurangan insulin juga menyebabkan alzheimer pasien DMT2 melalui mekanisme lain (Moreira, 2007; Akter *et al.*, 2011; Yarchoan *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2017). Kegagalan sel dalam mengambil dan metabolisme glukosa akibat resistensi insulin atau kekurangan insulin menyebabkan penurunan *Acetyl-CoA*, sehingga mengganggu sintesis asetilkolin (Holmquist *et al.*, 2007). Penelitian lain menunjukkan kemungkinan hubungan kadar glukosa dalam darah, resistensi insulin, dan produksi asetilkolin yang tidak adekuat melalui mekanisme lain. Asetilkolin disintesis sitoplasma dari *Acetyl-CoA* dan *Choline* melalui proses katalisis enzim *choline acetyltransferase* (ChAT). *Acetyl-CoA* berasal dari mitokondria yang terdapat dalam jumlah banyak pada ujung-ujung saraf (*nerve ending*). *Choline* ditranspor dari cairan ekstraseluler ke neuron terminal oleh *Na-dependent carrier membrane* (Katzung, 2004). Enzim ChAT diekspresikan dalam insulin dan reseptor positif *Insulin Like Growth Factor-1* (IGF1) neuron kortikal. Ekspresi dari enzim ChAT meningkat dengan stimulasi insulin atau IGF1. Sedangkan enzim ChAT dalam insulin atau reseptor positif IGF-1 neuron kortikal menurun pada penyakit alzheimer. Oleh karena itu, tingkat insulin yang rendah dan

resistensi insulin menyebabkan penurunan tingkat asetilkolin (Rivera *et al.*, 2005; Kroner, 2009; Akter *et al.*, 2011).

Asetilkolin merupakan neurotransmitter semua neuron kolinergik yang mempunyai peran penting dalam sistem saraf pusat dan perifer. Sistem kolinergik otak terlibat dalam proses fisiologis penting seperti proses perhatian, belajar, memori, respon stres, kesadaran, fisiologi tidur, dan penerimaan informasi sensoris (Ferreira-Vierra *et al.*, 2016). Asetilkolin berperan mengatur penerimaan, persandian, konsolidasi, rekonsolidasi, penghilangan, dan mendapatkan kembali sebuah memori. Kekurangan asetilkolin menurunkan fungsi tersebut pada otak (Ferreira-Vierra *et al.*, 2016). Kekurangan asetilkolin juga menyebabkan peningkatan fosforilasi protein tau dan produksi β -Amiloid yang mengakibatkan neurodegenerasi (Tata *et al.*, 2014). Degenerasi neuron kolinergik pada *nucleus basalis of Meynert* merupakan salah satu tanda histopatologi alzheimer (Ferreira-Vierra *et al.*, 2016).

2.4 Pengukuran Kadar Asetilkolin dan NF κ B pada Tikus

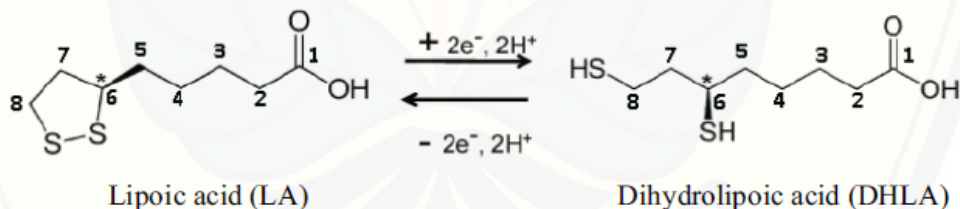
Asetilkolin disintesis neuron kolinergik di sistem saraf perifer maupun sistem saraf pusat, akan tetapi pada penyakit alzheimer yang menjadi fokus adalah neuron kolinergik di sistem saraf pusat terutama regio hipokampus otak (Lombardo dan Maskos, 2014). NF κ B secara umum terdapat pada semua sel. Dalam proses terjadinya alzheimer pasien DMT2, NF κ B menjalankan perannya dalam degenerasi neuron kolinergik dan pembentukan β -amiloid terjadi di sitoplasma neuron oleh karena disfungsi mitokondria neuron akibat gagalnya metabolisme glukosa (Aggarwal, 2003). Oleh karena itu kadar asetilkolin dan NF κ B pada model tikus DMT2-alzheimer banyak terdapat pada sampel jaringan otak. Untuk mengukur kadar asetilkolin dan NF κ B jaringan otak bisa menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) atau metode western blot. Pengukuran kadar asetilkolin secara kuantitatif lebih akurat dengan metode ELISA (Zhao *et al.*, 2015). Pengukuran kadar NF κ B sebagian besar penelitian menggunakan metode western blot, akan tetapi juga bisa menggunakan metode ELISA (Fatmawati *et al.*, 2010). ELISA atau nama lainnya *enzyme*

immunoassay merupakan teknik biokimia untuk mendeteksi antibodi atau antigen pada suatu sampel.

2.5 Alpha Lipoic Acid

Alpha lipoic acid (ALA) adalah molekul disulfida alami yang dikenal juga sebagai *thiotic acid* dan *1,2 dithiolane-3 pentanoic acid* (Gambar 2.9). ALA disintesis dalam tubuh manusia oleh mitokondria dari asam *octanoic* dan *cysteine* melalui reaksi enzim yang bisa mengalami *down-regulation* pada beberapa kondisi klinis seperti stres oksidatif. ALA juga ditemukan dalam beberapa sayuran seperti bayam, brokoli, dan tomat. Selain itu juga terdapat pada daging terutama jeroan (Gomes *et al.*, 2014).

ALA terdapat dalam dua bentuk enantiomer, yaitu isoform R dan S. Bentuk isoform R (R-ALA) mempunyai peran penting dalam metabolisme oksidatif mitokondria sebagai kofaktor esensial beberapa enzim seperti *pyruvate dehydrogenase* (PDH), *branched chain α -keto acid dehydrogenase* (KDH) dan *α -ketoglutarate dehydrogenase* (KGDH) (Holmquist *et al.*, 2007; Najafi *et al.*, 2014).



Gambar 2.9 Struktur kimia ALA dan DHLA (Sumber: Moura *et al.*, 2015)

Alphalipoic acid direduksi oleh enzim sitosol *glutathione-reduktase* (GSH-reductase), *thioedoksin reduktase*, dan enzim dihidrolipoil dehidrogenase (E3). Enzim E3 mitokondria mereduksi ALA menjadi *dihydrolipoic acid* (DHLA) dengan melepas NADPH (Gambar 2.9). *Alphalipoic acid* juga merupakan substrat untuk enzim *NADPH-dependent GSH-reductase* (Kim *et al.*, 2011; Mi *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2014).

ALA mempunyai fungsi sebagai antioksidan yang mengikat radikal bebas ROS. ALA juga mampu meregenerasi antioksidan endogen seperti koenzim Q10,

vitamin C, vitamin E, dan perbaikan protein teroksidasi (Mi *et al.*, 2011). ALA/DHLA disebut sebagai antioksidan universal, karena biasanya antioksidan hanya larut dalam membran lemak atau larut dalam air, tetapi ALA mempunyai sifat *lipophilic* dan *hydrophilic*. Hal tersebut membuat ALA disebut sebagai antioksidan unik dan memiliki keuntungan lebih dibandingkan antioksidan lain seperti vitamin C, vitamin E, dan *Glutathione* (Najafi *et al.*, 2014; Moura *et al.*, 2015; Rochette *et al.*, 2015). Karena sifat tersebut ALA mampu menembus membran sel, sitosol, dan sawar darah otak dengan cepat (Najafi *et al.*, 2014; Rochette *et al.*, 2015). Selain sifat antioksidan, ALA juga memiliki efek antiinflamasi berbeda dengan aktifitas antioksidannya (Moura *et al.*, 2015). Menurut penelitian lain, ALA memiliki efek positif dalam metabolisme glukosa dan resistensi insulin (Fava *et al.*, 2013). Berdasarkan sifat tersebut ALA menjadi subyek banyak penelitian, sebagai agen terapi potensial banyak penyakit kronis seperti *alzheimer*, *non alcoholic fatty liver disease*, *burning mouth syndrome*, *cardiovascular disease*, *hypertension*, beberapa jenis kanker, *glaucoma*, osteoporosis, dan diabetes mellitus (Gomes *et al.*, 2014).

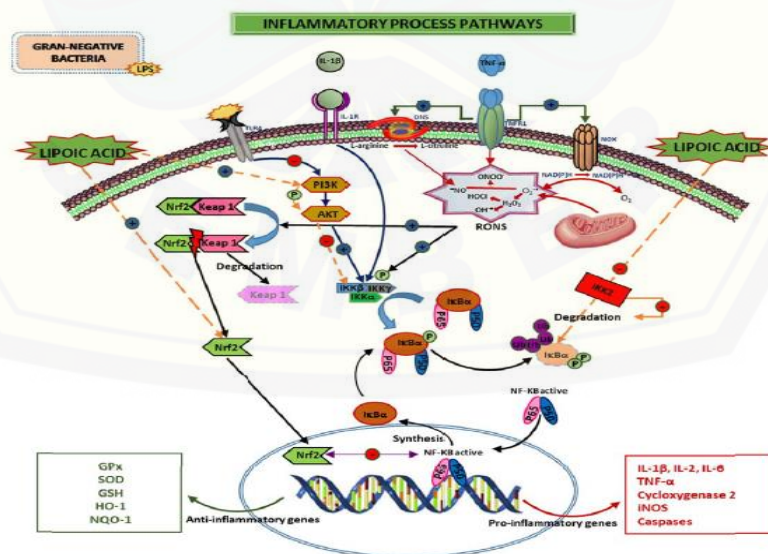
Penggunaan ALA secara oral seperti sayuran, daging atau suplemen, cepat diaborpsi di saluran pencernaan dan ditransport ke berbagai sel jaringan termasuk otak, karena ALA bisa melewati sawar darah otak. Selanjutnya ALA direduksi menjadi DHLA dan dimetabolisme hati dengan metabolit seperti bisnorlipoate dan tetranorlipoate. ALA diekskresi melalui ginjal (Gomes *et al.*, 2014). Berdasarkan penelitian yang sudah ada, belum ditemukan efek samping yang berarti dalam penggunaan ALA (Shay *et al.*, 2009).

2.6 Hubungan ALA terhadap Kadar NFκβ dan Asetilkolin

Kondisi hiperglikemia, peningkatan kadar asam lemak bebas, dan kegagalan metabolisme glukosa menyebabkan disfungsi mitokondria dan meningkatkan kadar ROS neuron, pada tahap selanjutnya menyebabkan stres oksidatif dan mengaktifasi NFκβ. ALA/DHLA memiliki efek antioksidan yang bisa mengikat ROS melalui donor elektronnya. Selain itu ALA juga mereduksi vitamin C dari asam dehidroaskorbat dan secara tidak langsung meregenerasi

vitamin E dari bentuk oksidasinya. Karena fungsi antioksidan tersebut, ALA mencegah aktivasi NF κ B (Tibullo *et al.*, 2017). Penelitian Ying *et al.*, (2010) menjelaskan ALA memiliki efek antiinflamasi dengan jalur berbeda dari efek antioksidannya yaitu menghambat aktivasi NF κ B melalui penghambatan aktivasi subunit *I* κ B Kinase-2 (IKK2), yang diketahui sebagai aktivator *I* κ B, sehingga ALA berhasil mencegah fosforilasi dan degradasi *I* κ B dan mencegah aktivasi dari NF κ B. ALA juga meningkatkan kadar *nuclear erythroid 2-related factor* (Nrf2) yang memiliki efek inhibisi keberadaan NF κ B (Gambar 2.10) (Ying *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2015).

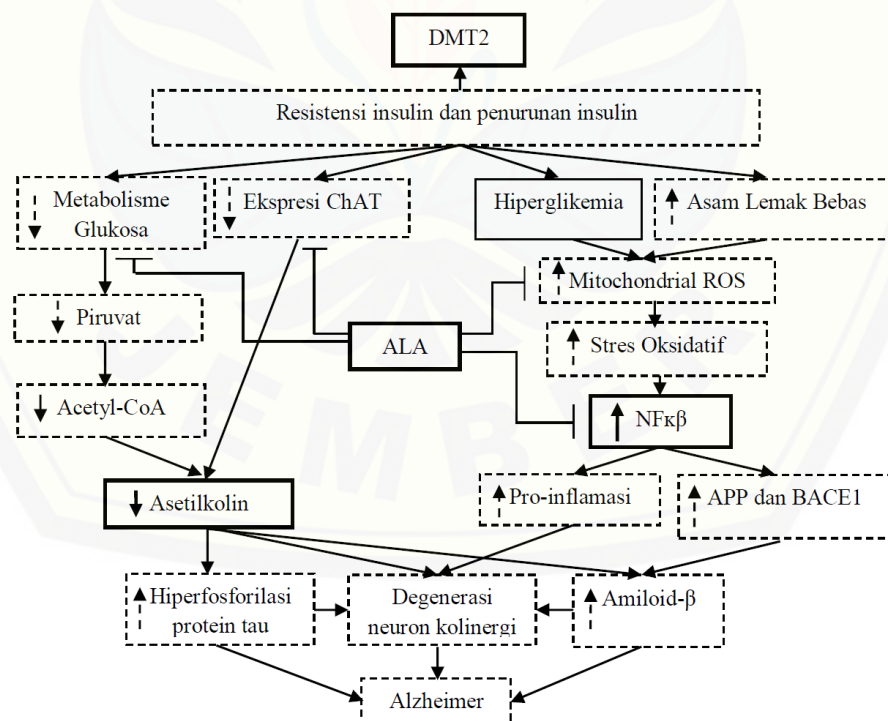
Penelitian yang dilakukan oleh Fava *et al.*, tahun 2013, pemberian ALA 600 mg/hari pada dua kelompok pasien, yaitu kelompok pasien alzheimer dengan DM dan kelompok pasien alzheimer tanpa DM. Hasil yang diperoleh terdapat perbaikan signifikan pada kelompok A sebesar 43% dibandingkan kelompok B sebesar 23%. Hal tersebut membuktikan ALA mempunyai peran perbaikan fungsi kognitif pasien alzheimer dengan DMT2. Penelitian tersebut selain dikaitkan dengan fungsi antioksidan dan antiinflamasi dari ALA juga dikaitkan dengan kemampuan ALA yang memiliki efek positif dalam metabolisme glukosa dan resistensi insulin (Fava *et al.*, 2013).



Gambar 2.10 Hubungan ALA terhadap NF κ B (Sumber: Moura *et al.*, 2015).





ALA meningkatkan kadar asetilkolin dengan mengaktivasi enzim *choline acetyltransferase* (ChAT) dan peningkatan *uptake* glukosa, sehingga menghasilkan lebih banyak *acetyl-CoA* untuk memproduksi asetilkolin (Holmquist *et al.*, 2007). ALA meningkatkan *uptake* glukosa pada jaringan dengan mengaktivasi *insulin signaling pathway*. Pada tahap selanjutnya terjadi fosforilasi dari insulin reseptor dan meningkatkan translokasi dan aktifitas intrinsik dari GLUT-4 sel sehingga terjadi peningkatan *uptake* glukosa (Rochette *et al.*, 2015). Peran ALA meningkatkan aktivitas enzim ChAT dibuktikan oleh penelitian secara *in vitro* oleh Haugaard dan Levin tahun 2000. Penelitian terbaru tahun 2015 oleh Zhao *et al.*, juga menyatakan ada peningkatan kadar enzim ChAT dan asetilkolin dengan pemberian ALA dosis 50 mg/kg selama 28 hari pada tikus model demensia vascular dengan induksi *bilateral commoncarotid arteries occlusion* (BCCAO) (Zhao *et al.*, 2015).

2.7 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.11 Kerangka Penelitian

Keterangan :

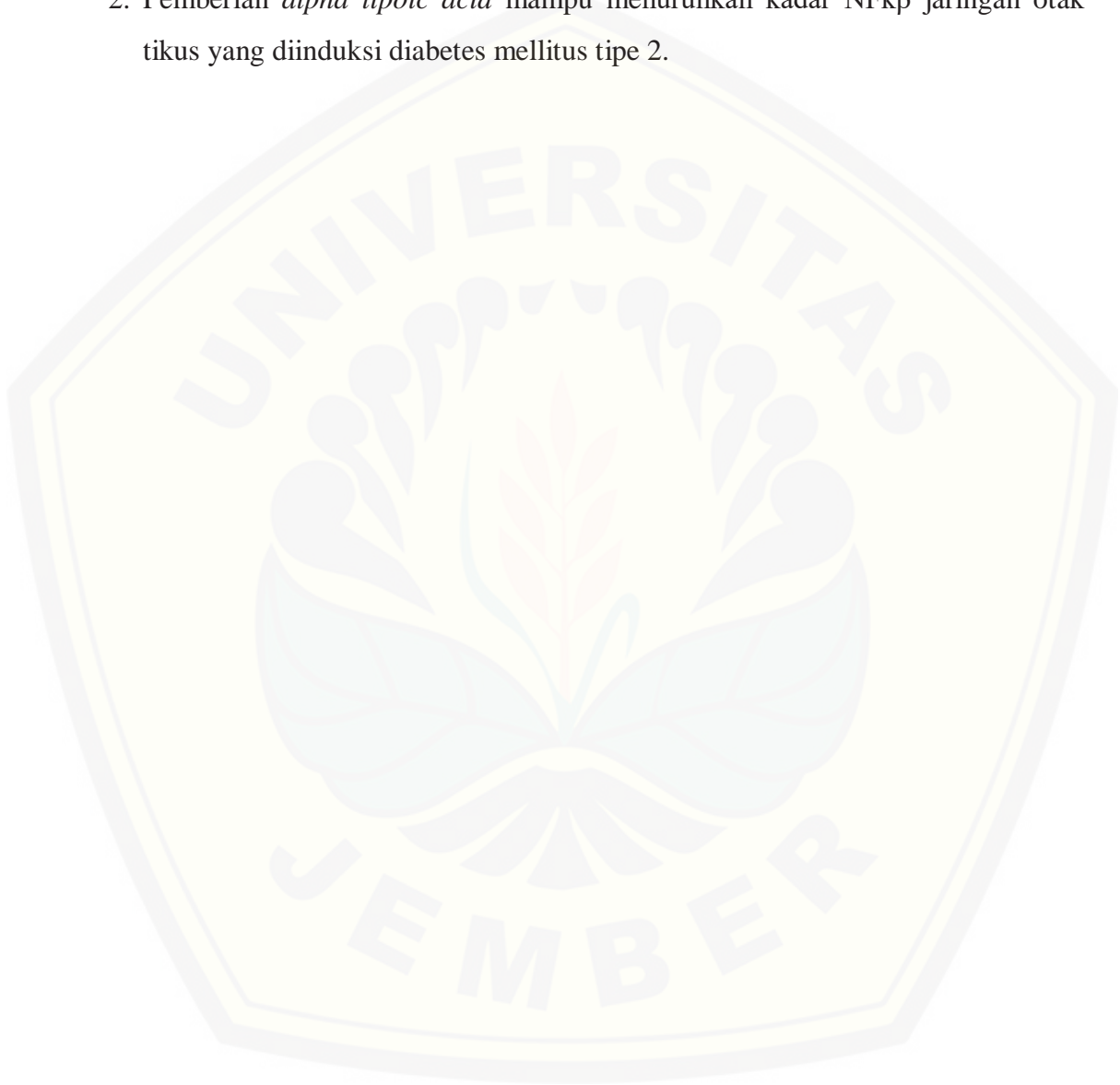
-  : Diteliti
-  : Tidak diteliti
-  : Menghambat
-  : Memicu

Diabetes mellitus tipe 2 terjadi akibat resistensi insulin dan penurunan insulin. Kondisi tersebut menyebabkan terjadinya peningkatan kadar asam lemak bebas dan hiperglikemia akibat glukosa yang tidak bisa dimetabolisme oleh sel. Kenaikan asam lemak bebas dan hiperglikemia mengakibatkan terjadinya disfungsi mitokondria sehingga meningkatkan produksi ROS mitokondria. Peningkatan jumlah ROS tersebut menyebabkan terjadinya stres oksidatif sel dan jaringan. Stres oksidatif mengaktivasi NF κ B yang menginduksi aktifnya sinyal respon inflamasi, sehingga menyebabkan inflamasi neuron dan degenerasi neuron, selain itu NF κ B juga menyebabkan pembentukan β -amiloid yang merupakan salah satu tanda histopatologi alzheimer. Di sisi lain, penurunan insulin DMT2 berpengaruh terhadap penurunan ekspresi enzim ChAT yang mengakibatkan penurunan sintesis asetilkolin. Kegagalan metabolisme glukosa juga mempunyai peran dalam menurunnya sintesis protein, yakni dengan menurunnya jumlah *Acetyl-CoA*. Penurunan kadar asetilkolin mengakibatkan degenerasi neuron dan hiperfosforilasi tau dan pembentukan β -amiloid. Peningkatan NF κ B dan penurunan asetilkolin mengakibatkan terjadinya komplikasi alzheimer pada pasien DMT2. *Alpha Lipoic Acid* mampu menurunkan kadar NF κ B pada mekanisme tersebut dengan sifat antioksidan yang mengikat dan menghilangkan ROS. Selain itu ALA juga menghambat aktivasi NF κ B melalui penghambatan terhadap aktivasi IKK2, sehingga *I κ B* tetap berikatan dengan NF κ B, menyebabkan NF κ B tetap tidak aktif. ALA memiliki efek positif dalam metabolisme glukosa sehingga jumlah *Acetyl-CoA* meningkat. Hal tersebut mengakibatkan peningkatan sintesis asetilkolin dan ALA juga mampu mengaktivasi enzim ChAT, sehingga meningkatkan sintesis asetilkolin.

2.8 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini ialah

1. Pemberian *alpha lipoic acid* mampu meningkatkan kadar asetilkolin jaringan otak tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2.
2. Pemberian *alpha lipoic acid* mampu menurunkan kadar NF κ B jaringan otak tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2.



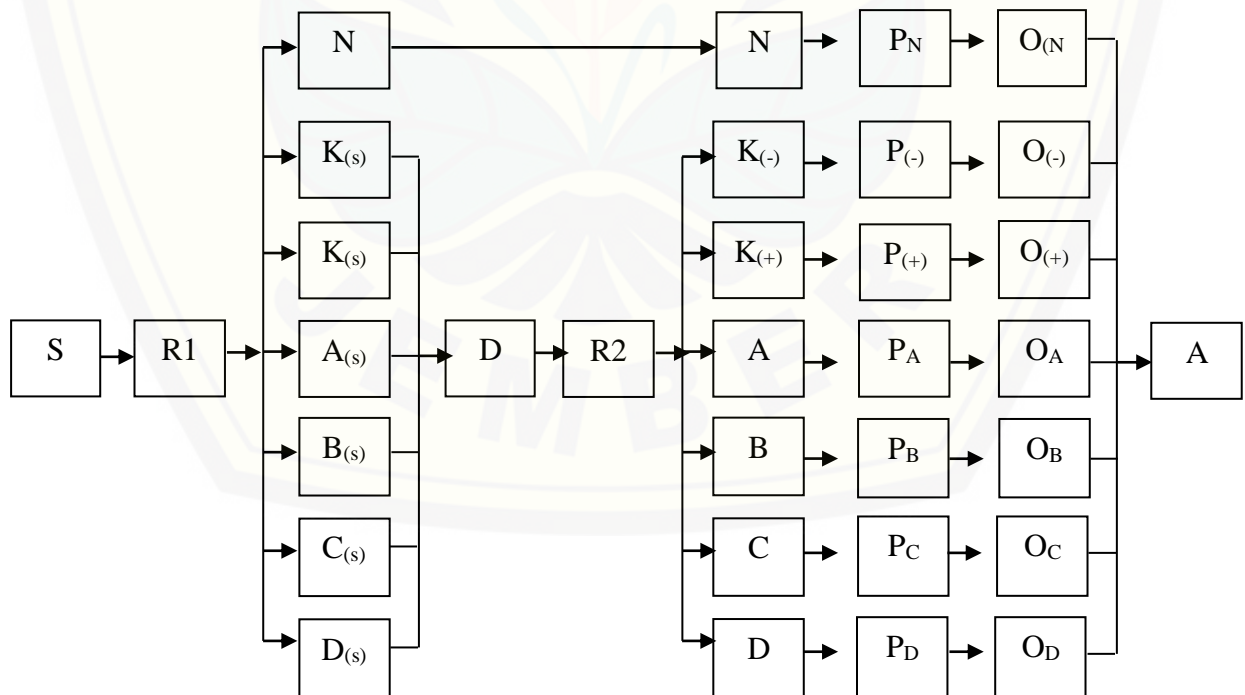
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental murni (*true experimental design*). Peneliti mengontrol variabel pengganggu, pengambilan sampel dengan *simple random sampling*, pemilihan kelompok dengan *random assignment*, dan terdapat kelompok pembanding (Levy dan Ellis, 2011). Terdapat tujuh kelompok yang dipilih secara random, yakni kelompok normal, dua kelompok kontrol, dan empat kelompok perlakuan.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini ialah eksperimental *post test only control group design* dengan satu kelompok normal, dua kelompok kontrol, dan empat kelompok perlakuan (Gambar 3.1 dan Tabel 3.1).



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

Keterangan:

- S = sampel tikus
 D = perlakuan DMT2
 R1 = *random assignment* pertama (berdasarkan berat badan)
 R2 = *random assignment* kedua (berdasarkan GDP) (Siswanto *et al.*, 2014)
 N = kelompok normal
 K₍₋₎ = kelompok kontrol negatif
 K₍₊₎ = kelompok kontrol positif
 A, B, C, D = kelompok perlakuan
 K_(S) = kelompok kontrol sementara
 A, B, C, D_(S) = kelompok perlakuan sementara
 P_(N) = perlakuan kontrol normal
 P₍₋₎ = perlakuan kontrol negatif (aquades)
 P₍₊₎ = perlakuan kontrol positif (*sulfonilurea* 0,09 mg)
 P_A = perlakuan A (ALA 0,3375 mg)
 P_B = perlakuan B (ALA 1,35 mg)
 P_C = perlakuan C (ALA 5,4 mg)
 P_D = perlakuan D (ALA 21,6 mg)
 O_{(N) (-)(+)A,B,C,D} = observasi kelompok normal, kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan A, B, C, dan D
 A = analisis data

Tabel 3.1 Tabel Perlakuan

No.	Nama Perlakuan	Bentuk Perlakuan
1.	Kontrol Normal	Tanpa pemberian perlakuan diabetes
2.	Kontrol Negatif	Perlakuan DMT2 (<i>high fat diet</i> dan Streptozotocin 40 mg/KgBB) + aquades
3.	Kontrol Positif	<i>High fat diet</i> + Streptozotocin 40 mg/KgBB + Sulfonilurea 0,09 mg
4.	Perlakuan A	<i>High fat diet</i> + Streptozotocin 40 mg/KgBB + ALA 0,3375 mg
5.	Perlakuan B	<i>High fat diet</i> + Streptozotocin 40 mg/KgBB + ALA 1,35 mg
6.	Perlakuan C	<i>High fat diet</i> + Streptozotocin 40 mg/KgBB + ALA 5,4 mg
7.	Perlakuan D	<i>High fat diet</i> + Streptozotocin 40 mg/KgBB + ALA 21,6 mg

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Terminasi, pengambilan sampel otak, dan pemeriksaan kadar asetilkolin dan NFκβ dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Waktu penelitian selama 2 bulan.

3.4 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah semua tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar yang berada di peternakan kota Malang.

3.5 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ialah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar dengan kriteria inklusi meliputi tikus berumur kurang lebih 3 bulan dengan berat badan 150-250 gram, bergerak aktif, sehat, dan belum pernah mendapat perlakuan dalam penelitian. Sedangkan kriteria eksklusi meliputi perilaku tidak normal, mati selama penelitian berlangsung, dan kadar gula darah puasa <250 mg/dL setelah induksi streptozotzin. Sampel penelitian ini dipilih dari populasi menggunakan teknik *simple random sampling*. Jumlah perlakuan penelitian ini sebanyak satu kelompok normal, dua kelompok kontrol, dan 4 kelompok perlakuan. Pengulangan dilakukan pada tiap kelompok untuk mencegah bias. Penghitungan besarnya pengulangan menggunakan rumus Federer sebagai berikut. Besar sampel:

$(n-1)(p-1) \geq 15$ (p: jumlah perlakuan, n: jumlah ulangan), sehingga

$(n-1)(7-1) \geq 15$

$n-1 \geq 2,5$

$n \geq 3,5$ dibulatkan ke atas menjadi 4. Jadi jumlah sampel yang dibutuhkan dalam penelitian adalah 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*).

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini ialah pemberian dosis ALA dan *sulfonilurea*. Pemberian dosis *sulfonilurea* sebesar 0,09 mg (David dan Bell, 2004) dan pemberian dosis ALA dibedakan menjadi empat dosis, yaitu 0,3375 mg; 1,35 mg; 5,4 mg; dan 21,6 mg (Shay *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013; Di Curzio *et al.*, 2014).

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini ialah kadar asetilkolin dan kadar NFκβ.

3.6.3 Variabel Luar

Variabel luar dalam penelitian ini dibedakan menjadi variabel yang dapat dikendalikan dan variabel yang tidak dapat dikendalikan.

a. Variabel luar dapat dikendalikan

Variabel luar yang dapat dikendalikan dalam penelitian ini meliputi umur, berat badan, jenis kelamin, galur, pemeliharaan, waktu dan lama perlakuan, dan jenis perlakuan hewan coba.

b. Variabel luar yang tidak dapat dikendalikan

Variabel luar yang tidak dapat dikendalikan ialah stres psikologis akibat perlakuan yang diberikan dan imun hewan coba, karena setiap hewan coba memiliki ambang batas stres psikologis dan imun yang berbeda.

3.7 Definisi Operasional

3.7.1 Tikus Diabetes Mellitus Tipe 2 (DMT2)

Model tikus DMT2 menggunakan *high fat diet-streptozotolin* (HFD/STZ), dengan pemberian diet tinggi lemak berupa sonde kuning telur 3 mL dan pakan jenis turbo serta air minum selama 2 pekan. Setelah itu dilakukan injeksi STZ yang dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M (pH 4,5) dengan dosis STZ 40 mg/kgBB. Setelah induksi STZ tikus diberikan dekstrosa 10% sebanyak 3 mL dengan disondekan dan sebagai minum secara *ad libitum* selama 24 jam pertama

untuk mencegah hipoglikemik syok. Sampel darah diambil dari ekor tikus 5 hari pasca induksi STZ. Hiperglikemia dinilai dengan mengukur kadar gula darah puasa (GDP). Tikus dengan GDP >250 mg/dL dikatakan DMT2 dan lanjut menjadi sampel penelitian. Jika GDP <250 mg/dL akan dieksklusi (Gandhi *et al.*, 2013).

3.7.2 Sulfonilurea

Obat dari golongan sulfonilurea yang digunakan yaitu glimepirid. Glimepirid yang digunakan pada penelitian ini adalah glimepirid generik 2 mg. Dosis yang digunakan adalah dosis pada manusia 2 mg/hari yang dikonversi ke dosis tikus 200 gBB. Takaran dosis glimepirid berdasarkan berat badan seluruh hewan coba kelompok kontrol positif kemudian dikonversi dengan dosis per 200 gBB. Hasil konversi didapatkan dosis sebesar 0,09 mg. Sediaan glimepirid dalam bentuk tablet kemudian dibuat bubuk dan dilarutkan. Berdasarkan penelitian sebelumnya pelarut glimepirid menggunakan Na-CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*). Glimepirid diberikan kepada hewan coba dengan sonde oral selama 30 hari (David dan Bell, 2004; Saraswathi dan Devaraj, 2013).

3.7.3 *Alpha Lipoic Acid* (ALA)

ALA yang digunakan merupakan produksi dari PT. Simex Pharmaceutical Indonesia dengan merk dagang ALA 600MG. Dosis yang digunakan adalah dosis pada manusia 600 mg/hari yang dikonversi ke dosis tikus 200 gBB (Fava *et al.*, 2013). Takaran dosis ALA berdasarkan rata-rata berat badan seluruh hewan coba kelompok perlakuan kemudian dikonversi dengan dosis per 200 gBB. Hasil konversi didapatkan dosis sebesar 0,3375 mg; 1,35 mg; 5,4 mg; dan 21,6 mg. Dosis ALA dalam bentuk bubuk ditimbang menggunakan neraca analitik digital, kemudian dilarutkan. Berdasarkan penelitian sebelumnya pelarut ALA menggunakan aquades dan diberikan kepada hewan coba dengan sonde oral selama 30 hari (Saraswathi dan Devaraj, 2013).

3.7.4 Kadar asetilkolin

Kadar asetilkolin diperoleh dari hasil pengukuran menggunakan metode ELISA. Sampel menggunakan jaringan otak tikus. Asetilkolin kit didapatkan dari Gamma Scientific Biolab dan ELISA *reader* dari laboratorium biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Data yang dihasilkan berupa nilai kadar asetilkolin dengan skala rasio.

3.7.5 Kadar NFκβ

Kadar NFκβ diperoleh dari hasil pengukuran menggunakan metode ELISA. Sampel menggunakan jaringan otak tikus. NFκβ kit didapatkan dari Gamma Scientific Biolab dan ELISA *reader* dari laboratorium biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Data yang dihasilkan berupa nilai kadar NFκβ dengan skala rasio.

3.8 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa kandang, spuit, sonde, *magnetic stirrer*, timbangan, elisa kit, elisa reader, eppendorf, mikrometer pipet, dan inkubator. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu hewan coba berupa tikus wistar jantan, pakan turbo, kuning telur, *alpha lipoic acid*, glimepirid, Na-CMC, aquades, streptozotzin, buffer fosfat, dekstrosa 10%, dan *phosphate buffered saline* (PBS).

3.9 Prosedur Penelitian

3.9.1 *Ethical Clearence*

Prosedur penelitian telah dilakukan pengurusan *ethical clearence* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan mendapat persetujuan sesuai etik nomor: 1.170/H25.1.11/KE/2018.

3.9.2 Adaptasi dan Perawatan Hewan Coba

Hewan coba diadaptasikan dalam kandang selama satu pekan untuk menghindari stres. Alas kandang, tempat pakan dan minum, sisa pakan dan kotoran tikus setiap 3 hari dibersihkan untuk menghindari timbulnya penyakit.

3.9.3 Perlakuan Diabetes Mellitus tipe 2 pada Hewan Coba

Pembuatan model tikus DMT2 dilakukan dengan pemberian diet tinggi lemak berupa pakan turbo, sonde kuning telur, dan air selama 2 pekan dilanjutkan dengan injeksi *streptozotosin* (STZ) dengan dosis 40 mg/KgBB yang dilarutkan dalam buffer sitrat secara intraperitoneal. Setelah induksi tikus diberikan dekstrosa 10% dengan cara disondekan dan sebagai minum selama 24 jam pertama untuk mencegah hipoglikemik syok. Setelah 5 hari pasca induksi STZ, darah diambil melalui ekor. Hiperglikemia dinilai dengan mengukur kadar gula darah puasa (GDP). Tikus dengan GDP >250 mg/dL dikatakan DMT2 dan lanjut menjadi sampel penelitian. Jika GDP <250 mg/dL akan dieksklusi (Gandhi *et al.*, 2013). Setelah didapatkan tikus dengan DMT2 selanjutnya dilakukan random assignment untuk pembagian kelompok (Siswanto *et al.*, 2014).

3.9.4 Pemberian *Alpha Lipoic Acid* dan Sulfonilurea pada Hewan Coba

Alpha lipoic acid dan sulfonilurea diberikan setiap hari secara per oral selama 30 hari. Dosis ALA yang diberikan dibagi dalam 4 kelompok yaitu: kelompok A dengan dosis ALA 0,3375 mg; kelompok B 1,35 mg; kelompok C 5,4 mg; dan kelompok D 21,6 mg. Dosis sulfonilurea diberikan terhadap kelompok kontrol positif setiap hari per oral selama 30 hari sebesar 0,09 mg.

3.9.5 Pengukuran Kadar Asetilkolin dan NFκβ

Setelah 30 hari perlakuan, tikus diterminasi menggunakan eter dan dilakukan pembedahan untuk diambil jaringan otaknya sebagai sampel. Setelah semua sampel siap kemudian dilakukan pengukuran kadar asetilkolin dan NFκβ menggunakan metode elisa. Pengukuran dilakukan sesuai prosedur sebagai berikut.

- a. Pengukuran Kadar Asetilkolin
1. Sampel jaringan otak dibilas menggunakan PBS (pH 7,4) untuk menghilangkan darah dan ditimbang sebelum dilakukan homogenisasi.
 2. Siapkan jaringan otak 100 mg dalam eppendorf.
 3. Menghomogenkannya dalam PBS (pH 7,4) dengan gelas *homogenizer* pada es. Suhu 2-8 °C atau -20 °C. Kemudian disentrifuge dengan kecepatan 2000-3000 RPM selama 20 menit.
 4. Mengambil supernatan dengan hati-hati (sampel)
 5. Bawa sampel ke suhu ruangan sebelum digunakan.
 6. Menyiapkan larutan standart
 7. Setelah larutan standart dan sampel siap, proses pengujian kadar dilakukan dalam suhu ruangan.
 8. Menentukan jumlah *well strips* yang akan digunakan untuk pengujian kadar. Memasukkan *well strips* pada frame untuk digunakan. *Well strip* yang tidak digunakan disimpan pada suhu 2-8 °C.
 9. Menambahkan 50 µL larutan standart pada *standard well*.
 10. Menambahkan 40 µL sampel pada *sample wells* dan lalu menambahkan 10µL anti-Ach antibodi pada *sample wells*. Lalu menambahkan streptavidin-HRP pada *sample wells* dan *standard well* (bukan *blank control well*). Mencampur *well*. Menutup pelat dengan penutup. Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C.
 11. Buka penutup dan bilas pelat 5 kali dengan pembilas buffer. Merendam *wells* dengan pembilas buffer paling tidak 0,35 mL selama 30 detik sampai 1 menit untuk masing-masing bilasan. Mengeringkan pelat dengan kertas serap atau bahan penyerap lainnya.
 12. Menambahkan larutan substrat A ke masing-masing *well* dan lalu menambahkan larutan substrat B ke masing-masing *well*. Inkubasi pelat dengan penutup yang baru selama 10 menit pada suhu 37 °C dengan kondisi gelap.
 13. Menambahkan 50 µL *stop solution* ke masing-masing *well*, warna biru akan segera berubah menjadi kuning.

14. Menentukan *optical density* (OD value) pada masing-masing *well* segera menggunakan *microplate reader* dengan gelombang 450 nm dalam waktu 30 menit setelah penambahan *stop solution*.
15. Membaca hasil kadar asetilkolin
 - b. Pengukuran Kadar NFκβ
 1. Sampel jaringan otak dibilas menggunakan PBS (pH 7,4) untuk menghilangkan darah dan ditimbang sebelum dilakukan homogenisasi.
 2. Siapkan jaringan otak 100 mg dalam eppendorf.
 3. Menghomogenkannya dalam PBS (pH 7,4) dengan gelas *homogenizer* pada es. Suhu 2-8 °C atau -20 °C. Kemudian disentrifuge dengan kecepatan 2000-3000 RPM selama 20 menit.
 4. Mengambil supernatan dengan hati-hati (sampel)
 5. Bawa sampel ke suhu ruangan sebelum digunakan.
 6. Menyiapkan larutan standart
 7. Setelah larutan standart dan sampel siap, proses pengujian kadar dilakukan dalam suhu ruangan.
 8. Menentukan jumlah *well strips* yang akan digunakan untuk pengujian kadar. Memasukkan *well strips* pada frame untuk digunakan. *Well strips* yang tidak digunakan disimpan pada suhu 2-8 °C.
 9. Menambahkan 50 µL larutan standart pada *standard well*.
 10. Menambahkan 40 µL sampel pada *sample wells* dan lalu menambahkan 10µL anti-NFκβ antibodi pada *sample wells*. Lalu menambahkan streptavidin-HRP pada *sample wells* dan *standard well* (bukan *blank control well*). Mencampur *well*. Menutup pelat dengan penutup. Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C.
 11. Buka penutup dan bilas pelat 5 kali dengan pembilas buffer. Merendam *wells* dengan pembilas buffer paling tidak 0,35 mL selama 30 detik sampai 1 menit untuk masing-masing bilasan. Mengeringkan pelat dengan kertas serap atau bahan penyerap lainnya.
 12. Menambahkan larutan substrat A ke masing-masing *well* dan lalu menambahkan larutan substrat B ke masing-masing *well*. Inkubasi pelat

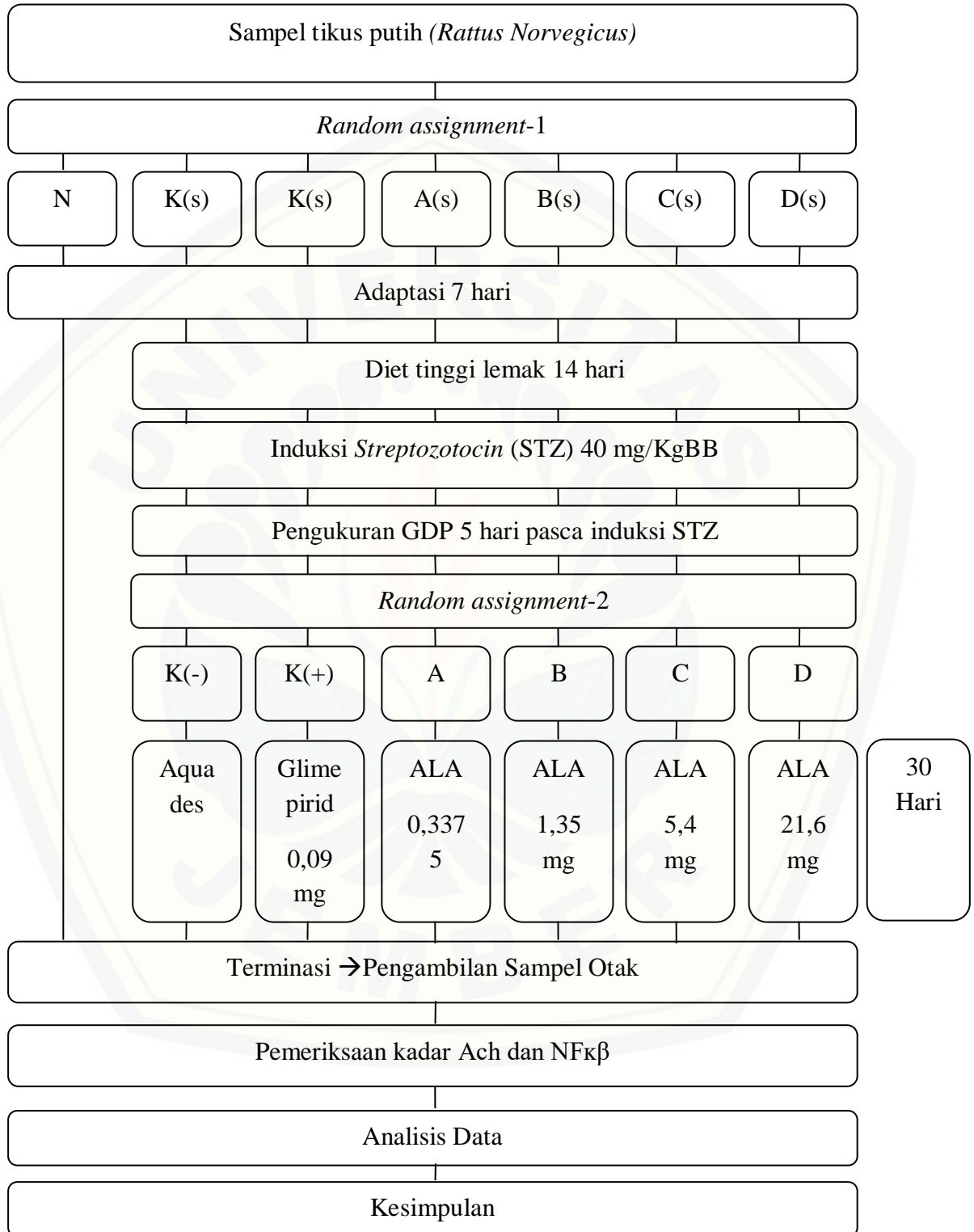
dengan penutup yang baru selama 10 menit pada suhu 37 °C dengan kondisi gelap.

13. Menambahkan 50 μL *stop solution* ke masing-masing *well*, warna biru akan segera berubah menjadi kuning.
14. Menentukan *optical density* (OD value) pada masing-masing *well* segera menggunakan *microplate reader* dengan gelombang 450 nm dalam waktu 30 menit setelah penambahan *stop solution*.
15. Membaca hasil kadar NF κ B.

3.10 Analisis Data

Data yang dianalisis ialah kadar asetilkolin dan NF κ B hewan coba. Analisis data dimulai dengan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Diperoleh sebaran data normal ($p > 0,05$) dan homogen pada kadar asetilkolin maka dilanjutkan uji komparasi menggunakan *OneWay Anova* kemudian untuk menilai perbedaan yang signifikan pada tiap kelompok digunakan uji *Post Hoc LSD*. Uji normalitas dan homogenitas kadar NF κ B diperoleh sebaran data normal ($p > 0,05$) dan tidak homogen ($p < 0,05$) maka dilanjutkan uji komparasi menggunakan *OneWay Anova* kemudian untuk menilai perbedaan yang signifikan pada tiap kelompok digunakan uji *Post Hoc Tamhane's* (Dahlan, 2013).

3.11 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut

1. ALA mampu meningkatkan kadar asetilkolin jaringan otak tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2
2. ALA tidak mampu menurunkan kadar NF κ B jaringan otak tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh maka peneliti mempunyai saran sebagai berikut

1. Penelitian lebih lanjut mengenai efek ALA secara molekuler untuk menghambat terjadinya alzheimer pada tikus yang diinduksi diabetes mellitus tipe 2.
2. Penelitian mengenai efek ALA terhadap kadar asetilkolin dan NF κ B tikus diabetes mellitus tipe 2 dengan sampel darah dan cairan serebrospinal sebagai marker deteksi dini atau prognosis keparahan alzheimer akibat komplikasi diabetes mellitus tipe 2.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, B. B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*. 3(9): 745.
- Akter, K., E. A. Lanza, S. A. Martin, N. Myronyuk, M. Rua, R. B. Raffa. 2011. Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: Shared Pathology and Treatment?. *British Journal Clinical Pharmacology*. 71(3): 365-376.
- Alzheimer's Association. 2018. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 14: 367-429.
- Bappenas. 2013. *Proyeksi Penduduk Indonesia 2010-2035*. Jakarta: Badan Pusat Statistik Republik Indonesia.
- Barnett, S. D. dan I. L. O. Buxton. 2017. The role of S-nitrosoglutathione Reductase (GSNOR) in human disease and therapy. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 52(3): 340-354.
- Bhatti, F., W. M. Richard, A. Laureano, T. Q. Mark, J. W. William, M. Christine. 2005. Mechanisms of Antioxidant and Pro-oxidant Effect of Alpha Lipoic Acid in The Diabetic And Nondiabetic Kidney. *Kidney International*. 67: 1371-1380.
- Butterfield, D. A., F. D. Domenico, E. Barone. 2014. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: A key role for oxidative stress in brain. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1842: 1693-1706.
- Cadirci, E., B. Z. Altunkaynak, Z. Halici, F. Odabasoglu, M. H. Uyanik, C. Gundogdu, H. Suleyman, M. Halici, M. Albayrak, dan B. Unal. 2010. Alpha-lipoic acid as a potential target for the treatment of lung injury caused by cecal ligation and puncture-induced sepsis model in rats. *Shock*. 33: 479-484.
- Cakatay, U., K. Refik, S. Ahmet, T. Fatma. 2004. Prooxidant Activities Of Alpha Lipoic Acid On Oxidative Protein Damage In The Aging Rat Heart Muscle. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 40 : 231-240.
- Cardoso, S. M., S. C. Correia, C. Carvalho, dan P. I. Moreira. 2017. Mitochondria in Alzheimer's Disease and Diabetes-Associated Neurodegeneration: License to Heal! In *Pharmacology of Mitochondria*. Hlm. 281-308. Springer, Cham

- Centers for Disease Control and Prevention. 2003. National diabetes fact sheet: general information and national estimates on diabetes in the United States, 2002. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.
- Chen, B.-Y., D. P. C. Lin, L. S. Chang, T. P. Huang, H. J. Liu, C. P. Luk, Y. L. Lo, H. H. Chan. 2013. Dietary α -lipoic acid prevents UVB-induced corneal and conjunctival degeneration through multiple effects. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54: 6757–6766.
- Dahlan, M. S. 2013. Statistika untuk kedokteran dan kesehatan. Jakarta. Salemba medika.
- David, S.H.dan M. B. Bell. 2004. Practical Considerations and Guidelines for Dosing Sulfonylureas as Monotherapy or Combination Therapy. *Clinical Therapeutics*. 26(11): 1714-1727.
- DeFronzo, R. A. 2009. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*. 58: 773-795.
- Di Curzio, D. L., E. Turner-Brannen, M. R. Del Bigio. 2014. Oral antioxidant therapy for juvenile rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Fluids Barriers CNS*. 11: 23-33.
- Dominguez, J., M. Yorek, M. Grant. 2014. Combination therapies prevent the neuropathic, pro-inflammatory characteristics of the bone marrow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 9: 1–53.
- Evans, J. L., D. Ira, Goldfine, A. Betty, Maddux, dan G. M. Grodsky. 2002. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*. 23(5): 599–622.
- Farooqui, A. A. dan T. Farooqui. 2018. Contribution of Diabetes and Metabolic Syndrome in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *In Role Of The Mediterranean Diet In The Brain And Neurodegenerative Diseases*. Hlm. 301-316.
- Fatmawati, H., Satuman, S. W. Endang, A. Rudijanto, M. R. Indra. 2010. The Role Of Lycopene to Nuclear Factor Kappa Beta (Nf- κ B) Activities and Intracellular Cell Adhesion Molecule-1 (Icam-1) Expressions on Leptin Induced Endothelial Cell. *Jurnal Ilmu Dasar*. 11 (2): 143- 150.
- Fava, A., D. Pirritano, M. Platino, D. Cristiano, G. Puccio, C. Colica, C. Ermio, M. D. Bartolo, G. Mauro, D. Bosco. 2013. The Effect of Lipoic Acid

Therapy on Cognitive Functioning in Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Neurodegenerative Disease*.

Ferreira-Vieira, T. H., M. Isabella, Guimaraes, R. F. Silva, dan F. B. Ribeiro. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*. 14: 101-115.

Gandhi, G. R., S. Antony, B. Kedike, I. Savarimuthu, G. P. Michael, V. Rajagopal. 2013. Insulin sensitization via partial agonism of PPAR γ and glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway by embelin in type 2 diabetic rats. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830 : 2243–2255.

Gloire, G., S. Legrand-Poels, dan J. Piette. 2006. NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology*. 72(11). 1493–1505.

Gomes, M. B., dan C. A. Negrato. 2014. Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Journal of Diabetol Metabolic Syndrom*. 6(1): 80.

Gordon, M. H. 1990. Measuring Antioksidan Activity. New York: CRC Press.

Haugaard, N., dan R. M. Levin. 2000. Regulation of the activity of choline acetyl transferase by lipoic acid. *Mol Cell Biochem*. 213: 61–63.

Holmquist, L., G. Stuchbury, K. Berbaum, S. Muscat, S. Young, K. Hager, J. Engel, dan G. Munch. 2007. Lipoic acid as a novel treatment for alzheimer's disease and related dementias. *Pharmacology & Therapeutics*. 113: 154–164.

Hsieh, H. L., dan C. M. Yang. 2013. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Bio Med Research International*. 2013.

Hsu, C. C., M. L. Wahlqvist, M. S. Lee, dan H. N. Tsai. 2011. Incidence of Dementia is Increased in Type 2 Diabetes and Reduced by the Use of Sulfonylureas and Metformin. *Journal of Alzheimer's Disease*. 24(2011): 485-493.

Huang, C. C., C. M. Chung, H. B. Leu, L. Y. Lin, C. C. Chiu, Y. H. Chien, H. C. Chia, P. H. Huang, T. Z. Chen, S. J. Lin, J. W. Chen, dan W. L. Chan. 2014. Diabetes Mellitus and the Risk of Alzheimer's Disease: A Nationwide Population-Based Study. *PLoS ONE*. 9(1): 87095.

- Jakicic, J. M., S. A. Jaramillo, A. Balasubramanyam, B. Bancroft, J. M. Curtis, A. Mathews, M. Pereira, J. G. Regensteiner, P. M. Ribisl. 2009. Look Ahead Study Group. Effect of a lifestyle intervention on change in cardiorespiratory fitness in adults with type 2 diabetes: results from the Look AHEAD Study. *Int J Obes (Lond)*. 33(3): 305.
- Japardi, I. 2002. *Penyakit Alzheimer*. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara. Hlm. 1-11.
- Javed H., M. M. Khan, A. Ahmad, K. Vaibhav, M. E. Ahmad, A. Khan, M. Ashafaq, F. Islam, M. S. Siddiqui, M. M. Safhi, dan F. Islam. 2012. Rutin Prevents Cognitive Impairments by Ameliorating Oxidative Stress and Neuroinflammation in Rat Model of Sporadic Dementia of Alzheimer Type. *Neuroscience*. 210 (2012): 340–352.
- Katzung, Bertram G. 2004. *Intoduction to Autonomic Pharmacology in Basic and Clinical Pharmacology Ninth Edition Page 75-93*. USA : McGraw Hill.
- Kaur, U., B. Priyanjalee, B. Aritri, S. Maitrayee, B. Atanu, dan C. Sasanka. 2015. Reactive Oxygen Species, Redox Signaling and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: The NF- κ B Connection. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2015(15): 446-457.
- Kemenkes. 2015. *Strategi Nasional Penanggulangan Penyakit Alzheimer dan Demensia Lainnya: Menuju Lanjut Usia Sehat dan Produktif*. Jakarta.
- Kim, M. Y., E. J. Kim, Y. N. Kim, C. Choi, B. H. Lee. 2011. Effects of α -lipoic acid and L-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats. *Journal of Nutritional Research anf Practice*. 5(5): 421–428.
- Kivipelto, M., Ngandu, T., Fratiglioni, L., Viitanen, M., Kareholt, I., Winblad, B., Helkala, E. L., Tuomilehto, J., Soininen, H., Nissinen, A. 2005. *Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease*. *Arch Neurol*. 62: 1556–60.
- Kroner, Z. 2009. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: type 3 diabetes?. *Altern Med Rev*. 14: 373–9.
- Lanctot, D. L., R. D. Rajaram, N. Herrmann. 2009. Review: therapy for Alzheimer's disease: how effective are current treatments? *Ther Adv Neurol*. 2: 163–80.
- Larson, E. B., M. F. Shadlen, L. Wang, W. C. McCormick, J. D. Bowen, L. Teri, dan W. A. Kukull. 2004. Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Ann Intern Med*. 140: 501.

- Levy, Y., dan T. J. Ellis. 2011. A guide for novice researchers on experimental and quasiexperimental studies in information systems research. *Interdisciplinary Journal of Information, Knowledge, and Management*. 6 : 151-161.
- Li, X., S. S. Dalin, X. Leng. 2016. Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment. *Clinical Interventions in Aging*. 10 : 549-560.
- Lin, E. H., C. M. Rutter, W. Katon, S. R. Heckbert, P. Ciechanowski, M. M. Oliver, E. J. Ludman, B. A. Young, L. H. Williams, D. K. McCulloch, dan K. M. Von. 2010. Depression and advanced complications of diabetes: a prospective cohort study. *Diabetes Care*. 33: 264.
- Lombardo, S., dan M. Uwe. 2014. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology xxx*: 1-8
- Luchsinger, J. A. 2012. Type 2 Diabetes and Cognitive Impairment: Linking Mechanisms. *J Alzheimer Dis*. 30(0):1-18.
- Medicinus. 2014. *Scientifi journal of pharmaeucetical development and medcial aplicatio*. Volume 27, no.2. Edition august 2014. ISSN 1979-39x
- Mi, Y. K., J. K. Eun, N. K. Young, C. Changsun, dan H. L. Bog. 2011. Effects of α -lipoic acid and L-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats. *Nutrition Research and Practice (Nutr Res Pract)*. 5(5):421-428.
- Morgan, M. J., dan Z. G. Liu. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research*. 21(1): 103-115.
- Moreira, P. I. 2014. Metformin in the diabetic brain: friend or foe?. *Journal of Annals of Translational Medicine*. 2(6): 54.
- Moura, F. A., Q. A. Kivia, C. F. S. Juliana, dan O. F. G. Marilia. 2015. Lipoic Acid: Its Antioxidant and Anti-Inflammatory Role and Clinical Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 15: 458-483.
- Mozaffarian, D., A. Kamineni, M. Carnethon, L. Djousse, K. J. Mukamal, dan D. Siscovick. 2009. Lifestyle risk factors and new-onset diabetes mellitus in older adults: the cardiovascular health study. *Arch Intern Med*. 169: 798-807.
- Najafi, R., Sharifi, A. M., dan Hosseini, A. 2014. Protective effects of alpha lipoic acid on high glucose-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Metabolic Brain Disease*. 30(3): 731-738.

- Perera, J., J. H. Tan, S. Jeevathayaparan, S. Chakravarthi, dan N. Haleagrahara. 2011. Neuroprotective Effects of Alpha Lipoic Acid on Haloperidol-Induced Oxidative Stress in the Rat Brain. *Journal of Cell and Bioscience*. 1(1): 12.
- Perdossi. 2015. *Panduan Praktik Klinik Diagnosis dan Penatalaksanaan Demensia*. Jakarta.
- Perkeni. 2015. *Konsensus Pengelolaan Dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Di Indonesia 2015*. PB Perkeni. ISBN: 978-979-19388-6-0.
- Rivera, E. J., A. Goldin, N. Fulmer, R. Tavares, J. R. Wands, dan S. M. De La Monte. 2005. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis*. 8: 247–68.
- Rochette, L., G. Steliana, M. Adriana, dan V. Catherine. 2015. Alpha lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 93: 1021–1027
- Saraswathi, R., dan S. N. Devaraj. 2013. Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial function in alloxan induced diabetic rats: Role of alpha lipoic acid. *Biomed. Prev. Nutr*. 3: 213–219.
- Shay, K. P., R. F. Moreau, E. J. Smith, A. R. Smith, dan T. M. Hagen. 2009. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Journal of Biochim Biophys Acta*. 1790(10): 1149–1160.
- Siswanto, Susila, dan Suyanto. 2014. *Metodologi Penelitian Kombinasi Kualitatif Kuantitatif Kedokteran dan Kesehatan*. Yogyakarta : Boss Script.
- Song, M. K., D. S. Bischoff, A. M. Song, K. Uyemura, dan D. T. Yamaguchi. 2017. Metabolic Relationship between Diabetes and Alzheimer's Disease Affected by Cyclo (His-Pro) Plus Zinc Treatment. *Journal of BBA Clinical*. 7 (2017): 41-54.
- Tata, A. M., V. Lucia, D. A. Chiara, dan R. Marcella. 2014. Cholinergic System Dysfunction and Neurodegenerative Diseases: Cause or Effect?. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 13(7): 1294-1303.
- Thakurta, I. G., M. Chattopadhyay, A. Ghosh, dan S. Chakrabarti. 2012. Dietary supplementation with N-acetyl cysteine, α -tocopherol and α -lipoic acid reduces the extent of oxidative stress and proinflammatory state in aged rat brain. *Biogerontology*. 13: 479–488.

Tibullo, D., L. T. Giovanni, G. Cesarina, G. Sonia, T. Daniele, D. A. Carmelina, L. Gabriella, A. Francesco, A. Roberto, B. Vincenzo. 2017. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflammation Research*. 66(11): 947-959.

Trivedi, P. P., dan G. B. Jena. 2013. Role of α -lipoic acid in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice: studies on inflammation, oxidative stress, DNA damage and fibrosis. *Food Chem. Toxicol.* 59: 339–355.

World Health Organization. 2016. *Global Report on Diabetes*

Yarchoan, M., dan S. E. Arnold. 2014. Repurposing Diabetes Drugs for Brain InsulinResistance in Alzheimer Disease. *Journal of Diabetes*. 2014(63): 2253-2261.

Ying, Z., K. Thomas, S. Qinghua, P. Sampath, R. Sanjay. 2011. Evidence that α -lipoic acid inhibits NF- κ B activation independent of its antioxidant function. *Inflammation Research*. 60:219–225.

Zhao, R., F. Xu, X. Xu, G. Tan, L. Liu, N. Wu, W. Zhang, dan J. Liu. 2015. Effects of alpha-lipoic acid on spatial learning and memory, oxidative stress, and central cholinergic system in a rat model of vascular dementia. *Neuroscience Letters*. 587: 113–119.

Zhao, Y., P. M. Vanhoutte, dan S. W. S. Leung. 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*. 129(2): 83-94.

LAMPIRAN 3.1 ETHICAL CLEARANCE**3.1a Halaman Pertama Lembar Persetujuan Etik**

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**

ETHICAL APPROVA

Nomor : 1.170 /H25.1.11/KE/2018

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

PEMANFAATAN *Alpha Lipoic Acid* TERHADAP KADAR ASETILKOLIN DAN NF κ B DALAM MENGHAMBAT PROGRESIVITAS ALZHEIMER PADA TIKUS YANG DIINDUKSI DIABETES MELLITUS TIPE 2

Nama Peneliti Utama : Ahmad Syaikudin
Name of the principal investigator

NIM : 152010101031

Nama Institusi : Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 3 September 2018
Ketua Komisi Etik Penelitian



3.1b Halaman Kedua Lembar Persetujuan Etik

Tanggapan Anggota Komisi Etik

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

Review Proposal :

- Penggunaan hewan coba menggunakan prinsip 3R sesuai buku pedoman penelitian kesehatan
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pemeriksaan laboratorium.

Jember, 3 September 2016

Review Etik

Nama: dr. Rini Riyanti, Sp.PK



LAMPIRAN 3.2 PERHITUNGAN DOSIS HEWAN COBA1. Pemberian dosis *alpha lipoic acid*

Dosis manusia	= 600 mg
Konversi dosis tikus BB 200 g	= 600 x 0,018
	= 5,4 mg
Dosis Kelompok A	= 0,3375 mg (Penurunan dosis 4x)
Dosis Kelompok B	= 1,35 mg (Penurunan dosis 4x)
Dosis Kelompok C	= 5,4 mg
Dosis Kelompok D	= 21,6 mg (Kenaikan dosis 4x)

2. Pemberian dosis glimepirid

Dosis manusia	= 2 mg
Konversi dosis tikus BB 200 g	= 2 x 0,018
	= 0,09 mg

3. Pemberian dosis streptozotolin

Dosis tikus	= 40 mg/kgBB
-------------	--------------

Tabel Dosis STZ (mg)

Kelompok	N	K(-)	K(+)	A	B	C	D
1	9,88	7,92	8,76	7,36	8,76	7,68	7,72
2	7,56	7,8	8,16	7,8	7,6	7,84	7,56
3	7,72	8,72	7,88	9,24	10,12	9,04	9,12
4	9,12	9,52	10,04	9,64	7,36	9,68	9,16

Tabel Volume Buffer Sitrat (mL)

Kelompok	N	K(-)	K(+)	A	B	C	D
1	0,43	0,35	0,39	0,33	0,39	0,34	0,34
2	0,34	0,35	0,36	0,35	0,34	0,35	0,34
3	0,34	0,38	0,35	0,41	0,45	0,40	0,40
4	0,40	0,42	0,44	0,43	0,33	0,43	0,40

LAMPIRAN 3.3 DOKUMENTASI PENELITIAN



3.3.1 Sonde Telur



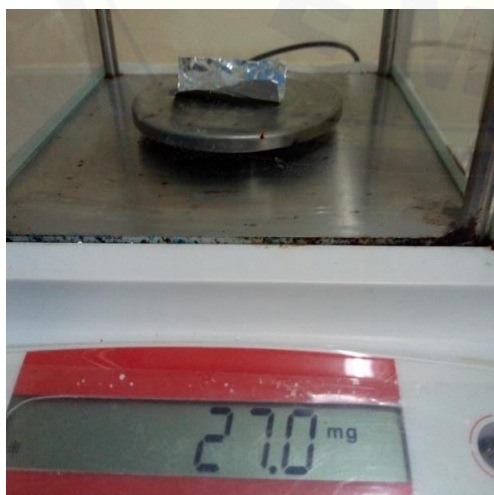
3.3.2 Timbang Tikus



3.3.3 Ukur GDP



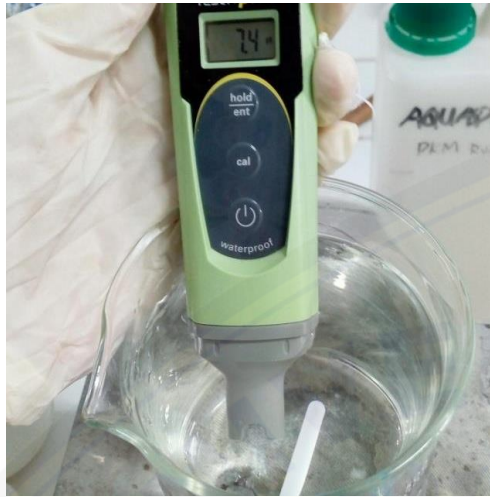
3.3.4 Induksi STZ



3.3.5 Timbang dosis ALA



3.3.6 Sonde ALA



3.3.7 Pembuatan PBS



3.3.8 Pengambilan Sampel Otak



3.3.9 Homogenkan sampel



3.3.10 Supernatan sampel

LAMPIRAN 4.1 DATA PENELITIAN

4.1.1 Data Berat Badan Tikus (gram)

Kelompok	N	K(-)	K(+)	A	B	C	D
1	198	192	184	247	219	219	204,33
2	195	196	195	189	204	190	177,67
3	218	226	231	193	197	253	220,67
4	238	242	241	228	251	184	203,33

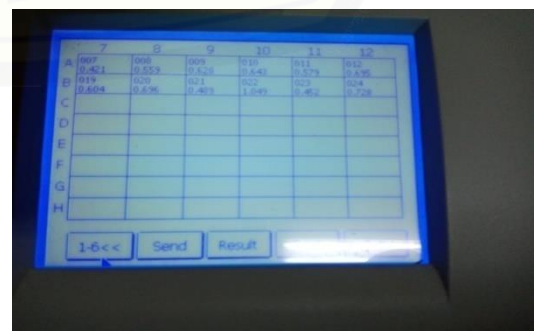
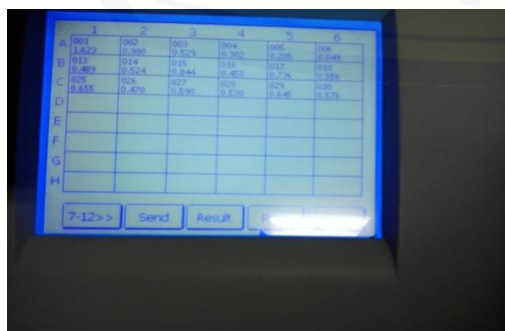
4.1.2 Hasil Tes Gula Darah Puasa (mg/dL)

Kelompok	N	K(-)	K(+)	A	B	C	D
1	-	451	535	264	384	363	412
2	-	378	265	397	413	300	309
3	-	361	502	363	396	321	354
4	-	363	257	526	345	545	465

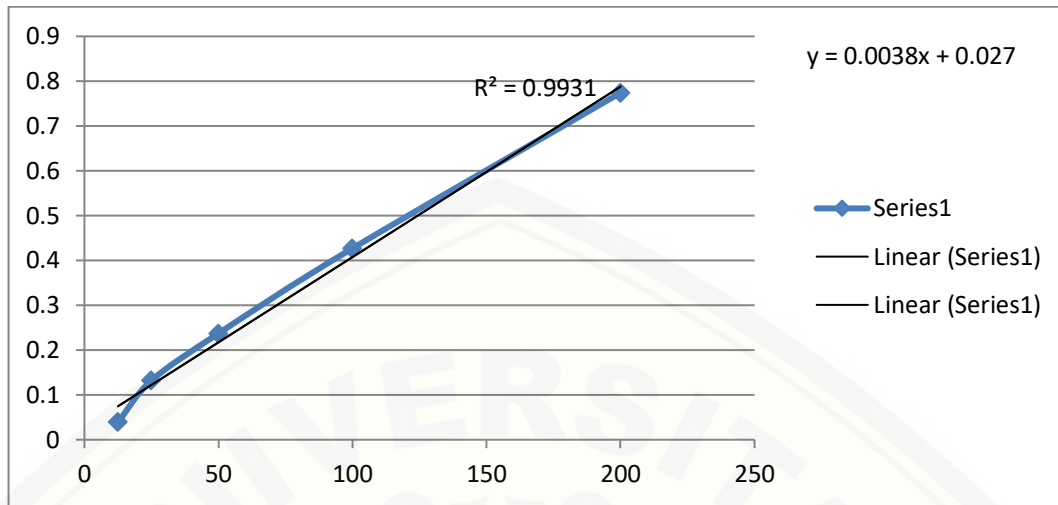
4.1.3 Nilai Absorbansi Asetilkolin



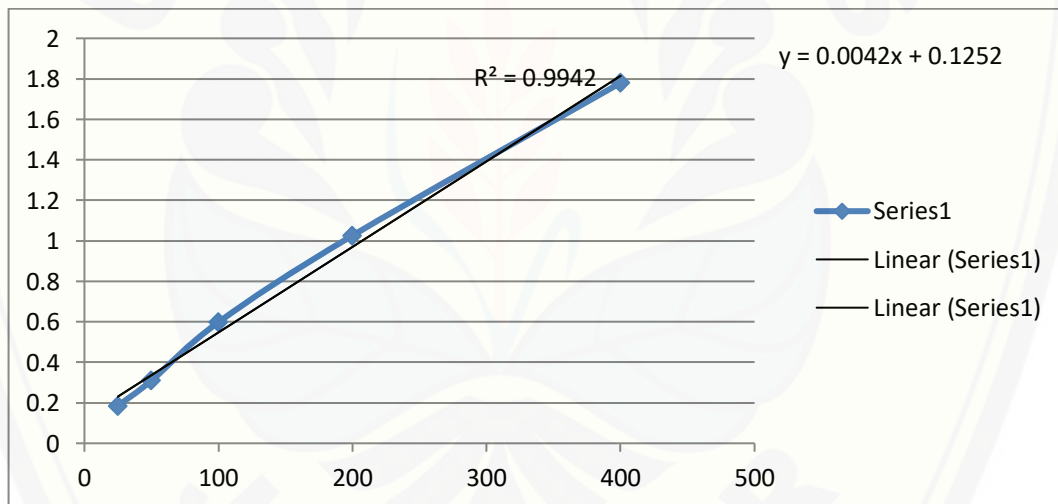
4.1.4 Nilai Absorbansi NFκβ



4.1.5 Persamaan Garis Fungsi Absorbansi Standart dan Kadar Asetilkolin



4.1.6 Persamaan Garis Fungsi Absorbansi Standart dan Kadar NFκβ



4.1.7 Kadar Asetilkolin (ng/mL)

Kelompok	N	K(-)	K(+)	A	B	C	D
1	111,33	118,67	128,33	215,33	173,67	168	204,33
2	105,33	78	131,33	156,33	136	23	177,67
3	82	32,67	116,67	137,33	132,67	217,67	220,67
4	113,33	73,33	54	121	168	232	203,33
Rata-rata	103	75,67	107,58	157,5	152,58	160,17	201,5
STDev	14,41	35,16	36,28	41,17	21,24	95,47	17,76

4.1.8 Kadar NFκβ (ng/mL)

Kelompok	N	K(-)	K(+)	A	B	C	D
1	88	134,5	137,5	134,5	120,25	67,25	100
2	88,75	132,5	131	158,75	115	37	141,75
3	94,75	125,75	95,75	48	97	112,75	137,25
4	110,75	110,75	30,75	94,25	102	98,25	110,25
Rata-rata	95,56	125,87	98,75	108,87	108,56	78,81	122,31
STDev	10,57	10,75	48,9	48,52	10,87	33,72	20,36



LAMPIRAN 4.2 ANALISIS DATA

4.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Tests of Normality

	Kelompo k	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar	N	,314	4	.	,815	4	,133
Asetilkolin	K(-)	,224	4	.	,967	4	,822
	K(+)	,349	4	.	,769	4	,057
	A	,261	4	.	,909	4	,478
	B	,282	4	.	,829	4	,165
	C	,283	4	.	,844	4	,207
	D	,291	4	.	,933	4	,611

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Kadar Asetilkolin

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,400	6	21	,063

Tests of Normality

	Kelompo k	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar	N	,281	4	.	,826	4	,158
NFkb	K(-)	,245	4	.	,877	4	,326
	K(+)	,245	4	.	,875	4	,317
	A	,201	4	.	,971	4	,846
	B	,227	4	.	,928	4	,580
	C	,218	4	.	,960	4	,776
	D	,268	4	.	,885	4	,360

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Kadar NFkb

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,316	6	21	,019

4.2.2 Uji One Way Anova**ANOVA**

Kadar Asetilkolin

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	44572,040	6	7428,673	3,627	,013
Within Groups	43007,833	21	2047,992		
Total	87579,873	27			

ANOVA

Kadar NFkb

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6300,402	6	1050,067	1,106	,392
Within Groups	19931,063	21	949,098		
Total	26231,464	27			

4.2.3 Uji Post Hoc**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Kadar Asetilkolin

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
N	K(-)	27,33333	31,99994	,403	-39,2142	93,8808
	K(+)	-4,58333	31,99994	,887	-71,1308	61,9642
	A	-54,50000	31,99994	,103	-121,0475	12,0475

	B	-49,58333	31,99994	,136	-116,1308	16,9642
	C	-57,16667	31,99994	,088	-123,7142	9,3808
	D	-98,50000*	31,99994	,006	-165,0475	-31,9525
K(-)	N	-27,33333	31,99994	,403	-93,8808	39,2142
	K(+)	-31,91667	31,99994	,330	-98,4642	34,6308
	A	-81,83333*	31,99994	,018	-148,3808	-15,2858
	B	-76,91667*	31,99994	,026	-143,4642	-10,3692
	C	-84,50000*	31,99994	,015	-151,0475	-17,9525
	D	-125,83333*	31,99994	,001	-192,3808	-59,2858
	K(+)	N	4,58333	31,99994	,887	-61,9642
K(-)		31,91667	31,99994	,330	-34,6308	98,4642
A		-49,91667	31,99994	,134	-116,4642	16,6308
B		-45,00000	31,99994	,174	-111,5475	21,5475
C		-52,58333	31,99994	,115	-119,1308	13,9642
D		-93,91667*	31,99994	,008	-160,4642	-27,3692
A		N	54,50000	31,99994	,103	-12,0475
	K(-)	81,83333*	31,99994	,018	15,2858	148,3808
	K(+)	49,91667	31,99994	,134	-16,6308	116,4642
	B	4,91667	31,99994	,879	-61,6308	71,4642
	C	-2,66667	31,99994	,934	-69,2142	63,8808
	D	-44,00000	31,99994	,184	-110,5475	22,5475
	B	N	49,58333	31,99994	,136	-16,9642
K(-)		76,91667*	31,99994	,026	10,3692	143,4642
K(+)		45,00000	31,99994	,174	-21,5475	111,5475
A		-4,91667	31,99994	,879	-71,4642	61,6308
C		-7,58333	31,99994	,815	-74,1308	58,9642
D		-48,91667	31,99994	,141	-115,4642	17,6308
C		N	57,16667	31,99994	,088	-9,3808
	K(-)	84,50000*	31,99994	,015	17,9525	151,0475
	K(+)	52,58333	31,99994	,115	-13,9642	119,1308
	A	2,66667	31,99994	,934	-63,8808	69,2142
	B	7,58333	31,99994	,815	-58,9642	74,1308
	D	-41,33333	31,99994	,211	-107,8808	25,2142
	D	N	98,50000*	31,99994	,006	31,9525
K(-)		125,83333*	31,99994	,001	59,2858	192,3808
K(+)		93,91667*	31,99994	,008	27,3692	160,4642
A		44,00000	31,99994	,184	-22,5475	110,5475

B	48,91667	31,99994	,141	-17,6308	115,4642
C	41,33333	31,99994	,211	-25,2142	107,8808

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar NFkb

Tamhane's

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
N	K(-)	-30,31250	21,78415	,179	-75,6151	14,9901
	K(+)	-3,18750	21,78415	,885	-48,4901	42,1151
	A	-13,31250	21,78415	,548	-58,6151	31,9901
	B	-13,00000	21,78415	,557	-58,3026	32,3026
	C	16,75000	21,78415	,451	-28,5526	62,0526
	D	-26,75000	21,78415	,233	-72,0526	18,5526
K(-)	N	30,31250	21,78415	,179	-14,9901	75,6151
	K(+)	27,12500	21,78415	,227	-18,1776	72,4276
	A	17,00000	21,78415	,444	-28,3026	62,3026
	B	17,31250	21,78415	,436	-27,9901	62,6151
	C	47,06250*	21,78415	,042	1,7599	92,3651
	D	3,56250	21,78415	,872	-41,7401	48,8651
K(+)	N	3,18750	21,78415	,885	-42,1151	48,4901
	K(-)	-27,12500	21,78415	,227	-72,4276	18,1776
	A	-10,12500	21,78415	,647	-55,4276	35,1776
	B	-9,81250	21,78415	,657	-55,1151	35,4901
	C	19,93750	21,78415	,370	-25,3651	65,2401
	D	-23,56250	21,78415	,292	-68,8651	21,7401
A	N	13,31250	21,78415	,548	-31,9901	58,6151
	K(-)	-17,00000	21,78415	,444	-62,3026	28,3026
	K(+)	10,12500	21,78415	,647	-35,1776	55,4276
	B	,31250	21,78415	,989	-44,9901	45,6151
	C	30,06250	21,78415	,182	-15,2401	75,3651
	D	-13,43750	21,78415	,544	-58,7401	31,8651
B	N	13,00000	21,78415	,557	-32,3026	58,3026

	K(-)	-17,31250	21,78415	,436	-62,6151	27,9901
	K(+)	9,81250	21,78415	,657	-35,4901	55,1151
	A	-,31250	21,78415	,989	-45,6151	44,9901
	C	29,75000	21,78415	,186	-15,5526	75,0526
	D	-13,75000	21,78415	,535	-59,0526	31,5526
C	N	-16,75000	21,78415	,451	-62,0526	28,5526
	K(-)	-47,06250*	21,78415	,042	-92,3651	-1,7599
	K(+)	-19,93750	21,78415	,370	-65,2401	25,3651
	A	-30,06250	21,78415	,182	-75,3651	15,2401
	B	-29,75000	21,78415	,186	-75,0526	15,5526
	D	-43,50000	21,78415	,059	-88,8026	1,8026
D	N	26,75000	21,78415	,233	-18,5526	72,0526
	K(-)	-3,56250	21,78415	,872	-48,8651	41,7401
	K(+)	23,56250	21,78415	,292	-21,7401	68,8651
	A	13,43750	21,78415	,544	-31,8651	58,7401
	B	13,75000	21,78415	,535	-31,5526	59,0526
	C	43,50000	21,78415	,059	-1,8026	88,8026

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 4.3 REKOMENDASI BEBAS PLAGIASI**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN**

Jl. Kalimantan I/37 Kampus Tegal Boto. Telp. (0331) 337877, Fax (0331) 324446
Jember 68121.

REKOMENDASI BEBAS PLAGIASI

Nomor : 8 /H25.1.11/KBSI/2018

Komisi bimbingan Skripsi dan Ilmiah, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya peningkatan kualitas dan originalitas karya tulis ilmiah mahasiswa berupa skripsi, telah melakukan pemeriksaan plagiasi atas skripsi yang berjudul :

**EFEK PEMBERIAN *ALPHA LIPOIC ACID* TERHADAP KADAR
ASETILKOLIN DAN NF κ B PADA TIKUS YANG DIINDUKSI
DIABETES MELLITUS TIPE 2**

Nama Penulis : Ahmad Syaikudin
NIM. : 152010101031
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Telah menyetujui dan dinyatakan "BEBAS PLAGIASI"

Surat Rekomendasi ini dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 19 Desember 2018
Komisi Bimbingan Skripsi & Ilmiah
Ketua,

Dr., dr. Yunita Armiyanti, M.Kes
NIP. 19740604 200112 2 002