

HASIL CEK_ARTIKEL 8 VS DISERTASI

by Sapto Yuliani 60990200

Submission date: 05-Nov-2020 09:13AM (UTC+0700)

Submission ID: 1436488868

File name: ARTIKEL_8_VS_DISERTASI.pdf (4.84M)

Word count: 63795

Character count: 319174

3

EFEK EKSTRAK RIMPANG KUNYIT (*Curcuma longa* Linn)

TERSTANDAR KURKUMIN PADA TIKUS MODEL

DEMENSIA YANG DIINDUKSI TRIMETILTIN

Disertasi



Diajukan oleh:

Sapto Yuliani

11/324334/SKU/00420

Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan

Fakultas Kedokteran

Universitas Gadjah Mada

2016

LEMBAR PENGESAHAN

Penelitian untuk Disertasi

3
EFEK EKSTRAK RIMPANG KUNYIT (*Curcuma longa* Linn)
TERSTANDAR KURKUMIN PADA TIKUS MODEL
DEMENSIA YANG DIINDUKSI TRIMETILTIN

Oleh :

Sapto Yuliani

11/324334/SKU/00420

Telah disetujui oleh :

Promotor

Tanggal _____

Prof. Dr. Mustofa, M.Kes., Apt

Ko-Promotor 1

Tanggal _____

dr. Ginus Partadiredja, M.Sc., Ph.D.

Ko-Promotor 2

Tanggal _____

drh. Sitarina Widyarini, MP., Ph.D.

SURAT PERNYATAAN

Dengan ini kami menyatakan bahwa Disertasi atas nama :

Nama : Sapto Yuliani

No. Mahasiswa : 11/324334/SKU/00420

Judul Disertasi : Efek Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma longa* L) Terstandar Kurkumin pada Tikus Model Demensia yang Diinduksi Trimetiltin

telah diperbaiki sesuai masukan Tim Penguji pada Ujian Tertutup yang dilaksanakan pada tanggal 21 Januari 2016

Yogyakarta, 5 Februari 2016


Yang menyatakan,

Sapto Yuliani

(Promovendus)

Menyetujui Tim Penguji :

Tandatangan

- | | | |
|--|-----------|---|
| 1. Prof. dr. Sofia Mubarika Haryana, M.Med.Sc.,
Ph.D | (Ketua) | _____ |
| 2. Prof. Dr. Mustofa, M.Kes., Apt | (Anggota) | _____ |
| 3. dr. Ginus Partadiredja, M.Sc., Ph.D. | (Anggota) | _____ |
| 4. drh. SitarinaWidyarini, MP., Ph.D. | (Anggota) | _____ |
| 5. Prof. Dr. dr. SamektoWibowo, P.Far.K.,
Sp.S(K),Sp.FK(K). | (Anggota) | _____ |
| 6. Dr. Med. dr. Indwiani Astuti | (Anggota) | _____ |
| 7. dr. Totok Utoro, D.Med.Sc., Sp.PA(K). | (Anggota) | _____ |
| 8. Prof. Dr. dr. HMT. Kamaluddin, M.Sc., Sp.FK. | (Anggota) | _____  |
| 9. dr. Nur Arfian, Ph.D. | (Anggota) | _____ |

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Disertasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 21 Januari 2016

Yang menyatakan ,

Sapto Yuliani

MOTTO

“Man Jadda Wajada”

(Whoever does something persistently will succeed)

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaykum warohmatullahi wabarokaatuh

Alhamdulillah rabbil'alamin, puji syukur ke hadirat Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat, nikmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan disertasi ini.

Penelitian ini dilakukan mengingat Indonesia merupakan negara yang memiliki kekayaan tanaman obat namun belum banyak yang dimanfaatkan. Rimpang kunyit (*Curcuma longa*, L) merupakan salah satu rimpang yang tidak hanya dikenal sebagai bumbu masakan Asia, termasuk Indonesia, namun juga merupakan obat untuk berbagai penyakit. Penggunaan obat herbal harus didasari pada bukti ilmiah dan terjamin keamanannya. Pengujian praklinik untuk mengamati patofisiologi dan molekuler farmakodinamik efek ekstrak kunyit sebagai pencegah demensia belum banyak dilakukan, sehingga mendorong penulis untuk melakukannya.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang tertulis di bawah ini :

1. Prof. Dr. Mustofa, M.Kes., Apt selaku pembimbing utama yang telah memberi bimbingan, nasehat, arahan dan dorongan moral yang sangat berguna dalam melaksanakan penelitian dan penyusunan disertasi ini .
2. dr. Ginus Partadiredja, M.Sc., Ph.D., selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, ilmu, nasehat dan dorongan moral yang sangat bermanfaat dalam melaksanakan penelitian dan penyusunan disertasi ini.

3. drh. Sitarina Widyarini, MP., Ph.D., yang telah memberikan bimbingan, ilmu, motivasi dan nasehat yang bermanfaat selama penelitian dan penyusunan disertasi.
4. Almarhum Dr. dr. Djoko Prakosa , yang telah memberikan bimbingan, ilmu dan nasehat selama penyusunan proposal penelitian ini.
5. Prof. Dr. dr. Samekto Wibowo, P.Far.K., Sp.S(K),Sp.FK(K), selaku penguji
6. Dr. Med. dr. Indwiani Astuti, selaku penguji
7. dr. Totok Utoro, D.Med.Sc., Sp.PA(K), selaku penguji
8. Prof. Dr. dr. HMT. Kamaluddin, M.Sc., Sp.FK., selaku penguji
9. dr. Nur Arfian, Ph.D., selaku penguji
10. Prof. dr. Sofia Mubarika Haryana, M.Med.Sc., Ph.D ., selaku ketua pengelola program doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan UGM.
11. Rektor Universitas Ahmad Dahlan (UAD) yang memberikan ijin, fasilitas dan kemudahan selama menjalankan studi.
12. Dekan dan seluruh staf Fakultas Farmasi UAD yang telah memberikan dorongan semangat untuk melanjutkan studi S3 dan memberikan kemudahan sampai penyelesaian studi S3,
13. Ibu dan almarhum bapak tercinta, yang telah memberi cinta, kasih sayang, doa, nasehat, motivasi, dan perjuangan yang tiada tara untuk membesarkan dan mewujudkan cita-cita ketujuh anak-anaknya.
14. Ibu dan almarhum bapak mertua, yang telah memberikan doa, nasehat dan semangat selama dan penyelesaian studi ini.
15. Suami tercinta (Ikhwanul Muttaqien) dan anak-anakku sayang (M. Aqila Zuhdi Muttaqien dan Fathina Hasna Firdausi Muttaqien) yang

telah dengan sabar dan penuh pengertian menyemangati selama proses studi ini.

16. Hamam Hudaya dan Samidi (Laboran laboratorium Farmakologi UAD), Yuli (Laboratorium Pangan dan Gizi, PAU, UGM) dan para mahasiswa: Naili Rafiah, Mutmainnah, Vania Sugestin, Yulianasari Pulungan, Safwan, Hanifa Kharimatulhaji, Didik Yuni P, dan Elinda, yang telah membantu secara teknis selama penelitian maupun penyusunan disertasi

17. Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi (DIKTI) yang telah memberi dana pendidikan melalui program Beasiswa Program Pasca Sarjana (BPPS) dan dana penelitian melalui skim Hibah Bersaing dan Hibah Disertasi Doktor.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas amal dan kebaikan yang telah bapak/ibu/saudara/i kepada penulis. Aamiin..

Wassalamu' alaikum warokhmatullahi wabarokaatuh

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
MOTTO	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xviii
ABSTRAK	xx
<i>ABSTRACT</i>	xxi
BAB I. LATAR BELAKANG.....	1
1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	7
1.3. Manfaat Penelitian.....	8
1.4. Keaslian Penelitian	9
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	13
2.1. Hippocampus.....	13
1. Anatomi	13
2. Fungsi Hippocampus.....	16
2.2. Memori	17
1. Definisi dan klasifikasi	17
2. Proses Memori.....	20
2.3. Demensia	22
1. Definisi	22
2. Epidemiologi	24
3. Patogenesis	24

4. Manajemen	26
2.4. Radikal Bebas	28
2.5. Peroksidasi lipid	30
2.6. Stres Oksidatif	32
2.7. Antioksidan	34
2.8. Trimetiltin.....	35
2.9. Kunyit (<i>Curcuma longa</i> Linn).....	37
2.10. Landasan Teori	39
2.12. Hipotesis Penelitian	44
BAB III. METODE PENELITIAN.....	46
3. 1. Rancangan Penelitian	46
3. 2. Variabel Penelitian	47
1. Variabel Bebas	47
2. Variabel Terpengaruh.....	47
3. Variabel Luar.....	48
3. 3. Definisi Operasional.....	48
3. 4. Alat, Bahan dan Tempat Penelitian	50
1. Alat	50
2. Bahan.....	51
3. Tempat Penelitian.....	52
3. 5. Prosedur Kerja Penelitian	53
1. Identifikasi rimpang kunyit	53
2. Ekstraksi dan standarisasi kurkumin dari rimpang kunyit	54
3. Pembuatan larutan TMT <i>chlorid</i>	55
4. Pembuatan larutan Sitikolin	55
5. Pembuatan larutan ekstrak	56
6. Pembuatan santan kelapa	56
7. Perlakuan hewan uji.	57
8. Uji memori spasial dengan <i>Morris water maze</i>	58
9. Penyiapan jaringan otak	61
10. Pengamatan biokimiawi	61

a.	Pengukuran kadar MDA darah	61
b.	Pengukuran kadar MDA otak	62
c.	Pengukuran aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)	62
d.	Pengukuran Aktivitas Katalase (CAT)	63
e.	Pengukuran aktivitas glutathion peroksidase (GPx).....	65
f.	Pengukuran aktivitas glutathion (GSH).....	66
g.	Pengukuran kadar protein otak tikus	67
11.	Pengamatan histologik	68
a.	Penyiapan jaringan hippocampus	68
b.	Pembuatan blok parafin	68
c.	Pemotongan blok jaringan hippocampus	69
d.	Estimasi volume daerah CA1 dan CA2-CA3 hippocampus	70
e.	Estimasi kepadatan numerik (<i>numerical density</i>).....	71
f.	Prosedur pengecatan imunohistokimia ekspresi protein <i>caspase-3</i> ...	74
12.	Analisis Data	75
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN		77
4.1.	Hasil.....	77
1.	Hasil identifikasi rimpang kunyit	77
2.	Hasil Ekstraksi dan Standarisasi.....	78
3.	Hasil penimbangan berat badan	79
4.	Hasil uji memori spasial	81
a.	<i>Acquisition trial</i>	81
b.	<i>Probe trial</i>	86
c.	Uji sensorimotor	89
5.	Uji biokimiawi.....	90
a.	Kadar MDA darah	90
b.	Kadar MDA otak	91
c.	Aktivitas SOD otak	92
d.	Aktivitas GPx.....	94
e.	Kadar GSH.....	95
f.	Aktivitas Katalase	96

6. Berat hippocampus dan uji histologik	97
a. Berat hippocampus	97
b. Uji histologik	99
4.2. PEMBAHASAN	108
1. Ekstraksi dan standarisasi ekstrak rimpang kunyit (<i>C. longa</i> Linn).....	108
2. Efek TMT dosis tunggal 8 mg/kg BB pada tikus <i>Sprague Dawley</i>	109
3. Efek ekstrak rimpang kunyit pada tikus <i>Sprague Dawley</i>	122
4. Efek ekstrak rimpang kunyit dibandingkan dengan sitikolin	128
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	130
5.1. Kesimpulan.....	130
5.2. Saran	131
RINGKASAN	132
SUMMARY	139
DAFTAR PUSTAKA	145
LAMPIRAN	170

DAFTAR TABEL

Tabel I. Hasil penelitian tentang aktivitas senyawa di dalam rimpang kunyit.....	9
Tabel II. Perlakuan pada kelompok penelitian.....	57
Tabel III. Jumlah penambahan larutan pada setiap sampel.....	63
Tabel IV. Rerata log 10 waktu latensi (Rerata \pm SEM)	82
Tabel V. Data log 10 (rerata \pm SEM) panjang lintasan	85
Tabel VI. Estimasi volume, kepadatan numerik, dan jumlah total sel pyramidal di daerah CA1	102
Tabel VII. Estimasi volume, kepadatan numerik, dan jumlah total sel pyramidal di daerah CA2-CA3	105

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Gambaran otak tikus yang terkait. CA1, CA2, CA3.....	13
Gambar 2. Gambaran histologik hippocampus dan sel pyramidal	15
Gambar 3. Diagram irisan hippocampus rodensia.	16
Gambar 4. Mekanisme molekuler terjadinya LTP.....	21
Gambar 5. Struktur sitikolin.....	27
Gambar 6. Proses peroksidasi lipid.....	31
Gambar 7. Rumus bangun Trimetiltin Klorida	35
Gambar 8. Gambaran histologik intoksikasi TMT pada hippocampus.....	37
Gambar 9. Struktur kurkumin	38
Gambar 10. Skema kerangka teori penelitian	43
Gambar 11. Skema rancangan penelitian efek ERKTK	46
Gambar 12. Skema jalannya penelitian.....	58
Gambar 13. Empat quadran bayangan pada kolam alat uji Morris <i>water maze</i> ...	60
Gambar 14. Gambar makroskopik hippocampus	68
Gambar 15. Gambaran mikroskopik potongan horisontal hippocampus	71
Gambar 16. Gambaran mikroskopik lapisan sel pyramidal CA1.	73
Gambar 17. Hasil identifikasi mikroskopik rimpang kunyit.....	77
Gambar 18. Kromatogram standar dan ekstrak kunyit	78
Gambar 19. Grafik kurva linier persamaan regresi.....	79
Gambar 20. Berat badan (rerata \pm SEM) tikus.....	79
Gambar 21. Gambaran klinis tikus <i>Sprague Dawley</i> diinjeksi TMT	80
Gambar 22. Data (rerata \pm SEM) waktu latensi (detik).	81
Gambar 23. Panjang lintasan (garis merah) tikus pada <i>acquisition trial</i>	83
Gambar 24. Data (rerata \pm SEM) panjang lintasan (m) tikus	84
Gambar 25. Grafik frekuensi (rerata \pm SEM) tikus.....	86
Gambar 26. Grafik (rerata \pm SEM) persentase (%) lama waktu	87
Gambar 27. Grafik (rerata \pm SEM) waktu latensi.....	89
Gambar 28. Grafik (rerata \pm SEM) kadar MDA plasma (mmol/L)	90
Gambar 29. Grafik (rerata \pm SEM) kadar MDA otak (nmol/mg)	91
Gambar 30. Grafik (rerata \pm SEM) aktivitas SOD otak (ng/mg protein).....	93

Gambar 31. Grafik (rerata ± SEM) aktivitas GPx (mU/mg protein)	94
Gambar 32. Grafik (rerata ± SEM) kadar GSH (μ g/mg protein)	95
Gambar 33. Grafik (rerata ± SEM) aktivitas katalase (mU/mg protein).....	96
Gambar 34. Grafik histogram data (rerata ± SEM) berat hippocampus.	98
Gambar 35. Gambaran mikroskopik sel pyramidal di daerah CA1	100
Gambar 36. Gambaran mikroskopik sel pyramidal di daerah CA3-CA2	101
Gambar 37. Gambaran mikroskopik pengecatan imunohistokimia <i>caspase-3</i> .	106
Gambar 38. Gambaran mikroskopik pengecatan imunohistokimia <i>caspase-3</i> .	107
Gambar 39. Peroksidasi lipid.	116
Gambar 40. Mekanisme pertahanan antioksidan	118
Gambar 41. Mekanisme ketoksikan TMT	119
Gambar 42. Mekanisme aksi kurkumin pada <i>Alzheimer's disease</i>	124

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Kelayakan Etik	170
Lampiran 2. Surat keterangan hasil identifikasi rimpang	171
Lampiran 3. Skema pembuatan ekstrak etanol rimpang kunyit	172
Lampiran 4. Standarisasi ekstrak	173
Lampiran 5. Perhitungan kadar abu, kadar abu larut asam dan kadar air	176
Lampiran 6. Data berat badan tikus setiap minggu.....	178
Lampiran 7. Foto-foto persiapan injeksi TMT dan sitikolin pada tikus	180
Lampiran 8. Gambar alat-alat untuk uji Morris <i>water maze</i>	181
Lampiran 9. Data waktu latensi	182
Lampiran 10. Data panjang lintasan (m) <i>acquisition trial</i>	194
Lampiran 11. Data berapa kali tikus dan persentase (%) lama waktu	206
Lampiran 12. Data waktu latensi (detik) hasil uji sensorimotor	208
Lampiran 13. Foto pengambilan darah pada hewan uji	210
Lampiran 14. Data kadar MDA plasma	211
Lampiran 15. Foto preparasi otak	212
Lampiran 16. Data kadar MDA otak	213
Lampiran 17. Foto alat-alat yang digunakan untuk uji biokimiawi	214
Lampiran 18. Data aktivitas GPx	215
Lampiran 19. Data aktivitas GSH	217
Lampiran 20. Data aktivitas Katalase	219
Lampiran 21. Data aktivitas SOD	221
Lampiran 22. Data kadar protein	223
Lampiran 23. Bobot sampel homogenat otak	225
Lampiran 24. Preparasi pengujian histologik.....	226
Lampiran 25. Berat hippocampus setelah perlakuan	227
Lampiran 26. Estimasi volume, densitas numerik dan jumlah total	228
Lampiran 27. Penghitungan presisi volume CA-1	230
Lampiran 28. Penghitungan presisi jumlah sel pyramidal daerah CA-1	231
Lampiran 29. Estimasi volume, densitas numerik, dan jumlah total	232
Lampiran 30. Presisi volume sel pyramidal daerah CA3-CA2.....	234

Lampiran 31. Presisi jumlah sel pyramidal di daerah CA3-CA2	235
Lampiran 32. Foto imunohistokimia.....	236

DAFTAR SINGKATAN

A β	= <i>Amyloid-beta peptide</i>
AChE	= <i>Acetylcholin Esterase</i>
AD	= <i>Alzheimer Disease</i>
AMPA	= <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
APP	= <i>Amyloid Precursor Protein</i>
BHT	= <i>Butylated Hydroxy Toluene</i>
BDNF	= <i>Brain- Derived Neurotrophic Factor</i>
Ca	= <i>Calcium</i>
CA	= <i>Cornu Ammonis</i>
CAT	= <i>Catalase</i>
ChAT	= <i>Choline Acetyltransferase</i>
CO ₂	= <i>Carbon dioxide</i>
CREB	= <i>cAMP Response Element-Binding</i>
DG	= <i>Gyrus Dentata;</i>
dH ₂ O	= <i>Deionized Dihydrogen Oxide</i>
DMSO	= <i>Dimethyle Sulfoxide</i>
DNA	= <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTPA	= <i>Diethylenetriamine Pentaacetic Acid</i>
DTNB	= <i>5,5'- Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i>
EC	= <i>Entorhinal Cortex</i>
EDTA	= <i>Ethylene Diamine Tetraacetyle Acid</i>
ERKTK	= <i>Ekstrak Rimpang Kunyit Terstandar Kurkumin</i>
GFAP	= <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GRx	= <i>Glutathione Reductase</i>
GSH	= <i>Reduced Glutathion</i>
GSSG	= <i>Glutathion Disulfide/Oxidized Glutathion</i>
HNE	= <i>4-Hydroxynonenal</i>
H ₂ O ₂	= <i>Hydrogen Peroxide</i>
HRP	= <i>Horseradish Peroxidase</i>
ICV	= <i>Intra-cerebroventrikuler</i>

i.p	= Intra-peritoneal
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
LTP	= <i>Long Term Potentiation</i>
MDA	= <i>Malondialdehyde</i>
MWM	= <i>Morris Water Maze</i>
p.o	= per oral
PUFA	= <i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
SOD	= <i>Superoxide Dismutase</i>
NADH	= <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NFTs	= <i>neurofibrillary tangles</i>
NMDA	= <i>N-methyl-D-aspartate</i>
RNS	= <i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	= <i>Reactive Oxygen Species</i>
SD	= <i>Sprague Dawley</i>
SSA	= <i>5-Sulfosalicylic Acid</i>
STZ	= Streptozotocin
TCA	= <i>Trichloro Acetat</i>
TBA	= <i>Thiobarbituric Acid</i>
TBARs	= <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TBI	= <i>Traumatic Brain Injury</i>
TEP	= <i>1,1,3,3-tetraethoxypropane</i>
TMT	= <i>Trimethyltin</i>

ABSTRAK

Demensia dapat disebabkan karena kematian neuron otak akibat stres oksidatif. Rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn) mengandung kurkumin yang memiliki efek antioksidatif dan neuroprotektif. Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengembangkan ekstrak rimpang kunyit sebagai sediaan pencegah demensia. Tujuan khususnya adalah untuk mengkaji mekanisme *in vivo* ekstrak rimpang kunyit (*C. longa* L.) terstandar kurkumin pada tikus *Sprague Dawley* model demensia yang diinduksi trimetiltin (TMT) dengan: (1) mengamati memori spasial melalui uji Morris *water maze*, (2) mengukur penanda stres oksidatif melalui pengamatan biokimiawi kadar MDA plasma dan otak, kadar glutation (GSH), aktivitas glutation peroksidase (GPx), superoksid dismutase (SOD), dan katalase (CAT) otak, (3) pengamatan histologik dengan menghitung estimasi jumlah total sel pyramidal hippocampus di daerah CA1 dan CA2-CA3 dengan metode stereologi serta pengamatan semikuantitatif imunohistokimia ekspresi protein *caspase-3* di daerah tersebut.

Penelitian ini menggunakan tikus *Sprague Dawley*, umur sekitar 2 bulan, berat 180-200 g, dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor. Kelompok normal (KN) diberi larutan CMC-Na per oral (p.o) dan injeksi saline intraperitoneal (i.p); Kelompok Kontrol Sakit (KS) diberi larutan CMC-Na p.o dan injeksi larutan TMT dalam saline 0,9% i.p; Kelompok Kontrol Positif (KP) diberi sitikolin dosis 200 mg/kg p.o dan injeksi TMT; dan kelompok ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin (ERKTK) yang diberi variasi dosis yaitu 100 mg/kg BB (E100), 200 mg/kgBB (E200), 300 mg/kg BB (E300) dan juga injeksi TMT. ERKTK dan sitikolin diberi mulai hari 1 sampai hari 28, sedangkan injeksi TMT diberikan dosis tunggal pada hari ke 8 perlakuan. Uji Morris *water maze* (MWM) dilakukan mulai hari ke 29 sampai hari 35. Setelah itu hewan uji diambil darahnya melalui sinus orbitalis, kemudian dikorbakan untuk diambil otaknya. Hemispherium cerebri kiri untuk pengamatan biokimiawi dan hemispherium cerebri kanan diambil hippocampusnya untuk pengamatan histologik. Hasil uji memori spasial dianalisis statistik dengan uji *one-way repeated measures analysis of variance* (ANOVA). Data hasil uji biokimiawi dan histologik dianalisis statistik dengan uji *one-way ANOVA* atau Kruskal Wallis. Untuk mengetahui perbedaan di antara 2 kelompok dilanjutkan dengan uji Tukey HSD atau Mann Whitney dengan tingkat signifikansi 0,05.

Ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin (ERKTK) dosis 200 mg/kg BB dapat meningkatkan memori spasial tikus *Sprague Dawley* model demensia yang terpapar TMT. Berdasarkan pengamatan biokimiawi ERKTK 200 mg/kg BB dapat mencegah peningkatan kadar MDA plasma dan otak, meningkatkan aktivitas GPx, SOD, CAT serta kadar GSH otak, dan mencegah penurunan estimasi jumlah total sel pyramidal serta peningkatan ekspresi *caspase-3* di daerah CA2-CA3 hippocampus. Tikus yang diberi ERKTK dosis 200 mg/kg BB menunjukkan hasil uji MWM, uji biokimiawi, dan imunohistokimia *caspase-3* yang hampir sama dengan tikus yang diberi sitikolin.

Kata kunci: demensia; *Curcuma longa* Linn.; TMT; MDA; antioksidan; hippocampus; *caspase-3*

ABSTRACT

Dementia seems to primarily implicate oxidative stress-induced neuronal death in the brain. Turmeric (*Curcuma longa* L.) contains curcumin which has anti-oxidative and neuro-protective effects. The general objective of this research is to develop the extract of turmeric as a preventive preparation of dementia. The specific objective of this research is to study the *in vivo* mechanism of standardized turmeric rhizome extract on *Sprague Dawley* rat model of dementia induced by TMT, by : (1) observing spatial memory with the Morris water maze test; (2) measuring oxidative stress markers i.e, malondialdehyde (MDA) levels of plasma and brain, levels of glutathion (GSH), activities of glutathion peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) of brain; (3) calculating the estimation of the total number of pyramidal cells in the hippocampal area CA1 and CA2- CA3 by stereology method and semiquantitatively calculating the protein expression of caspase-3 in the such areas.

Sixty adult male Sprague-Dawley rats (195-215 g) were randomly divided into six groups consisting of 10 rats for each group. The groups are N group (normal group), which received oral CMC-Na solution and intra-peritoneal injection of 0.9% saline; T group (control group), which was given oral CMC-Na solution and intraperitoneal injection of TMT chloride dissolved in 0.9% saline; positive control group, which was treated with oral 200 mg/kg bw of citicoline solution and TMT chloride injection; and E100, E200, E300 groups, which were treated with oral 100 mg/kg BW, 200 mg/kg BW, and 300 mg/kg BW, respectively, of turmeric rhizome extract, besides intra-peritoneal injection of TMT chloride. The turmeric rhizome extract and citicoline solutions were given at day 1 up to day 28 of experiment, whereas the TMT chloride injection given as a single dose of 8 mg/kg bw was administered at day 8 of experiment. Morris water maze test were carried out one day after the day of the last treatment of the rats (i.e. day 29) and the test lasted for 7 days. At day 36 the blood were taken from orbital sinus, afterthat all rats were sacrificed and the cerebrums were then dissected out from the skull. The left cerebral hemispheres were used for biochemical observation whereas the right one were used for histological examination. The spatial memory test were analyzed statistically with one way repeated measures ANOVA. Data of biochemical and histological test were analyzed by one way ANOVA or Kruskal Wallis test followed by Tukey HSD or Mann Whitney test with 0.05 significance level .

Standardized turmeric extract dose of 200 mg / kg BW improved spatial memory of *Sprague Dawley* rat models of dementia exposed by TMT. This dose lowered the levels of MDA plasma and brain, increased the activities of GPx, SOD, CAT and the levels of GSH of brain. In addition, 200 mg/ kg BW of turmeric extract administration on rats might partially hindered the deficits of pyramidal cells and the increases of caspase-3 expression in the CA2-CA3 region. To some extent these effects seemed to be comparable to those of citicoline.

Keywords: dementia; *Curcuma longa* L.; TMT; MDA; antioxidant, hippocampus, caspase-3

BAB I

LATAR BELAKANG

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Demensia adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan kumpulan gejala gangguan fungsi memori seperti mudah lupa, disorientasi, sulit berkomunikasi, menurunnya kemampuan menganalisa dan mengambil keputusan (Weiner *et al.*, 2012). Demensia menjadi permasalahan di seluruh dunia. Semakin meningkat usia harapan hidup suatu negara, jumlah orang berusia lanjut semakin meningkat. Hal ini dapat menimbulkan masalah serius dalam bidang sosial ekonomi dan kesehatan. Peningkatan angka kelangsungan hidup di masyarakat seiring dengan peningkatan insidensi demensia dapat menurunkan angka produktivitas (Brookmeyer *et al.*, 2007).

Jumlah penderita demensia di Amerika diprediksi meningkat secara eksponensial dari 25,5 juta orang pada tahun 2000 menjadi 114 juta orang pada tahun 2050 (Wimo *et al.*, 2003). Perkiraan global prevalensi demensia pada orang yang berumur lebih dari 60 tahun adalah 1,9% di Afrika, 3,9% di Eropa Timur, 4,0% di Cina, 4,6% di Amerika Latin, 5,4% di Eropa Barat dan 6,4% di Amerika Utara (Qiu *et al.*, 2007), sementara di China dan Asia Tenggara diperkirakan akan meningkat 3 kali lipat pada tahun 2041 (Ferri *et al.*, 2005).

Sebagian besar demensia disebabkan oleh kerusakan sel saraf otak. Penyebab terbanyak demensia adalah penyakit Alzheimer (Christen, 2000; Evans *et al.*, 2004). Penyebab lainnya seperti stroke, Parkinson, *multiple sclerosis*,

hidrosefalus, tumor otak, trauma di kepala, infeksi di otak termasuk HIV, defisiensi vitamin B 12 dan asam folat, alkoholisme, penyakit lupus, diabetes, dan pengaruh obat (Traywick, 2007).

Stres oksidatif yaitu ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan, merupakan patogenesis penting dalam perkembangan demensia (Butterfield *et al.*, 2002). Peningkatan stres oksidatif menyebabkan degenerasi sel saraf otak yang dapat menyebabkan demensia (Praticò *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2005). Sel otak sangat peka terhadap kerusakan oksidatif karena otak merupakan organ dengan kebutuhan oksigen tinggi. Kandungan asam lemak tidak jenuh otak tinggi, tetapi sistem pertahanan antioksidan relatif sedikit dibandingkan organ lain (Smith *et al.*, 2000). Kerusakan oksidatif terhadap lipid dan protein dapat menyebabkan gangguan fungsional dan struktural membran sel, inaktivasi enzim dan akhirnya terjadi kematian sel (Ansari *et al.*, 2008). Kerusakan oksidatif pada lipid menghasilkan produk seperti malondialdehid (MDA), 4 hidroksi-2,3-nonenal (HNE), akrolein dan lain-lain. Di dalam tubuh antioksidan endogen seperti glutathion peroksidase (GPx), superoksid dismutase (SOD) dan katalase (CAT) berperan untuk mencegah kerusakan oksidatif tersebut (Block *et al.*, 2002). Dengan demikian pengukuran terhadap produk oksidasi lipid dan antioksidan tersebut dapat memberikan gambaran yang lebih jelas adanya stres oksidatif.

Pada penderita demensia Alzheimer, daerah otak yang berfungsi untuk proses memori, yaitu lobus frontal bagian medial serta hippocampus, ukurannya berkurang. Hal ini terjadi akibat degenerasi sinapsis dan kematian neuron (Arendt, 2009). Hippocampus merupakan bagian dari sistem limbik otak yang berperan

untuk proses memori dan navigasi ruangan (Guyton dan Hall, 2011). Lesi hippocampus pada rodens dilaporkan menyebabkan gangguan memori spasial (Moser dan Moser, 1998). Hippocampus dan bagian cortex otak merupakan daerah utama transmisi kolinergik yang peka terhadap kerusakan oksidatif (Earley *et al.*, 1992; Philbert *et al.*, 2000) sehingga kerusakan sinapsis di daerah tersebut berperan pada gangguan proses memori (Fukui *et al.*, 2002; Good, 2002).

Penggunaan model demensia menggunakan hewan uji sudah banyak dilakukan. Beberapa pendekatan yang dilakukan adalah kemiripan gejala yang timbul pada hewan uji dengan yang terjadi pada manusia, di antaranya adalah adanya penurunan memori, perubahan penanda stres oksidatif dan gangguan sistem kolinergik (Richardson dan Burns, 2002). Salah satu senyawa yang dapat menginduksi demensia pada hewan uji adalah trimetiltin (TMT). TMT merupakan organometal yang bersifat neurotoksik (Hattori *et al.*, 2011). Sel saraf yang peka terhadap efek toksik TMT adalah hippocampus, cortex piriformis, cortex entorinal, amigdala, neocortex dan tuberkel olfaktorik (Balaban *et al.*, 1988). TMT menyebabkan gangguan sistem kolinergik yang dapat mengganggu proses memori (Geloso *et al.*, 2007). TMT meningkatkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) (Porter dan Landfield, 1998) dan dapat meningkatkan pembentukan radikal hidroksil, malondialdehid dan karbonil protein hippocampus (Shin *et al.*, 2005). Tikus yang mendapat paparan TMT dosis 3 mg/kg BB secara intraperitoneal selama 3 hari berturut-turut mengalami penurunan volume hippocampus mulai hari ke-4 paparan. Sel-sel piramidal pada daerah CA3 dan CA1 hippocampus merupakan daerah yang peka terhadap efek toksik yang

ditimbulkan oleh TMT. Penurunan jumlah sel pyramidal di daerah tersebut secara dramatik terjadi antara hari ke 14-28 (Robertson *et al.*, 1987). Intoksikasi TMT pada hewan uji sesuai untuk model neurodegeneratif dengan gangguan memori sehingga bermanfaat untuk studi penyakit demensia Alzheimer (Kassed *et al.*, 2003).

Usaha untuk menurunkan insidensi demensia sudah banyak dilakukan. Di antaranya pencarian obat baik secara sintesis maupun eksplorasi dari bahan alam. Target obat untuk demensia dapat berupa aktivitas antikolinesterase (Lin *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2006; Vasudevan dan Parle, 2009) dan antioksidatif (Dhanasekaran *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2007). Penghambatan aktivitas asetilkolinesterase akan meningkatkan aktivitas neurotransmitter asetilkolin sehingga akan memberikan efek positif pada proses memori (McGleenon *et al.*, 1999; Müller, 2007). Sedangkan antioksidan memiliki efek terapeutik terhadap berbagai jenis kelainan neurodegeneratif yang berhubungan dengan stres oksidatif (Ahmad *et al.*, 2005; Ishrat *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2004). Berbagai studi menunjukkan keterkaitan antara ROS dengan patogenesis dari penyakit demensia Alzheimer sehingga memungkinkan terapi menggunakan senyawa antioksidan (Devore *et al.*, 2010).

Banyak tanaman obat dengan kandungan antioksidan terbukti secara empiris bermanfaat mencegah gangguan neurodegeneratif. Salah satu tanaman obat yang memiliki kandungan antioksidan yang tinggi adalah kunyit (*Curcuma longa* Linn) (Bishnoi *et al.*, 2008). Kunyit mengandung senyawa kurkumin, demetoksikurkumin dan bisdemetoksi kurkumin yang potensial sebagai

antioksidan dan agen neuroprotektif (Bala *et al.*, 2006; Bishnoi *et al.*, 2008; Dohare *et al.*, 2008; Kuhad dan Chopra, 2007). Karakter lipofilik yang tinggi menyebabkan peningkatan disposisi kurkumin di otak (Yang *et al.*, 2005).

Kajian *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan kurkumin dapat mencegah proses neurodegeneratif karena stres oksidatif (Frautschy *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2001; Ono *et al.*, 2004; Sultana *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Kurkumin secara *in vitro* dapat menghambat peroksidasi lipid di otak (Sreejayan dan Rao, 1994). Selain itu kurkumin dapat mencegah peningkatan malondialdehid (produk peroksidasi lipid) dan memperbaiki penurunan glutathion pada tikus yang diinduksi stres oksidatif dengan asam kainat (Gupta *et al.*, 2009). Kurkumin juga dapat menormalkan memori spasial pada tikus model demensia yang diinduksi streptozotocin secara intraserebroventrikuler (Agrawal *et al.*, 2010; Ishrat *et al.*, 2009). Kurkumin juga dapat mencegah apoptosis neuron otak pada mencit model demensia yang diinduksi $AlCl_3$ (Pan *et al.*, 2008).

Kurkumin diketahui banyak terdapat dalam rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn). Sediaan ekstrak kunyit terstandar kurkumin diharapkan lebih mendekati ke penggunaan praktis di masyarakat. Penelitian tentang efek ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin pada tikus model demensia yang diinduksi TMT belum pernah dilakukan.

Secara umum rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimana efek ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin (ERKTK) pada tikus model demensia yang terpapar TMT? Secara lebih rinci rumusan masalah yang diajukan adalah :

1. Bagaimana efek variasi dosis ERKTK terhadap memori spasial tikus model demensia yang diinduksi TMT? : (i) Bagaimana efek ERKTK terhadap waktu latensi dan panjang lintasan pada *acquisition trial*? (ii) Bagaimana efek ERKTK terhadap frekuensi dan persentase lama tikus berada pada kuadran target pada *probe trial*? (iii) Apakah perbedaan memori spasial bukan disebabkan karena adanya gangguan sensorik, motorik, dan motivasional pada uji sensorimotor?
2. Bagaimana aktivitas dan mekanisme antioksidan variasi dosis ERKTK pada tikus model demensia yang diinduksi TMT?: (i) Bagaimana aktivitas ERKTK terhadap kadar malondialdehid (MDA) plasma? (ii) Bagaimana aktivitas ERKTK terhadap kadar MDA otak? (iii) Bagaimana aktivitas ERKTK terhadap aktivitas glutathion peroksidase (GPx) otak? (iv) Bagaimana aktivitas ERKTK terhadap aktivitas superoksid dismutase (SOD) otak? (v) Bagaimana aktivitas ERKTK terhadap aktivitas katalase (CAT) otak? (vi) Bagaimana aktivitas ERKTK terhadap kadar glutathion (GSH) otak?
3. Bagaimana efek variasi dosis ERKTK pada tikus model demensia yang diinduksi TMT terhadap gambaran histologik hippocampus?: (i) Bagaimana efek ERKTK terhadap estimasi volume lapisan piramidal dan jumlah total sel piramidal daerah CA1 hippocampus? (ii) Bagaimana efek ERKTK terhadap estimasi volume lapisan piramidal dan jumlah total sel piramidal daerah CA2-CA3 hippocampus? (iii) Bagaimana ekspresi protein *caspase-3* di daerah CA1 hippocampus?

- (iv) Bagaimana ekspresi protein *caspase-3* di daerah CA2-CA3 hippocampus ?
4. Bagaimana efek variasi dosis ERKTK dibandingkan dengan sitikolin pada tikus model demensia yang diinduksi TMT?

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan umum

Secara umum penelitian ini adalah untuk mengkaji efek ERKTK terhadap tikus model demensia yang diinduksi TMT sebagai landasan pengembangan sediaan obat tradisional untuk mencegah demensia.

Tujuan khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengkaji efek variasi dosis ERKTK terhadap memori spasial tikus *Sprague Dawley* model demensia yang diinduksi TMT: (i) Mengkaji efek ERKTK terhadap waktu latensi dan panjang lintasan pada *acquisition trial*, (ii) Mengkaji efek ERKTK terhadap frekuensi dan persentase lama tikus berada pada kuadran target pada *probe trial*. (iii) Mengkaji perbedaan memori spasial bukan disebabkan karena adanya gangguan sensorik, motorik, dan motivasional pada uji sensorimotor.
2. Mengkaji aktivitas dan mekanisme antioksidan variasi dosis ERKTK pada tikus model demensia yang diinduksi TMT: (i) Mengkaji aktivitas ERKTK terhadap kadar malondialdehid (MDA) plasma. (ii) Mengkaji aktivitas ERKTK terhadap kadar MDA otak. (iii) Mengkaji aktivitas ERKTK

terhadap aktivitas glutathion peroksidase (GPx) otak. (iv) Mengkaji aktivitas ERKTK terhadap aktivitas superoksid dismutase (SOD) otak. (v) Mengkaji aktivitas ERKTK terhadap aktivitas katalase (CAT) otak. (vi) Mengkaji aktivitas ERKTK terhadap kadar glutathion (GSH) otak.

3. Mengkaji efek variasi dosis ERKTK terhadap gambaran histologik hippocampus pada tikus model demensia yang diinduksi TMT: (i) Mengkaji efek ERKTK terhadap estimasi volume lapisan pyramidal dan jumlah total sel piramidal daerah CA1 hippocampus. (ii) Mengkaji efek ERKTK terhadap estimasi volume lapisan pyramidal dan jumlah total sel pyramidal daerah CA2-CA3 hippocampus. (iii) Mengkaji ekspresi protein *caspase-3* di daerah CA1 hippocampus. (iv) Mengkaji ekspresi protein *caspase-3* di daerah CA2-CA3 hippocampus
4. Mengkaji efek variasi dosis ERKTK dibandingkan dengan sitikolin dosis 200 mg/kg BB pada ⁶ tikus model demensia yang diinduksi TMT

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah akan memberikan informasi tentang hasil uji praklinik pengamatan patofisiologik dan molekuler farmakodinamik efek pemberian ekstrak kunyit pada tikus model demensia sehingga dapat menjadi dasar pengembangan bahan alam dalam pengobatan formal secara klinik dengan sediaan obat tradisional. Selain itu penelitian ini juga dapat menjadi model penelitian pengembangan obat herbal /bahan alam Indonesia untuk menjadi produk unggulan sesuai tuntutan pasar global.

1.4. Keaslian Penelitian

Penelusuran literatur laporan hasil penelitian tentang aktivitas neuroprotektif senyawa dalam kunyit yang telah dilakukan peneliti sebelumnya ditunjukkan pada Tabel I.

Tabel I. Hasil penelitian tentang aktivitas senyawa di dalam rimpang kunyit sebagai pencegah penyakit neurodegeneratif

Peneliti, tahun	Metode/desain	Bahan uji	Efek
Lim <i>et al.</i> , 2001	<i>In vivo</i> pada mencit transgenik Alzheimer	Kurkumin	Kurkumin menurunkan protein teroksidasi dan interleukin-1 β , mengurangi <i>astrocytic marker</i> GFAP dan menurunkan 43–50% plak <i>insoluble β amyloid</i> (A β), dan <i>soluble</i> A β .
Wu, 2006	<i>In vivo</i> pada tikus SD yang diberi diet lemak tinggi	Kurkumin	Kurkumin meningkatkan memori spasial, menormalkan kadar BDNF, synapsin-1 dan CREB hippocampus.
Pan <i>et al.</i> , 2008	<i>In vitro</i> pada sel PC 12 dan <i>in vivo</i> pada mencit yang diberi AlCl ₃ oral dan D-Galaktosa secara intra-peritoneal (ip)	Kurkumin	Secara <i>in vitro</i> kurkumin meningkatkan viabilitas dan laju apoptosis sel PC 12. Secara <i>in vivo</i> kurkumin meningkatkan memori spasial, memperbaiki perubahan neuropatologik hippocampus, dan meningkatkan ekspresi gen Bcl-2.
Kumar <i>et al.</i> , 2009	<i>In vivo</i> pada tikus Wistar yang diinjeksi dengan streptozotocin (STZ), intra-cerebro-ventrikuler (ICV)	Kurkumin	Kurkumin meningkatkan reseptor M1 dan M3 serta reseptor insulin, menurunkan aktivitas AChE dan Glu3 pada cerebellum.
Isirat <i>et al.</i> , 2009	<i>In vivo</i> pada tikus Wistar yang diinjeksi STZ (ICV)	Kurkumin	Kurkumin meningkatkan memori-spasial, mencegah peningkatan 4-HNE, MDA, H ₂ O ₂ , protein karbonil dan glutathion teroksidasi (GSSG), meningkatkan aktivitas GPx, <i>Glutathion Reductase</i> (GR), dan ChAT otak.

Tabel II. Lanjutan hasil penelitian tentang aktivitas senyawa di dalam rimpang kunyit sebagai pencegah penyakit neurodegeneratif

Peneliti, tahun	Metode/desain	Bahan uji	Efek
Gupta <i>et al.</i> , 2009	<i>In vivo</i> pada tikus Wistar yang diinjeksi asam kainat (i.p)	Kurkumin	Kurkumin meningkatkan latensi kejang, mencegah peningkatan kadar MDA dan menormalkan kadar GSH otak.
Awasthi <i>et al.</i> , 2010	<i>In vivo</i> pada mencit Swiss yang diinjeksi STZ secara intra-cerebral (IC).	Kurkumin	Kurkumin meningkatkan memori spasial, <i>cerebral blood flow</i> (CBF), kadar GSH otak, mencegah peningkatan MDA otak, ROS, nitrit dan AChE.
Agrawal <i>et al.</i> , 2010	<i>In vivo</i> pada tikus <i>Sprague Dawley</i> (SD) yang diinjeksi STZ (ICV)	Kurkumin	Kurkumin meningkatkan memori spasial, kadar GSH dan reseptor insulin. mencegah peningkatan kadar MDA, dan aktivitas AChE.
Khuwaja <i>et al.</i> , 2011	<i>In vivo</i> pada tikus Wistar yang diinjeksi <i>6-hydroxydopamine</i> pada striatum kanan.	Kurkumin	Kurkumin memperbaiki parameter uji <i>behavioral</i> , mencegah peningkatan MDA, meningkatkan kadar GSH dan aktivitas GPx, GR, katalase (CAT) dan SOD.
Xu <i>et al.</i> , 2009	<i>In vivo</i> pada tikus SD yang diinduksi stres kronik.	Kurkumin	Kurkumin memperbaiki memori spasial dan morfologi dendritik sel pyramidal daerah CA3, menurunkan kadar kortikosteron.
Zhao <i>et al.</i> , 2009	<i>In vivo</i> pada tikus SD yang dioklusi arteri serebralnya.	Kurkumin	Kurkumin menurunkan kadar MDA, sitokrom-c, dan ekspresi <i>cleaved caspase-3</i> dan meningkatkan ekspresi Bcl-2 mitokondria.
Jaques <i>et al.</i> , 2012	<i>In vivo</i> pada tikus Wistar yang diberi asap rokok	Kurkumin	Kurkumin meningkatkan memori spasial, mencegah peningkatan AChE pada cerebellum, korteks cerebral, hippocampus dan darah.

Tabel III. Lanjutan hasil penelitian tentang aktivitas senyawa di dalam rimpang kunyit sebagai pencegah penyakit neurodegeneratif

Peneliti, tahun	Metode/desain	Bahan uji	Efek
Ali dan Arafa, 2011	<i>In vivo</i> pada tikus yang diinduksi skopolamin (ICV)	Kurkumin	Kurkumin meningkatkan memori spasial, GSH, AChE, dan menurunkan kadar MDA.
Sunanda BPV, 2014	<i>In vivo</i> pada mencit yang diberi skopolamin secara oral	Kurkumin	Kurkumin meningkatkan memori spasial (uji <i>elevated plus maze</i>).

Tabel I, II, dan III menunjukkan bahwa sudah banyak penelitian efek kurkumin dilakukan terhadap hewan uji model gangguan neurodegeneratif / demensia dengan paparan senyawa kimia seperti skopolamin, kolkhisin, 6-hidroksidopamin, STZ, asam kainat dan lain-lain. Paparan senyawa lain yang sudah dilakukan adalah dengan injeksi TMT (Jung *et al.*, 2013; Koda *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011). Beberapa pendekatan yang dilakukan untuk membuat model demensia pada hewan uji adalah kemiripan gejala yang timbul pada hewan uji dengan yang terjadi pada manusia, di antaranya adalah adanya gangguan sistem kolinergik, penurunan memori, dan perubahan penanda stres oksidatif (Richardson dan Burns, 2002). Selain menyebabkan stres oksidatif (Porter dan Landfield, 1998; Shin *et al.*, 2005) dan gangguan sistem kolinergik yang dapat mengganggu proses memori (Geloso *et al.*, 2007), paparan TMT pada hewan uji secara selektif juga dapat menyebabkan penurunan jumlah sel piramidal hippocampus pada daerah CA1 dan CA3 yang terkait dengan sirkuit memori (Robertson *et al.*, 1987). Beberapa penelitian menyatakan bahwa gejala

intoksikasi TMT pada hewan uji dapat dijadikan model studi penyakit demensia Alzheimer (Corvino *et al.*, 2005; Geloso *et al.*, 2007; Kassed *et al.*, 2003; Philbert *et al.*, 2000).

Sejauh ini belum ada penelitian aktivitas ekstrak kunyit terstandar kurkumin pada tikus model demensia yang diinduksi TMT. Dalam penelitian ini hewan uji mendapat paparan TMT untuk membuat model demensia. Pemberian sediaan ekstrak kunyit terstandar kurkumin diharapkan lebih mendekati ke penggunaan praktis di masyarakat. Selain itu keaslian dari penelitian ini adalah belum pernah diamati tentang pengaruh ekstrak kunyit terstandar kurkumin pada tikus model demensia yang dipapar TMT terhadap estimasi volume lapisan, kepadatan numerik dan jumlah sel pyramidal hippocampus di regio CA1 dan CA2-CA3 yang dianalisis dengan prosedur stereologi. Untuk mengetahui mekanisme aktivitas ekstrak kunyit dalam penelitian ini juga diamati secara kualitatif sel yang mengekspresi *caspase-3* serta aktivitas enzim antioksidan endogen seperti SOD, GSH, GPx dan katalase pada homogenat hemispherium cerebri untuk mengetahui mekanisme efek antioksidatif dan neuroprotektifnya.

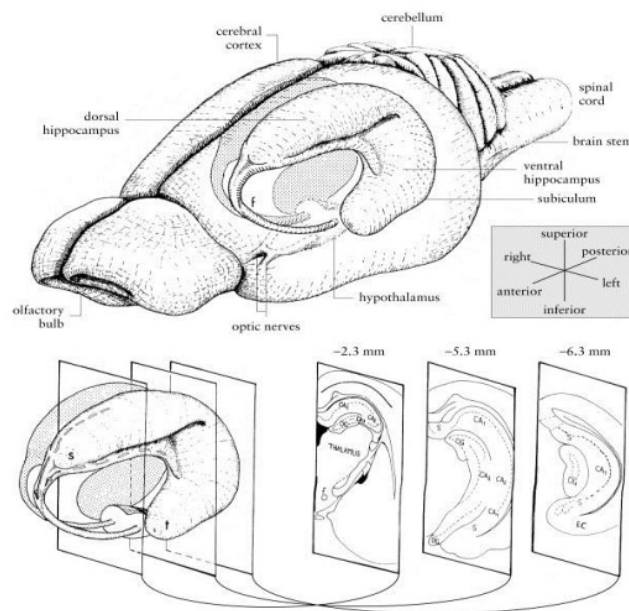
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hippocampus

1. Anatomi

Hippocampus merupakan bagian dari formasi hippocampi yang terletak di lobus temporalis. Pada manusia panjang hippocampus adalah ± 5 cm, terletak memanjang di dasar *cornu inferius ventriculus lateralis* (Standring, 2005). Pada hewan uji tikus, hippocampus terletak di dinding ventroposterior dan ventrolateral cortex cerebri (Bayer, 1985).

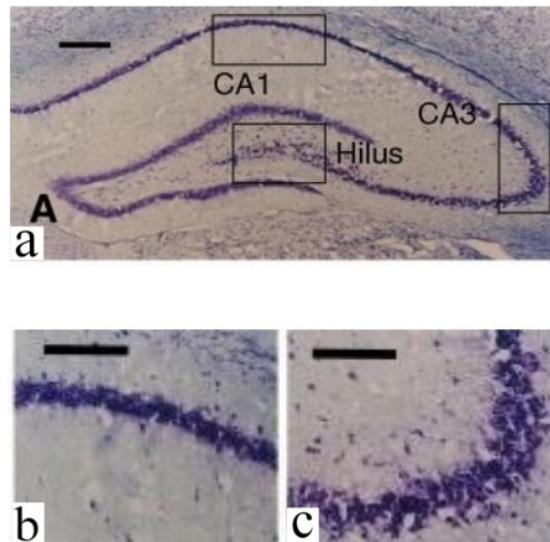


Gambar 1. Gambaran otak tikus yang menunjukkan gambaran 3 dimensi hippocampus dan struktur yang terkait. CA1, CA2, CA3: daerah cornu ammonis 1-3; DG: gyrus dentata; EC: cortex entorhinal; f: fornix; s: *septal pole* dari hippocampus; S: subiculum; t: *temporal pole* dari hippocampus (dikutip dari Cheung dan Cardinal, 2005).

Tiga lapisan kelompok sel penyusun hippocampus pada manusia jika diurutkan mulai dari yang terluar adalah lapisan polimorfik, lapisan piramidal dan lapisan molekuler. Lapisan piramidal terdiri dari tiga sampai empat baris sel piramidal, dan sel piramidal berperan sebagai neuron utama di hippocampus. Berdasarkan sitoarsitektornya hippocampus dibagi menjadi tiga bagian dan disingkat menjadi CA1, CA2, dan CA3 (Duvernoy, 2005; Swann *et al.*, 1989).

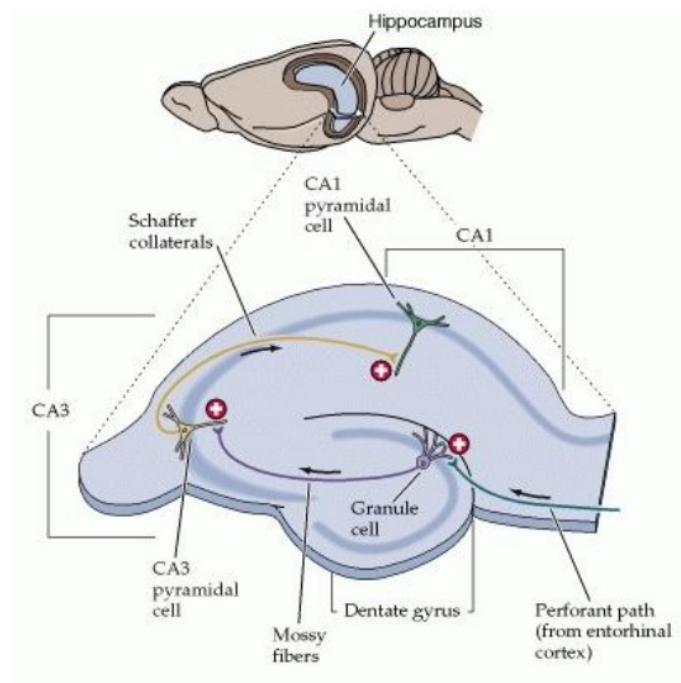
Pada potongan koronal, CA terbagi menjadi beberapa jenis berdasar struktur dan morfologi neuron piramidal :

- a. CA1, menyusun sebagian besar *Cornu ammonis*, berlanjut dari subikulum. Bentuk sel piramidal pada lapisan ini trianguler dan kecil tersebar pada stratum piramidal. Pada tikus, area ini terlihat lebih gelap karena dipadati oleh badan sel neuron piramidal. Stratum piramidal CA1 dibedakan menjadi stratum superficiale dan stratum profundum
- b. CA2, badan sel berbentuk ovoid (oval), besar, dan dangkal serta tersusun padat
- c. CA3, terletak pada genus Cornu Ammonis, pada area ketika memasuki kecembungan gyrus dentatus. Bentuk sel mirip CA2, namun kepadatannya lebih rendah. Penampakan khas yaitu adanya serat halus tidak bermyelin dan *mossy fiber*, yang berasal dari gyrus dentatus. Serat tersebut mengelilingi badan sel neuron piramidal dan menekan antara stratum radiatum dan stratum pyramidale membentuk lapisan tambahan yaitu stratum lucidum (Krzak *et al.*, 2003).



Gambar 2. a) Gambaran histologik hippocampus tikus normal, b) sel pyramidal area CA1 hippocampus, c) sel pyramidal area CA3 hippocampus (dikutip dari Tariq *et al.*, 2008)

Dendrit dari sel pyramidal daerah CA1 akan menerima sinapsis dari kolateral Schaffer, yaitu akson dari sel pyramidal di daerah CA3. Proses LTP (*Long Term Potentiation*) terjadi pada koneksi sinaptik antara kolateral Schaffer dan sel pyramidal CA1. Stimulasi elektrik pada kolateral Schaffer menghasilkan *excitatory postsynaptic potentials* (EPSPs) di pascasinaptik sel CA1. Jika kolateral Schaffer distimulasi hanya 2 atau 3 kali per menit, EPSP di sel-sel CA1 tetap konstan. Stimuli dengan frekuensi tinggi pada akson yang sama menyebabkan LTP. LTP juga terjadi di sinapsis yang lain seperti cortex, amygdala, dan cerebellum (Purves *et al.*, 2004).



Gambar 3. Diagram irisan hippocampus rodensia yang menunjukkan daerah CA1-CA3, jalur eksitatori dan koneksi sinaptik (dikutip dari Purves *et al.*, 2004).

2. Fungsi Hippocampus

Hippocampus bersama bagian-bagian di cerebrum (otak besar) memiliki peran yang sangat besar dalam fungsi kognisi termasuk belajar dan ingatan (Guyton dan Hall, 2006). Pada rodensia, hippocampus berperan dalam atensi dan penghambatan tingkah laku, memori spasial dan navigasi (Abbott dan Blum, 1996). Hippocampus bukan sebagai tempat penyimpanan memori jangka panjang melainkan sebagai pengorganisir sehingga informasi yang diperoleh dapat disimpan menjadi memori jangka panjang dimana proses tersebut disebut dengan proses konsolidasi (Maviel *et al.*, 2004). Pada awal proses konsolidasi, memori

berada di hippocampus dan setelah proses konsolidasi selesai, memori akan berada di cortex (Andersen, 2007). Memori dengan jejas yang kuat dapat diungkap kembali dengan mudah, sedangkan memori dengan jejas yang lemah lebih sulit untuk diungkap kembali (Kandel *et al.*, 2013).

Sel di hippocampus mengkode informasi spasial yang spesifik sehingga hippocampus sangat penting bagi persepsi spasial. Hippocampus kanan lebih terlibat dalam memori spasial, sedangkan hippocampus kiri lebih terlibat dalam memori verbal (Kandel *et al.*, 2013). Dalam pembentukan memori spasial hippocampus mengaktifasi *place cells* (sel-sel tempat) dalam menanggapi lokasi lingkungannya. O'Keefe dan Nadel (1979) menyatakan bahwa sel-sel tempat hippocampus melengkapi landasan neuronal untuk pembentukan memori spasial, oleh karena itu gangguan pada hippocampus dapat mengganggu memori spasial, seperti misalnya ketidakmampuan untuk membuat jalan pintas.

Hippocampus dan bagian korteks otak, daerah utama transmisi kolinergik untuk memonitor proses belajar dan mengingat, merupakan daerah yang peka terhadap kerusakan oksidatif. Kerusakan sinapsis pada daerah tersebut telah dilaporkan berperan pada penurunan fungsi memori yang menjadi gejala utama demensia (Fukui *et al.*, 2002).

2.2. Memori

1. Definisi dan klasifikasi

Memori merupakan suatu proses untuk menyimpan informasi baru dan usaha mendapatkan kembali informasi yang telah disimpan untuk digunakan pada

waktu yang akan datang. Sedangkan pembelajaran adalah proses dimana informasi baru diperoleh oleh sistem saraf dan dapat diamati melalui perubahan perilaku (Budson dan Price, 2005; Froemke *et al.*, 2007; Lynch, 2004; Purves *et al.*, 2004). Sistem memori adalah cara atau langkah bagaimana otak memproses informasi agar dapat diingat kembali (*retrieve*) pada waktu yang akan datang (Budson dan Price, 2005). Tanpa memori kita mungkin akan mengulang-ulang kesalahan, tidak mempunyai kemampuan belajar, dan tidak bisa mengulangi keberhasilan (Tortora dan Derrickson, 2006) serta tidak dapat bertahan hidup (Jakubowska-Doğru *et al.*, 2003).

Secara fisiologis, memori merupakan hasil dari perubahan kemampuan penjaralan sinaptik dari satu neuron ke neuron berikutnya. Perubahan ini menghasilkan jaras-jaras yang terfasilitasi yang disebut jejak-jejak ingatan (*memory traces*) (Guyton dan Hall, 2001).

Ada banyak teori yang menjelaskan pembagian memori. Berdasarkan tipe informasi yang disimpan, memori dibagi menjadi dua, yaitu memori deklaratif dan memori non deklaratif (Anderson, 2013). ⁶ Memori deklaratif adalah memori tentang suatu objek, dan yang secara sadar dapat diekspresikan dengan bahasa. Sedangkan memori non deklaratif (atau disebut juga memori prosedural) adalah memori yang dihubungkan dengan aktivitas motorik / *skills* yang dapat dilakukan secara tidak sadar (Purves *et al.*, 2004). Memori deklaratif dibagi menjadi memori episodik dan memori semantik. Memori episodik yaitu memori berkaitan dengan pengalaman pribadi seseorang sedangkan memori semantik yaitu memori yang

berkaitan dengan pengetahuan konseptual dan pengetahuan faktual (Budson dan Price, 2005).

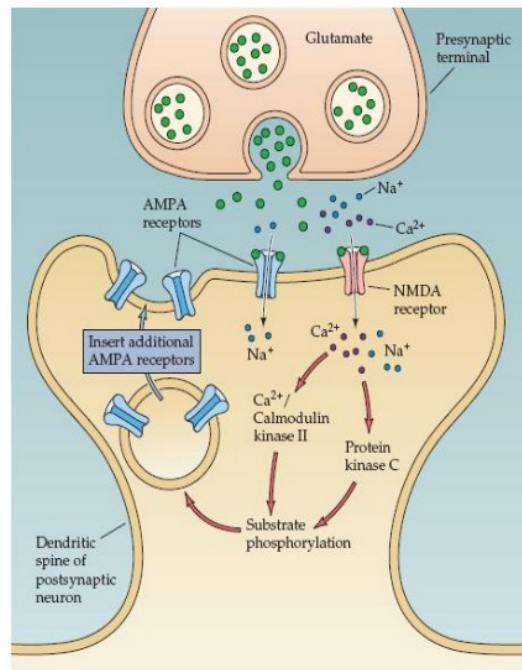
Berdasarkan waktu penyimpanannya memori dibagi menjadi memori jangka pendek dan memori jangka panjang. Memori jangka pendek adalah memori yang berlangsung beberapa detik atau menit, kecuali memori ini diubah menjadi memori jangka panjang. Memori jangka panjang adalah memori yang sekali disimpan dapat diingat kembali selama bertahun-tahun bahkan seumur hidup (Guyton dan Hall, 2001). Penyimpanan memori jangka panjang melalui perubahan fisik yang lebih permanen di otak pada struktur neuron prasinap dan pascasinap. Contoh dari perubahan-perubahan semacam itu adalah pembentukan hubungan sinaps baru, perubahan permanen membran prasinap dan pascasinap baik dari luas permukaan dan jumlah reseptor neurotransmitter, peningkatan atau penurunan sintesis neurotransmitter (Guyton dan Hall, 2001; Stanton *et al.*, 2006).

Memori spasial termasuk dalam kelompok memori jangka pendek yaitu berupa kemampuan untuk menyimpan sementara, mempertahankan, dan memanipulasi informasi baru sebagai panduan kegiatan yang sedang dilakukan (Floresco *et al.*, 1999). Memori spasial pada binatang berperan membantu binatang menemukan lokasi atau rute perjalanan ke arah tempat tersedianya makanan dan juga digunakan untuk upaya keselamatan mempertahankan hidup (Jakubowska-Doğru *et al.*, 2003). Memori spasial pada tikus sama dengan memori deklaratif pada manusia yaitu memori tentang suatu objek (Guyton dan Hall, 2001; Purves *et al.*, 2004).

2. Proses Memori

Pembentukan dan pemanggilan memori terbagi dalam tiga subproses yang berurutan yaitu *encoding*, *storage*, dan *retrieval*. *Encoding* adalah proses memasukan informasi ke dalam sistem saraf. Setelah proses *encoding* dilanjutkan dengan proses *storage* dimana terjadi penyimpanan informasi ke dalam otak menjadi memori. Bagian terakhir dari proses pembentukan memori adalah *retrieval*, yaitu pemanggilan kembali informasi yang telah disimpan (Rains, 2001).

Memori dapat terbentuk melalui proses pembelajaran yang melibatkan sistem limbik terutama hippocampus dan amigdala, korteks asosiasi lobus frontalis, lobus parietalis, dan lobus temporalis, serta thalamus (Andersen, 2007). Informasi dalam bentuk impuls-impuls pesan akan dihantarkan ke *cortex cerebri* yang akan menjadi memori jangka pendek. Selanjutnya diubah menjadi memori jangka panjang oleh hippocampus melalui *long term potentiation* (LTP) pada saat seseorang tidur (Lynch, 2004). LTP merupakan proses penguatan hantaran impuls antar neuron (Lu dan Chow, 1999). Mekanisme molekuler terjadinya LTP disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Mekanisme molekuler terjadinya *Long Term Potentiation* (LTP) (dikutip dari Purves *et al.*, 2004)

Proses terjadinya LTP diawali dengan masuknya ion kalsium (Ca^{2+}) ke dalam membran pascasinaptik yang dimediasi melalui aktivitas reseptor *N-methyl D-aspartate* (NMDA). Terbukanya saluran Ca karena ikatan reseptor non-NMDA dan reseptor metabotropik. Ion kalsium yang masuk akan memicu aktivitas *Ca-dependent kinase*, PKC dan *Ca-calmodulin*, dan tirosin kinase. Protein kinase tersebut akan beraksi melalui pascasinaptik untuk menyisipkan reseptor AMPA baru pada spina pascasinaptik, dengan demikian akan meningkatkan sensitivitasnya terhadap glutamat (Kandel *et al.*, 2013; Purves *et al.*, 2004). Perubahan struktural spina dendritik dapat terjadi 1 jam sesudah adanya stimulus

yang menginduksi terjadinya LTP, sehingga dapat menghasilkan sinapsis baru (Purves *et al.*, 2004).

2.3. Demensia

1. Definisi

Demensia adalah suatu istilah yang digunakan untuk menggambarkan kumpulan gejala yang ditandai dengan gangguan fungsi memori, seperti mudah lupa, disorientasi, sulit berkomunikasi, menurunnya kemampuan menganalisa dan mengambil keputusan (Weiner *et al.*, 2012). Penderita demensia menunjukkan gejala yang bervariasi. Sebanyak 20-30% orang penderita demensia mengalami depresi dan sekitar 20 % memiliki kecemasan (Calleo dan Stanley, 2008). Gejala ini juga sering diikuti dengan psikosis dan agitasi (Shub dan Kunik, 2009).

Sebagian besar demensia disebabkan oleh kerusakan sel-sel saraf otak. Penyebab terbanyak demensia adalah penyakit Alzheimer (AD). Penyebab lainnya seperti stroke, Parkinson, *multiple sclerosis*, hidrosefalus, tumor otak, trauma di kepala, infeksi di otak termasuk HIV, defisiensi vitamin B 12 dan asam folat, alkoholisme, penyakit lupus, penyakit hepar, pengaruh obat-obat tertentu dan lain-lain (Traywick, 2007).

Demensia Alzheimer atau yang dikenal juga sebagai demensia senilis atau penyakit Alzheimer merupakan bentuk umum demensia (Christen, 2000; Evans *et al.*, 2004). Penyakit Alzheimer merupakan penyakit neurodegeneratif yang dapat menimbulkan kemunduran proses memori (Barnes *et al.*, 2006; Myhrer, 2003), pemahaman (Verdon *et al.*, 2007) dan kemampuan bicara (Forbes-McKay dan

Venneri, 2005). Penyakit ini bersifat *irreversible*, progresif dan cenderung meningkat pada usia 65 tahun dan semakin meningkat pada usia lebih dari 85 tahun (Prince dan Jackson, 2009). Seseorang yang menderita demensia Alzheimer berkaitan dengan gangguan memori deklaratifnya sehingga tidak mampu mengingat fakta dan peristiwa (Guyton dan Hall, 2011). Gejala lainnya dapat berupa perubahan tingkah laku seperti kecemasan dan disforia (Mega *et al.*, 1996).

Pada penderita Alzheimer, ukuran daerah otak yang berfungsi untuk proses belajar dan mengingat, yaitu lobus frontal dan medial serta hippocampus berkurang. Hal ini terjadi akibat degenerasi sinapsis dan kematian neuron (Arendt, 2009). Laju penurunan volume hippocampal orang tua normal adalah 0,8% per tahun, namun pada seseorang penderita Alzheimer laju penurunannya adalah 4,4% per tahun (Schuff *et al.*, 2009). Otak penderita Alzheimer menunjukkan atrofi akibat hilangnya neuron dan adanya debris yang meluas (Anonim, 2011). Atrofi dimulai dari lobus temporalis medialis dan berlanjut ke neocortex (Braak dan Braak, 1995).

Demensia vaskuler merupakan penyebab paling banyak kedua penderita demensia (Stewart, 2007). Penderita vaskuler demensia ditandai dengan kehilangan progresif fungsi kognitif akibat dari gangguan suplai oksigen ke otak sehingga menyebabkan apoptosis sel (Imfeld *et al.*, 2013). *Frontal lobe dementia* merupakan demensia spesifik yang menyerang lobus frontalis otak dan mengakibatkan perubahan kepribadian seperti apatis, kehilangan harapan hidup dan menurunnya kemampuan untuk berkomunikasi. Beberapa penyakit lain

seperti Parkinson dan HIV juga dapat berkembang menjadi demensia pada stadium akhir penyakit ini (Wimo *et al.*, 2013).

2. Epidemiologi

Demensia Alzheimer merupakan salah satu penyebab kematian yang meningkat setiap tahunnya seiring meningkatnya umur harapan hidup (Borson *et al.*, 2013). Insidensi penyakit ini pada tahun 2005 di kawasan Asia Pasifik berjumlah 13,7 juta orang dan di Indonesia berjumlah 606.100 orang. Pada tahun 2050 diperkirakan penderita demensia di kawasan Asia Pasifik akan meningkat menjadi 64,6 juta orang (Anonim, 2006). Di Amerika Serikat diprediksi bahwa jumlah penderita demensia meningkat secara eksponensial dari 25,5 juta pada tahun 2000 menjadi 114 juta pada tahun 2050 (Wimo *et al.*, 2003). Perkiraan global prevalensi demensia pada orang yang berumur lebih dari 60 tahun adalah 1,9% di Afrika, 3,9% di Eropa Timur, 4,0% di Cina, 4,6% di Amerika Latin, 5,4% di Eropa Barat dan 6,4% di Amerika Utara (Qiu *et al.*, 2007) sementara di China dan Asia Tenggara diperkirakan akan meningkat 3 kali lipat pada tahun 2041 (Ferri *et al.*, 2005).

3. Patogenesis

Stres oksidatif merupakan patogenesis penting dalam perkembangan demensia (Butterfield *et al.*, 2002). Otak sangat rentan terhadap serangan radikal bebas karena otak merupakan organ dengan kebutuhan oksigen atau energi tinggi, tetapi sistem pertahanan antioksidan relatif sedikit dibandingkan organ lain

(Musalmah *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2000). Radikal bebas dapat menyebabkan peroksidasi lipid, oksidasi protein, dan DNA yang dapat menyebabkan kematian neuron (Varadarajan *et al.*, 2001). Kematian neuron dapat mempengaruhi perilaku atau gejala kejiwaan serta memori, yang secara bertahap dapat mengakibatkan ketidak mampuan melakukan kegiatan normal sehari-hari (Ji dan Wilson, 2007).

Menurut Haass dan Selkoe (2007) patogenesis demensia Alzheimer terjadi karena adanya gangguan agregasi protein akibat hiperfosforilasi protein *tau* (τ) yang menghasilkan *neurofibrillary tangles* (NFTs) dan peningkatan agregasi *amyloid-beta peptide* ($A\beta$) dari *amyloid precursor protein* (APP). APP merupakan protein integral membran yang diekspresikan pada beberapa jaringan dan terkonsentrasi pada sinapsis dan neuron. Fungsi primer APP tidak diketahui namun diduga sebagai regulator pembentukan sinaps (Priller *et al.*, 2006) dan plastisitas neural (Turner *et al.*, 2003).

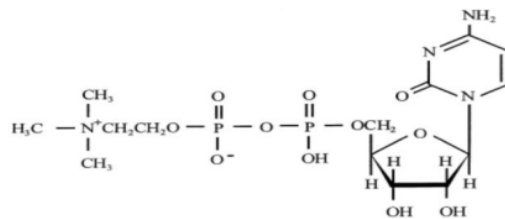
Protein APP dihidrolisis pada tapak yang berbeda oleh α sekretase, β sekretase dan γ sekretase. Ketika APP dihidrolisis oleh α sekretase akan dihasilkan produk peptida yang non toksik. Namun ketika dihidrolisis oleh β sekretase dan γ sekretase akan dihasilkan polipeptida dengan 40-42 asam amino yang toksik. Polipeptida tersebut akan membentuk agregat ekstraseluler yang dapat menempel pada reseptor AMPA dan saluran ion Ca^{2+} , sehingga meningkatkan influks Ca^{2+} . Polipeptida tersebut akan menginisiasi respon inflamasi dengan menghasilkan *tangles* intraseluler (Barrett *et al.*, 2009).

4. Manajemen

Selama ini sudah banyak usaha yang dilakukan untuk menurunkan insidensi demensia. Usaha-usaha yang sudah dilakukan meliputi pencarian obat baik secara sintesis maupun penelusuran dari bahan alam. Target obat untuk demensia meliputi aktivitas antikolinesterase (Lin *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2006; Vasudevan dan Parle, 2009), aktivitas antioksidatif (Dhanasekaran *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2007), modulasi aktivitas sekretase yang menghasilkan β amiloid (Dhanasekaran *et al.*, 2009; Fujiwara *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009), degradasi β -amiloid (Lee *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2005), pengkelat logam berat (Ren *et al.*, 2006), faktor nootropik (Moriguchi *et al.*, 2013) dan mekanisme kematian sel (Yu *et al.*, 2005).

Obat seperti donepezil atau rivastigmin selama ini digunakan untuk terapi simptomatik demensia Alzheimer karena menghambat asetilkolinesterase (AChE) (Okello *et al.*, 2004). Asetilkolinesterase adalah enzim yang memecah neurotransmitter asetilkolin. Penghambatan aktivitas asetilkolinesterase akan meningkatkan aktivitas neurotransmitter asetilkolin yang akan memberikan efek positif pada fungsi kognitif (Darreh-Shori *et al.*, 2002; Giacobini *et al.*, 2002; Müller, 2007). Asetilkolin merupakan neurotransmitter terkait dengan plastisitas sinaptik, terutama untuk belajar dan memori jangka pendek. Asetilkolin dapat meningkatkan amplitudo potensial sinaptik yang mengikuti potensiasi jangka panjang (LTP, *long term potentiation*) pada tempat seperti di gyrus dentatus, CA1, cortex piriformis dan neocortex (Crespo *et al.*, 2006).

Citidine-5-diphosphocholine (CDP-*choline*) atau sitikolin telah digunakan sebagai neuroprotektor dan obat yang dapat meningkatkan fungsi memori pada penyakit Alzheimer (Alvarez *et al.*, 1999; Cacabelos *et al.*, 1996; J *et al.*, 1994) dan penyakit neurovaskuler (Adibhatla dan Hatcher, 2005). Diduga CDP-*choline* digunakan sebagai *raw material* untuk sintesis fosfolipid, yang merupakan komponen membran sel yang dibutuhkan untuk memelihara struktur sel saraf. Berdasarkan penelitian Takasaki *et al.* (2011) pemberian sitikolin 100, 300, 1000 mg/kg BB per oral selama 7 hari pada tikus model demensia serebrovaskuler, dapat mengurangi kesalahan memasuki lengan pada uji radial *maze* serta menurunkan jumlah apoptosis neuron yang ditunjukkan dengan penurunan ekspresi protein *caspase-3* yang berperan dalam fase eksekusi kematian sel.



Gambar 5. Struktur sitikolin (dikutip dari D'Orlando dan Sandage, 1995)

Pencegahan demensia juga dilakukan dengan pemberian senyawa statin, vitamin E (antioksidan) serta *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAID) (Anonim, 2006). Penggunaan senyawa antioksidan memberikan manfaat karena senyawa antioksidan dapat memproteksi neuron dari toksisitas β -amiloid (Sano *et al.*, 1997). Berbagai studi juga menunjukkan keterkaitan ROS dengan patogenesis penyakit Alzheimer sehingga memungkinkan terapi menggunakan antioksidan

(Devore *et al.*, 2010). Pemberian antioksidan dapat memproteksi membran sel dari cedera oksidatif (Chew dan Park, 2004) sehingga berfungsi sebagai agen neuroprotektif. Beberapa penangkap radikal bebas lain seperti vitamin E dan C, ekstrak Ginkgobiloba, melatonin, flavonoid dan karotenoid dapat menghambat efek toksik beta amiloid dan hidrogen superoksida pada kultur hipokampal organotipik (Bastianetto *et al.*, 2000; Pappolla *et al.*, 1997). Senyawa kurkumin juga dapat menurunkan secara signifikan protein teroksidasi dan interleukin-1 α (sitokin inflamasi) yang terkait dengan pembentukan plak neuritik pada otak (Lim *et al.*, 2001).

2.4. Radikal Bebas

Radikal bebas atau oksidan adalah spesies kimiawi yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluarnya (Gilbert, 2000; Riley, 1994). Radikal bebas bersifat tidak stabil, sangat reaktif dan cenderung bereaksi dengan molekul lain untuk mencari pasangan elektronnya menjadi bentuk yang lebih stabil (Kato *et al.*, 1995). Sumber radikal bebas dapat berasal dari sumber eksogen dan endogen. Sumber eksogen berasal dari absorpsi radiasi lingkungan seperti sinar ultraviolet, rokok, pestisida, polusi lingkungan yang berasal dari asap kendaraan bermotor serta zat toksik lainnya. Sedangkan sumber endogen berasal dari reaksi oksidatif yang terjadi selama proses metabolisme normal atau metabolisme enzimatik dari senyawa kimia eksogen (Robbin *et al.*, 1989; Packer, 1994) yang dapat berasal dari mitokondria, sitokrom P450, peroksisom dan aktivasi sel inflamasi (Inoue *et al.*, 2003).

Radikal yang dihasilkan tersebut umumnya adalah ⁶ *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) (Pham-Huy *et al.*, 2008). ROS dapat dibagi menjadi 2 kelompok yaitu radikal bebas dan non radikal bebas. Molekul mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dan reaktif terhadap molekul lain disebut sebagai radikal bebas. Sedangkan ketika 2 radikal bebas saling memberikan elektron yang tidak berpasangan maka akan dihasilkan non radikal (Birben *et al.*, 2012). Contoh radikal bebas oksigen adalah radikal superoksida, hidroksil, peroksil ($\text{RO}_2\cdot$), alkoksil ($\text{RO}\cdot$), dan hidroperoksil ($\text{HO}_2\cdot$). Sedangkan contoh radikal nitrogen adalah nitrik oksida dan nitrogen dioksida ($\cdot\text{NO}_2$). Oksigen dan nitrogen dapat dikonversi menjadi spesies reaktif non radikal lainnya seperti hidrogen peroksida, asam hipoklorit (HOCl), asam hipobromit dan peroksinitrit (ONOO^-) (Fang *et al.*, 2002). Spesies-spesies tersebut dapat berperan ganda yaitu sebagai senyawa yang menguntungkan namun juga merupakan senyawa toksik (Lopaczynski dan Zeisel 2001). Pada kadar yang cukup, ROS dan RNS dapat berperan dalam fungsi biologis seperti sebagai bakterisidal dan bakteriolisis, proses menghasilkan energi atau transport elektron (ATP tubuh), mediator respon terhadap infeksi patogen, sinyal apoptosis sel atau jalur sinyal transduksi dan *second messenger*, serta sintesis eikosanoid (Batish *et al.*, 2006). Namun pada konsentrasi yang tinggi spesies-spesies tersebut dapat menyebabkan stres oksidatif, yang dapat merusak struktur sel (Birben *et al.*, 2012; Valko *et al.*, 2006).

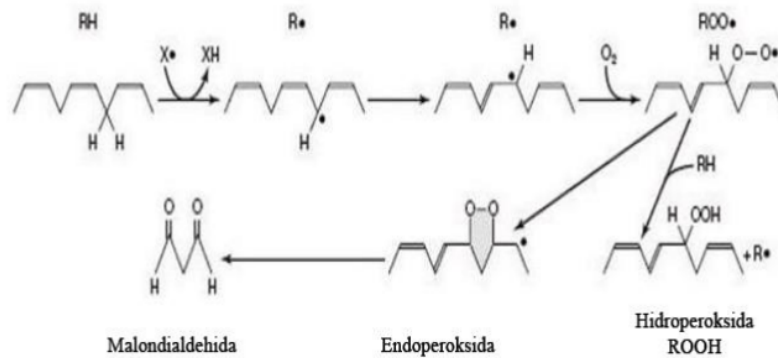
2.5. Peroksidasi lipid

Peroksidasi lipid adalah suatu mekanisme destruksi oksidatif asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) yang terbentuk dari proses autokatalitik tidak terkontrol yang menghasilkan pembentukan asam lemak hidroperoksida dan senyawa aldehid (Cheeseman dan Slater, 1993). Asam lemak tak jenuh ganda pada membran sel adalah target dari peroksidasi lipid (Mardiani, 2008), Peroksidasi lipid dapat diinisiasi oleh radikal bebas seperti radikal anion superoksida, radikal hidroksil dan radikal peroksil (McCord, 2000).

Proses peroksidasi lipid umumnya dimulai dengan penarikan atom hidrogen yang mengandung satu elektron dari ikatan rangkap PUFA membentuk radikal lipid. Penambahan oksigen akan menyebabkan terbentuknya radikal peroksil lipid yang selanjutnya akan menarik lagi atom hidrogen dari ikatan rangkap PUFA yang lain, sehingga terbentuk radikal lipid berikutnya. Sedangkan radikal peroksil lipid tersebut akan mengalami dekomposisi menjadi lipid peroksida (Pendit, 1996).

Menurut Murray *et al.* (2009) serta Gurr dan James (1980), proses peroksidasi lipid terdiri atas tiga tahap, yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Tahap inisiasi diawali dengan pemisahan sebuah atom hidrogen oleh radikal bebas dari suatu gugus metilena (-CH₂-) dari asam lemak tak jenuh ganda *polyunsaturated fatty acid* (PUFA), yang membentuk radikal karbon (-*CH-) pada PUFA. Radikal karbon distabilkan melalui pengaturan ulang ikatan rangkap yang membentuk diena terkonjugasi. Jika diena terkonjugasi bereaksi dengan O₂ maka akan terbentuk radikal lipid peroksida (ROO*). Pada tahap propagasi, radikal lipid

peroksida juga dapat menghilangkan sebuah atom hidrogen dari molekul lipid lain yang berdekatan sehingga membentuk radikal lipid lain, yang bereaksi dengan O_2 sehingga reaksi peroksidasi lipid terus berlanjut (Murray *et al.*, 2009). Pembentukan endoperoksida lipid pada PUFA yang mengandung sedikitnya tiga ikatan rangkap akan mendorong pembentukan *malondialdehyde* (MDA), sebagai produk dari reaksi peroksidasi. Tahap terminasi terjadi saat dua molekul radikal bebas bereaksi atau adanya senyawa antioksidan dan membentuk spesies nonradikal (Murray *et al.*, 2009). Proses peroksidasi lipid dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Proses peroksidasi lipid (dikutip dari Murray *et al.*, 2009)

Markesbery (1997) melaporkan bahwa peroksidasi lipid adalah penyebab utama kerusakan membran fosfolipid pada penderita demensia Alzheimer (AD). Produk peroksidasi lipid yaitu *4-hydroxynonenol* (HNE), yang ditemukan dengan konsentrasi tinggi pada pasien AD (Gabbita *et al.*, 1998), terbukti toksik terhadap kultur sel hippocampus. Senyawa aldehida diduga menyebabkan kematian sel dengan mempengaruhi enzim ATPase yang terkait dengan transfer ion dan

homeostasis kalsium (Mark *et al.*, 2002). Peningkatan konsentrasi kalsium dapat menyebabkan peristiwa kaskade intraseluler yang akan meningkatkan ROS dan kematian sel (Mattson, 1995).

2.6. Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah kondisi ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan yang terdapat di dalam tubuh dimana keberadaan radikal-bebas tersebut di dalam tubuh melampaui kapasitas antioksidan yang terdapat di dalam tubuh (Fang *et al.*, 2002; Powers dan Jackson, 2008). Peningkatan radikal tersebut dapat terjadi sebagai akibat dari metabolisme oksigen, reperfusi oksigen saat kondisi hipoksia, oksidasi hemoglobin dan mioglobin, dan lain-lain (Finaud *et al.*, 2006). Dalam jumlah normal, radikal bebas dapat berperan sebagai sistem pertahanan, biosintesis hormon, fertilisasi, dan sinyal seluler (Paravicini dan Touyz, 2008).

Stres oksidatif yang berlangsung terlalu lama dapat menimbulkan kerusakan pada DNA, protein, lipid sehingga dapat memicu terjadinya penyakit degeneratif (Finaud *et al.*, 2006). Telah dilaporkan bahwa stres oksidatif berkontribusi pada perkembangan penyakit seperti kanker, gangguan neurologik (Jenner, 2003; Sayre *et al.*, 2001), aterosklerosis, hipertensi, iskemia (Dhalla *et al.*, 2000; Kasparová *et al.*, 2005), diabetes, sindrom distress respirasi akut, fibrosis pulmonar idiopatik (Asami *et al.*, 1997) dan asma (Dut *et al.*, 2008).

Otak merupakan organ yang mudah mengalami stres oksidatif. Hal ini disebabkan karena: 1) metabolisme otak membutuhkan oksigen dalam jumlah besar, meskipun berat otak hanya 2% dari berat tubuh, otak menggunakan sekitar

50% dari seluruh oksigen tubuh, 2) kandungan PUFA yang tinggi, hampir 50% dari struktur jaringan otak, 3) jaringan otak mengandung asam askorbat 100 kali lipat dibanding di pembuluh darah perifer, tetapi mempunyai antioksidan alami lebih rendah daripada jaringan lain (Grotto *et al.*, 2009; Siswonoto, 2008) (Clemens dan Pannetta, 1995).

Saat ini untuk mengetahui adanya stres oksidatif dapat digunakan penanda biologi untuk mengetahui adanya penyakit dan juga efikasi dari suatu obat. Penanda dapat ditemukan di darah, urin dan cairan biologis yang lain. Beberapa penanda spesifik untuk mengetahui kerusakan pada bagian tertentu dari tubuh, misalnya: lipid peroksida, MDA dan 4-hidroksinonenal (HNE) merupakan penanda kerusakan oksidatif pada lipid; iso-prostan sebagai produk radikal bebas oksidasi asam arakhnoik; 8-oksoguanin (8-hidroksiguanin) dan *thymineglycol* sebagai indikator kerusakan oksidatif pada DNA; dan protein karbonil, hidroksileusin, hidrovalin, dan nitrotirosin merupakan produk oksidasi protein dan asam amino (Morita *et al.*, 2012).

Telah dilaporkan bahwa otak penderita demensia Alzheimer mengalami stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan senyawa yang mengindikasikan adanya oksidasi protein (protein karbonil, 3-nitrotirosin), peroksidasi lipid (MDA, HNE; F2-isoprostanes dan F4-neuroprostanes), dan oksidasi asam nukleat (8-hidroksi-2-deoksiganosin, 8-hidroksiguanosin) (Hensley *et al.*, 1995; Markesbery, 1997; Smith *et al.*, 2001).

2.7. Antioksidan

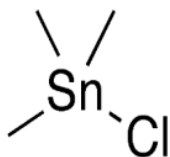
Antioksidan adalah suatu molekul/ senyawa yang mempunyai kemampuan menstabilkan atau deaktivasi radikal bebas sebelum radikal bebas tersebut menyerang tubuh (Rahman, 2007). Antioksidan akan menetralkan kelebihan radikal bebas, sehingga melindungi sel dari efek toksik dan berperan dalam pencegahan penyakit (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Senyawa antioksidan di dalam tubuh diklasifikasikan menjadi 2 yaitu antioksidan enzimatik dan antioksidan non enzimatik (Fang *et al.*, 2002; Kharrazi *et al.*, 2008). Kedua antioksidan tersebut akan bekerja secara sinergis. Antioksidan enzimatik yang secara langsung terkait dalam penetralan ROS dan RNS adalah : superoksid dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathion peroksidase (GPx) dan glutathion reduktase (GRx) (Butterfield *et al.*, 2002; Ceriello, 2008; Gandhi dan Abramov, 2012). SOD merupakan pertahanan lini pertama melawan radikal bebas, dengan mengkatalisis dismutasi superoksida anion radikal ($O_2^{\cdot-}$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) melalui reaksi reduksi. Oksidan yang terbentuk (H_2O_2) kemudian ditransformasi menjadi air dan oksigen (O_2) oleh katalase atau glutathion peroksidase. Enzim selenoprotein GPx mengoksidasi glutathion tereduksi (GSH) menjadi glutathion teroksidasi (GSSG). Glutathion reduktase, merupakan enzim flavoprotein, meregenerasi GSH dari GSSG, dengan NADPH sebagai sumber tenaga untuk mereduksi. Di samping hidrogen peroksida, GPx juga mereduksi lipid atau nonlipid hidroperoksida selama mengoksidasi glutathion (GSH) (Baharun *et al.*, 2006; Dröge, 2002; Genestra, 2007; Halliwell, 2006).

Antioksidan non-enzimatik dibagi menjadi antioksidan metabolik dan antioksidan nutrien. Antioksidan metabolik dihasilkan oleh proses metabolisme di dalam tubuh seperti asam lipoid, glutation, L-arginin, koenzim Q10, melatonin, asam urat, bilirubin, protein pengkelat, transferrin, dan lain-lain (Dröge, 2002; Willcox *et al.*, 2004). Sedangkan nutrien antioksidan adalah senyawa yang tidak dapat dihasilkan di dalam tubuh dan harus disediakan melalui makanan atau suplemen seperti vitamin E, vitamin C, karotenoid, selenium, *manganese*, *zinc*, flavonoid, asam lemak omega-3 dan omega-6 dan lain-lain (Pham-Huy *et al.*, 2008).

2.8. Trimetiltin

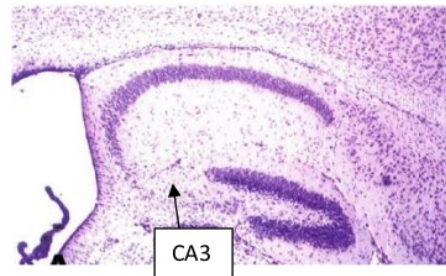
Trimetiltin (TMT) merupakan produk industri dimetiltin klorida, suatu agen untuk menstabilkan plastik tertentu. Zat ini merupakan organometal yang bersifat neurotoksik yang dapat merusak daerah sistem limbik dan cortex serebral (Balaban *et al.*, 1998). Secara eksperimen TMT telah diketahui dapat menyebabkan degenerasi selektif pada sistem saraf pusat rodensia sehingga menyebabkan kematian saraf secara selektif, menghasilkan astrogliosis reaktif, dan aktivasi mikrogliial pada sistem limbik terutama pada hippocampus (Corvino *et al.*, 2005; Farghaly *et al.*, 2010).



Gambar 7. Rumus Bangun Trimetiltin Klorida

Trimetiltin meningkatkan pembentukan spesies oksigen reaktif (Shuto *et al.*, 2009). Pemberian TMT secara sistemik dapat meningkatkan pembentukan radikal hidroksil, malondialdehid dan karbonil protein hippocampus (Shin *et al.*, 2005). TMT juga mengganggu sistem serotonergik dan noradrenergik (Ogita *et al.*, 2004), menginduksi kaskade apoptosis, mengaktifkan astrosit dan mikroglia, serta menghasilkan sitokin proinflamasi (Buck-Koehntop *et al.*, 2005). Dosis akut tunggal TMT dapat menginduksi perubahan lapisan sel granula, sedangkan dosis kronik yang lebih rendah dapat mempengaruhi daerah sel pyramidal CA1-CA4 (Robertson *et al.*, 1987).

Gambaran histopatologi dari jaringan saraf karena pemberian TMT menunjukkan adanya akumulasi *dense bodies*, vakuola autofagik pada sitoplasma dan vakuolisasi apparatus golgi serta retikulum endoplasma sel saraf (Harry dan d'Hellencourt, 2003). TMT juga dapat menginduksi nekrosis dan apoptosis pada sel granular serebelar (Gunasekar *et al.*, 2001; Harry *et al.*, 2003). Paparan TMT klorid pada tikus dosis 3 mg/kg BB secara intraperitoneal selama 3 hari berturut-turut menunjukkan adanya nekrosis dan hilangnya sel-sel pyramidal bagian dorsal daerah CA3 dan CA1 setelah hari ke-8 paparan. Lesi tersebut berkembang progresif hingga hari ke 28 (Robertson *et al.*, 1987).



Gambar 8. Gambaran histologik intoksikasi TMT pada hippocampus menunjukkan hilangnya neuron pyramidal pada daerah CA3 (dikutip dari Philbert *et al.*, 2000)

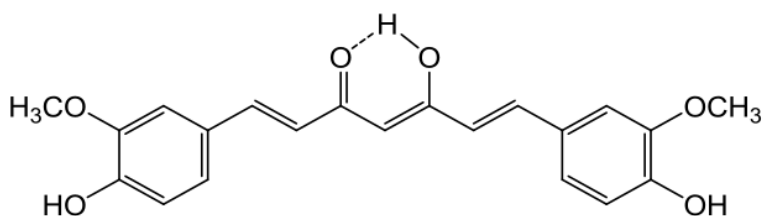
Sistem kolinergik pusat juga telah dikaitkan dengan efek neurodegeneratif dari TMT. Trimetiltin dapat mengurangi jumlah reseptor kolinergik muskarinik, sehingga perbaikan perilaku karena paparan TMT dilakukan dengan memberikan inhibitor asetilkolin esterase tacrin (Geloso *et al.*, 2007). Gejala intoksikasi TMT menyebabkan TMT sesuai untuk model neurodegeneratif kronik dengan gangguan kognitif sehingga bermanfaat untuk studi penyakit demensia Alzheimer (Kassed *et al.*, 2003).

2.9. Kunyit (*Curcuma longa* Linn)

Kunyit mempunyai susunan taksonomi sebagai berikut: Kingdom: Spermatophyta; sub-divisio: Angiospermae; Kelas: Monokotiledoneae; Ordo: Zingiberales; Famili : Zingiberaceae; Genus: Curcuma; Spesies : *Curcuma longa* Linn (Wijayakusuma *et al.*, 1992). Kunyit dikenal sebagai bumbu kari masakan Asia yang telah dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Penelitian tentang kunyit yang sudah dilakukan adalah aktivitasnya sebagai antioksidan (Eybl *et al.*, 2006; Jurenka, 2009), antikanker (Chauhan, 2002), antiarthritis (Park *et al.*, 2007),

antihiperkolesterolemia (Ramírez-Tortosa *et al.*, 1999), anti platelet (Lee, 2006), antihepatotoksik (Park *et al.*, 2000), antiprotozoal (Rasmussen *et al.*, 2000), antifungal (Sharma *et al.*, 2010), antihiperkolesterolemia (Miquel *et al.*, 2002) antirematik (Araújo dan Leon, 2001).

Kunyit mengandung senyawa yang berkhasiat obat, yang disebut kurkuminoid yang terdiri dari kurkumin, desmetoksikurkumin dan bisdesmetoksikurkumin serta zat-zat bermanfaat lainnya. Kandungan kurkuminoid: kurkumin : R1 = R2 = OCH₃ 10 % (seperti terlihat pada Gambar 9), demetoksikurkumin : R1 = OCH₃, R2 = H 1 – 5 %, bisdemetoksikurkumin: R1 = R2 = H, sisanya minyak atsiri / *volatil oil* (keton sesquiterpen, turmeron, tumeon 60%, zingiberen 25%, feldanren, sabinen, borneol dan sineil), lemak 1-3 %, karbohidrat 3 %, protein 30%, pati 8%, vitamin C 45-55%, garam-garam mineral (zat besi, fosfor, dan kalsium) (Paramasivam *et al.*, 2009).



Gambar 9. Struktur kurkumin (Paramasivam *et al.*, 2009)

Kandungan kurkumin dalam kunyit potensial berfungsi sebagai agen neuroprotektif (Bala *et al.*, 2006; Bishnoi *et al.*, 2008; Cole *et al.*, 2007; Dohare *et al.*, 2008; Kuhad dan Chopra, 2007; Ringman *et al.*, 2005). Aktivitas antioksidan kurkumin beberapa kali lebih poten sebagai penangkap radikal bebas

dibandingkan vitamin E (Bengmark, 2006; Braga *et al.*, 2003; Chainani-Wu, 2003). Kurkumin secara *in vitro* dapat menghambat peroksidasi lipid di otak (Kalpana dan Menon, 2004; Sreejayan dan Rao, 1994). Studi *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan kurkumin dapat menurunkan beta amyloid yang diinduksi oleh stres oksidatif dan neurotoksisitas (Begum *et al.*, 2008; Frautschy *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2001; Ono *et al.*, 2004; Perluigi *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005a). Kurkumin dapat mengurangi kadar beta amiloid terlarut dan tidak terlarut sebanyak 43-50 persen (Lim *et al.*, 2001). Kurkumin dapat mencegah peningkatan malondialdehid (produk peroksidasi lipid) dan memperbaiki penurunan glutathion pada tikus yang diinduksi stres oksidatif dengan asam kainat (Gupta *et al.*, 2009). Kurkumin dapat mencegah stres oksidatif dan memperbaiki antioksidan endogen (Ishrat *et al.*, 2009). Kurkumin juga dapat menormalkan penurunan memori pada tikus yang diinduksi streptozotocin secara intraserebral (Agrawal *et al.*, 2010).

2.10. Landasan Teori

Otak merupakan organ yang peka terhadap stres oksidatif. Hal ini disebabkan karena otak merupakan organ dengan kebutuhan energi tinggi, kandungan asam lemak tidak jenuh yang tinggi, laju kebutuhan oksigen tinggi tetapi sistem pertahanan antioksidan relatif sedikit dibandingkan organ lain (Musalmah *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2001).

Salah satu zat neurotoksik yang dapat menyebabkan stres oksidatif pada otak adalah trimetiltin (TMT). Sel saraf yang peka terhadap toksisitas TMT ditemukan pada hippocampus, cortex piriformis, cortex entorinal, amigdala,

neocortex dan tuberkel olfaktorika (Balaban *et al.*, 1988). TMT dapat meningkatkan pembentukan ⁶ *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) (Viviani *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006). Peningkatan ROS dan RNS dapat menyebabkan kerusakan oksidatif terhadap lipid dan protein, sehingga menyebabkan gangguan fungsional dan struktural membran sel. Gangguan membran sel dapat menyebabkan inaktivasi enzim dan peningkatan kadar Ca^{2+} intraseluler sehingga mengaktifasi enzim katepsin D dan kalpain yang berperan dalam kematian sel ⁴ (Jovanovic *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1995; Ansari *et al.*, 2008). Kerusakan oksidatif pada lipid menghasilkan produk seperti malondialdehid (MDA), 4 *hydroxy-2,3-nonenal* (HNE), *acrolein* dan lain-lain. Di dalam tubuh, antioksidan endogen seperti glutathion peroksidase (GPx), superoksid dismutase (SOD), dan katalase (CAT) berperan untuk mencegah kerusakan oksidatif tersebut (Ashok dan Ali, 1999; Block *et al.*, 2002). Dengan demikian pengukuran terhadap produk oksidasi lipid dan antioksidan tersebut dapat memberikan gambaran yang lebih jelas adanya stres oksidatif.

Peningkatan ROS dan RNS dapat menurunkan BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) hippocampus yang berperan untuk plastisitas sinaptik dan induksi *long term potentiation* (LTP). Penurunan BDNF selanjutnya dapat menurunkan sinapsin 1, yaitu protein yang terletak di ujung saraf yang berkaitan dengan pelepasan neurotransmitter, elongasi aksonal dan memelihara kontak sinaptik. Disfungsi sinaptik berkaitan dengan proses memori. Penurunan BDNF juga dapat menyebabkan penurunan CREB (*Cyclic AMP- response elementary-binding*) yaitu faktor neurotropik (Finkbeiner, 2000; Ying *et al.*, 2002) yang

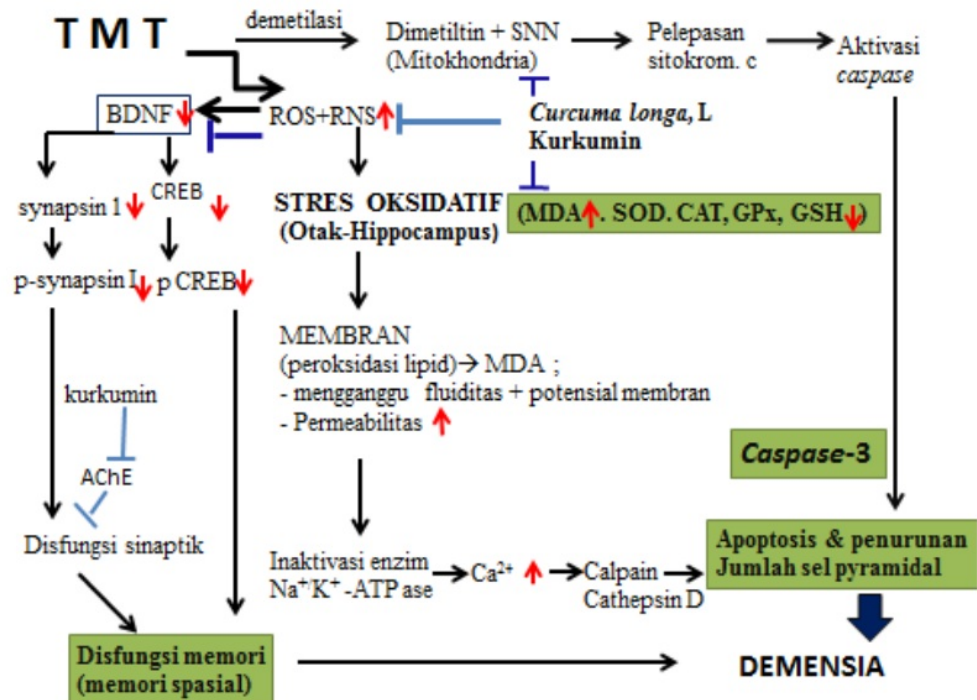
berperan dalam plastisitas sinaptik. Kemudian TMT juga dapat menyebabkan disfungsi mitokondria, mengaktifkan protein kinase-C (Roy *et al.*, 1999) dan menginduksi *apoptotic cascade* (Thompson *et al.*, 1996) yang dapat menyebabkan kematian sel pyramidal hippocampus melalui mekanisme apoptosis. Kerusakan mitokondria oleh TMT kemungkinan dimediasi oleh protein stannin (SNN) dari sel yang sensitif terhadap TMT (Back *et al.*, 2004). Kematian sel pyramidal hippocampus menyebabkan jumlah sel akan berkurang sehingga dapat mempengaruhi proses memori. Menurut Kassed *et al.* (2003) dan Park *et al.* (2011) paparan TMT dapat digunakan sebagai model demensia pada hewan uji karena dapat meningkatkan pembentukan spesies oksigen reaktif, gangguan sistem kolinergik dan penurunan memori spasial.

Senyawa antioksidan banyak dilaporkan mempunyai efek neuroprotektif terhadap demensia. Berbagai studi telah menunjukkan adanya keterkaitan antara *reactive oxygen species* (ROS) dengan patogenesis demensia sehingga memungkinkan pencegahan menggunakan senyawa antioksidan (Devore *et al.*, 2010). Senyawa antioksidan pada hewan uji dapat mencegah disfungsi mitokondria (Bertoni-Freddari *et al.*, 1995; Subramaniam *et al.*, 1998), fragmentasi DNA (Bagchi *et al.*, 1998), dan mengurangi neurotoksisitas (Huang *et al.*, 2000), apoptosis (Ahlemeyer *et al.*, 2000) dan kematian neuronal (Dong *et al.*, 1999). Rimpang kunyit mengandung kurkumin yang mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi (Braga *et al.*, 2003; Chainani-Wu, 2003). Menurut Pan *et al.* (2008) pemberian senyawa kurkumin juga dapat mencegah apoptosis pada tikus model demensia yang terpapar $AlCl_3$. Mekanisme apoptosis melibatkan

protein-protein, salah satunya adalah *caspase-3* yang berperan dalam fase eksekusi apoptosis sel. Dengan demikian pengamatan ekspresi *caspase-3* dapat menjadi biomarker adanya apoptosis. Selain itu kurkumin telah dilaporkan dapat meningkatkan asetilkolin yaitu suatu neurotransmitter yang berperan untuk meningkatkan amplitudo potensial sinaptik yang mengikuti potensiasi jangka panjang (LTP).

Penggunaan senyawa murni mempunyai beberapa kelemahan dalam aplikasi penggunaan secara massal terkait dengan kepraktisan produksinya. Oleh karena itu penggunaan ekstrak kunyit terstandar kurkumin diharapkan dapat mengatasi permasalahan tersebut.

2.1.1. Kerangka Teori



Gambar 10. Skema kerangka teori penelitian ² Efek Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma longa, L*) Terstandar Kurkumin pada Tikus Model Demensia yang Diinduksi TMT

Keterangan : ↓ memicu ↓ meningkat ↑ menurun
 ⊥ : menghambat ■ variabel yang diteliti

2.12. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan permasalahan dan landasan teori telah yang dikemukakan, maka dapat diajukan suatu hipotesis yaitu :

1. Variasi dosis ERKTK dapat meningkatkan memori spasial tikus SD model demensia yang diinduksi TMT: (i) ERKTK meningkatkan waktu latensi dan panjang lintasan pada *acquisition trial* (ii) ERKTK meningkatkan frekuensi dan persentase lama tikus berada pada kuadran target pada *probe trial* (iii) Perbedaan memori spasial bukan disebabkan karena adanya gangguan sensorik, motorik, dan motivasional pada uji sensorimotor.
2. Variasi dosis ERKTK memiliki aktivitas antioksidan pada tikus SD model demensia yang diinduksi TMT: (i) ERKTK mencegah peningkatan kadar malondialdehid (MDA) plasma. (ii) ERKTK mencegah peningkatan kadar MDA otak. (iii) ERKTK meningkatkan aktivitas glutathion peroksidase (GPx) otak. (iv) ERKTK meningkatkan aktivitas superoksid dismutase (SOD) otak. (v) ERKTK meningkatkan aktivitas katalase (CAT) otak. (vi) ERKTK meningkatkan kadar glutathion (GSH) otak.
3. Variasi dosis ERKTK mencegah perubahan gambaran histologik hippocampus pada tikus SD yang diinduksi TMT: (i) ERKTK mencegah penurunan estimasi volume lapisan pyramidal dan jumlah total sel piramidal daerah CA1 hippocampus. (ii) ERKTK mencegah penurunan estimasi volume lapisan pyramidal dan jumlah total sel pyramidal daerah CA2-CA3 hippocampus. (iii) ERKTK mencegah ekspresi protein *caspase-3* di daerah CA1 hippocampus.

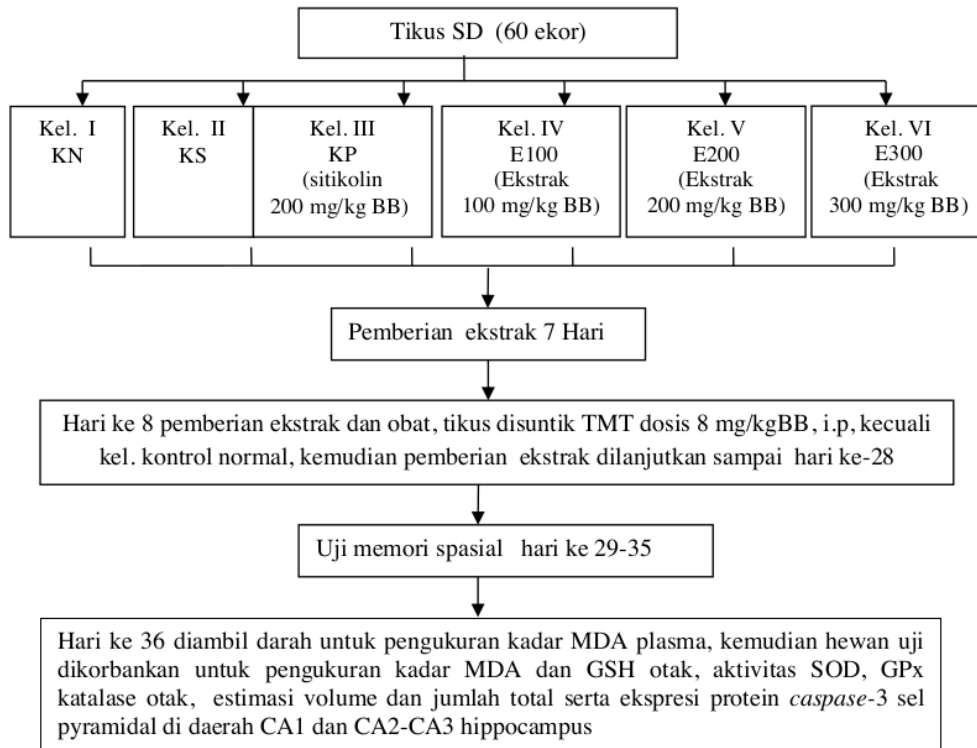
(iv) ERKTK mencegah ekspresi protein *caspase-3* di daerah CA2-CA3 hippocampus.

4. Variasi dosis ERKTK mempunyai efek yang sama atau lebih baik dibandingkan dengan sitikolin dosis 200 mg / kg BB pada tikus SD model demensia yang diinduksi TMT

BAB III
METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis eksperimental laboratorik. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *posttest-only control group design*, yaitu penelitian dengan perolehan data pasca perlakuan dengan tetap menggunakan variabel kontrol. dengan skema penelitian seperti pada Gambar 11.



Gambar 11. Skema rancangan penelitian efek ERKTK pada tikus *Sprague Dawley* model demensia yang diinduksi TMT. (KN, kontrol normal; KS, kontrol sakit; KP, kontrol positif)

3.2. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian ekstrak kunyit (*C. longa*, Linn) terstandar kurkumin dengan ⁷ dosis 100, 200, dan 300 mg/kg BB selama 28 hari.

2. Variabel Terpengaruh

Variabel terpengaruh dalam penelitian ini adalah

- (a) hasil uji memori spasial dengan uji Morris *water maze* berupa :
 - (i) waktu latensi dan panjang lintasan pada *acquisition trial*
 - (ii) frekuensi dan % lama waktu berada di kuadran target pada *probe trial*
 - (iii) waktu latensi pada uji sensorimotor
- (b) hasil uji biokimiawi berupa:
 - (i) kadar MDA plasma dan otak
 - (ii) aktivitas GPx otak
 - (iii) kadar GSH otak
 - (iv) aktivitas SOD otak
 - (v) aktivitas katalase otak
- (c) hasil uji histologik berupa :
 - (i) estimasi volume lapisan pyramidal di daerah CA1
 - (ii) estimasi volume lapisan pyramidal di daerah CA2-CA3
 - (iii) estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA1
 - (iv) estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA2-CA3

(v) ekspresi protein *caspase-3* di daerah CA1 hippocampus

(vi) ekspresi protein *caspase-3* di daerah CA2-CA3 hippocampus;

3. Variabel Luar

Variabel luar terdiri dari variabel terkontrol dan tidak terkontrol. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah jenis hewan uji, jenis kelamin, umur, pakan, berat badan hewan uji. Variabel yang tidak dapat dikendalikan adalah absorpsi dari TMT, ekstrak dan sitikolin di dalam hewan uji.

3.3. Definisi Operasional

1. Ekstrak terstandar merupakan ekstrak dari rimpang kunyit yang diperoleh dengan maserasi, yang memiliki kadar kurkumin tertentu berdasarkan hasil uji penetapan kadar dengan KLT-densitometer.
2. Model demensia adalah hewan uji galur *Sprague Dawley* sebagai model demensia dengan menyuntikkan trimetiltin (TMT klorid) dosis tunggal 8 mg/kg BB secara intra-peritoneal pada hari ke 8 pemberian ekstrak/sitikolin
3. Memori spasial adalah memori pada hewan uji yang digunakan untuk menemukan rute perjalanan menuju ke platform. Dalam penelitian ini memori spasial diamati berdasarkan uji Morris *water maze* yang terdiri dari 3 tahap yaitu *acquisition trial*, *probe trial* dan uji sensorimotor. Parameter untuk menggambarkan memori spasial adalah waktu latensi dan panjang lintasan pada *acquisition trial*; frekuensi dan % lama waktu

berada di kuadran target pada *probe trial* serta waktu latensi pada uji sensorimotor.

4. Waktu latensi adalah waktu (satuan detik) yang dicatat dengan *stopwatch* mulai tikus dimasukkan kolam sampai tikus berada di atas platform.
5. Panjang lintasan adalah jarak tempuh (satuan meter) yang diamati mulai tikus dimasukkan kolam sampai mencapai platform. Setiap tes direkam dengan kamera video, lalu diputar ulang dan pada layar monitor dilakukan pengukuran jarak tempuh lintasan menggunakan *curvimeter* mulai titik awal sampai tikus berada di platform. Jarak dihitung menggunakan rumus dibawah ini:

$$\text{Jarak} = \frac{\text{diameter kolam yang sebenarnya}}{\text{diameter kolam pada video}} \times \text{jarak pada video}$$

6. Frekuensi adalah jumlah ⁶ berapa kali tikus berada di target kuadran pada uji *probe trial*
7. Persen (%) lama waktu adalah total waktu tikus berada di kuadran target selama 60 detik, kemudian dibagi 60 dan dikalikan 100.
8. Pemeriksaan biokimiawi adalah pemeriksaan terhadap kadar MDA plasma (mmol/L) dan homogenat otak (nmol/mg) dengan metode spektrofotometri, dan aktivitas GPx (mU/mg protein), GSH (μ g/mg protein), SOD (ng/mg protein) dan katalase (mU/mg protein) pada otak yang dilakukan dengan metode kolorimetri. Bagian otak yang digunakan adalah hemispherium cerebri kiri.
9. Sel pyramidal hippocampus adalah neuron yang berada pada lapisan *Cornu Ammonis* (CA) hippocampus. Dalam penelitian ini akan dihitung

jumlah sel pyramidal CA1 dan CA2-CA3 dengan metode stereologi pada preparat histologik hippocampus yang dicat dengan toluidin *blue*

10. Imunohistokimia adalah metode visualisasi/pewarnaan sel dan jaringan yang dilakukan dengan dasar reaksi antigen-antibodi. Dalam penelitian ini akan dilihat ekspresi protein *caspase-3* pada sel pyramidal di daerah CA1 dan CA2-CA3 yang ditunjukkan dengan warna coklat pada inti atau sitoplasmanya dan yang tidak mengekspresikan protein *caspase-3* berwarna biru.

3.4. Alat, Bahan dan Tempat Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan uji adalah kandang hewan uji, jarum oral, spuit injeksi 1 mL, seperangkat alat bedah dan timbangan (Ohaus, New Jersey, USA). Alat untuk ekstraksi dan standarisasi adalah maserator, seperangkat alat gelas (Pyrex, Iwaki, Indonesia), *rotary evaporator* (Heidolph, Germany), densitometer (*TLC Scanner* densitometer, CAMAG, Switzerland). Alat uji memori spasial adalah kolam *maze*, video kamera (Prolink, Taiwan), *curvimeter* (Silva Sweden AB, Bromma, Sweden), *hair dryer* (Miyako, Indonesia). Alat untuk prosedur stereologi adalah mikrotom (Reichert Wein / Nr 13137, Austria), mikroskop (XSZ, PR China) yang dilengkapi kamera digital (Optilab Advance, Miconos, Indonesia), monitor (Samsung, Korea), *printer* (Canon MP 237 *printer*, Canon Inc., Kyoto, Japan), skala mikrometer (Ted Pella, Inc., USA, Prod. No. 2280-10), *Adobe Photoshop CS6* program (Adobe System Inc., San Jose, USA) dan *counter* (*Hand tally Counter*, Kenko HT 302).

Alat uji imunohistokimia adalah, *poly-L-lysine slide*, *decloaking chamber* (Decloaking Chamber™ NXGEN, Biocare Medical, Concord, California), mikroskop (Olympus, CX 75.). Alat uji biokimiawi adalah *deep freezer* (LG), neraca analitik (*AND GR 202*), *microcentrifuge* (Kubota, Japan), inkubator (Memmert, Germany), *waterbath* (Memmert, Germany), *homogenizer* (*Potter-Elvehjem Tissue Grinders*), vortex (Vortex Mixer, VM 300), spektrofotometer (Shimadzu, Japan), mikro pipet (Socorex, Switzerland), *yellow tip*, *blue tip*, tabung Eppendorf, pHmeter (WTW, pH3110 set 2, Germany), *96-well plate*, *plate reader* (Bio Rad model 680 XR, USA).

2. Bahan

Bahan untuk pembuatan ekstrak terstandar adalah simplisia rimpang kunyit (*C. longa*, L) yang didapat dari CV. Merapi Farma Herbal, Yogyakarta. Simplisia tersebut diperoleh dari rimpang kunyit yang tua, umur saat dipanen sekitar 1 tahun, dibuat dengan cara pengeringan panas matahari. Selanjutnya dilakukan identifikasi rimpang kunyit di Laboratorium Biologi UAD. Pakan untuk hewan uji adalah BR2 (Japfa Comfeed, Indonesia) memiliki komposisi: kadar air maksimal 12%, protein kasar minimal 15%, lemak kasar 3-7%, serat kasar maksimal 6%, abu maksimal 7%, kalsium 0,9-1,1%, fosfor 0,6-0,9%. Bahan untuk ekstraksi dan standarisasi ekstrak adalah etanol 96% (Merck, Germany), silica gel 60 F 254 (Merck, Germany), kloroform (PA, Merck, Germany), metanol (PA, Merck, Germany), kurkumin murni sebagai standar (Sigma-Aldrich, St. Lois, USA) dan CMC-Na sebagai pensuspensi. Bahan obat pembanding adalah

sitikolin (Bernofarm Pharmaceutical Company, Indonesia). Bahan untuk induksi demensia adalah TMT *chloride* (Sigma-Aldrich, Inc., St.Louis, USA) dan NaCl fisiologis (Otsuka, Japan). Bahan untuk uji memori adalah air kran dan santan kelapa, bahan untuk pengamatan mikroskopik adalah gas CO₂, formaldehid 37% (E-Merck, Germany), PBS, *graded ethanol* (JT Baker, USA) dan toluidin *blue*. Bahan untuk uji imunohistokimia adalah *poly- L-lysin glass object*, xylene (JT. Baker, USA), *graded etanol* (JT. Baker, USA), H₂O₂ 3% (JT. Baker, USA), *backgroud sniper* (Biocare Medical, Concord, California), antibodi primer (*Rabbit Polyclonal Anti-Caspase-3 Antibody*, Lab Vision Co., USA), *Trekkie Universal Link* (Biocare Medical, Concord, California), *Trek Avidin-HRP* (Biocare Medical, Concord, California), *Betazoid DAB Chromogen solution* (Biocare Medical, Concord, California) dan *Hematoxyline*. Bahan untuk penetapan kadar MDA adalah KCl 1,15%, *sodium dedocyl sulfate* 8,1%, larutan asam asetat 20%, larutan air 0,8%, n-butanol, *pyridine*, NaOH 0,5 N, TBA 2% dan TEP (*1,1,3,3-tetraethoxypropane*) sebagai larutan standar yang diperoleh dari Laboratorium Pangan dan Gizi, PAU, UGM. Bahan yang digunakan dalam penetapan aktivitas enzim adalah SOD kit, CAT kit, GPx kit dan GSH kit, semuanya adalah produk BioVision Inc., USA.

3. Tempat Penelitian

Identifikasi rimpang kunyit dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA UAD. Pembuatan serbuk dan ekstraksi rimpang kunyit dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi, UAD. Standarisasi

ekstrak dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia dan Laboratorium Kimia Analisa, Fakultas Farmasi, UAD. Pemeliharaan hewan uji, uji memori spasial, pengambilan darah dan pembedahan hewan uji dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi UAD. Pengukuran kadar MDA plasma dan otak dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi, Pusat Antar Universitas (PAU), UGM. Pengukuran aktivitas GPx, SOD, katalase, kadar GSH dan kadar protein dilakukan di Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT unit III) UGM. Pembuatan blok parafin jaringan hippocampus dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, UGM. Pemotongan blok parafin dan pembuatan preparat histologik dengan pengecatan Toluidin *Blue* dilakukan di Laboratorium Histologi dan Biologi Sel, Fakultas Kedokteran, UGM. Analisis stereologi dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi, UAD. Pemotongan dan penempatan jaringan hippocampus pada *poly-L-lysine slide* dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran UGM, sedangkan pengecatan imunohistokimia *caspase-3* dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Rumah Sakit Dr. Sardjito, Yogyakarta. Pengamatan dan pemotretan hasil imunohistokimia dilakukan oleh ahli Patologi Anatomi di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan UGM.

3.5. Prosedur Kerja Penelitian

1. Identifikasi rimpang kunyit

Kegiatan ini bertujuan untuk menghindari kesalahan penggunaan bahan. Simplisia rimpang kunyit (*C.longa*) yang digunakan dalam penelitian

diidentifikasi di Laboratorium Biologi, UAD Yogyakarta. Keaslian simplisia rimpang kunyit dibuktikan dengan Surat Keterangan B/B.12/974/V/2014 yang disajikan pada Lampiran 2.

2. Ekstraksi dan standarisasi kurkumin dari rimpang kunyit

Simplisia kunyit digiling, kemudian diayak dengan ayakan ukuran -18/+40. Kemudian 500 gram serbuk kunyit ditimbang dan dimasukkan ke dalam maserator berpengaduk elektrik, ditambah 1,25 L etanol 96%, diaduk selama 3 jam dan dibiarkan termaserasi selama 24 jam. Maserat disaring sampai ampas dapat terpisah dari maseratnya, kemudian dilakukan remaserasi dengan menambah 1,25 L etanol 96%. Setelah disaring, filtrat yang diperoleh diuapkan pada evaporator hingga kental tetapi masih dapat dituang. Penguapan dilanjutkan dengan panci *stainless steel* di atas penangas air hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian ditimbang. Ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan penghitungan rendemen dan evaluasi ekstrak. Evaluasi yang dilakukan adalah : organoleptis (bau, rasa, warna), viskositas, kadar air, kadar abu, kadar abu larut asam, profil KLT dan kadar kurkumin.

Standarisasi ekstrak diawali dengan pembuatan standar kurkumin 1 mg/mL. Pembuatan kurva baku (0.125 ; 0.25; 0,5; 1; 2; 4 mg/mL) dan pembuatan sampel dilakukan dengan cara melarutkan 100 mg ekstrak dalam 10 mL etanol 96% kemudian ditotolkan pada *plate* KLT dan dielusi menggunakan fase diam Silika Gel 60 F 254 dan fase gerak campuran kloroform dan metanol dengan perbandingan 9:1. Setelah filtrat terelusi intensitas warna yang terbentuk pada KLT-densitometri dibaca pada panjang gelombang 426 nm.

3. Pembuatan larutan TMT *chlorid*

Dosis TMT ditentukan berdasarkan hasil uji pendahuluan dengan menggunakan variasi dosis TMT yaitu dosis 3 mg/kg BB yang diberikan selama 3 hari berturut-turut (Robertson *et al.*, 1987), dosis tunggal 6 mg/kg BB (Park *et al.*, 2010) dan 8 mg/kg BB (Geloso *et al.*, 2007) pada masing-masing 5 ekor tikus per dosis TMT. Pemberian TMT dosis 3 mg/kg BB selama 3 hari berturut-turut menyebabkan semua tikus mati setelah 2 hari diinjeksi TMT, sedangkan pemberian dosis tunggal 6 mg/kg BB tidak menyebabkan kematian namun gambaran histopatologik jaringan hippocampusnya menunjukkan kesan normal. Dosis TMT yang dipilih dalam penelitian ini adalah dosis 8 mg/kg BB, karena tikus menunjukkan kesan adanya perubahan pada gambaran histopatologik hippocampusnya. Larutan TMT dibuat dengan melarutkan TMT-klorida ke dalam NaCl 0,9% (Geloso *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2011). Pemberian larutan TMT secara intra-peritoneal dengan dosis 8 mg/kgBB.

Untuk bobot tikus 200 gram volume larutan yang diberikan sebesar 0,2 ml. Konsentrasi larutan TMT dihitung dengan cara :

$$\frac{0,2 \text{ kgBB} \times 8 \text{ mg/kgBB}}{0,2 \text{ mL}} \times 100 \text{ ml} = 800 \text{ mg/100mL}$$

$$= 0,8\% \text{ }^b/\text{ }^v (8 \text{ mg/mL})$$

4. Pembuatan larutan Sitikolin

Larutan sitikolin dibuat dengan melarutkan serbuk tablet sitikolin ke dalam CMC-Na. Pemberian larutan sitikolin secara per oral dengan dosis 200 mg/KgBB. Untuk bobot tikus 200 g volume larutan yang diberikan sebesar 2,0 mL. Konsentrasi larutan sitikolin dihitung dengan cara :

$$\frac{0,2 \text{ KgBB} \times 200 \text{ mg/KgBB}}{2,0 \text{ mL}} \times 100 \text{ ml} = 2000 \text{ mg/100mL}$$

$$= 2\% \text{ b/v (20 mg/mL)}$$

Apabila berat 1 tablet sitikolin adalah 700 mg yang mengandung 500 mg sitikolin sehingga serbuk tablet sitikolin yang ditimbang adalah:

$$\frac{700}{500} = \frac{x}{20} \quad x = 28 \text{ mg}$$

5. Pembuatan larutan ekstrak

Larutan ekstrak dibuat dengan mensuspensikan ekstrak dengan larutan CMC-Na 1%. Volume larutan obat yang diberikan pada tikus dengan bobot 200 gram secara per oral adalah 2,0 mL. Sehingga konsentrasi larutan ekstrak rimpang kunyit dapat dihitung dengan cara:

$$\text{Volume} = \frac{\text{bobot tikus (kg)} \times \text{dosis (mg/KgBB)}}{\text{konsentrasi (mg/mL)}}$$

- a. Untuk dosis 100 mg/KgBB:

$$\frac{0,2 \text{ KgBB} \times 100 \text{ mg/KgBB}}{2,0 \text{ mL}} \times 100 \text{ mL} = 1000 \text{ mg/100mL}$$

$$= 1\% \text{ b/v (10 mg/mL)}$$
- b. Untuk dosis 200 mg/KgBB :

$$\frac{0,2 \text{ KgBB} \times 200 \text{ mg/KgBB}}{2,0 \text{ mL}} \times 100 \text{ ml} = 2000 \text{ mg/100mL}$$

$$= 2\% \text{ b/v (20 mg/mL)}$$
- c. Untuk dosis 300 mg/KgBB :

$$\frac{0,2 \text{ KgBB} \times 300 \text{ mg/KgBB}}{2,0 \text{ mL}} \times 100 \text{ ml} = 3000 \text{ mg/100mL}$$

$$= 3\% \text{ b/v (30 mg/mL)}$$

6. Pembuatan santan kelapa

Sebanyak 2,5 kg parutan kelapa ditambahkan dengan sejumlah air sampai diperoleh hasil perasan parutan kelapa (santan) sebanyak 10 L. Santan kelapa

kemudian dimasukkan dalam kolam MWM yang sudah berisi air, sampai tercampur merata. Santan kelapa selalu dibuat baru setiap hari selama uji MWM.

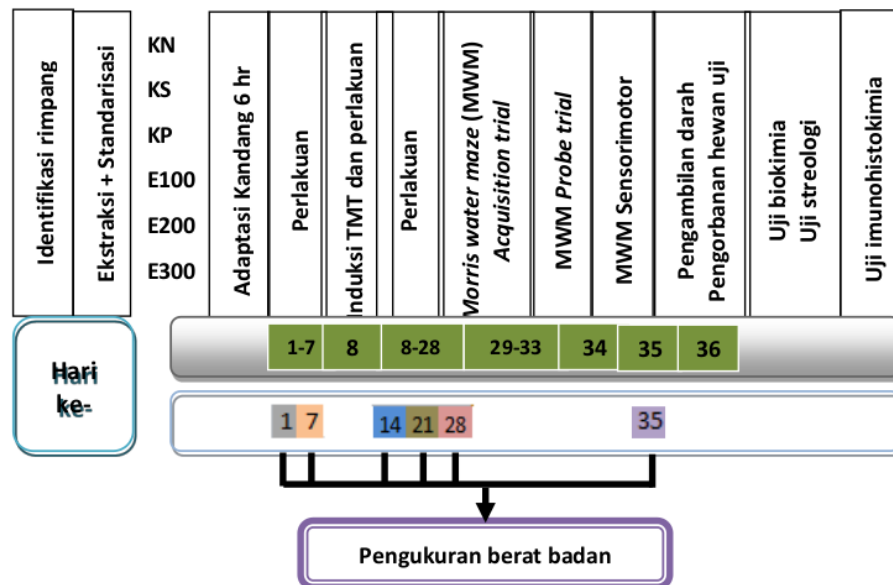
7. **Perlakuan hewan uji.**

Hewan uji berupa tikus *Sprague Dawley* diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM, jenis kelamin jantan, umur berkisar 2 bulan (dewasa), berat 180-200 g. Tikus dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan masing-masing 10 ekor. Sebelum mendapat perlakuan, tikus diadaptasikan selama 6 hari dengan kondisi: suhu ruangan 24–26 °C dan kelembaban 60–65% dengan siklus gelap dan terang 12 jam. Tikus mendapat pakan dan minum *ad libitum*. Pengelompokan hewan uji adalah sebagai berikut:

Tabel III. Perlakuan pada kelompok penelitian

No.	Kelompok	TMT	Perlakuan
1.	KN (normal)	-	- Diberi 2 mL CMC-Na, per oral - Diinjeksi 0,2 mL NaCl 0,9%, ip
2.	KS (Kontrol Sakit)	Diinjeksi TMT dosis 8 mg/kg BB, dilarutkan dengan NaCl 0,9 %, ip, 0,2 mL	- Diberi 2 mL CMC-Na, per oral
3.	KP (kontrol positif)	Diinjeksi TMT dosis 8 mg/kg BB, dilarutkan dengan NaCl 0,9 %, ip, 0,2 mL	- Diberi Sitikolin dosis 200 mg/kg BB dilarutkan dalam CMC Na, per oral, 2 mL
4.	E100 (Ekstrak dosis 100 mg/kg BB)	Diinjeksi TMT dosis 8 mg/kg BB, dilarutkan dengan NaCl 0,9 %, ip, 0,2 mL	- Diberi ekstrak kunyit dosis 100 mg/kg BB dilarutkan dalam CMC Na, per oral, 2 mL
5.	E200 (Ekstrak dosis 200 mg/kg BB)	Diinjeksi TMT dosis 8 mg/kg BB, dilarutkan dengan NaCl 0,9 %, ip, 0,2 mL	- Diberi ekstrak kunyit dosis 200 mg/kg BB dilarutkan dalam CMC Na, per oral, 2 mL
6.	E300 (Ekstrak dosis 300 mg/kg BB)	Diinjeksi TMT dosis 8 mg/kg BB, dilarutkan dengan NaCl 0,9 %, ip, 0,2 mL	- Diberi ekstrak kunyit dosis 300 mg/kg BB dilarutkan dalam CMC Na, per oral, 2 mL

Pemberian ekstrak dan obat selama 28 hari. Pada hari ke 8, kecuali kelompok normal, tikus disuntik TMT dosis tunggal 8 mg/kgBB secara intra-peritoneal. Mulai hari ke 29-35 tikus diuji memori spasial. Pengambilan darah melalui sinus orbitalis dilakukan setelah uji memori spasial atau sebelum tikus dikorbankan. Setelah itu tikus dikorbankan dengan CO₂, untuk pengamatan histologik dan biokimiawi.



Gambar 12. Skema jalannya penelitian Efek Ekstrak Rimpang Kunyit Terstandar Kurkumin pada Tikus Model Demensia yang Diinduksi Trimethyltin

8. Uji memori spasial dengan Morris water maze

Metode yang digunakan sesuai metode yang dilakukan oleh Uygur dan Arslan (2010) dengan modifikasi. Pengujian memori spasial dilakukan setelah pemberian ekstrak, yaitu pada hari ke-29 hingga ke-33 dilakukan *acquisition trial*, hari ke-34 dilakukan probe trial dan selanjutnya pada hari ke-35 dilakukan uji

sensorimotor. Alat uji *water maze* berbentuk kolam untuk berenang dengan diameter 150 dengan tinggi 40 cm. Kolam diisi dengan air dengan kedalaman 18-19 cm dengan suhu $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Untuk membuat air keruh, ke dalam air ditambahkan bahan non toksik yaitu larutan santan (± 10 L). Sebuah platform sirkuler yang terbuat dari kaleng cat warna putih (diameter 13 cm, tinggi 16,5 cm) ditempatkan di tengah salah satu kuadran yang dipilih secara random dengan permukaan atasnya berkisar 1,5 - 2,5 cm di bawah permukaan air. Posisi platform tetap konstan untuk masing-masing tikus pada keseluruhan eksperimen. Kolam dibagi menjadi 4 kuadran dengan garis bayangan. Pada tepi kolam dari masing-masing kuadran ditandai 2 *starting points* dengan jarak yang sama. Setiap *starting point* hanya digunakan satu kali setiap hari oleh masing-masing tikus. Di sekitar ruang tempat kolam berada terdapat sejumlah *fixed-visual cues* seperti sebuah kalender, sumber cahaya, sebuah meja, sebuah pintu dan dua orang pengamat. Sebuah video ditempatkan di tengah atas kolam yang disambungkan dengan sebuah komputer laptop untuk pengamatan perilaku tikus selama uji Morris *water maze*.

Pada *acquisition trial* tikus dilatih untuk menemukan platform yang terletak di bawah permukaan air yaitu empat kali per hari selama lima hari berturut-turut. Saat memasukkan tikus ke kolam, tikus diletakkan menghadap dinding tangki di salah satu kuadran yang telah dipilih secara random (tidak termasuk kuadran yang ditempati platform). Latihan diakhiri jika tikus mencapai platform atau setelah berenang selama 60 detik tetapi belum mencapai platform. Jika tikus tidak mampu mencapai platform selama 60 detik, tikus dibimbing ke

arah platform dan ditempatkan di atas platform selama 15 detik sebelum latihan berikutnya. Selang waktu tiap latihan tiap tikus minimal selama 60 detik. Waktu dan panjang lintasan tikus mencapai platform dicatat. Setiap selesai latihan tikus dikeringkan dengan *hair dryer* dan handuk kering, kemudian setelah selesai uji tikus dikembalikan ke kandangnya.

Pada hari ke enam uji Morris *water maze* dilakukan satu kali ⁶ *probe trial* dimana tikus dibiarkan berenang selama 60 detik tanpa platform. Waktu berenang tikus melintasi kuadran platform dan frekuensi tikus berada di kuadran platform dicatat. Sehari setelah *probe trial* selesai, dilakukan uji kemampuan sensorimotoris tikus yang bertujuan untuk menilai adanya kelemahan bukan disebabkan karena pada proses pembelajaran spasial, namun karena kelemahan sensori, motor atau motivasional (Craig *et al.*, 2009; Uygur dan Arslan, 2010). Uji dilakukan dengan memunculkan platform di atas permukaan air dan diberi bendera pada permukaan platform-nya Tikus direnangkan kembali selama 60 detik dengan meletakkan tikus di salah satu kuadran secara random dan dicatat waktu untuk mencapai platform.



Gambar 13. Empat kuadran bayangan pada kolam alat uji Morris *water maze*

9. Penyiapan jaringan otak

Setelah uji memori spasial, tikus dikorbankan dengan cara memasukkan dalam suatu wadah kemudian dialiri dengan gas CO₂. Tikus kemudian dibedah pada bagian kepalanya. Setelah itu otak diambil, bulbus olfactorius dan cerebellum dibuang. Otak besar dibagi menjadi 2, hemispherium cerebri kanan untuk pemeriksaan histologik dan hemispherium cerebri kiri untuk pemeriksaan biokimiawi. Hemispherium cerebri kanan dimasukkan dalam larutan fiksasi formalin 10% dalam PBS dan dibiarkan terendam selama 6 hari, sedangkan hemispherium cerebri kiri disimpan dalam *deep freezer* sampai dilakukan pengamatan biokimiawi.

10. Pengamatan biokimiawi

a. Pengukuran kadar MDA darah

Pengukuran kadar MDA darah dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi, Pusat Antar Universitas (PAU), UGM. Pemeriksaan kadar MDA plasma dilakukan dengan metode TBARS mengikuti metode yang dijabarkan Wuryastuti (2000). Sebanyak 0,75 mL asam fosfat dimasukkan ke dalam tabung *polypropylene* yang telah berisi 0,25 *thiobarbituric acid* (TBA). Selanjutnya 0,05 mL sampel plasma ditambahkan ke dalam tabung, diikuti dengan 0,45 mL air. Campuran dikocok selama 2 menit. Setelah itu dipanaskan dalam *water bath* selama 60 menit dengan suhu 60 °C. Campuran selanjutnya didinginkan 1 - 2 jam sehingga suhunya mencapai 30 °C. Kemudian dimasukkan ke dalam kolom *Sep-Pak C₁₈* untuk mengikat MDA dan dicuci dengan 5 mL metanol dan air. Ke dalam

campuran ditambahkan 4 mL metanol dan ditampung ke dalam kuvet. Kepekatan warna dibaca dengan spektrofotometer visibel dengan panjang gelombang 532 nm. Sedangkan *1,1,3,3-tetraethoxypropane* (TEP) digunakan sebagai larutan standar. Nilai TBARS dinyatakan dalam satuan malondialdehid (MDA) mmol/L plasma darah.

b. Pengukuran kadar MDA otak

Pengukuran kadar MDA darah dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi, Pusat Antar Universitas (PAU), UGM. Sebanyak 1 gram homogenat hemispherium cerebri kiri, ditambahkan dengan 500 μ L NaCl 0,9%, kemudian dimasukkan ke tabung Eppendorf dan disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit. Sebanyak 100 μ L supernatan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 550 μ L aquades, 100 μ L TCA, 100 μ L HCl 1 N, 100 μ L Na-tiobarbiturat 1 % kemudian divortek. Setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 500 rpm selama 10 menit dan dipanaskan dalam *water bath* 100 $^{\circ}$ C selama 30 menit. Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum 532 nm.

c. Pengukuran aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)

Pengukuran aktivitas SOD berdasarkan protokol kit SOD produksi Biovision.

1. Preparasi sampel

Homogenat diperfusi dengan PBS untuk menghilangkan sel-sel darah merah. Sebanyak 0,1 g homogenat ditambah 0,2 mL 0,1 M Tris/HCl 0,1 M pH 7,4

dingin, disentrifus pada kecepatan 14000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Supernatan diambil untuk diukur aktivitas SOD-nya.

2. Pengukuran aktivitas SOD otak

Disiapkan 4 tabung reaksi dan ditambah 20 μ L larutan sampel pada tabung nomor 1 dan 3, dan ditambah aquadest sebanyak 20 μ L pada tabung nomor 2 dan 4. Sebanyak 200 μ L larutan WST ditambahkan pada semua tabung. Kemudian sebanyak 20 μ L larutan *buffer* ditambahkan pada tabung nomor 3 dan 4 dan sebanyak 20 μ L larutan enzim ditambahkan secara bersamaan pada tabung nomor 1 dan 2. Campuran ⁷ diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit kemudian absorbansi dibaca pada panjang gelombang 450 nm menggunakan *plate reader*. Jumlah masing-masing penambahan perlakuan ditunjukkan pada Tabel IV.

Tabel IV. Jumlah penambahan larutan pada setiap sampel

	Sampel	Blanko 1	Blanko 2	Blanko 3
Larutan Sampel	20 μ L	---	20 μ L	---
Air	---	20 μ L	---	20 μ L
Larutan WST	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
Enzim	20 μ L	20 μ L	---	---
Larutan <i>buffer</i>	---	---	20 μ L	20 μ L

d. Pengukuran Aktivitas Katalase (CAT)

Pengukuran aktivitas CAT berdasarkan protokol kit CAT produksi BioVision.

1. Preparasi sampel

Sebanyak 0,1 gram homogenat ditambah 0,2 mL larutan *buffer* dingin, campuran disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diambil untuk pengujian aktivitas CAT.

2. Pengukuran Kurva Standar H₂O₂

Larutan H₂O₂ 0.88M diencerkan menggunakan aquadest hingga menghasilkan konsentrasi 20 mM H₂O₂. Kemudian sebanyak 50 μ L H₂O₂ 20 mM diencerkan menggunakan 0,95 mL dH₂O hingga menghasilkan 1 mM H₂O₂, Kemudian diambil masing-masing 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ L ditambahkan larutan *buffer* hingga volume 90 μ L untuk menghasilkan seri konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/H₂O₂. Masing-masing kemudian ditambah 10 μ L larutan stop reaksi, diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Selanjutnya ditambah 50 μ L campuran 46 μ L larutan *buffer*, 2 μ L larutan *OxiRed Probe*, dan 2 μ L larutan HRP. Campuran digojok hingga tercampur sempurna kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar kemudian absorbansi dibaca pada panjang gelombang 570 nm menggunakan *plate reader*.

3. Pengukuran aktivitas katalase

Sebanyak 2-78 μ L supernatan ditambah larutan *buffer* hingga volume 78 μ L, kemudian ditambah 10 μ L larutan stop reaksi. Campuran diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Selanjutnya ditambah 50 μ L campuran, 46 μ L larutan *buffer*, 2 μ L larutan *OxiRed Probe*, dan 2 μ L larutan HRP. Campuran digojok hingga tercampur sempurna kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 570 nm menggunakan *plate reader*.

e. Pengukuran aktivitas glutathione peroxidase (GPx)

Pengukuran aktivitas GPx berdasarkan protokol kit GPx produksi BioVision.

1. Preparasi sampel

Sebanyak 0,1 gram homogenat ditambahkan 0,2 mL larutan *buffer* dingin. Campuran kemudian disentrifus pada kecepatan 10000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diambil untuk pengujian aktivitas GPx.

2. Pengukuran kurva standar NADPH

Sebanyak 25 μL larutan NADPH 40 mM diencerkan menggunakan 975 μL dH_2O untuk menghasilkan 1 mM NADPH standar, diambil masing-masing 0, 20, 40, 60, 80, 100 μL kemudian ditambah larutan *buffer* hingga volume 100 μl untuk menghasilkan seri konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, 100 nmol/standar. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 340 nm menggunakan *plate reader*.

3. Pengukuran aktivitas glutathione peroxidase otak

Sebanyak 2-50 μL supernatan ditambah larutan *buffer* hingga volume 50 μL , kemudian ditambah 40 μL campuran 33 μL larutan *buffer*, 3 μL larutan NADPH 40 mM, 2 μL larutan GR, 2 μL larutan GSH. Campuran digojok hingga tercampur sempurna kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar, ditambah larutan *Cumene Hydroperoxide*. Campuran sampel dan kontrol absorbansi dibaca di dua waktu yang berbeda pada panjang gelombang 570 nm menggunakan *plate reader*.

f. Pengukuran aktivitas glutation (GSH)

Pengukuran aktivitas GSH berdasarkan protokol kit GSH produksi BioVision.

1. Preparasi sampel

Sebanyak 0,1 gram homogenat ditambahkan 0,4 mL larutan *buffer* GSH dingin kemudian digojok sampai tercampur sempurna. Homogenat ditambah 100 μ L larutan SSA 5%, disentrifus pada kecepatan 8000 rpm 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diambil untuk pengujian aktivitas GSH.

2. Pengukuran Kurva Standar GSH

Dibuat seri larutan standar dengan mengambil sebanyak 50, 40, 30, 20, 10, dan 0 μ L dari larutan standar 1 mg/mL GSH. Sebanyak 20 μ L dari masing-masing seri ditambah 160 μ L campuran 20 μ L NADPH, 140 μ L *buffer* glutation reduktase, dicampur dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Campuran ditambah larutan substrat glutation sebanyak 20 μ L dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Absorbansi dibaca menggunakan *plate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

3. Pengukuran aktivitas GSH otak

Sebanyak 1-20 μ L supernatan ditambahkan 160 μ L campuran 20 μ L NADPH, 140 μ L *buffer* glutation reduktase, dicampur dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Campuran ditambah larutan substrat glutation sebanyak 20 μ L dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Absorbansi dibaca menggunakan *plate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

g. ⁷ Pengukuran kadar protein otak tikus

Pengukuran kadar protein berdasarkan metode Biuret

1. Pengukuran kurva standar albumin

Larutan standar albumin dibuat dengan menambahkan 10 mL aquadest dengan 15 mg albumin. ⁷ Dari larutan standar, diambil masing-masing 150, 120, 100, 80, 60, 40, 20, 0 μ L dan dimasukkan dalam tabung Eppendorf, kemudian ditambah aquadest sampai volume 150 μ L sehingga dihasilkan seri konsentrasi 1,5; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,0 mg/mL. Masing-masing larutan yang telah dibuat, kemudian ditambah reagen Biuret 100 μ L, diaduk rata, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Absorbansi dibaca menggunakan *plate reader* pada panjang gelombang 540 nm. Hasil absorpsi kemudian dibuat kurva standar albumin sehingga dihasilkan persamaan linear hubungan absorbansi dengan konsentrasi larutan.

2. Pengukuran kadar protein jaringan otak

⁷ Sebanyak 100 mg homogenat otak ditambah 0,4 mL aquadest kemudian disentrifus pada kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan dikumpulkan. Sebanyak 40 μ L supernatan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf kemudian ditambah aquadest sampai volume 150 μ L dan ditambah larutan reagen 100 μ L. Campuran divortek sebelum diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Kemudian absorbansi dibaca menggunakan *plate reader* pada panjang gelombang 540 nm.

11. Pengamatan histologik

a. Penyiapan jaringan hippocampus

Hemispherium cerebri kanan dimasukkan ke dalam pot jaringan yang berisi formalin 10% dalam PBS selama 6 hari. Kemudian hippocampus dipisahkan dengan hati-hati dari hemispherium cerebri tersebut, ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam pot jaringan kembali untuk proses pembuatan preparat histologik. Gambar utuh hippocampus ditunjukkan pada Gambar 14.



Gambar 14. Gambar makroskopik hippocampus setelah dipisahkan dari hemispherium cerebri kanan yang telah direndam dalam formalin 10% dalam PBS selama 6 hari

b. Pembuatan blok parafin

Pembuatan blok parafin hippocampus dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran UGM. Hippocampus dimasukkan dalam kain kasa, didehidrasi dan direndam dalam larutan etanol bertingkat yaitu 70, 80 90, 100, 100 dan 100%. masing-masing selama 60 menit pada suhu kamar. Proses selanjutnya dilakukan penjernihan (*clearing*) menggunakan xylol selama 15 menit

pada suhu kamar sebanyak tiga kali. Setelah proses *clearing* dilakukan proses infiltrasi dengan parafin cair sebanyak 3 kali pemindahan, masing-masing 60 menit dalam inkubator suhu 60°C. Jaringan kemudian dibenamkan dalam parafin cair dan didinginkan dalam suhu kamar sehingga menjadi blok parafin.

c. Pemotongan blok jaringan hippocampus

Pemotongan blok jaringan hippocampus dilakukan di laboratorium Histologi dan Biologi Sel Fakultas Kedokteran UGM. Blok parafin dipotong horisontal menggunakan mikrotom dengan ketebalan (t) 3 µm. Potongan pertama kali yang menunjukkan adanya jaringan hippocampus dianggap sebagai potongan ke satu, kemudian potongan berikutnya diberi nomor secara berurutan. Sepasang potongan dari tiap 200 potongan diambil secara random (menggunakan lotere) Prosedur tersebut diulang sampai seluruh jaringan hippocampus habis terpotong.

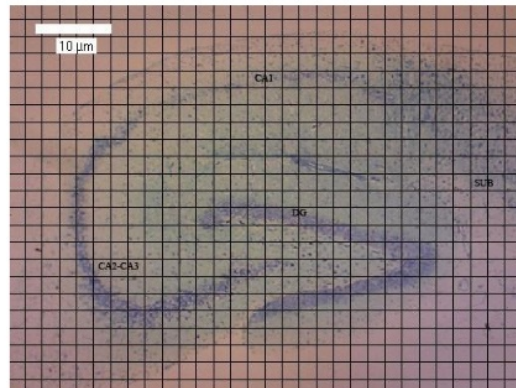
Dalam penelitian ini sekitar 600–1400 potongan dari hippocampus per tikus diperoleh dan sekitar 3-7 pasang potongan diambil untuk evaluasi stereologik. *Slide* potongan hippocampus kemudian diproses histologik dan dilakukan pengecatan dengan toluidine *blue*. Pengecatan toluidin *blue* dilakukan dengan prosedur sebagai berikut: parafin dihilangkan dengan *xylol*, kemudian dimasukkan dalam etanol 100, 95 dan 70% masing-masing selama 5 menit, setelah itu dimasukkan dalam aquades. Pengecatan dengan toluidin *blue* selama 40-60 menit dalam oven suhu 60° C, kemudian dimasukkan ke dalam etanol 70%, 95% dan 100%. Setelah diberi *canadian balsam*, preparat ditutup dengan dek glas.

d. Estimasi volume daerah CA1 dan CA2-CA3 hippocampus

Untuk menghitung estimasi volume regio CA1 dan CA2-CA3 menggunakan prinsip Cavalieri (Gundersen dan Jensen, 1987; Miki *et al.*, 2005; Partadiredja dan Bedi, 2010). Satu potongan dari setiap pasang potongan yang dipilih pada setiap 200 potongan diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran $\times 4$. Potongan jaringan hippocampus difoto menggunakan sebuah kamera digital Optilab *advance* yang telah digabungkan dengan mikroskop cahaya dan dihubungkan dengan komputer laptop. Untuk menggabungkan beberapa potongan gambar menjadi gambar formasi hippocampal secara utuh digunakan Adobe Photoshop CS6 program. Selanjutnya untuk mengetahui perbesaran akhir yang tepat digunakan skala mikrometer, dan dalam penelitian ini dihasilkan perbesaran $\times 107,9$. Sebuah *virtual grid* berukuran 1cm x 1cm ditumpangkan pada gambar hippocampus yang utuh (Gambar 15). Tiap *point* mewakili area (u) yang luasnya $0,00859 \text{ mm}^2$. Kemudian dengan bantuan *counter* dihitung *point grid* yang jatuh pada regio CA1 maupun CA2-CA3 dari masing-masing potongan hippocampus tiap tikus. Jumlah total *point* (ΣP) untuk masing-masing tikus diperoleh dari jumlah seluruh *point* yang jatuh pada seluruh potongan hippocampus dari masing-masing tikus. Dalam penelitian ini rerata jumlah *point* yang dihitung per tikus adalah 120 *point* untuk regio CA1 dan 101 *point* untuk CA2-CA3. Volume regio CA1 atau CA2-CA3 dihitung menggunakan rumus berikut (Tang dan Nyengaard, 2004):

$$V=T.(a/p).\Sigma P$$

Dimana “(a/p)” adalah area yang diwakili oleh masing-masing *point* and “T” adalah jarak antara satu potongan dengan potongan yang diambil berikutnya ($200 \times 3 \mu\text{m} = 600 \mu\text{m}$).



Gambar 15. Gambaran mikroskopik potongan horisontal hippocampus (3 μm) dengan pengecatan toluidin *blue*. Sebuah grid *virtual* berukuran 1cm x 1cm ditumpangkan pada gambar hippocampus yang utuh. Cornu Ammonis terdiri dari regio lapisan sel pyramidal CA1, CA2 dan CA3 (DG, *dentate gyrus*; SUB, *subiculum*)

e. Estimasi kepadatan numerik (*numerical density*) sel pyramidal di regio CA1 dan CA2–CA3

Estimasi kepadatan numerik sel pyramidal di regio CA1 dan CA2–CA3 ditentukan menggunakan *probe* disektor fisik (Partadiredja and Bedi, 2010; Sterio, 1984; West, 2012). Sebuah disektor fisik terdiri dari sepasang potongan yang berurutan dengan jarak potongan (h) sama dengan ketebalan potongan (t). Dari sepasang potongan tersebut, satu potongan dianggap sebagai “*sample section*” dan potongan yang satunya dianggap sebagai “*look-up section*”.

Masing-masing potongan dari disektor fisik tersebut diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran $\times 10$ dan difoto dengan kamera digital

Optilab. Bidang pandang yang akan difoto ditentukan menggunakan prosedur *systematic random sampling* dengan memilih secara acak angka antara 1-10. Berdasarkan cara tersebut dalam penelitian ini diperoleh sekitar 2-6 bidang pandang per regio. Gambar dari bidang pandang yang dipilih dari “*sample section*” difoto dan disimpan pada memori komputer. Bidang pandang dan lokasi yang sama pada “*look-up section*” juga difoto dan disimpan pada memori komputer. Gambar-gambar tersebut kemudian dicetak pada kertas normal dan ditentukan perbesarannya dengan skala mikrometer ($\times 280$). Kemudian pada hasil cetakan gambar tersebut, dibuat kotak bingkai hitung dengan ukuran sedikit lebih kecil dari gambaran satu lapang pandang, di atas regio CA1 atau CA2-CA3 yang akan dihitung (Gambar 16). Perbesaran akhir kotak bingkai hitung dalam penelitian ini adalah sebesar $0,01148 \text{ mm}^2$. Kemudian penghitungan *disector count* (Q-) dilakukan berdasarkan nucleus sel pyramidal yang tampak pada *sample section* namun tidak tampak pada *look-up section*. Lalu bergantian, *slide* yang menjadi *look-up section* ditukar menjadi *sample section* dan *sample section* menjadi *look-up section* (West, 2012),

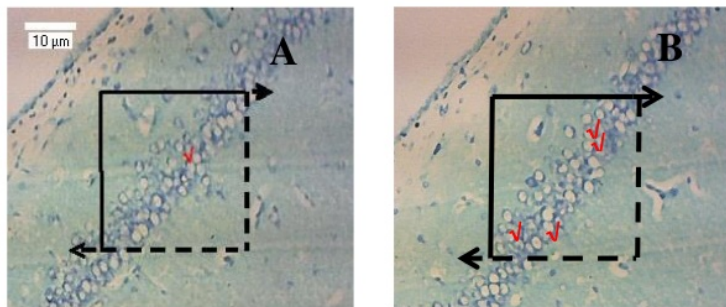
Prosedur penghitungan menggunakan prinsip *forbidden line rule* yang ditetapkan oleh Gundersen (1977). Kotak bingkai hitung terdiri dari dua garis eksklusi utuh pada dua sisi yang bersebelahan, dan dua garis inklusi putus-putus pada dua sisi yang lain (Gambar 16). Sel yang menyentuh garis eksklusi tidak dihitung, sedangkan sel yang menyentuh garis inklusi dihitung. Hal tersebut untuk mencegah terjadinya penghitungan ganda (Boyce *et al.*, 2010).

Rerata jumlah *disector count* per tikus dalam penelitian ini adalah 153 untuk regio CA1 and 101 untuk regio CA2-CA3. Kepadatan numerik (Nv) sel pyramidal yang diperoleh diestimasi menggunakan rumus (Partadiredja dan Bedi, 2010; West, 2012):

$$Nv = \Sigma Q^- / a.h$$

Keterangan : Nv = densitas sel pyramidal regio CA1 atau CA2-CA3
 ΣQ^- = jumlah total penghitungan
 a = luas area total *test section*, satuan μm
 h = tebal pemotongan, satuan μm

Jumlah total sel pyramidal pada hippocampus diestimasi dengan mengalikan volume dengan kepadatan numerik ($V \times Nv$).



Gambar 16. (A) dan (B) menunjukkan gambaran mikroskopik lapisan sel pyramidal CA1 dari sepasang potongan dengan ketebalan $3 \mu\text{m}$ yang mewakili “sample section” dan “look-up section” untuk menunjukkan prinsip *probe* disektor fisik. Kotak bingkai hitung merupakan area hitung dimana sel yang terletak pada garis putus-putus tidak dihitung Neuron yang menunjukkan profil nuclear digunakan sebagai unit hitung. Nuclei sel pyramidal yang nampak pada satu potongan namun tidak nampak di potongan yang lain, ditandai dengan tanda centang merah (✓).

f. Prosedur pengecatan imunohistokimia ekspresi protein *caspase-3*

Prosedur pengecatan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Rumah Sakit Sardjito, Yogyakarta, menggunakan protokol Starr Trek *Universal Detection System* (Biocare Medical, Concord, California). Potongan horisontal (3 μm) blok parafin hippocampus dipilih dan diletakkan pada gelas obyek *poly-L-lysine*. *Slide* tersebut kemudian diinkubasi semalaman pada suhu 45°C. Kemudian dilakukan deparafinisasi dalam *xylene* dan dilanjutkan dengan rehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (99, 96, 70%). *Slide* diinkubasi dalam H₂O₂ 3% selama 15 menit dan dicuci dengan air kran. *Retrieving* dilakukan dalam *buffer* citrat pH 6 menggunakan *decloacking chamber* pada suhu 95 °C selama 40 menit, kemudian ditempatkan pada suhu kamar selama 30 menit. *Protein blocking* dilakukan menggunakan *background sniper* dengan menginkubasi *slide* selama 15 menit. Antibodi primer (*Rabbit Polyclonal Anti-Caspase-3 Antibody*) dengan pengenceran 1:100 ditetaskan. Sebuah *slide* tanpa ditetesi antibodi primer juga dibuat untuk kontrol negatif. *Slide* tersebut kemudian ditempatkan pada suhu kamar selama 1 jam, selanjutnya dicuci dengan PBS selama 5 menit. *Trekkie Universal Link*, yang mengandung *biotinylated secondary antibody*, ditetaskan kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 20 menit. *Slide* kemudian dicuci dengan PBS. *Trek Avidin-HRP* ditetaskan dan dicuci dengan PBS. Selanjutnya ditetesi larutan Betazoid DAB Chromogen dan dibiarkan 3 menit pada suhu ruangan. Diberi Hematoxylin sebagai *counter-stain*. *Slide* kemudian didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dan dijernihkan dengan *xylene*. Akhirnya dilakukan *mounting* dan *cover-slipped*, dilanjutkan pengamatan di bawah

mikroskop. Sel yang mengalami apoptosis akan mengalami perubahan morfologi sel, yang dicirikan dengan adanya ekspresi protein *caspase-3* yang tercat berwarna coklat pada sitoplasma, nukleus atau keduanya di sel pyramidal. Kriteria intensitas sel apoptotik didasarkan pada rerata jumlah sel apoptosis dari 3 bidang pandang (dengan perbesaran 400x) yang dipilih secara acak per potongan dari masing-masing hippocampus. Terdapat 3 kategori intensitas yaitu: tingkat rendah jika rerata jumlah sel apoptotik <5 sel; tingkat moderat (>5 sampai <15 sel); dan tingkat tinggi (>15 sel) (Resendes *et al.*, 2004). Penghitungan dilakukan pada *slide* yang sebelumnya tidak diketahui identitasnya.

12. Analisis Data

Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov (jika data lebih dari 50) atau uji Saphiro-Wilk (jika data kurang dari 50) dan uji homogenitas dilakukan dengan uji Levene. Hasil uji Morris *water maze* berupa data waktu latensi dan panjang lintasan ditransformasi menjadi data log10 sehingga data terdistribusi normal dan homogen kemudian dianalisis statistik dengan *one way repeated measure ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *posthoc* Tukey HSD. Data hasil uji *probe trial* dan sensorimotor, hasil uji biokimiawi dan stereologi jika data terdistribusi normal dan homogen diuji dengan *one way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *posthoc* Tukey HSD, sedangkan jika tidak memenuhi normalitas atau homogenitas diuji dengan Kruskall Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann Whytney dengan tingkat signifikansi 5%.

Nilai presisi pada analisis stereologi dihitung dengan formula $CV_{tot}^2 = CV_{bio}^2 + CE_{tot}^2$, dimana CV_{tot} (*total coefficient of variance*) adalah variabilitas total di dalam dan di antara kelompok-kelompok, CE_{tot} (*total coefficient of error*) adalah *stereological noises*, dan CV_{biol} (*biological coefficient of variations*) adalah koefisien variasi biologis antara individu. Strategi *sampling* dianggap optimal jika $CE_{tot} \leq \frac{1}{2} CV_{tot}$ atau ketika $\frac{CE_{tot}^2}{CV_{tot}^2}$ berkisar antara 0,2 and 0,5 (Nyengaard, komunikasi personal). Signifikansi data ditetapkan jika $p < 0,05$. Data hasil pengamatan imunohistokimia ekspresi *caspase-3* dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan dengan kelompok kontrol/ normal.

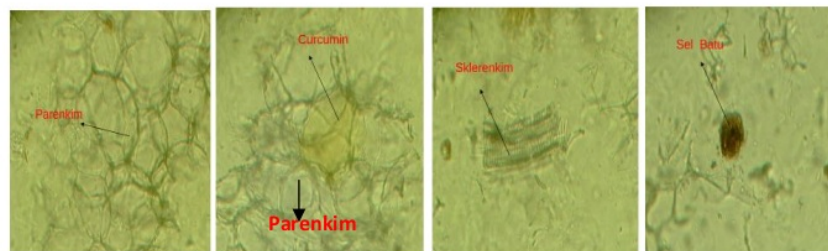
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

1. Hasil identifikasi rimpang kunyit

Tahap awal penelitian dilakukan identifikasi simplisia untuk menghindari kesalahan dan memastikan jenis simplisia yang digunakan. Hasil identifikasi tanaman dan rimpang kunyit dilakukan di laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta menunjukkan bahwa tanaman dan rimpang yang digunakan adalah *C. longa* L. Adapun hasil identifikasi pada penelitian ini dapat ditunjukkan pada Gambar 17 dan selengkapnya pada Lampiran 1, Lampiran 2, Lampiran 3.



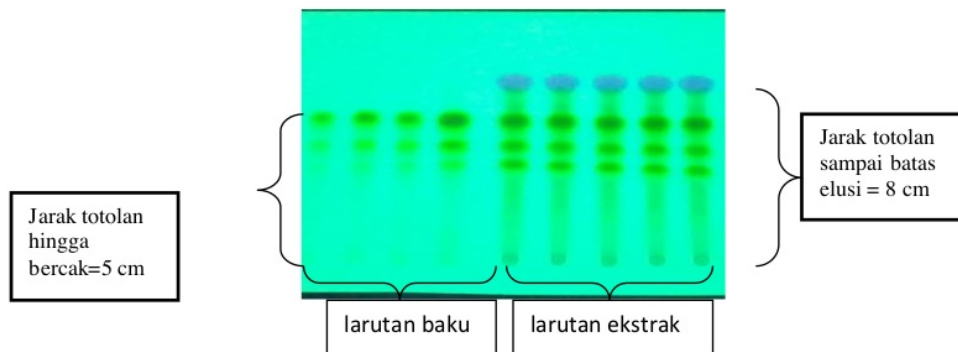
Gambar 17. Hasil identifikasi mikroskopik rimpang kunyit

Berdasarkan hasil identifikasi di atas jika dibandingkan dengan hasil mikroskopis dari buku “Farmakope Herbal Indonesia” secara teoritis diperoleh hasil yang sesuai seperti yang tertera dalam buku “Farmakope Herbal Indonesia” meskipun ada beberapa fragmen yang tidak ada dalam hasil identifikasi. Hasil identifikasi pada penelitian menunjukkan adanya fragmen pengenal yang khas yaitu sel parenkim yang mengandung senyawa berwarna kuning (kurkumin)

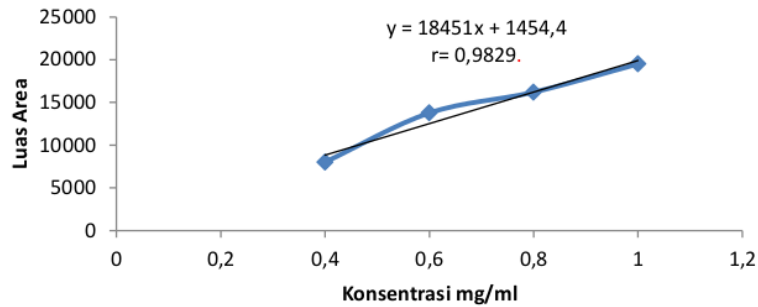
sehingga dapat dipastikan bahwa rimpang ⁶ yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang *Curcuma longa* Linn.

2. Hasil Ekstraksi dan Standarisasi

Berdasarkan hasil ekstraksi dengan maserasi diperoleh data bahwa rendemen ekstrak 30,38%, kadar abu 0,319%, kadar abu larut asam 0,193%, kadar air 5% dan secara organoleptis ekstrak yang diperoleh berwarna coklat gelap, kental serta mempunyai bau khas. Berdasarkan analisis dengan KLT-densitometri menunjukkan bahwa kadar kurkumin ekstrak adalah sebesar 28,08%. Kromatogram standar dan ekstrak disajikan pada Gambar 18 dan perhitungan kadar abu, kadar abu larut asam, kadar air dan kadar kurkumin di Lampiran 4.



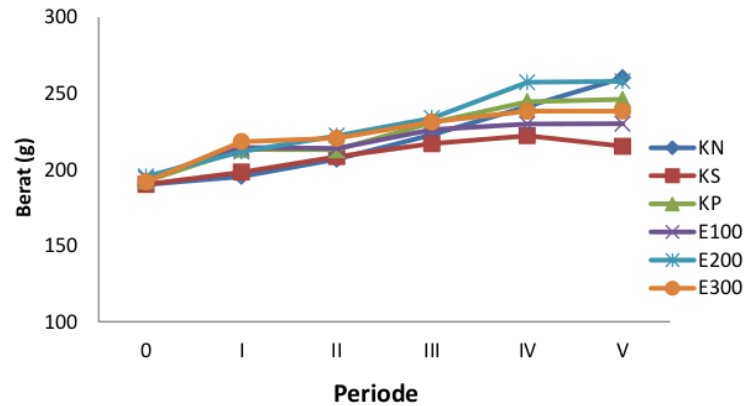
Gambar 18. Kromatogram standar dan ekstrak kunyit pada fase diam silika gel F254 dan fase gerak kloroform : metanol (9 : 1), menunjukkan perhitungan $R_f = \text{jarak totalan hingga bercak} / \text{jarak totalan sampai batas elusi}$. R_f standar kurkumin: $5 \text{ cm} / 8 \text{ cm} = 0,625$; R_f ekstrak : $5 \text{ cm} / 8 \text{ cm} = 0,625$



Gambar 19. Grafik kurva linier persamaan regresi hubungan antara konsentrasi seri larutan baku dan luas areanya.

3. Hasil penimbangan berat badan

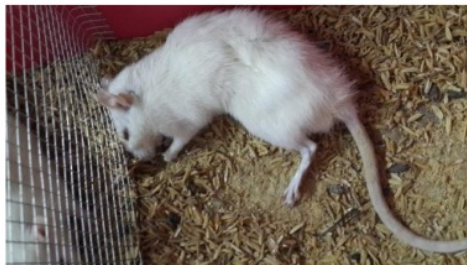
Berat badan tikus ditimbang setiap 1 minggu selama 5 minggu. Hasil penimbangan badan ditunjukkan pada Gambar 20 dan selengkapnya pada Lampiran 6.




Gambar 20. Berat badan (rerata \pm SEM) tikus yang diukur tiap minggu selama 5 minggu pada kelompok normal (KN), yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB (KS) dan mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin dosis 100 mg/kg BB (E100), 200 mg/kgBB (E200) serta 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari.

Hasil penimbangan berat badan pada minggu pertama menunjukkan bahwa rerata berat badan tikus tidak berbeda antar kelompok ($p > 0,05$). Secara umum hasil penimbangan berat badan menunjukkan ada penambahan berat badan tikus setiap minggunya pada semua kelompok. Berdasarkan hasil uji statistik terhadap rerata berat badan selama 5 minggu menggunakan uji statistik *one way repeated measures ANOVA* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan rerata berat badan di antara kelompok-kelompok perlakuan ($df = 5,54$; $F = 0,908$; $p = 0,078$). Namun apabila dilihat rerata berat badan pada kelompok KS pada akhir perlakuan (minggu ke V) menunjukkan berat badan yang paling kecil di antara kelompok-kelompok lainnya. Berdasarkan hasil uji statistik menggunakan uji *one way ANOVA* pada minggu ke V tersebut menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan rerata berat badan tikus pada kelompok yang diberi TMT saja dibandingkan dengan yang normal ($p = 0,045$)

Pengamatan klinis menunjukkan bahwa beberapa tikus yang diinjeksi TMT menunjukkan bulu-bulu yang lebih kusam, tingkah laku yang lebih agresif serta mengalami kejang beberapa hari setelah disuntik TMT. Hal tersebut tidak terjadi pada tikus kelompok normal.



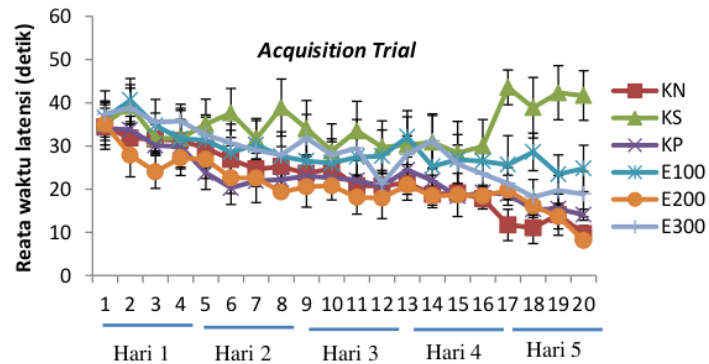
Gambar 21.  ambaran klinis tikus *Sprague Dawley* pada hari ke 28 setelah diinjeksi TMT dosis tunggal 8 mg/kg BB pada hari ke 8 perlakuan menunjukkan bulu kusam, berat badan menurun.

4. Hasil uji memori spasial

a. *Acquisition trial*

2) Waktu latensi

Data rerata waktu latensi pada semua kelompok selama 20 kali latihan pada *acquisition trial* disajikan pada Gambar 22 dan selengkapnya pada Lampiran 9. Hampir semua kelompok menunjukkan pola waktu latensi yang naik turun pada setiap latihannya. Berdasarkan Gambar 22 menunjukkan bahwa kelompok tikus yang diinjeksi TMT saja menunjukkan nilai rerata waktu latensi yang paling besar di antara kelompok-kelompok lainnya.



Gambar 22. Data (rerata \pm SEM) waktu latensi (detik) tikus ($n=10$) pada *acquisition trial* uji MWM yang dilakukan 4 kali sehari selama 5 hari, pada kelompok normal (KN) dan yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kgBB (E200) dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari.

Untuk menghasilkan data yang homogen dan terdistribusi normal, data waktu latensi ditransformasi menjadi data log 10. Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji *repeated-measure* ANOVA terhadap data log 10 waktu latensi menunjukkan ada efek yang signifikan ($p < 0,05$) tetapi interaksi antara *trial* dan kelompok tidak signifikan ($p > 0,05$). Hasil uji statistik waktu latensi ditunjukkan pada Tabel V.

Tabel V. Rerata log 10 waktu latensi (rerata \pm SEM) selama 20 kali latihan pada *acquisition trial* uji *Morris water maze* pada kelompok normal (KN) dan yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kgBB (E200), dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari.

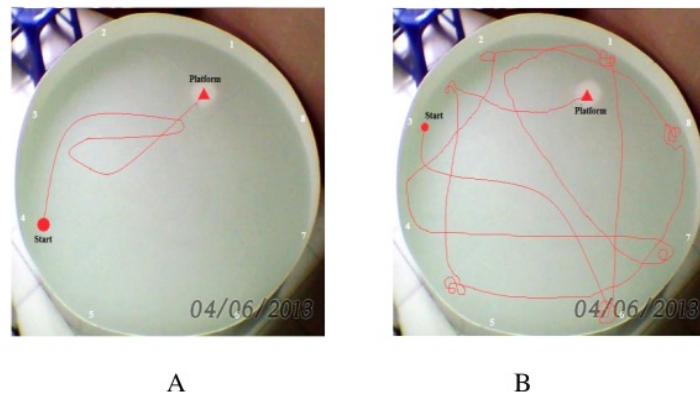
Kelompok	n	Waktu latensi	Df	F	P
KN	10	1,260 \pm 0034 ^a			
KS	10	1,442 \pm 0.103			
KP	10	1,298 \pm 0.063 ^a	5, 54	6,703	0,0001
E100	10	1,384 \pm 0.087 ^b			
E200	10	1,263 \pm 0.094 ^a			
E300	10	1,393 \pm 0.064 ^b			

^a $p < 0,05$ berbeda signifikan dengan KS; ^b $p < 0,05$ berbeda signifikan dengan KN

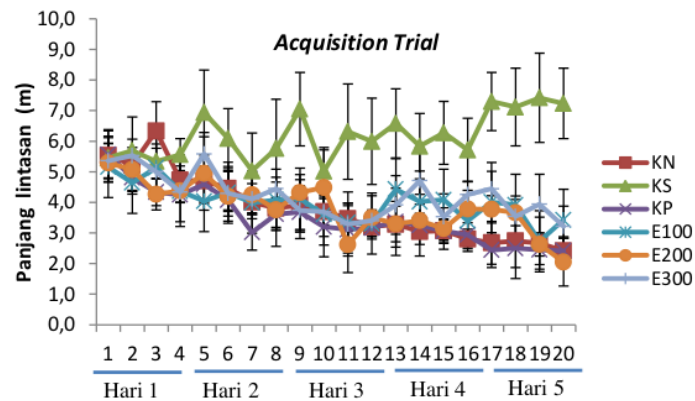
Hasil uji *posthoc* Tukey HSD (Tabel V) menunjukkan bahwa waktu latensi pada kelompok yang diinjeksi TMT saja (KS) paling lama dan nilainya lebih besar secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KN ($p = 0,0001$), KP ($p = 0,004$) dan E200 ($p = 0,0001$). Tidak ada perbedaan yang signifikan waktu latensi antara kelompok KS dengan kelompok-kelompok E100 ($p = 0,238$) dan E300 ($p = 0,312$). Waktu latensi kelompok KN berbeda tidak signifikan dibandingkan dengan kelompok KP ($p = 0,437$) dan E200 ($p = 0,327$).

3) Panjang Lintasan

Data panjang lintasan semua kelompok selama 20 kali latihan pada *acquisition trial* disajikan pada Gambar 23 dan Gambar 24 selengkapnya pada Lampiran 10. Berdasarkan Gambar 24 menunjukkan bahwa kelompok tikus yang diinjeksi TMT saja menunjukkan nilai panjang lintasan yang paling besar di antara kelompok-kelompok lainnya.



Gambar 23. Panjang lintasan (garis merah) tikus pada *acquisition trial*, (A) kelompok normal (KN); (B) kelompok kontrol sakit (KS) yang diberi TMT dosis tunggal 8 mg/kg BB.



Gambar 24. Data (rerata \pm SEM) panjang lintasan (m) tikus ($n = 10$) pada *acquisition trial* uji MWM yang dilakukan 4 kali sehari selama 5 hari pada kelompok normal (KN) dan yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kg BB (E100), 200 mg/kg BB (E200), dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari.

Hasil pengukuran panjang lintasan tikus mencapai platform juga menunjukkan nilai panjang lintasan yang naik turun untuk setiap latihannya pada masing-masing kelompok. Untuk menghasilkan data yang homogen dan terdistribusi normal, data panjang lintasan sebelumnya ditransformasi menjadi data log 10. Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan *repeated-measures* ANOVA terhadap data log 10 panjang lintasan, menunjukkan ada efek yang signifikan ($p < 0,05$) tetapi interaksi antara *trial* dan kelompok tidak signifikan ($p > 0,05$). Hasil uji statistik waktu latensi disajikan pada Tabel VI.

Tabel VI. Data log 10 (rerata \pm SEM) panjang lintasan selama 20 kali latihan pada *acquisition trial* uji MWM pada kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kg BB (E100), 200 mg/kgBB (E200), dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari.

Kelompok	n	Panjang lintasan	df	F	P
KN	10	0,507 \pm 0,070 ^a			
KS	10	0,703 \pm 0,093			
KP	10	0,455 \pm 0,074 ^a	5, 54	4,707	0,001
E100	10	0,504 \pm 0,087 ^a			
E200	10	0,497 \pm 0,080 ^a			
E300	10	0,539 \pm 0,087 ^a			

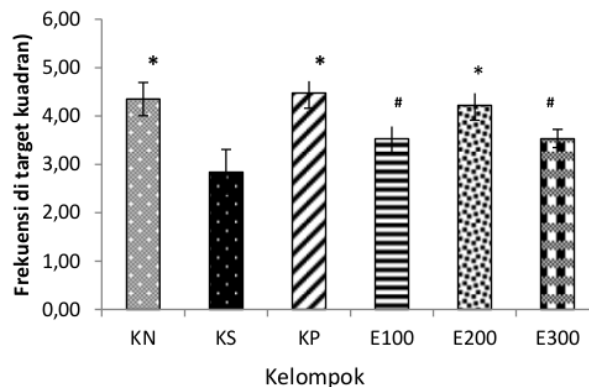
^ap < 0,05 dibandingkan dengan KS; ^bp < 0,05 dibandingkan dengan KN

Analisis statistik data log10 panjang lintasan menunjukkan bahwa panjang lintasan kelompok KS memiliki nilai panjang lintasan terbesar di antara semua kelompok. Berdasarkan analisis statistik dengan uji *posthoc* Tukey HSD menunjukkan bahwa panjang lintasan kelompok KS lebih besar secara signifikan dibandingkan dengan kelompok-kelompok KN (p = 0,0001), KP (p = 0,001), E100; (p = 0,001), E200 (p = 0,001), dan E300 (p = 0,006). Tidak ada perbedaan yang signifikan panjang lintasan antara kelompok KN dengan kelompok-kelompok KP (p = 0,424), E100 (p = 0,966), E200 (p = 0,948), E300 (p = 0,511)

b. *Probe trial*

1) Frekuensi berada di kuadran target

Data hasil uji *probe trial* adalah frekuensi tikus berada di kuadran target dan persentase (%) lama tikus berada di kuadran target. Hasil uji *probe trial* disajikan pada Gambar 25. Hasil selengkapnya terdapat pada Lampiran 11.



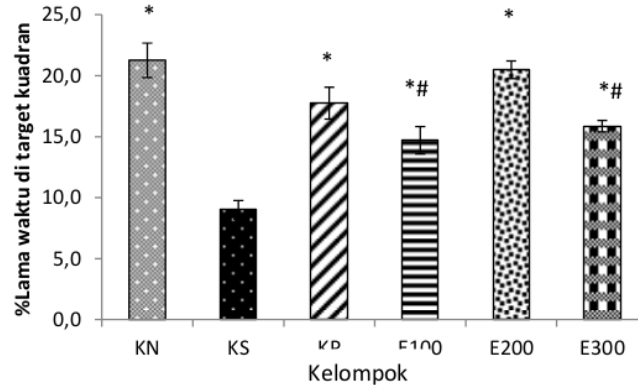
Gambar 25. Grafik histogram data frekuensi (rerata ± SEM) tikus berada di target kuadran *probe trial* uji MWM pada kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinduksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB (KS) pada hari ke 8 serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP) dan ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kg BB (E100), 200 mg/kg BB (E200), dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari. * $p < 0,05$, dibandingkan dengan KS; # $p < 0,05$, dibandingkan dengan KN

Data frekuensi tikus berada di kuadran target dianalisis statistik dengan uji normalitas menggunakan uji Kolmogorov Smirnov dan uji homogenitas dengan uji Levene. Hasil uji menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$) sehingga kemudian dilakukan uji *one way* ANOVA. Hasil uji *one way* ANOVA menunjukkan bahwa nilai $df = 5, 54$; $F = 7,894$; $p = 0,0001$ sehingga memberi kesimpulan bahwa ada kelompok-kelompok yang berbeda signifikan. Analisis selanjutnya menggunakan uji *posthoc* Tukey HSD

menunjukkan bahwa frekuensi tikus berada di kuadran target pada kelompok KS lebih kecil secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KN ($p = 0,0001$), KP ($p = 0,0001$) dan E200 ($p = 0,001$). dan tidak berbeda signifikan dengan kelompok-kelompok E100 ($p = 0,272$) dan E300 ($p = 0,144$). Kelompok KN tidak berbeda signifikan dengan kelompok-kelompok KP ($p = 0,713$) dan E200 ($p = 0,272$).

2) Persentase (%) lama waktu di kuadran target

Data hasil uji *probe trial* berupa persentase (%) lama waktu tikus berada di kuadran target disajikan pada Gambar 26. Hasil selengkapnya terdapat pada Lampiran 11.

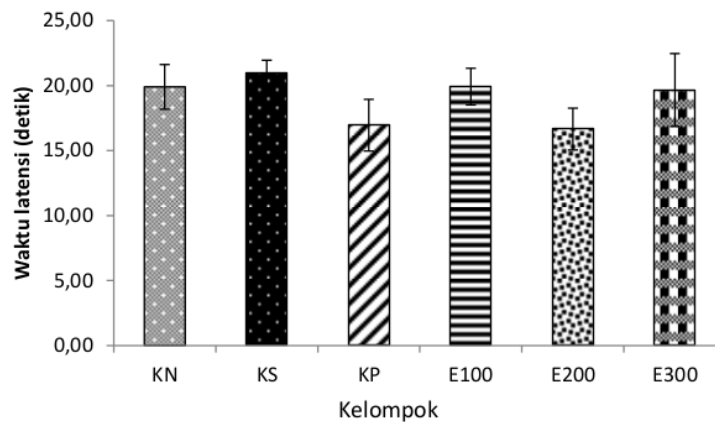


Gambar 26. Grafik histogram data (rerata ± SEM) persentase (%) lama waktu tikus ($n = 10$).berada di kuadran target pada *probe trial* uji MWM pada kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kg BB (E100), 200 mg/kg BB (E200) dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari. * $p < 0,05$ dibandingkan dengan kelompok KS; # $p < 0,05$ dibandingkan dengan kelompok KN

Data % lama waktu tikus berada di kuadran target dianalisis statistik dengan uji normalitas menggunakan Kolmogorov-Smirnov dan uji homogenitas menggunakan uji Levene. Hasil uji menunjukkan bahwa data terdistribusi normal (p > 0,05) dan homogen (p > 0,05). Analisis selanjutnya dilakukan uji *one way* ANOVA dan diperoleh nilai $df = 5, 54; F = 10.735; p = 0.0001$, sehingga memberikan kesimpulan bahwa ada kelompok-kelompok yang berbeda signifikan. Analisis selanjutnya menggunakan uji *posthoc* Tukey menunjukkan bahwa % lama waktu tikus berada di kuadran target kelompok KS lebih kecil secara signifikan dibandingkan dengan kelompok-kelompok KN (p = 0,0001), KP (p = 0,000), E100 (p = 0,005), E200 (p = 0,0001), dan E300 (p = 0,001). Kelompok KN tidak berbeda signifikan dengan kelompok-kelompok KP (p = 0,074) dan E200 (p = 0,689).

c. Uji sensorimotor

Data hasil uji sensorimotor disajikan pada Gambar 27 dan selengkapnya pada Lampiran 12.



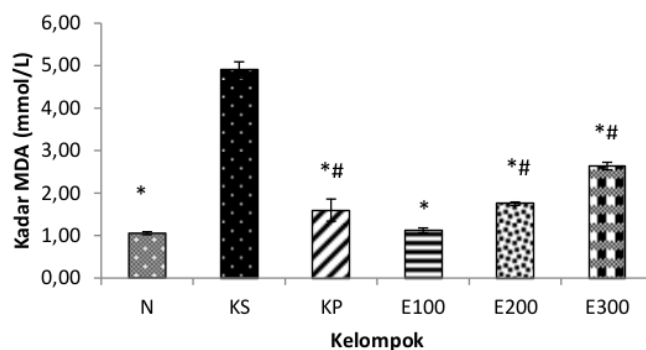
Gambar 27. Grafik histogram data (rerata \pm SEM) waktu latensi pada uji sensorimotor pada tikus ($n = 10$) kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kgBB (E200), dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari. $p > 0,05$

Data waktu latensi hasil uji sensorimotor dianalisis statistik dengan uji normalitas menggunakan Kolmogorov Smirnov dan uji homogenitas dengan uji Levene menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$). Analisis selanjutnya menggunakan uji *one way ANOVA* menunjukkan nilai $df = 5, 54$; $F = 10,735$; $p = 0,978$. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan waktu latensi di antara kelompok-kelompok perlakuan, sehingga kemampuan memori tikus tidak disebabkan karena adanya gangguan sensori, motor dan motivasi dari hewan uji.

5. Uji biokimiawi

a. Kadar MDA darah

Pengambilan darah untuk pengukuran kadar MDA plasma dilakukan setelah tikus melakukan uji memori spasial. Kadar MDA plasma disajikan pada Gambar 28 dan selengkapnya pada Lampiran 14.



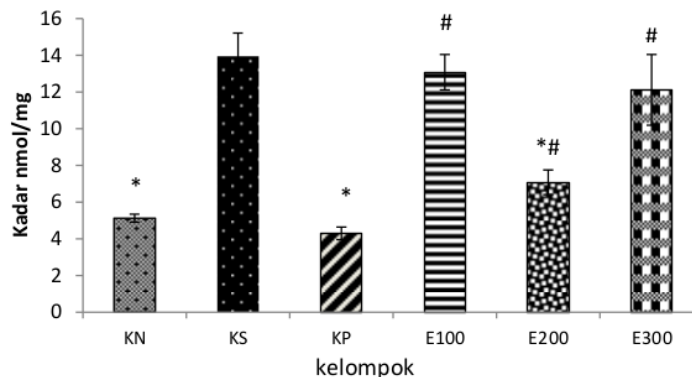
Gambar 28. Grafik histogram (rerata \pm SEM) kadar MDA plasma (mmol/L) yang diukur pada hari ke 36 pada tikus ($n = 6$) kelompok norm7 (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kgBB (E200), dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari. * $p < 0,05$ berbeda signifikan dengan KS; # $p < 0,05$ berbeda signifikan dengan KN

Data hasil pengukuran kadar MDA plasma dianalisis normalitas menggunakan Saphiro-Wilk dan uji homogenitas menggunakan uji Levene menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$), namun tidak homogen ($p < 0,05$). Analisis selanjutnya menggunakan uji Kruskall Wallis menunjukkan nilai *chi square* 25,686; $df = 5$; $p = 0,0001$. Hasil tersebut menunjukkan ada perbedaan di antara kelompok-kelompok sehingga selanjutnya dilakukan uji

Mann-Whitney. Hasil uji Mann Whytney menunjukkan bahwa pemberian TMT dapat meningkatkan kadar MDA plasma. Peningkatan kadar MDA plasma kelompok KS lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan kelompok-kelompok KN ($p = 0,002$). KP ($p = 0,002$), E100 ($p = 0,002$), E200 ($p = 0,002$) dan E300 ($E = 0,002$). Kadar MDA plasma kelompok KN berbeda tidak signifikan dengan kelompok E100 ($p = 0,394$), namun kadar MDA plasma kelompok KN lebih kecil signifikan dibandingkan dengan kelompok KP ($p = 0,002$); E200 ($p = 0,002$) dan E300 ($p = 0,002$).

b. Kadar MDA otak

Bagian otak yang diukur kadar MDAny adalah hemispherium cerebri kiri. Data hasil pengukuran kadar MDA otak disajikan pada Gambar 29 dan hasil selengkapnya pada Lampiran 16.

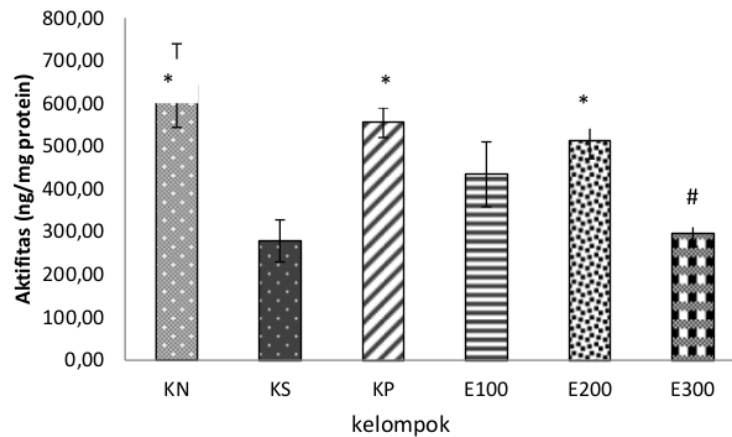


Gambar 29. Grafik histogram data (rerata ± SEM) kadar MDA otak (nmol/mg) yang diukur pada hari ke 36 pada tikus ($n = 6$) kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kgBB (E200) dan 300 mg/kg BB (300) selama 28 hari. * $p < 0,05$ dibandingkan dengan KS; $p < 0,05$ dibandingkan dengan KN

Data hasil pengukuran kadar MDA otak dianalisis normalitasnya menggunakan Saphiro-Wilk dan uji homogenitas menggunakan uji Levene menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$), namun tidak homogen ($p < 0,05$). Analisis selanjutnya menggunakan uji Kruskall Wallis menunjukkan nilai *chi square* 27,982; $df = 5, 30$; $p = 0,0001$. Hasil tersebut menunjukkan ada perbedaan di antara kelompok-kelompok sehingga selanjutnya dilakukan uji Mann-Whytney. Hasil uji Mann-Whytney menunjukkan kadar MDA otak kelompok KS lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KN ($p = 0,002$). KP ($p = 0,002$) dan E200 ($p = 0,002$). Kadar MDA otak kelompok KP berbeda tidak signifikan dengan kelompok KN, namun untuk kelompok E200 lebih tinggi secara signifikan dengan kelompok KN ($p = 0,015$).

c. Aktivitas SOD otak

Aktivitas SOD diukur pada homogenat hemispherium kiri setelah hewan uji dikorbankan. Hasil uji aktivitas SOD disajikan pada Gambar 30 dan selengkapnya pada Lampiran 21.

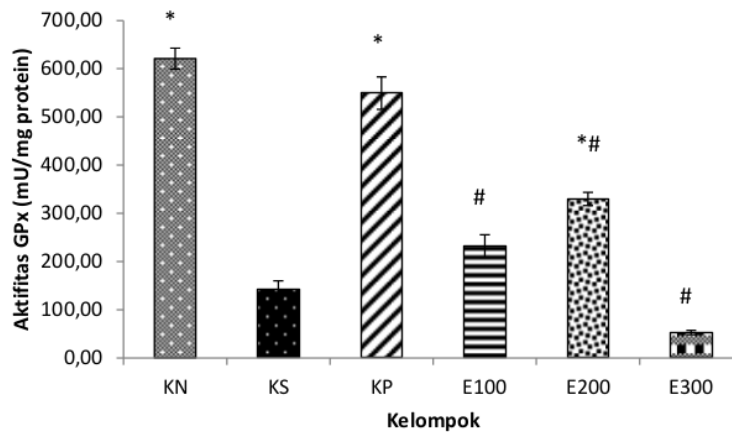


Gambar 30. Grafik histogram data (rerata \pm SEM) aktivitas superoksida dismutase (SOD) otak (ng/mg protein) yang diukur pada hari ke 36 pada tikus ($n = 6$) kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kg BB (E100), 200 mg/kg BB (E200), dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari. * $p < 0,05$ berbeda signifikan dengan KS; # $p < 0,05$ berbeda signifikan dengan KN

Data aktivitas SOD otak dianalisis statistik dengan uji normalitas menggunakan Saphiro-Wilk dan uji homogenitas dengan uji Levene menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) namun tidak homogen ($p < 0,05$). Analisis selanjutnya dilakukan dengan uji Kruskal Wallis dan diperoleh hasil *chi square* = 19,697; $df = 5$; $p = 0,001$. Uji selanjutnya menggunakan uji Mann Whytney menunjukkan bahwa kelompok KS aktivitas SOD-nya lebih kecil secara signifikan dibandingkan dengan kelompok-kelompok KN ($p = 0,004$), KP ($p = 0,002$), serta E200 ($p = 0,015$). Aktivitas SOD kelompok KN berbeda tidak signifikan dengan kelompok-kelompok KP ($p = 0,485$), E100 ($p = 0,132$), dan E200 ($p = 0,180$)

d. Aktivitas GPx

Aktivitas GPx diukur pada homogenat cerebrum kiri setelah hewan uji dikorbankan. Data rerata aktivitas GPx pada semua kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 31 dan hasil selengkapnya pada Lampiran 18.



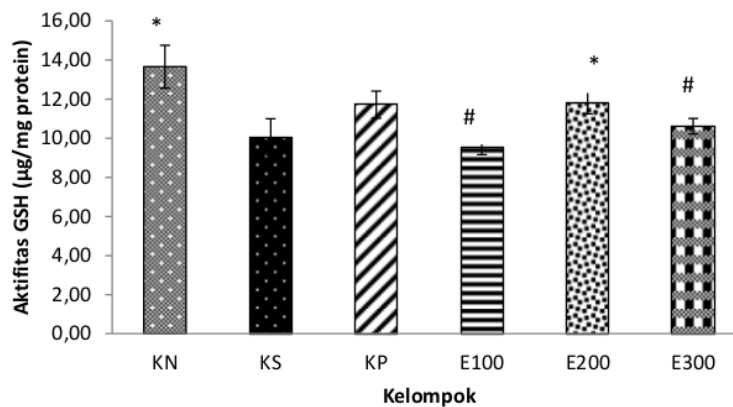
Gambar 31. Grafik histogram data (rerata \pm SEM) aktivitas GPx (mU/mg protein) otak yang diukur pada hari ke 36 pada tikus ($n = 6$) kelompok normal (K7) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kgBB (E200), dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari.

Data hasil pengukuran aktivitas GPx dianalisis statistik menggunakan uji normalitas Saphiro-Wilk dan uji homogenitas uji Levene menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) namun tidak homogen ($p < 0,05$). Analisis selanjutnya menggunakan uji Kruskal Wallis menunjukkan nilai *chi-square* = 28,210; $df = 5$; $p = 0,0001$. Analisis selanjutnya menggunakan uji Kruskal Wallis menunjukkan bahwa aktivitas GPx kelompok KS lebih kecil secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KN ($p = 0,002$), KP ($p = 0,002$) dan E200 ($p =$

0,015). Tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok KP dengan KN ($p = 0,589$).

e. Kadar GSH

Kadar GSH diukur pada homogenat hemispherium cerebri kiri setelah hewan uji dikorbankan. Data rerata aktivitas GSH pada semua kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 32 dan hasil selengkapnya pada Lampiran 19.



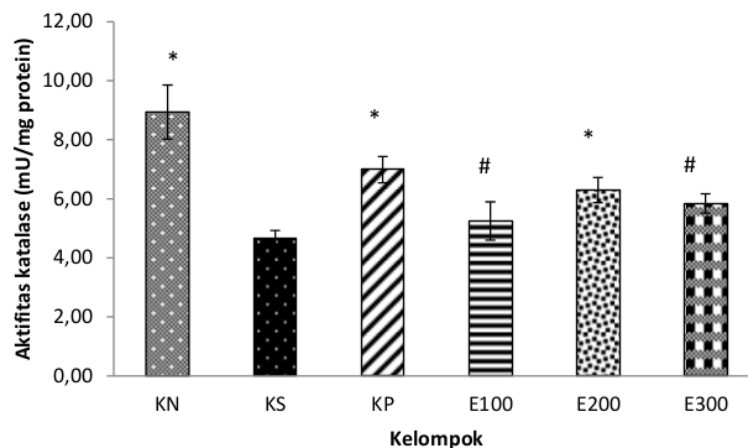
Gambar 32. Grafik histogram data (rerata \pm SEM) kadar GSH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) otak yang diukur pada hari ke 36 pada tikus ($n = 6$) kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kgBB (E200), dan 300 mg/kg B B (E300) selama 28 hari. * $p < 0,05$ berbeda signifikan dengan KS, # $p < 0,05$ berbeda signifikan dengan KN.

Data hasil pengukuran kadar GSH dianalisis statistik menggunakan uji normalitas Saphiro-Wilk dan uji homogenitas uji Levene menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$). Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan nilai $df = 5, 30$; $F = 4,214$; $p = 0,005$, sehingga kemudian dilakukan uji *posthoc*. Hasil uji *posthoc* Tukey HSD menunjukkan bahwa ada

perbedaan yang signifikan antara kelompok KS dengan kelompok KN ($p = 0,002$). Hanya kelompok E200 yang menunjukkan kadar GSH yang berbeda signifikan dengan kelompok KS. Namun apabila dibandingkan dengan KN, kelompok KP dan E200 menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p = 0,070$ dan $p = 0,086$)

f. Aktivitas Katalase

Aktivitas katalase diukur pada homogenat cerebrum kiri setelah hewan uji dikorbankan. Data rerata aktivitas katalase pada semua kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 33 dan hasil selengkapnya pada Lampiran 20.



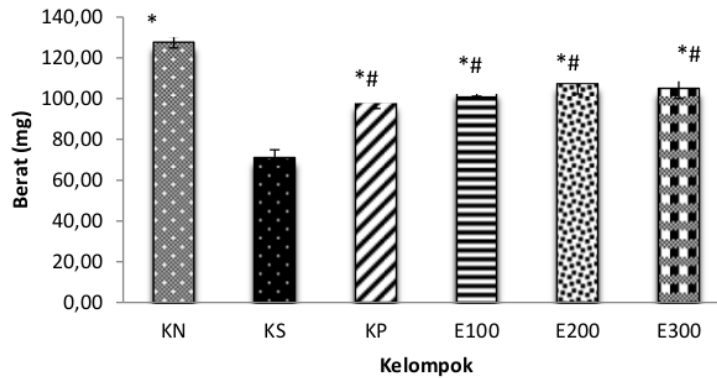
Gambar 33. Grafik histogram data (rerata \pm SEM) aktivitas katalase (mU/mg protein) otak yang diukur pada hari ke 36 pada tikus ($n=6$) kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kgBB (E200), dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari. * $p < 0,05$ berbeda signifikan dengan kelompok KS.

Data hasil pengukuran aktivitas katalase diuji normalitas dengan uji Saphiro-Wilk dan uji homogenitas dengan uji Levene menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$) sehingga data diuji statistik dengan *one way* Anova. Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan nilai $df = 5, 30$; $F = 7, 533$; $p = 0,0001$ sehingga dilakukan uji *posthoc* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji *posthoc* Tukey HSD menunjukkan bahwa aktivitas katalase kelompok KS lebih kecil secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KN ($p = 0,000$), KP ($p = 0,006$) dan E200 ($p = 0,045$). Namun aktivitas katalase kelompok KN lebih besar secara signifikan dibandingkan dengan kelompok-kelompok KP ($p = 0,018$), E100 ($p = 0,0001$), E200 ($p = 0,002$), dan E300 ($p = 0,000$).

6. Berat hippocampus dan uji histologik

a. Berat hippocampus

Hippocampus ditimbang setelah dipisahkan dari cerebrum kanan yang telah direndam dalam formalin 10% dalam PBS selama 6 hari. Hasil penimbangan berat hippocampus disajikan pada Gambar 1 dan selengkapnya pada Lampiran 25.



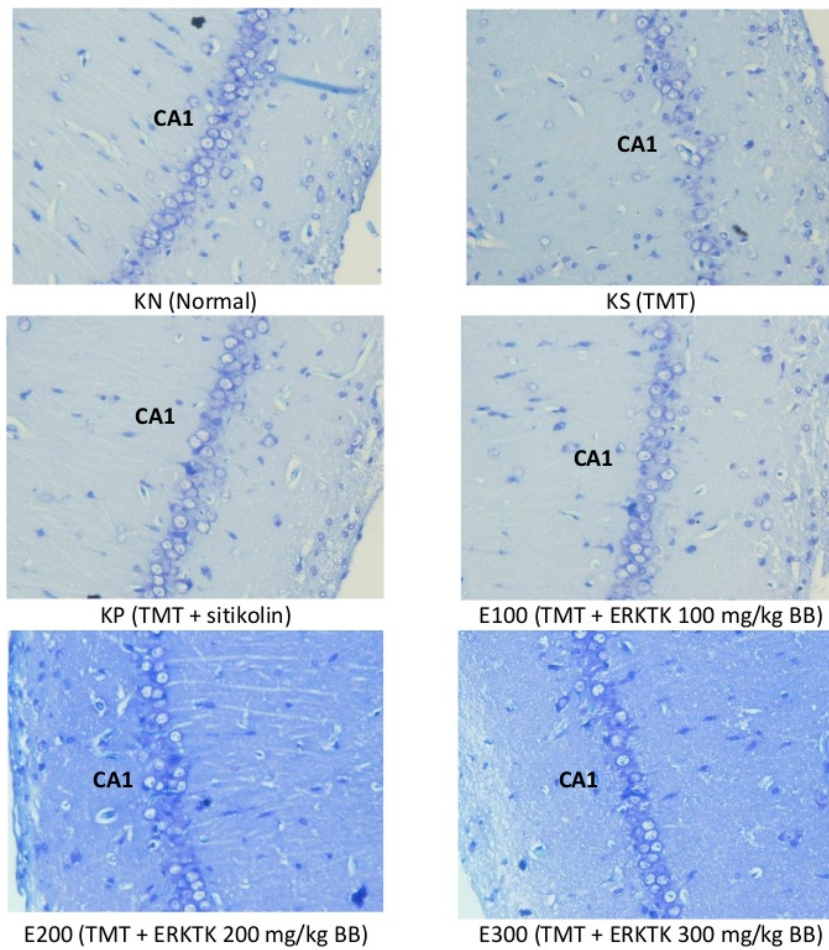
Gambar 34. Grafik histogram data (rerata \pm SEM) berat hippocampus yang ditimbang setelah dipisahkan dari otak tikus ($n = 6$) pada kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kgBB (E200) dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari. * $p < 0,05$, berbeda signifikan dengan kelompok KS; # $p < 0,05$, berbeda signifikan dengan kelompok KN.

Berdasarkan data berat hippocampus menunjukkan bahwa rerata berat hippocampus pada kelompok yang diinjeksi TMT saja menunjukkan rerata berat hippocampus yang paling kecil. Data hasil pengukuran berat hippocampus diuji normalitas menggunakan uji Saphiro-Wilk dan uji homogenitas menggunakan uji Levene menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$). sehingga data diuji statistik dengan *one way* ANOVA. Hasil uji *one way* ANOVA menunjukkan nilai $df = 5, 30$; $F = 14,197$; $p = 0,0001$ sehingga dilakukan uji *posthoc* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji *posthoc* Tukey HSD menunjukkan rerata berat hippocampus kelompok KS lebih kecil secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KN ($p = 0,0001$). KP ($p = 0,000$), E100 ($p = 0,0001$), E200 ($p = 0,0001$), dan E300 ($p = 0,0001$). Namun

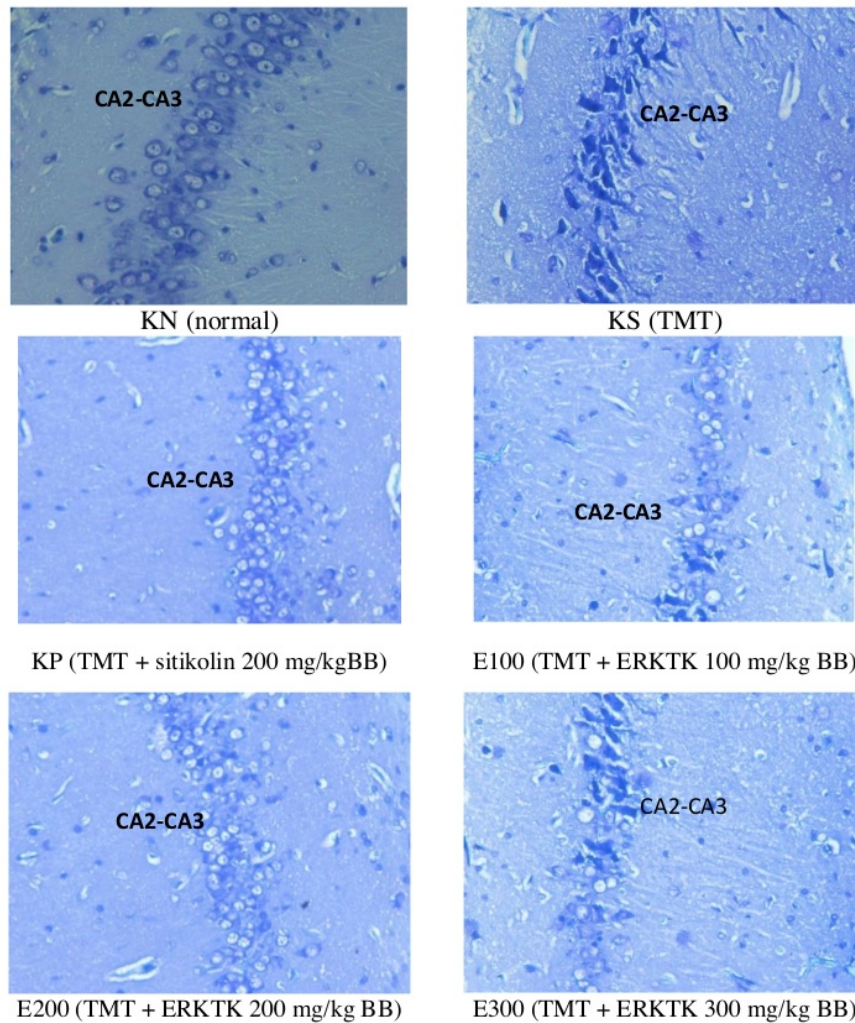
demikian rerata berat hippocampus kelompok yang diberi sitikolin maupun ekstrak masih lebih kecil secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KN.

b. Uji histologik

Uji histologik dilakukan dengan menghitung estimasi volume, kepadatan numerik dan estimasi jumlah sel pyramidal dengan prosedur stereologi, serta dilakukan pengamatan ekspresi gen *caspase-3* di regio CA1-CA3 hippocampus dengan pengecatan imunohistokimia. Gambaran mikroskopik hippocampus dengan pengecatan toluidin *blue* tersaji pada Gambar 35 dan Gambar 36.



Gambar 35. Gambaran mikroskopik sel pyramidal di daerah CA1 hippocampus pada kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kgBB (E200) dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari. Pengecatan toluidin *blue*, perbesaran 400x.



Gambar 36. Gambaran mikroskopik sel pyramidal di daerah CA3-CA2 hippocampus pada kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kgBB (E200) dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari. Pengecatan toluidin *blue*, perbesaran 400x.

1. Estimasi volume dan jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 dan CA2-CA3 hippocampus

Estimasi volume, kepadatan numerik, dan jumlah total sel pyramidal dihitung dengan prosedur stereologi. Hasil penghitungan volume, kepadatan numerik dan jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 ditunjukkan pada Tabel VII dan hasil selengkapnya pada Lampiran 26.

Tabel VII. Hasil analisis stereologi (rerata \pm SD) estimasi volume, kepadatan numerik, dan jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 pada tikus (n=6) kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ekstrak rimpang kunyit dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kgBB (E200) dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari.

Kel.	n	Vol (mm ³)	CV (Vol)	CE (Vol)	Nv (/mm ³)	Num	CV (Num)	CE (Num)
KN	6	0,93 \pm 0,05 ^a	0,06	0,09	241727,92 \pm 26848,35 ^a	225991,11 \pm 30617,77 ^a	0,13	0,10
KS	6	0,55 \pm 0,26	0,37	0,07	144331,61 \pm 65565,92	91573,51 \pm 30383,53	0,33	0,13
KP	6	0,79 \pm 0,33	0,21	0,07	132925,94 \pm 61900,62 ^b	122234,71 \pm 29865,55 ^b	0,24	0,13
E100	6	0,51 \pm 0,21 ^b	0,16	0,13	143624,25 \pm 82751,55 ^b	87649,32 \pm 38241,09 ^b	0,43	0,14
E200	6	0,61 \pm 0,13 ^b	0,37	0,09	147341,97 \pm 66666,04 ^b	97150,15 \pm 55190,84 ^b	0,56	0,14
E300	6	0,59 \pm 0,25 ^b	0,16	0,12	129422,48 \pm 63082,87 ^b	90601,73 \pm 30735 ^b	0,34	0,15
		One-way ANOVA df = 5, 30 F = 6,641 p = 0,000	CV _{tot} = 0,25 CV _{bio} = 0,23	CE _{tot} = 0,09 CE _{tot} ² /E _{tot} ² = 0,15	One-way ANOVA df = 5, 30 F = 6,081 p = 0,001	One-way ANOVA df = 5, 30 F = 12,702 p = 0,0001	CV _{tot} = 0,36 CV _{bio} = 0,34	CE _{tot} = 0,13 CE _{tot} ² /E _{tot} ² = 0,13

Kel, kelompok; n, jumlah subyek; V, rerata volume regio CA1; ANOVA, analysis of variance; CE_{tot}, total coefficient of error; CV_{tot}, total coefficient of variation; CV_{bio}, biological coefficient of variation; df, degree of freedom; n, jumlah subyek; Nv, kepadatan numerik; J, rerata jumlah total sel CA1; Vol, rerata volume daerah CA1. ^ap<0,05, dibandingkan dengan KS; ^bp < 0,05, dibandingkan dengan kelompok KN

Rerata volume daerah CA1 berkisar antara 0,5 - 0,9 mm³ sedangkan rerata estimasi jumlah total sel pyramidal 90-220 ribu neuron di daerah CA1. Nilai presisi estimasi analisis stereologi estimasi volume di daerah CA1 adalah 0,15 dan nilai presisi estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 adalah 0,13. Nilai tersebut menunjukkan strategi sampling yang baik. Data volume, kepadatan numerik dan jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 diuji normalitasnya menggunakan uji Saphiro-Wilk dan uji homogenitas menggunakan uji Levene, dan diperoleh hasil bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$).

Berdasarkan hasil analisa statistik menggunakan *one-way* ANOVA terhadap data volume, kepadatan numerik dan estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 and CA2-CA3 hippocampus menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan di antara kelompok-kelompok ($p < 0,05$). Hasil uji *Post hoc* Tukey HSD terhadap data volume sel pyramidal di daerah CA1 menunjukkan bahwa volume lapisan sel pyramidal di daerah CA1 pada kelompok KS lebih kecil secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KN ($p = 0,0001$). Namun tidak ada perbedaan yang signifikan volume antara kelompok KS dan KP ($p = 0,110$), E100 ($p = 0,998$), E200 ($p = 0,971$) dan E300 ($p = 0,998$). Data kepadatan numerik sel pyramidal di daerah CA1 kelompok KS lebih kecil secara signifikan dibandingkan kelompok KN ($p = 0,012$). Kepadatan numerik sel pyramidal di daerah CA1 kelompok KN lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KP ($p = 0,002$), E100 ($p = 0,011$), E200 ($p = 0,001$) dan T-TE300 ($p = 0,001$). Estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 pada kelompok KS

lebih kecil secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KN ($p = 0,0001$). Tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok KS dengan KP, juga dengan semua kelompok yang diberi dengan ekstrak.

Hasil penghitungan estimasi volume, kepadatan numerik, dan jumlah sel pyramidal di daerah CA2-CA3 ditunjukkan di Tabel VIII. Rerata volume daerah CA2-CA3 berkisar antara 0,6-1,15 mm³. Rerata estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA2-CA3 antara 84-167 ribu neuron. Nilai presisi analisis stereologi volume adalah 0,28 di daerah CA2-CA3 sedangkan untuk jumlah total sel pyramidal adalah 0,23. Nilai presisi tersebut menunjukkan strategi sampling yang baik. Analisis data volume lapisan pyramidal di daerah CA2-CA3 menunjukkan bahwa volume kelompok KS lebih kecil secara signifikan dibandingkan kelompok KN ($p = 0,0001$), KP ($p = 0,0001$) dan T-TE200 ($p = 0,004$). Volume lapisan pyramidal di daerah CA2-CA3 kelompok KN lebih besar secara signifikan dibandingkan dengan kelompok E100 ($p = 0,0001$) dan E300 ($p = 0,0001$). Namun demikian tidak ada perbedaan yang signifikan kepadatan numerik di antara kelompok-kelompok. Estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA2-CA3 pada kelompok KS lebih kecil secara signifikan dibandingkan dengan kelompok KN ($p = 0,001$). Namun, tidak ada perbedaan yang signifikan jumlah sel pyramidal di daerah CA2-CA3 antara kelompok KS dan kelompok-kelompok KP ($p = 0,095$) dan E200 ($p = 0,471$), juga antara kelompok KN dengan KP ($p = 0,546$) dan E200 ($p = 0,122$).

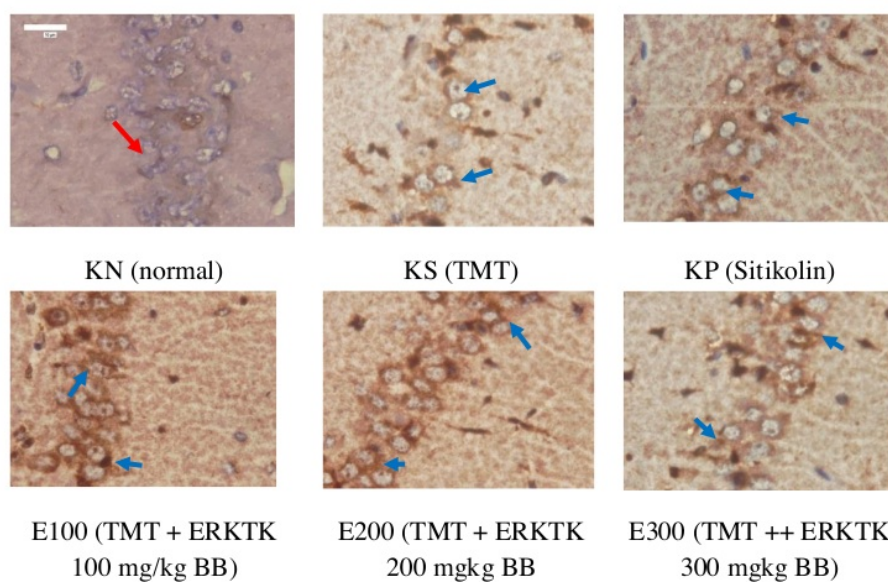
Tabel VIII. Hasil analisis stereologi (rerata \pm SD) estimasi volume, kepadatan numerik, dan jumlah total sel pyramidal di daerah CA2-CA3 pada tikus (n=6) kelompok normal (KN) dan kelompok-kelompok yang diinjeksi dosis tunggal TMT 8 mg/kg BB pada hari ke 8 (KS) serta mendapatkan perlakuan sitikolin dosis 200 mg/kg BB (KP), ERKTK dosis 100 mg/kgBB (E100), 200 mg/kg BB (E200), dan 300 mg/kg BB (E300) selama 28 hari.

Kel	N	Vol (mm ³)	CV (Vol)	CE (Vol)	Nv (/mm ³)	Num	CV (Num)	CE (Num)
KN	6	1,15 \pm 0,06 ^a	0,05	0,04	123881,81 \pm 20163,59	167594,41 \pm 28160,31 ^a	0,17	0,1
KS	6	0,60 \pm 0,14	0,24	0,11	122146,94 \pm 58974,27	84534,98 \pm 17128,05	0,20	0,19
KP	6	0,99 \pm 0,18 ^a	0,18	0,04	113894,87 \pm 61136,54	135897,61 \pm 41505,02	0,30	0,13
E100	6	0,66 \pm 0,13 ^b	0,19	0,09	119213,15 \pm 65966,32	92273,89 \pm 32428,09 ^b	0,35	0,14
E200	6	0,92 \pm 0,18 ^a	0,20	0,09	128940,98 \pm 53714,30	118496,91 \pm 2664,64	0,22	0,13
E300	6	0,65 \pm 0,08 ^b	0,12	0,05	114792,7 \pm 75595,27	90318,21 \pm 41540,88 ^b	0,45	0,14
		One-way ANOVA			One-way ANOVA	One-way ANOVA		
		CV _{tot} = 0,17 CV _{bio} = 0,15		CE _{tot} = 0,09	df = 5, 30	df = 5, 30	CV _{tot} = 0,30	CE _{tot} = 0,14
		F = 15,894		CE _{tot} ² / CV _{tot} ² = 0,28	F = 0,177	F = 6,025	CV _{bio} = 0,34	CE _{tot} ² / CV _{tot} ² = 0,23
		P = 0,0001			P = 0,969	P = 0,001		

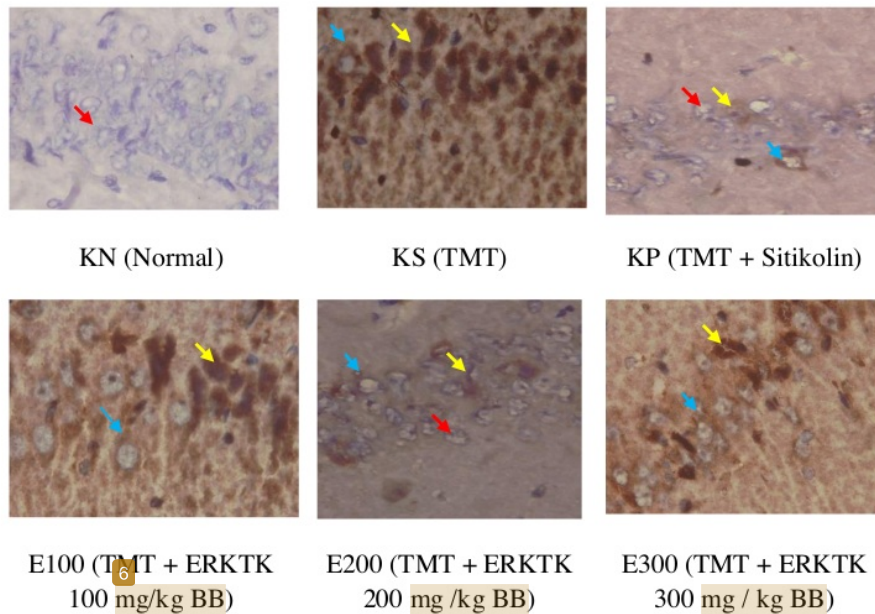
Kel, kelompok; n, jumlah subyek; Vol, rerata volume regio CA2-CA3; ANOVA, analysis of variance; CE_{tot}, total coefficient of error; CV_{tot}, total coefficient of variation n, CV_{bio}, biological coefficient of variation ; df, degree of freedom; n, jumlah subyek; Nv,kepadatan numerik; J, rerata jumlah total sel CA2-CA3; Vol, rerata volume daerah CA2-CA3. ^ap < 0,05, dibandingkan dengan kelompok KS; ^bp < 0,05, dibandingkan dengan kelompok KN

2. Hasil pengecatan imunohistokimia *caspase-3* di daerah CA1 dan CA2-CA3 hippocampus.

Pengecatan imunohistokimia dilakukan pada irisan yang berdekatan dengan irisan yang digunakan untuk penghitungan volume atau jumlah sel pyramidal pada prosedur stereologi. Hasil pengecatan imunohistokimia disajikan pada Gambar 37 dan Gambar 38.



Gambar 37. Gambaran mikroskopik pengecatan imunohistokimia *caspase-3* sel pyramidal hippocampus di daerah CA1 tikus model demensia yang diinduksi TMT. Pada kelompok yang diinjeksi TMT (KS), protein *caspase-3* dominan diekspresikan di sitoplasma (↗) sel CA1. *Caspase-3* tidak diekspresikan pada sel normal (↘). Ekspresi *caspase-3* di daerah CA1 kelompok perlakuan menunjukkan gambaran yang sama dengan kelompok normal (KN). Perbesaran 400x; ERKTK, ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin.



Gambar 38. Gambaran mikroskopik pengecatan imunohistokimia *caspase-3* jaringan hippocampus tikus model demensia yang diinduksi TMT. Pada kelompok yang diinjeksi TMT, protein *caspase-3* dominan diekspresikan di nukleus (↘) dan sitoplasma (↘) di daerah CA2-CA3. Ekspresi *caspase-3* di daerah CA2-CA3 pada kelompok KP dan E200 menunjukkan kurang intensif dibandingkan dengan kelompok-kelompok KS, E100 dan E300. Perbesaran 400x; ERKTK, ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin.

Berdasarkan hasil pengecatan imunohistokimia menunjukkan bahwa protein *pro-apoptotic caspase-3* terekspresi pada tikus yang diinjeksi TMT dan tidak diekspresikan pada kelompok normal. Antibodi spesifik untuk *caspase-3* secara selektif tercat coklat pada sitoplasma dan nukleus sel di daerah CA2-CA3 dan dominan tercat pada sitoplasma saja di daerah CA1.

4.2. PEMBAHASAN

1. Ekstraksi dan standarisasi ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn)

Metode ekstraksi rimpang kunyit yang digunakan adalah maserasi, yaitu dengan perendaman dan pengadukan. Dasar pemilihan metode ini karena pada metode maserasi tidak ada proses pemanasan sehingga senyawa yang terkandung dalam rimpang kunyit yang tidak tahan pemanasan tidak akan rusak. Selain itu cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan untuk maserasi, sederhana dan mudah. Penggunaan etanol 96% sebagai pelarut karena kandungan zat aktif di dalam ekstrak kunyit yaitu kurkumin tidak dapat larut dalam air dan heksan, tetapi dapat larut dengan baik dalam etanol, metanol, aseton dan dimetilsulfoksida (Li *et al.*, 2011; Stankovic, 2004).

Uji KLT-densitometri dilakukan untuk mengidentifikasi adanya kurkumin dalam ekstrak yang diuji dan untuk mengetahui berapa kadar kurkumin yang terdapat dalam ekstrak etanol rimpang kunyit. Metanol digunakan sebagai fase gerak karena kemampuan metanol untuk meningkatkan polaritas kloroform sehingga terbentuk suatu sistem eluen yang dapat memisahkan komponen dalam ekstrak berdasarkan nilai *retardation factor* (R_f) dalam ekstrak dengan baik (Khopkar, 2003). Identifikasi ekstrak kunyit menghasilkan tiga bercak noda (kromatogram) yakni kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin yang merupakan senyawa polifenol (Chattopadhyay *et al.*, 2004).

Ekstrak kunyit selanjutnya dilarutkan dalam *carboxymethyl cellulose* (CMC), rantai panjang dari polisakarida, yang dapat digunakan sebagai agen

pengikat, *stabilizer* dan *suspending agent* (Bär *et al.*, 1995). CMC dapat larut dengan baik di dalam air dan menghasilkan larutan yang jernih, serta aman (JECFA, 1990; SCF, 1992) sehingga dalam penelitian ini digunakan untuk mensuspensikan ekstrak (Surojanametakul *et al.*, 2010).

2. Efek TMT dosis tunggal 8 mg/kg BB pada tikus *Sprague Dawley*

Trimetiltin dalam penelitian ini digunakan untuk menginduksi terjadinya demensia pada hewan uji. Trimetiltin diberikan pada hari ke 8 (7 hari setelah pemberian perlakuan ekstrak maupun sitikolin) dengan tujuan agar hewan uji sudah mendapatkan kadar zat aktif ekstrak /sitikolin dalam darah sebelum paparan TMT. Trimetiltin merupakan neurotoksikan yang dapat menghasilkan degenerasi neuron yang tergantung dosis (*dose-dependen response*) pada sistem limbik (Earley *et al.*, 1992; Philbert *et al.*, 2000), dengan target utamanya adalah hippocampus (Ogita *et al.*, 2004; Whittington *et al.*, 1989). Bagian utama dari hippocampus yang mengalami efek toksik adalah sel-sel pyramidal (Ogita *et al.*, 2005; Whittington *et al.*, 1989). Percobaan dengan menggunakan hewan uji menunjukkan pola neurodegenerasi hippocampal yang tergantung pada spesies, strain, umur, dosis, larutan pembawa serta jalur pemberian (Balaban *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1983; Harry dan Lefebvre d'Hellencourt, 2003; O'callaghan *et al.*, 1989), dengan dosis toksik lebih tinggi pada tikus dibandingkan dengan mencit, gerbil, hamster dan monyet kecil (Chang, 1986; Chang *et al.*, 1983; Ekuta *et al.*, 1998). Dalam penelitian ini digunakan tikus galur *Sprague Dawley* karena galur tersebut memiliki performa spasial yang lebih baik dibandingkan dengan tikus

Wistar pada usia yang sama (Wyss *et al.*, 2000). Tikus juga memiliki kapasitas hemoglobin mengikat TMT yang lebih besar, sehingga lebih kecil menimbulkan ketoksikan akut dibandingkan pada mencit (Aldridge *et al.*, 1981; Chang *et al.*, 1983).

Hasil penimbangan berat badan tikus selama perlakuan menunjukkan bahwa rerata berat badan tikus dari mulai awal sampai terakhir perlakuan menunjukkan hasil yang tidak berbeda bermakna. Namun pada minggu ke 5 (akhir perlakuan), kelompok tikus yang diinjeksi TMT saja menunjukkan rerata berat badan yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok normal ($p < 0,05$). Pengamatan klinis menunjukkan bahwa beberapa tikus yang diinjeksi TMT menunjukkan bulu-bulu yang lebih kusam dan tingkah laku yang lebih agresif dibandingkan tikus kelompok normal. Menurut Balaban *et al.*, (1988) TMT merupakan kelompok organotin yang dapat menyebabkan degenerasi neural dan perubahan tingkah laku. Paparan pada rodensia, dapat menyebabkan hewan uji mengalami disorientasi, agresif, dan kejang-kejang. Efek tersebut dapat disebabkan karena hilangnya struktur septal dan destruksi yang ekstensif pada neuron amigdala dan hippocampus (Boyer, 1989; Dyer *et al.*, 1982). Sel-sel epitelial pada tubulus proksimal ginjal juga merupakan jaringan yang peka terhadap efek toksik dari TMT sehingga dapat menyebabkan peningkatan pH urin dan menyebabkan diuresis (Cook *et al.*, 1984; Opacka dan Sparrow, 1985). Selain itu TMT juga merusak sistem imun dan menyebabkan atrofi limpa (Brown *et al.*, 1979; Snoeij *et al.*, 1986) sehingga hal ini kemungkinan yang dapat menyebabkan penurunan berat badan (Philbert *et al.*, 2000).

Untuk mengkaji proses pembelajaran dan memori yang melibatkan hippocampus dalam penelitian ini digunakan uji memori spasial. Berbagai uji memori telah membuktikan bahwa TMT dapat mengganggu tingkah laku yang berkaitan dengan kerusakan hippocampus, yang dapat diamati melalui uji *passive avoidance* (Walsh *et al.*, 1982a) dan uji *radial arm maze* (Alessandri *et al.*, 1994; Bushnell dan Angell, 1992; Miller dan O'Callaghan, 1984; Walsh *et al.*, 1982b). Intoksikasi TMT dapat mempengaruhi *acquisition (tes penyelamatan diri)* pada *water maze* dan *Biel maze (water avoidance)* (Park *et al.*, 2011). Uji Morris *water maze* merupakan suatu tes untuk memori spasial dimana tikus harus mengingat lokasi dan platform yang terendam (Ploughman, 2008). Uji ini mempunyai beberapa keuntungan, diantaranya adalah : (1) tidak memerlukan periode pelatihan sebelumnya dan latihan dapat dilakukan dalam waktu yang singkat, yaitu 10-20 kali latihan, (2) tidak dipengaruhi oleh indera penciuman, (3) dapat mengidentifikasi adanya defisit visual, motorik atau motivasional, (4) tidak menyakitkan hewan uji misal dengan menyetrum atau melaparkan terlebih dahulu, (5) mudah dilakukan dan biaya lebih murah (Alvin and Terry 2009; Brandeis *et al.*, 1989) Waktu latensi dan panjang lintasan dari 20 kali latihan selama 5 hari berturut-turut pada *acquisition trial* merupakan proses pembelajaran spasial. Sedangkan frekuensi dan % lama waktu tikus berada di kuadran target pada *probe trial* menunjukkan kemampuan penyimpanan memori spasial tikus. Tikus normal akan mencari secara acak platform yang tersembunyi, namun setelah berulang kali tikus akan menjadi lebih efisien (nilai waktu latensi dan panjang lintasan akan lebih kecil) dalam menemukan platform. Tikus yang mengalami lesi hippocampus

atau kemunduran fungsi hippocampus akan kehilangan kemampuan belajar menggunakan petunjuk visual untuk menemukan platform (Bizon *et al.*, 2009; Purves *et al.*, 2004).

Hasil uji Morris *water maze* menunjukkan bahwa tikus yang diinjeksi dengan TMT dosis tunggal 8 mg/kg BB mengalami penurunan memori spasial. Hal ini ditunjukkan dengan adanya peningkatan lama waktu latensi dan panjang lintasan pada *acquisition trial*, peningkatan frekuensi dan % lama waktu tikus berada di kuadran target pada *probe trial* selama uji Morris *water maze*.

Telah diketahui bahwa lesi pada hippocampus dapat menyebabkan amnesia berat pada memori tertentu pada manusia maupun mamalia lainnya (Meck *et al.*, 2013a; Scoville dan Milner, 2000). Lesi selektif pada hippocampus telah dilaporkan dapat merusak performa memori pengenalan pada manusia (Manns *et al.*, 2003), kera (Beason-Held *et al.*, 1999; Nemanic *et al.*, 2004; Zola *et al.*, 2000), dan rodent (Prusky *et al.*, 2004). Tikus dengan lesi bilateral hippocampus menunjukkan gangguan memori spasial (Broadbent *et al.*, 2004). Hippocampus adalah jaringan untuk mengolah informasi yang penting dan konsolidasi memori spasial. Input sensori dari lingkungan yang diterima oleh sensori kortikal dan area asosiasi akan ditransmisikan ke kortek entorhinal dan formasi hippocampal (gyrus dentata), kemudian ke daerah cornu ammonis (CA3, CA2, CA1), melanjut ke subiculum, dan pada akhirnya akan ditransfer kembali ke daerah asosiasi (Andersen, 2007). Tikus yang diuji dengan Morris *water maze* melakukan mekanisme untuk menemukan platform yang tersembunyi melalui 5 langkah yaitu, (1) *Exploration*, dimana hewan uji menyesuaikan diri dengan

lingkungan, (2) *Self localization*, hewan uji harus menentukan lokasi platform melalui petunjuk yang ada, (3) *Route learning*, dimana selama perjalanan menuju platform, rute disimpan di area CA hippocampus, (4) *Replay of routes during sleep*, dimana selama tidur rute akan diulang kembali, (5) *Consolidation*, rute akan ditransfer ke penyimpanan jangka panjang (Redish dan Touretzky, 1998). Terjadinya lesi hippocampus di daerah CA1 (Davis *et al.*, 1987) atau CA3 (Sutherland *et al.*, 1983) dapat menyebabkan penurunan memori spasial yang dapat dibandingkan dengan lesi pada seluruh hippocampus. Gangguan pembelajaran spasial yang berkaitan dengan ketoksikan TMT dalam penelitian ini juga mendukung penelitian sebelumnya (Jung *et al.*, 2013; Koda *et al.*, 2008; Noland *et al.*, 1982; Park *et al.*, 2011; Stanton, 1991).

Hasil pengukuran parameter biokimiawi menunjukkan bahwa tikus yang hanya diinjeksi TMT menunjukkan peningkatan kadar MDA darah, MDA otak dan terjadi penurunan kadar GSH, aktivitas GPx, SOD, dan katalase. Mekanisme TMT dalam menimbulkan efek toksik belum diketahui seluruhnya dengan pasti (Geloso *et al.*, 2011), Secara umum ketoksikan senyawa organotin berkaitan dengan jumlah dan panjang gugus alkil yang terikat pada tin dan memiliki spesifisitas yang tinggi pada aksinya di neuron (Dopp *et al.*, 2007; Florea *et al.*, 2004; Snoeij *et al.*, 1987; Winship, 1988). Pemberian TMT pada hewan uji terbukti dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa kerusakan neurotoksik akibat induksi TMT dimediasi oleh turunan dari *reactive oxygen species (ROS) dan reactive nitrogen species (RNS)* (Clerici, 1996; Harry *et al.*, 2001; Viviani *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006). TMT

meningkatkan pembentukan ROS secara *in vitro* (Viviani *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006) dan *in vivo* (Ali *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2008). Pemberian TMT akan meningkatkan turunan spesies oksidatif seluler pada beberapa jenis *cells line* (Gunasekar *et al.*, 2001; Jenkins dan Barone, 2004; Mundy dan Freudenrich, 2006) serta pada hippocampus tikus *Sprague Dawley* (Shin *et al.*, 2005).

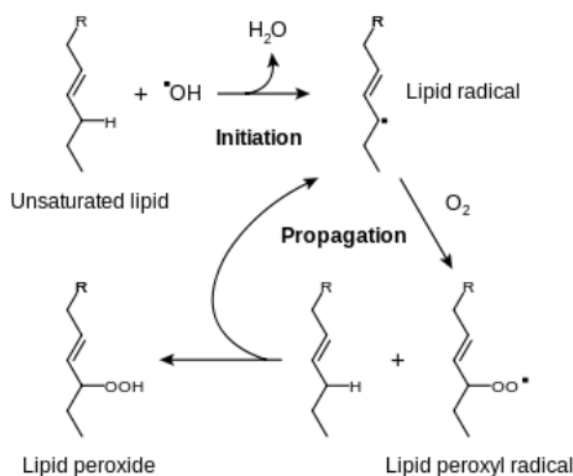
Dalam penelitian ini tikus yang mendapat injeksi TMT dosis tunggal 8 mg/kgBB menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA darah maupun otak. Malondialdehid (MDA) merupakan senyawa yang dapat menggambarkan aktivitas radikal bebas di dalam sel sehingga pengukuran kadar MDA dijadikan sebagai salah satu petunjuk terjadinya stres oksidatif akibat radikal bebas (Gawel *et al.*, 2004).

Peningkatan kadar MDA otak disebabkan karena otak merupakan organ yang mudah mengalami stres oksidatif. Otak memiliki aktivitas metabolik yang tinggi. Kandungan asam lemak tidak jenuh otak tinggi, tetapi mekanisme sistem pertahanan antioksidatifnya relatif sedikit dibandingkan organ lain (Panetta dan Clemens, 1994; Smith *et al.*, 2000). Kerusakan yang diinduksi oleh oksiradikal terhadap makromolekul (lipid, protein, asam nukleat dan lain-lain) menjadi faktor penting gangguan neurodegeneratif (Liu *et al.*, 2001; Wickens, 2001). Asam lemak tak jenuh ganda (*Poly Unsaturated Fatty Acid/PUFA*) merupakan komponen dari membran sel yang sangat rentan terhadap kerusakan oksidatif. Kerusakan oksidatif dapat disebabkan oleh induksi berbagai spesies reaktif radikal dan non radikal yang meliputi *reactive oxygen species* (ROS), *reactive nitrogen species* (RNS), dan *reactive aldehydic species* (Weinert dan Timiras, 2003; Yu *et*

al., 2005). Radikal bebas oksigen yang paling reaktif di dalam tubuh adalah anion superoksida (O_2^-), hidroksil radikal ($\cdot OH$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (McCord, 2000).

Kerusakan oksidatif pada membran lipid, disebut peroksidasi lipid, diinisiasi oleh atom hidrogen dari PUFA oleh spesies reaktif. Reaksi ini menghasilkan radikal lipid (L^*) yang selanjutnya dapat menginduksi pembentukan radikal yang lain, meliputi radikal peroksil lipid (LOO^*), lipid hidroperoksida (LOOH) dan radikal alkoksil lipid (Fang *et al.*, 2002; Merry, 2002).

Peroksidasi membran lipid dan protein (*carbonyl group formation*) dapat mengganggu fluiditas membran, menurunkan potensial membran, meningkatkan permeabilitas membran terhadap ion yang menginaktifkan enzim yang terikat pada membran (Farmer dan Mueller, 2013) seperti Na^+/K^+ -ATPase, sehingga akan menyebabkan terjadinya kematian sel. Peroksidasi asam lemak tidak jenuh menghasilkan produk akhir lipid seperti 4-HNE, MDA, akrolein dan lain-lain (Fang *et al.*, 2002).



Gambar 39. Peroksidasi lipid (dikutip dari Young dan McEneny, 2001).

Senyawa aldehyd (MDA dan 4-Hidroksi-2E-nonenal (HNE)) yang dihasilkan dari proses peroksidasi lipid, memiliki reaktivitas yang tinggi dengan kelompok sulfhidril dari sistein, histidin dan lisin yang merupakan komponen utama enzim neuron seperti Na-K-ATPase (Mark *et al.*, 1997). ATPase terkait dengan transfer ion dan homeostasis kalsium. Peningkatan konsentrasi kalsium dapat menyebabkan peristiwa kaskade intraseluler yang menghasilkan peningkatan ROS dan kematian seluler (Mattson, 1995).

Studi sebelumnya telah melaporkan bahwa pada penderita AD ringan sampai sedang terjadi peningkatan kadar MDA di plasma (Greilberger *et al.*, 2008; Martín-Aragón *et al.*, 2008; Zafrilla *et al.*, 2006) dan di sel darah merah (Baldeiras *et al.*, 2008). Penelitian menggunakan hewan uji juga telah membuktikan bahwa pemberian TMT dapat meningkatkan kadar MDA di dalam tubuh (Park *et al.*, 2011). Peningkatan kadar MDA dan karbonil protein telah

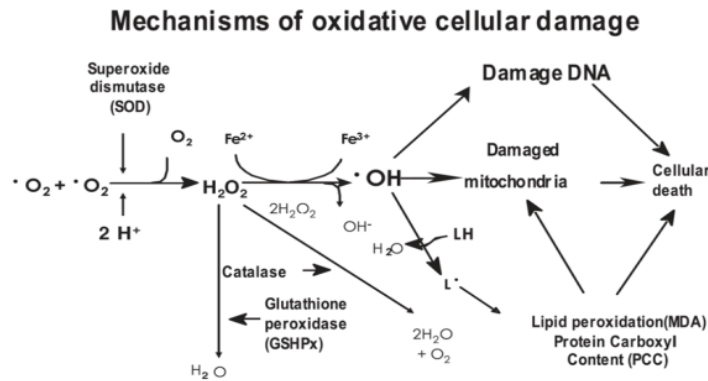
dilaporkan menunjukkan adanya peningkatan yang sejalan dengan penurunan kapasitas antioksidannya (Mutlu-Türkoğlu *et al.*, 2003).

Secara normal organisme akan melakukan mekanisme pertahanan untuk mengeliminasi radikal bebas melalui jalur enzimatik maupun non enzimatik. Jalur non enzimatik meliputi senyawa - senyawa yang berperan sebagai protein pengikat metal, penangkap radikal dan antioksidan seperti glutation (GSH), Co, Mn, Zinc, selenium (Fang *et al.*, 2002; Knight, 2000).

Antioksidan GSH merupakan senyawa yang dikenal sebagai substrat untuk berbagai metabolit toksik. GSH dapat mengurangi toksisitas berbagai obat dan senyawa kimia. Glutation tereduksi yang merupakan antioksidan kelompok tiol non protein, dapat berperan menjadi buffer radikal bebas di otak (Dringen, 2000). Glutation disintesis dari glutamat, sistein, dan glisin. N-asetilsistein adalah prekursor sistein untuk sintesis GSH intraseluler. Radikal bebas oksigen akan direduksi oleh GPx menjadi glutation disulfid (GSSG). GSH dibentuk kembali oleh *redox recycling*, dimana GSSG direduksi menjadi GSH oleh glutation reduktase (GR) dengan membutuhkan NADPH. Penurunan kadar GSH dapat mengganggu H_2O_2 clearance sehingga dapat meningkatkan pembentukan radikal $OH\cdot$. Radikal $OH\cdot$ merupakan molekul yang sangat toksik pada otak sehingga dapat menimbulkan kerusakan oksidatif pada otak (Dringen, 2000; Sun, 1990). Selain itu GSH dapat bereaksi dengan berbagai senyawa elektrofilik xenobiotik dalam reaksi katalitik dari glutation-S-transferase. GSH juga efektif menangkap ROS, yaitu lipid peroksil radikal, peroksil nitrit, dan H_2O_2 , secara langsung dan tidak langsung. GSH dapat berkonjugasi dengan NO, menghasilkan formasi S-

nitrosoglutathione adduct, yang akan dipecah oleh sistem tioredoksin untuk melepaskan GSH dan NO. Kemudian GSH juga berinteraksi dengan glutaredoksin dan tioredoksin (*thiol-proteins*), yang mempunyai peranan penting dalam pengaturan homeostasis *cellular redox* (Javed *et al.*, 2012)

Senyawa antioksidan lain di dalam tubuh juga memberikan sistem pertahanan terhadap radikal bebas. SOD bekerja dengan mengubah radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Sedangkan katalase dan glutathione peroxidase akan mengkatalisis degradasi H_2O_2 menjadi molekul air dan oksigen (Bild *et al.*, 2012).

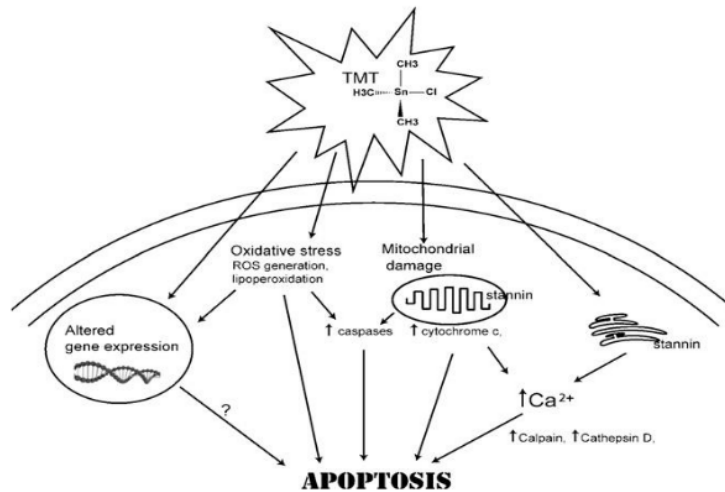


Gambar 40. Mekanisme pertahanan antioksidan (dikutip dari Munoz dan Castilla-Cortazar, 2012)

Pengamatan histologik juga menunjukkan bahwa tikus yang diinjeksi TMT mengalami penurunan volume dan estimasi jumlah sel pyramidal di daerah CA1 dan CA2-CA3 hippocampus. Penurunan jumlah sel pyramidal tersebut didukung dengan adanya ekspresi protein *caspase-3* di sitoplasma sel pyramidal di daerah CA1 dan di sitoplasma maupun nukleus sel pyramidal di daerah CA2-CA3 hippocampus yang lebih intensif dibandingkan dengan kelompok normal, yang

menunjukkan bahwa penurunan jumlah sel karena sel mengalami kematian melalui proses apoptosis. Hasil tersebut juga mendukung hasil penimbangan berat hippocampus dimana semua kelompok tikus yang diinjeksi TMT terjadi penurunan berat hippocampus yang signifikan dibandingkan dengan kelompok normal. Dilaporkan oleh Arendt, (2009) bahwa pada penderita demensia Alzheimer, dimana daerah otak yang berfungsi untuk proses memori, yaitu lobus frontal bagian medial serta hippocampus, ukurannya berkurang. Hal ini terjadi akibat degenerasi sinapsis dan kematian neuron

TMT dapat mengganggu sistem serotonergik dan kolinergik, mengaktifkan protein kinase C ((Roy *et al.*, 1999; Pavlaković *et al.*, 1995), dan menginduksi *apoptotic cascade* (Thompson *et al.*, 1996). Mekanisme ketoksikan TMT dalam menginduksi terjadinya apoptosis digambarkan oleh Geloso *et al.*, (2011)



Gambar 41. Mekanisme ketoksikan TMT (dikutip dari Geloso *et al.*, 2011)

Kerusakan pada sel yang sensitif terhadap TMT berkaitan dengan stres oksidatif, *calcium overload* dan kerusakan mitokondria. Kerusakan mitokondria

kemungkinan dimediasi oleh protein stannin (SNN), yaitu sebuah protein dengan 88 asam amino yang dikode oleh cDNA dari sel yang sensitif terhadap TMT (Buck *et al.*, 2004). Stannin dapat ditemukan di jaringan limfe, ginjal dan saraf dengan ekspresi stannin paling besar berada di limpa, selanjutnya di hippocampus, neocortex, cerebellum, striatum, otak tengah, dan ginjal (Dejneka *et al.*, 1997). SNN kemungkinan terletak di membran luar mitokondria (Billingsley *et al.* 2006) dan membran retikulum endoplasma (Davidson *et al.*, 2004). SNN akan mengikat secara langsung dengan dimetilin (hasil demetilasi dari TMT), sehingga menyebabkan pelepasan sitokrom c dan aktivasi berbagai *caspase*. Aktivasi famili *caspase* dari protease sistein dapat memediasi apoptosis yang diinduksi TMT secara *in vivo* (Geloso *et al.*, 2002). *Calcium overload* terjadi tergantung pada penyimpanan intraseluler yang ada pada mitokondria dan retikulum endoplasma, kemudian menyebabkan aktivasi *Calpain* dan *Cathepsin D* yang akan memicu terjadinya apoptosis (Billingsley *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 1996). Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa analisis imunohistokimia pada irisan otak tikus yang diinduksi TMT dosis 8 mg/kg BB secara intraperitoneal menunjukkan hilangnya ekspresi stannin pada sel pyramidal dan gyrus dentata. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekspresi stannin berkaitan dengan hilangnya sel-sel tersebut akibat induksi TMT (Patanow *et al.*, 1997).

Hasil uji stereologi pada hippocampus tikus yang hanya diinjeksi TMT (kelompok KS) menunjukkan bahwa estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 region terjadi penurunan yaitu sebesar 59.5%. Jumlah tersebut lebih besar dibandingkan dengan penurunan yang terjadi di daerah CA2-CA3 yaitu sebesar

49.6%. Selain itu ekspresi protein *caspase-3* dominan terjadi di bagian sitoplasma sel pyramidal di daerah CA1 sedangkan di daerah CA2-CA3 terjadi pada bagian nucleus dan sitoplasma. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan karena ada perbedaan kepekaan sel di kedua daerah tersebut terhadap senyawa neurotoksik. (Wang dan Michaelis, 2010). Telah dilaporkan bahwa daerah CA1 memiliki banyak reseptor NMDA (NMDARs) daripada daerah CA3 (Fiacco *et al.*, 2003; Korbo *et al.*, 1996). Aktivasi NMDARs akibat stres oksidatif menghasilkan peningkatan kadar Ca^{2+} yang lebih banyak di neuron CA1 daripada di neuron CA3 (Haxaire *et al.*, 2012; Wang dan Michaelis, 2010). Peningkatan kadar Ca^{2+} tersebut dapat menyebabkan eksitotoksisitas glutamat yang akan memicu terjadinya apoptosis sel (Lu *et al.*, 2014; Quincozes-Santos *et al.*, 2014) yang lebih banyak terjadi di daerah CA1 daripada di daerah CA2-CA3. Apoptosis neuron ditandai dengan adanya ekspresi *caspase-3*, yaitu suatu enzim anggota *cysteine-aspartic acid protease* (Alnemri *et al.*, 1996), yang berperan pada fase eksekusi apoptosis sel.

Tikus yang mendapat injeksi TMT menunjukkan lesi yang ekstensif pada Cornu Ammonis (CA) (Geloso *et al.*, 2011a; Lattanzi *et al.*, 2013) terutama di sel pyramidal daerah CA1 dan CA3 (Latini *et al.*, 2010). Estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 dan CA2-CA3 pada kelompok KS (yang diinjeksi TMT saja) menunjukkan penurunan yang signifikan setelah 28 hari diinjeksi TMT. Penurunan jumlah sel pyramidal pada hari ke-28 tersebut dapat disebabkan karena sifat ketoksikan tertunda (*delayed toxicity*) dari TMT. Hal ini dimungkinkan karena TMT memiliki afinitas yang tinggi pada hemoglobin

(Koczyk, 1996), sehingga hemoglobin akan berperan sebagai *reservoir* yang secara perlahan melepaskan TMT ke plasma untuk selanjutnya menuju ke otak (Harry *et al.*, 1985). Penelitian sebelumnya (Robertson *et al.*, 1987) menunjukkan bahwa penurunan jumlah sel pyramidal akibat ketoksikan TMT terjadi antara 14 dan 28 hari dan kerusakan struktural mulai teramati 2-3 hari setelah pemberian TMT, semakin jelas dalam 21 hari dan berlanjut selama beberapa minggu kemudian (Whittington *et al.*, 1989).

3. Efek ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin pada tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi TMT.

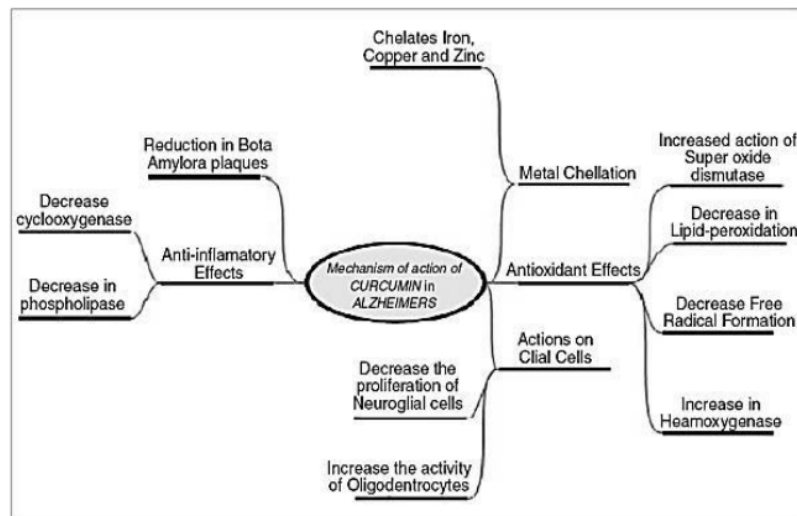
Hasil pengukuran parameter biokimiawi secara keseluruhan menunjukkan bahwa pemberian ERKTK dosis 200 mg/kg BB mendukung hipotesis bahwa pemberian ERKTK mampu mencegah stres oksidatif. ERKTK dosis 200 mg / kg BB dapat menurunkan kadar MDA darah dan otak dan serta meningkatkan antioksidan endogen berupa kadar GSH, aktivitas GPx, SOD dan katalase. Sudah banyak dilaporkan bahwa kunyit mengandung kurkumin dan turunannya (demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin) yang memiliki aktivitas antioksidan yang potensial (Kumar *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2001). Aktivitas antioksidan kurkumin beberapa kali lebih poten dibandingkan dengan vitamin E sebagai *free radical scavenger* (Zhao *et al.*, 1989). Aktivitas antioksidan kurkumin disebabkan karena adanya gugus fenolik dan metoksi, dimana konjugasi dengan 1,3-diketon mempunyai kemampuan menangkap radikal oksigen (Rajan dan Mohanan, 2013).

Kurkumin melindungi otak dari peroksidasi lipid (Martín-Aragón *et al.*, 1997), dan menangkap radikal bebas (Sreejayan dan Rao, 1997). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kurkumin memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi pada penyakit Alzheimer (Giri *et al.*, 2004), mencegah peningkatan kadar MDA (Agrawal *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2009), menetralkan oksigen reaktif (Unnikrishnan dan Rao, 1995) dan radikal bebas dari nitrit oksida (Avci *et al.*, 2012).

Dalam penelitian ini variasi dosis ERKTK menunjukkan efek terhadap pencegahan peningkatan kadar MDA plasma yang berbeda dengan efeknya terhadap kadar MDA otak. Dosis 100 mg /kg BB ERKTK mampu mencegah peningkatan kadar MDA plasma namun tidak mampu mencegah peningkatan kadar MDA otak. Hal ini kemungkinan disebabkan karena kurkumin dapat melindungi hemoglobin dari oksidasi (Unnikrishnan dan Rao, 1995) radikal bebas yang dihasilkan oleh TMT, sehingga ERKTK dosis 100 mg/kg BB memiliki efek protektif yang lebih besar di plasma.

Selanjutnya, kurkumin juga mempunyai kemampuan meningkatkan aktivitas enzim GPx dan SOD (Bala *et al.*, 2006), dan memperbaiki aliran darah serebral (Awasthi *et al.*, 2010). Kemampuan kurkumin dalam meningkatkan GSH disebabkan karena afinitasnya untuk menginduksi mRNA dari gen biosintetik GSH (Dickinson *et al.*, 2003). Penelitian pada tikus yang mengalami cedera oksidatif karena sodium arsenit menunjukkan bahwa kurkumin dapat memproteksi organ testis, otak, dan paru dengan meningkatkan aktivitas GSH S-transferase, SOD dan katalase (El-Demerdash *et al.*, 2009). Hal yang paling

penting dari kurkumin adalah kemampuannya dalam melintasi *blood-brain barrier* sehingga meningkatkan efek neuroprotektifnya pada jaringan target (Yang *et al.*, 2005).



Gambar 42. Mekanisme aksi kurkumin pada *Alzheimer's disease* (Bala *et al.*, 2006)

Hasil uji MWM menunjukkan bahwa di antara variasi dosis ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin (ERKTK) yang digunakan dalam penelitian ini, pemberian ERKTK dosis 200 mg/kg BB menunjukkan performa memori spasial pada uji MWM yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok tikus yang diberi TMT saja (KS). Waktu latensi dan panjang lintasan pada *acquisition trial* menunjukkan nilai yang lebih kecil dibandingkan kelompok yang diberi TMT saja. Demikian juga pada uji *probe trial*, tikus yang diberi ERKTK dosis 200 mg/kg BB menunjukkan nilai frekuensi dan % lama waktu di kuadran target yang lebih besar dibandingkan kelompok yang hanya diberi TMT.

Dilaporkan dalam penelitian Agrawal *et al.*, (2010) dan Jaques *et al.*, (2012) bahwa kurkumin dapat meningkatkan aktivitas kolinergik pada hewan uji demensia yang diinduksi dengan streptozotocin intracerebroventrikuler. Kerusakan pada saraf kolinergik menyebabkan penurunan neurotransmitter asetilkolin sehingga mengganggu proses sinapsis (Wenk, 2003). Asetilkolin merupakan neurotransmitter terkait dengan plastisitas sinaptik, terutama untuk belajar dan memori jangka pendek. Asetilkolin dapat meningkatkan amplitudo potensial sinaptik yang mengikuti potensiasi jangka panjang (LTP, *long term potentiation*) pada tempat seperti di girus dentata, CA1, cortex piriformis dan neocortex (Crespo *et al.*, 2006). Gangguan sinapsis pada daerah tersebut telah dilaporkan berperan pada penurunan memori yang menjadi gejala utama demensia (Fukui *et al.*, 2002).

Kurkumin juga dapat menormalkan kadar protein BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) yang berperan untuk plastisitas sinaptik (Bolton *et al.*, 2000; Hariri *et al.*, 2003) dan dibutuhkan untuk pembelajaran normal pada uji MWM (Mu *et al.*, 1999). BDNF disintesis terutama oleh neuron yang terletak di hippocampus (Drapeau *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2003; Steffenach *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2004) yang diperlukan untuk induksi LTP (Linnarsson *et al.*, 1997; Patterson *et al.*, 1996). BDNF akan memfasilitasi transmisi sinaptik dan mengatur aktivasi sinapsin 1 dan CREB (Finkbeiner, 2000; Jovanovic *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1995; Ying *et al.*, 2002) sehingga penurunan kadar BDNF dapat mengganggu proses memori. Hasil penelitian ini mendukung hipotesis bahwa pemberian

ekstrak kunyit dapat memperbaiki memori spasial hewan uji model demensia yang diinduksi TMT.

Dalam penelitian ini ERKTK dapat mencegah gangguan fungsional sel-sel yang berperan dalam memori spasial. Hasil uji stereologi menunjukkan bahwa pemberian ERKTK dosis 100, 200 maupun 300 mg/kg BB secara struktural belum mampu mencegah penurunan jumlah sel pyramidal di daerah CA1 pada tikus yang diinduksi TMT. Namun demikian kelompok yang diberi ekstrak kunyit dosis 200 mg/kg BB menunjukkan estimasi jumlah total sel pyramidal yang tidak berbeda signifikan dengan kelompok normal (KN) meskipun juga tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol TMT (KS). Perbedaan aktivitas ekstrak kunyit di daerah CA1 dengan CA2-CA3 tersebut menunjukkan adanya perbedaan efikasi ekstrak kunyit terhadap kedua daerah tersebut. Hasil tersebut juga didukung dengan hasil pengecatan imunohistokimia dimana melalui pengamatan semikuantitatif menunjukkan bahwa ERKTK dosis 200 mg/kg dapat mencegah apoptosis sel-sel pyramidal di daerah CA2-CA3 namun tidak di daerah CA1. Penelitian ini belum mendukung hipotesis sepenuhnya bahwa ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin dapat mencegah kematian sel sehingga mencegah penurunan jumlah sel pyramidal di daerah CA1 dan CA2-CA3. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa pemberian kurkumin dapat menurunkan disfungsi mitokondria (Wang *et al.*, 2005) serta dapat memberikan perlindungan pada neuron melalui peningkatan kadar Bcl-2 (Pan *et al.*, 2008) sehingga mencegah terjadinya kematian sel melalui mekanisme apoptosis. Namun demikian dikarenakan analisis hasil imunohistokimia hanya dilakukan pada satu irisan jaringan hippocampus saja

sehingga dapat menimbulkan hasil yang bias. Oleh karena itu untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan analisis kuantitatif yang tidak bias (stereologi) untuk mendukung hasil penelitian ini.

Hasil penelitian ini tampaknya menunjukkan hubungan dosis-respon efek neuroprotektif ekstrak kunyit yang non linier. Secara keseluruhan, performa memori spasial, hasil analisis biokimiawi dan histologik menunjukkan bahwa pada kelompok yang diberi ekstrak kunyit dosis 200 mg/kgBB (E200) lebih baik dibandingkan dengan kelompok yang diberi ekstrak kunyit dosis yang lebih besar (300 mg/kg BB). Ekspresi *caspase-3* di daerah CA1 dan CA2-CA3 pada tikus yang diberi ekstrak dosis 300 mg/ kg BB secara semikualitatif juga lebih intensif dibandingkan dengan tikus yang diberi ekstrak dosis 200 mg/ kg BB.

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa kurkumin juga mempunyai aktivitas pro-oksidan. Hal ini kemungkinan yang menyebabkan adanya efek yang berlawanan dari kurkumin sebagai antioksidan. Kurkumin mempunyai kecenderungan untuk menstimulasi pembentukan pro-oksidan (ROS dan GSSG) yang tergantung dengan konsentrasinya (Alrawaiq dan Abdullah, 2014). Aktivitas pro-oksidan tersebut dimediasi melalui turunan fenoksil radikal dari kurkumin oleh sistem peroxidase-H₂O₂, yang mengoksidasi glutation seluler atau NADH, membentuk ROS (Galati *et al.*, 2002). Peningkatan ROS intraseluler berkaitan dengan apoptosis yang dimediasi oleh kurkumin (Yoshino *et al.*, 2004). Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa kurkumin tidak mampu mencegah pemecahan DNA *single-strand* oleh H₂O₂, dan menyebabkan kerusakan DNA (Kelly *et al.*, 2001). Kurkumin dapat menyebabkan penurunan membran potensial

mitokondra dan menstimulasi pelepasan sitokrom *c* untuk mengaktifkan *caspase-9* and *caspase-3*, yang pada akhirnya dapat menginisiasi kematian sel apoptotik (Jana *et al.*, 2004). Meskipun demikian masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis yang tepat dari ekstrak kunyit yang dapat menyebabkan efek pro-oksidatif.

4. Efek ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin dibandingkan dengan sitikolin pada tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi TMT

³ Tikus yang diberi ERKTK dosis 200 mg/kg BB menunjukkan hasil uji MWM dan uji biokimia yang hampir sama dengan tikus yang diberi sitikolin. Selain itu ERKTK dosis 200 mg/kg BB menunjukkan aktivitas yang sama dengan sitikolin dalam mencegah penurunan jumlah sel pyramidal di daerah CA2-CA3, meskipun keduanya belum mampu mencegah penurunan jumlah sel pyramidal di daerah CA1. Dalam penelitian ini pemberian sitikolin dapat menurunkan secara signifikan waktu latensi dan panjang lintasan pada *acquisition trial* serta meningkatkan frekuensi dan % lama waktu di kuadran target pada *probe trial* uji MWM. Sitikolin juga mampu menurunkan kadar MDA plasma dan otak, serta meningkatkan kadar GSH, aktivitas GPx, SOD dan katalase otak pada tikus *Sprague Dawley* yang dipapar TMT. Selain itu sitikolin dapat mencegah penurunan jumlah sel pyramidal di daerah CA2-CA3 hippocampus serta mencegah terjadinya apoptosis di daerah tersebut.

Sitikolin atau *citidine-5-diphosphocholine* atau *CDP-choline* telah digunakan sebagai obat neuroprotektif dan obat untuk meningkatkan memori (Alvarez-Sabin dan Román, 2011; Dávalos *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2000). Obat ini

telah digunakan untuk meningkatkan memori pada stroke serebral (Alvarez-Sabin dan Román, 2011; Dávalos *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2000), demensia Alzheimer (Cacabelos *et al.*, 1996), dan penyakit neurovaskuler lainnya (Parisi *et al.*, 2008). *Citicoline* efektif meningkatkan aliran darah otak pada pasien demensia vaskuler (Tanaka *et al.*, 1994) dan efektif dalam meningkatkan fungsi kognitif dan aliran darah pada pasien *Alzheimer's disease* (Caamaño *et al.*, 1994). Sitikolin juga dapat meningkatkan kadar asetilkolin yang berperan dalam meningkatkan fungsi kognitif pada pasien demensia (Colucci *et al.*, 2012). Penelitian pada hewan uji telah membuktikan bahwa sitikolin dapat memperbaiki memori spasial pada hewan uji yang mengalami *traumatic brain injury* (Jacotte-Simancas *et al.*, 2015), demensia cerebrovaskuler (Takasaki *et al.*, 2011) serta memperbaiki gangguan memori pada hewan uji yang diinduksi oleh skopolamin (Takasaki *et al.*, 2011) dan yang mengalami oklusi arteri cerebral (Pramila *et al.*, 2015).

Sitikolin dapat merangsang biosintesis glutation dan mengaktivasi glutation reduktase serta mencegah peroksidasi lipid (Adibhatla dan Hatcher, 2002). Penelitian praklinik telah membuktikan bahwa sitikolin mampu meningkatkan jumlah sel hidup di daerah CA1 hippocampus pada *forebrain* hewan gerbil yang dibuat iskemia (Grieb dan Rejda, 2002), menurunkan jumlah sel yang positif terhadap pengecatan imunohistokimia *caspase-3* dan mencegah fragmentasi DNA di zona penumbra tikus yang mengalami oklusi arteri serebral (Krupinski *et al.*, 2002). Kemampuan sitikolin dalam mencegah dekomposisi dan resintesis membran fosfolipid, kemungkinan yang menyebabkan sitikolin dapat memproteksi neuron di CA terutama di daerah CA2-CA3 (Grieb *et al.*, 2000).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin (ERKTK) dosis 200 mg/kg BB dapat mencegah penurunan memori spasial. ERKTK 200 mg/kg BB dapat menurunkan waktu latensi dan panjang lintasan pada *acquisition trial*, meningkatkan frekuensi dan persentase lama tikus berada pada kuadran target pada *probe trial* pada uji MWM, dan perbedaan memori spasial pada kelompok-kelompok perlakuan bukan disebabkan karena adanya gangguan sensorik, motorik, dan motivasional pada uji sensorimotor.
2. ERKTK dosis 200 mg/kg BB mempunyai aktivitas dan mekanisme antioksidan yaitu dengan mencegah kenaikan kadar malondialdehid (MDA) plasma dan MDA otak, meningkatkan aktivitas glutathion peroksidase (GPx) otak, meningkatkan aktivitas superoksid dismutase (SOD) otak, meningkatkan aktivitas katalase (CAT) otak, dan meningkatkan kadar glutathion (GSH) otak.
3. Pemberian ERKTK dosis 200 mg/kg BB mampu mencegah penurunan estimasi volume lapisan piramidal dan jumlah total sel piramidal daerah CA2-CA3, namun belum mampu mencegah penurunan estimasi volume lapisan piramidal dan jumlah total sel piramidal di daerah CA1 hippocampus. Hasil ini juga didukung oleh pengamatan imunohistokimia dimana pemberian ekstrak kunyit dosis 200 mg/kg BB secara semikuantitatif

dapat mencegah ekspresi protein *caspase-3* di daerah CA2-CA3 namun tidak di daerah CA1 hippocampus.

4. Pemberian ERKTK dosis 200 mg/kg BB mempunyai efek yang mirip dengan sitikolin dosis 200 mg/kg BB.

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis ERKTK yang dapat mencegah penurunan estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 hippocampus pada tikus model demensia yang diinduksi TMT
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis ERKTK yang mempunyai aktivitas pro-oksidan.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut efek ERKTK terhadap jumlah ekspresi protein *caspase-3* dengan prosedur stereologi pada tikus model demensia yang diinduksi TMT
4. Perlu penelitian lebih lanjut efek ERKTK terhadap *pathway* kolinergik yang memediasi fungsi memori.

RINGKASAN

Demensia adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan kumpulan gejala gangguan fungsi memori seperti mudah lupa, disorientasi, sulit berkomunikasi, menurunnya kemampuan menganalisa dan mengambil keputusan. (Weiner *et al.*, 2012). Demensia menjadi permasalahan di seluruh dunia, dimana prevalensinya meningkat setiap tahunnya. Kematian neuron otak akibat stres oksidatif menjadi patogenesis yang penting pada demensia. Rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn) mengandung kurkumin yang memiliki efek antioksidatif dan neuroprotektif. Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengembangkan ekstrak rimpang kunyit sebagai sediaan pencegah demensia. Tujuan khususnya adalah untuk mengkaji mekanisme *in vivo* ekstrak rimpang kunyit (*C. longa* L.) terstandar kurkumin pada tikus *Sprague Dawley* model demensia yang diinduksi trimetiltin (TMT) dengan: (1) mengamati memori spasial melalui uji Morris *water maze*, (2) mengukur penanda stres oksidatif melalui pengamatan biokimiawi kadar MDA plasma dan otak, kadar glutathion (GSH), aktivitas glutathion peroksidase (GPx), superoksid dismutase (SOD), dan katalase (CAT) otak, (3) pengamatan histologik dengan menghitung estimasi jumlah total sel pyramidal hippocampus di daerah CA1 dan CA2-CA3 dengan metode stereologi serta pengamatan semikuantitatif imunohistokimia ekspresi protein *caspase-3* di daerah tersebut.

Penelitian ini menggunakan tikus *Sprague Dawley*, umur berkisar 2 bulan, berat 180-200 g, dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor. Kelompok normal (KN) diberi larutan CMC-Na

per oral (p.o) dan injeksi salin intraperitoneal (i.p); Kelompok Kontrol Sakit (KS) diberi larutan CMC-Na p.o dan injeksi larutan TMT dalam salin 0,9% i.p; Kelompok Kontrol Positif (KP) diberi sitikolin dosis 200 mg/kg p.o dan injeksi TMT; dan kelompok ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin (ERKTK) yang diberi variasi dosis yaitu 100 mg/kg BB (E100), 200 mg/kg BB (E200), 300 mg/kg BB (E300) dan juga injeksi TMT. ERKTK dan sitikolin diberi mulai hari 1 sampai hari 28, sedangkan injeksi TMT diberikan dosis tunggal pada hari ke 8 perlakuan. Uji Morris *water maze* dilakukan mulai hari ke 29 sampai hari 35. Setelah itu hewan uji diambil darahnya melalui sinus orbitalis, kemudian dikorbankan untuk diambil otaknya. Hemispherium cerebri kiri untuk pengamatan biokimiawi dan hemispherium cerebri kanan diambil hippocampusnya untuk pengamatan histologik. Hasil uji memori spasial dianalisis statistik dengan uji *one way repeated measures ANOVA* . Data hasil uji biokimiawi dan histologik dianalisis statistik dengan uji *one way ANOVA* atau Kruskal Wallis. Untuk mengetahui perbedaan di antara 2 kelompok dilanjutkan dengan uji Tukey HSD atau Mann Whitney ¹ dengan tingkat signifikansi 0,05.

Berdasarkan hasil uji Morris *water maze* menunjukkan bahwa tikus yang diinjeksi dengan TMT dosis tunggal 8 mg/kg BB mengalami penurunan memori spasial. Selain itu berdasarkan hasil pengukuran parameter biokimiawi menunjukkan bahwa tikus yang diinjeksi TMT saja menunjukkan peningkatan kadar MDA darah, MDA otak dan terjadi penurunan kadar GSH, aktivitas GPx, SOD, dan katalase. Estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 dan CA2-CA3 pada kelompok tikus yang diinjeksi TMT juga menunjukkan penurunan yang

signifikan 28 hari setelah diinjeksi TMT. Hasil ini juga didukung dengan peningkatan ekspresi *caspase-3* di sitoplasma sel pyramidal CA1 dan sitoplasma serta nukleus di sel pyramidal CA2-CA3.

Mekanisme TMT dalam menimbulkan efek toksik belum diketahui seluruhnya dengan pasti. Namun secara umum ketoksikan senyawa organotin berkaitan dengan jumlah dan panjang gugus alkil yang terikat pada tin dan memiliki spesifisitas yang tinggi pada aksinya di neuron (Dopp *et al.*, 2007; Florea *et al.*, 2004). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa kerusakan neurotoksik akibat induksi TMT dimediasi oleh turunan dari ⁶ *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (NOS). TMT meningkatkan pembentukan ROS secara *in vitro* dan *in vivo* (Viviani *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008). Kerusakan pada sel yang sensitif terhadap TMT berkaitan dengan stres oksidatif, *calcium overload* dan kerusakan mitokondria. Kerusakan mitokondria kemungkinan dimediasi oleh protein stannin (SNN), yaitu sebuah protein dengan 88 asam amino yang dikode oleh cDNA dari sel yang sensitif terhadap TMT yang dapat ditemukan pada bagian otak (Buck *et al.*, 2004). SNN akan mengikat secara langsung dengan dimetil tin (hasil demetilasi dari TMT), sehingga menyebabkan pelepasan *cytochrome c* dan aktivasi berbagai *caspase*. Aktivasi famili *caspase* dari protease sistein dapat memediasi apoptosis yang diinduksi TMT secara *in vivo*. *Calcium overload* terjadi tergantung pada penyimpanan intraseluler yang ada pada mitokondria dan retikulum endoplasmik, kemudian menyebabkan aktivasi *calpain* dan *cathepsin D* yang akan memicu terjadinya apoptosis. Lesi selektif

pada hippocampus telah dilaporkan dapat merusak performa memori pengenalan pada manusia, kera dan rodent.

Pemberian ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin (ERKTK) dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB menunjukkan bahwa ERKTK dosis 200 mg/kg BB menunjukkan performa memori spasial, parameter biokimiawi dan histologik yang paling baik di antara dosis ERKTK yang diberikan. Sudah banyak dilaporkan bahwa kunyit mengandung kurkumin dan turunannya (demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin) yang memiliki aktivitas antioksidan yang potensial. Aktivitas antioksidan kurkumin beberapa kali lebih poten dibandingkan dengan vitamin E sebagai *free radical scavenger* (Zhao *et al.*, 1989) Aktivitas antioksidan kurkumin disebabkan karena adanya gugus fenolik dan metoksi, dimana konjugasi dengan 1,3-diketon mempunyai kemampuan menangkap radikal oksigen dan radikal bebas nitrit oksida, melindungi otak dari peroksidasi lipid, mencegah peningkatan kadar MDA, meningkatkan aktivitas enzim GPx dan SOD, serta meningkatkan GSH. Hal yang paling penting dari kurkumin adalah kemampuannya dalam melintasi *blood-brain barrier* sehingga meningkatkan efek neuroprotektifnya pada jaringan target.

Hasil penelitian sebelumnya melaporkan bahwa kurkumin dapat meningkatkan aktivitas kolinergik pada hewan uji demensia yang diinduksi dengan streptozotocin secara intracerebroventrikuler (Agrawal *et al.*, 2010; Jaques *et al.*, 2012). Peningkatan aktivitas kolinergik ditunjukkan dengan peningkatan asetilkolin yang merupakan neurotransmitter terkait dengan plastisitas sinaptik, terutama untuk belajar dan memori jangka pendek. Asetilkolin dapat

meningkatkan amplitudo potensial sinaptik yang mengikuti potensiasi jangka panjang (LTP, *long term potentiation*) pada tempat seperti di girus dentata, CA1, cortex piriformis dan neocortex. Gangguan sinapsis pada daerah tersebut telah dilaporkan berperan pada penurunan memori yang menjadi gejala utama demensia. Selain itu, kurkumin juga dapat menormalkan kadar protein BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) yang berperan untuk plastisitas sinaptik dan dibutuhkan untuk pembelajaran normal pada uji MWM. BDNF disintesis terutama oleh neuron yang terletak di hippocampus yang diperlukan untuk memfasilitasi transmisi sinaptik dan mengatur aktivasi sinapsin 1 dan CREB (Finkbeiner, 2000; Ying *et al.*, 2002). Dengan demikian penurunan kadar BDNF dapat mengganggu proses memori.

Hasil penelitian ini tampaknya menunjukkan hubungan dosis-respon efek neuroprotektif ekstrak kunyit yang non linier. Peningkatan dosis ERKTK tidak menunjukkan hasil yang lebih baik. Hal ini kemungkinan yang menyebabkan adalah adanya efek yang berlawanan dari kurkumin sebagai antioksidan. Dilaporkan bahwa kurkumin mempunyai kecenderungan untuk menstimulasi pembentukan pro-oksidan (ROS dan GSSG) yang tergantung dengan konsentrasinya (Alrawaiq dan Abdullah, 2014). Aktivitas pro-oksidan ini kemungkinan yang menyebabkan efek ERKTK dosis 300 mg /kg BB menunjukkan efek yang tidak lebih baik dibandingkan dengan ERKTK dosis 200 mg/ kg BB, Namun demikian ekstrak kunyit yang menyebabkan efek pro oksidatif sejauh ini belum diketahui.

³ Tikus yang diberi ERKTK dosis 200 mg/kg BB menunjukkan hasil uji MWM dan uji biokimia yang hampir sama dengan tikus yang diberi sitikolin. Selain itu ERKTK dosis 200 mg/kg BB menunjukkan aktivitas yang sama dengan sitikolin dalam mencegah penurunan jumlah sel pyramidal di daerah CA2-CA3, meskipun keduanya belum mampu mencegah penurunan jumlah sel pyramidal di daerah CA1. Sitikolin atau *citidine-5-diphosphocholine* atau *CDP-choline* telah digunakan sebagai neuroprotektif dan obat untuk meningkatkan memori (Alvarez-Sabin dan Roman, 2011; Davaloz *et al.*, 2002). Sitikolin dapat merangsang biosintesis glutation dan mengaktivasi glutation reduktase serta mencegah peroksidasi lipid. Kemampuan sitikolin dalam mencegah dekomposisi dan resintesis membran fosfolipid, kemungkinan juga yang menyebabkan sitikolin dapat memproteksi neuron di CA terutama di daerah CA2-CA3 (Grieb *et al.*, 2000).

⁶ Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak rimpang kunyit terstandar kurkumin (ERKTK) dosis 200 ⁶ mg/kg BB dapat meningkatkan memori spasial tikus *Sprague Dawley* model demensia yang terpapar TMT. ³ Berdasarkan pengamatan biokimiawi ERKTK 200 mg/kg BB dapat mencegah peningkatan kadar MDA plasma dan otak, meningkatkan aktivitas GPx, SOD, CAT serta kadar GSH otak, dan mencegah penurunan estimasi jumlah total sel pyramidal serta peningkatan ekspresi *caspase-3* di daerah CA2-CA3 hippocampus. Tikus yang diberi ERKTK dosis 200 mg/kg BB menunjukkan hasil uji MWM, uji biokimiawi, dan imunohistokimia *caspase-3* yang hampir sama dengan tikus yang diberi sitikolin. Penelitian lebih lanjut disarankan untuk

mengetahui dosis ERKTK yang dapat mencegah penurunan estimasi total jumlah sel pyramidal di daerah CA1 serta dosis ekstrak ERKTK yang mempunyai aktivitas pro-oksidan. Selain itu juga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut efek ERKTK terhadap jumlah ekspresi protein *caspase-3* dengan prosedur stereologi pada tikus model demensia yang diinduksi TMT.

SUMMARY

² Dementia refers to a collective symptom encompassing disturbances on memory, thinking, and social abilities, which are sufficiently severe to hinder normal daily life (Weiner *et al.*, 2012). Dementia is become a worldwide problem which its prevalence increase every year. Oxidative stress-induced death cell is important patogenesis of dementia. ² Turmeric (*Curcuma longa* L.) contains curcuminoids which has anti-oxidative and neuro-protective effects. The general objective of this research is to develop the turmeric extract as a preventive preparation for dementia. The specific objective of this research is to study the *in vivo* mechanism of standardized turmeric rhizome extract on *Sprague Dawley* rat model of dementia induced by TMT, by : (1) observing spatial memory with the Morris water maze test; (2) measuring oxidative stress markers i.e, malondialdehyde (MDA) levels of plasma and brain, levels of glutathion (GSH), activities of glutathion peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) of brain; (3) calculating the estimation of the ² total number of pyramidal cells in the hippocampal area CA1 and CA2- CA3 by stereology method and semiquantitavely calculating the protein expression of caspase-3 in the such areas.

² Sixty adult male *Sprague-Dawley* rats (195-215 g) were randomly divided into six groups of 10. The groups are ² N group (normal group), which received oral CMC-Na solution and intra-peritoneal injection of 0.9% saline; T group (control group), which was given oral CMC-Na solution and intra-

peritoneal injection of TMT chloride dissolved in 0.9% saline; positive control group (T-Cit), which was treated with oral 200 mg/kg bw of citicoline solution and TMT chloride injection; and T-E100, T-E200, T-E300 groups, which were treated with oral 100 mg/kg BW, 200 mg/kg BW, and 300 mg/kg BW, respectively, of turmeric rhizome extract, besides intra-peritoneal injection of TMT chloride. The turmeric rhizome extract and citicoline solutions were given at day 1 up to day 28 of experiment, whereas the TMT chloride injection given as a single dose of 8 mg/kg bw was administered at day 8 of experiment. Morris water maze test were carried out one day after the day of the last treatment of the rats (i.e. day 29) and the test lasted for 7 days. At day 36 the blood were taken, after that all rats were sacrificed and the cerebrums were then dissected out from the skull. The left cerebral hemispheres were used for biochemical observation whereas the right one were used for histological preparation. The spatial memory test were analyzed statistically with one way repeated measure ANOVA. Data of biochemical and histological test were statistically analyzed by one way ANOVA or Kruskal Wallis test followed by Tukey HSD or Mann Whitney test with 5% significance level.

In the present study, we found that rats treated with TMT only (T group) suffered from severe deficits in the spatial memory performance during the MWM test. The rats injected with a single dose of TMT showed the increase of plasma and brain levels of MDA and the decrease of antioxidants of SOD, catalase, GSH as well as GPx. The estimated total number of pyramidal neurons in the CA1 and CA2-CA3 regions decreased on the rat injected by TMT. These results were

supported by the increasing of caspase-3 expression in both CA1 and CA2-CA3 regions.

The precise mechanism of TMT effects are not entirely clear however. In general the toxicity of organotin compounds related to the amount and length of alkyl groups attached to the tin and has a high specificity in neurons (Dopp *et al.*, 2007; Florea *et al.*, 2004). Previous *in vitro* and *in vivo* studies reported that TMT-mediated neuron damage was induced by derivatives of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (Viviani *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008). TMT is demethylated to dimethyltin which binds directly by protein called stannin (SNN), an 88 amino acid protein encoded by cDNA of TMT-sensitive cells. SNN may be localised in the outer mitochondrial membrane and endoplasmic reticulum membrane and interacts with regulatory proteins involved in the promotion of apoptosis and activates caspase-3 as an effector caspase for neuronal damage in the hippocampus. Selective lesions in the hippocampus have been reported to damage the recognition memory performance in humans, monkey and rodent .

The administration of 100 mg / kg BW, 200 mg / kg BW and 300 mg / kg BW of turmeric rhizome extract showed that the dose of 200 mg / kg BW showed spatial memory performance, biochemical and histological parameters of the T-E200 group was the best amongst the three turmeric-extract treated groups. It has been widely reported that turmeric contains curcumin and its derivatives (demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin) which have potent antioxidant activity. The antioxidant activity of curcumin several times more potent than

vitamin E as a free radical scavenger. The phenolic and the methoxy groups on the phenyl ring appear to be important structural features for these actions, where conjugation with 1,3 - diketone has the ability captured oxygen radicals and free radical nitric oxide, protects the brain from lipid peroxidation, prevent increased levels of MDA, increase the activity of enzymes GPx and SOD, and also increase GSH level. The most important property of curcumin is its ability to cross the blood-brain barrier thus increasing its neuroprotective effects on target tissues (Yang *et al.*, 2005).

Previous result reported that curcumin can enhance cholinergic activity in rat intracerebroventricular streptozotocin-induced dementia (Agrawal *et al.*, 2010; Jaques *et al.*, 2012). An increase in cholinergic activity is indicated by the increase in acetylcholine, a neurotransmitter associated with synaptic plasticity and learning and memory. Acetylcholine can increase the amplitude of the synaptic potential that follows the long-term potentiation (LTP, long term potentiation) in the dentate gyrus, CA1, piriformis cortex and neocortex. Disruption synapses in the area have been reported to play a role in memory loss being the main symptoms of dementia. In addition, curcumin can also normalize levels of BDNF (brain-derived neurotrophic factor) that contribute to synaptic plasticity and is required for normal learning in MWM test. BDNF is synthesized mainly by neurons located in the hippocampus, which is needed to facilitate and regulate synaptic transmission synapsin 1 and CREB activation (Finkbeiner, 2000; Ying *et al.*, 2002). Thus decreased levels of BDNF may disrupt the memory process.

The present ² study revealed that no linear dose – response relationship occurred in the neuroprotective effects of turmeric extract. Overall, the spatial learning and memory performance as well as histological results of T-E200 group was the best amongst the three turmeric-extract treated groups. This may be understood in light of possibly paradoxical effects of curcumin. Contradictory to the above-mentioned anti-oxidant effects, curcumin has been shown to exert pro-oxidant activities. Curcumin tends to stimulate the formation of pro-oxidants (ROS and GSSG) in a concentration-dependent manner (Alrawaig and Abdullah, 2014). Such pro-oxidant activities appear to be mediated through the generation of phenoxyl radical of curcumin by peroxidase–H₂O₂ system, which co-oxidizes cellular glutathione or NADH, to form ROS. Curcumin-mediated apoptosis is closely associated with the increase of the intracellular level of ROS. The precise dose of curcumin that can cause pro-oxidative effects, however, remains unclear so far.

² The rats treated with 200 mg/kg BW of turmeric extract performed similarly to the rats treated with citicoline in the MWM task. The drug was able to reduce the levels of plasma and brain MDA, as well as increasing the levels of GSH, GPx, SOD and catalase activities of brain in rats exposed by TMT. ² In addition, this particular dosage of turmeric extract was found to inhibit the decrease of the number of CA2-CA3 region pyramidal cells at the same degree as citicoline. Nevertheless, both turmeric extract and citicoline were not able to prevent the decrease of the number and apoptosis of CA1 region pyramidal cells. Citicoline (citidine-5-diphosphocholine or CDP-choline) has been regularly used

as a neuroprotective and memory enhancing drug (Alvarez-Sabin and Roman, 2011; Davaloz *et al.*, 2002). It can stimulate the biosynthesis of glutathione and activates the glutathione reductase and preventing lipid peroxidation. It seems that the ability of citicoline to block decomposition and to resynthesise of membrane phospholipids enables it to selectively and partially protects CA regions pyramidal neurons, especially in CA2-CA3 regions (Grieb *et al.*, 2000).

In summary, 200 mg/ kg BW of turmeric extract administration on rats may prevent the TMT-induced deficits of spatial memory, oxidative stress and partially hinder the deficits of pyramidal cells in the CA2-CA3 region. To some extent these effects seem to be comparable to those of citicoline. Further studies are therefore warranted to explore this extract potentials to be developed as an alternative medicine for dementia.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2006. Management of patients with dementia A national clinical guideline Clinical Practice Guidelines [WWW Document]. Guidel. Cent. URL <https://www.guidelinecentral.com/summaries/management-of-patients-with-dementia-a-national-clinical-guideline/> (accessed 8.18.15)
- Abbott, L.F., Blum, K.I., 1996. Functional significance of long-term potentiation for sequence learning and prediction. *Cereb. Cortex*. 6, 406–416.
- Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., 2005. Cytidine 5'-Diphosphocholine (CDP-Choline) in Stroke and Other CNS Disorders. *Neurochem. Res.* 30, 15–23.
- Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., 2002. Citicoline mechanisms and clinical efficacy in cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* 70, 133–139.
- Agrawal, R., Mishra, B., Tyagi, E., Nath, C., Shukla, R., 2010. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacol. Res.* 61, 247–252.
- Ahlemeyer, B., Beier, H., Semkova, I., Schaper, C., Kriegelstein, J., 2000. S-100 β protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT1A-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 858, 121–128.
- Ahmad, R., Ali, A.M., Israf, D.A., Ismail, N.H., Shaari, K., Lajis, N.H., 2005. Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some Hedyotis species. *Life Sci.* 76, 1953–1964.
- Aldridge, W.N., Brown, A.W., Brierley, J.B., Verschoyle, R.D., Street, B.W., 1981. Brain damage due to trimethyltin compounds. *Lancet* 2, 692–693.
- Alessandri, B., FitzGerald, R.E., Schaeppi, U., Krinke, G.J., Classen, W., 1994. The use of an unbaited tunnel maze in neurotoxicology: I. Trimethyltin-induced brain lesions. *Neurotoxicology* 15, 349–357.
- 5 Ali, E.H.A., Arafa, N.M.S., 2011. Comparative protective action of curcumin, memantine and diclofenac against scopolamine-induced memory dysfunction. *Fitoterapia* 82, 601–608.
- Ali, S.F., LeBel, C.P., Bondy, S.C., 1992. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13, 637–648.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J., 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Alrawaiq, N.S., Abdullah, A., 2014. A Review of Antioxidant Polyphenol Curcumin and its Role in Detoxification. *Int. J. Pharm Tech Res.* 6, 280–289.
- 2 Alvarez-Sabin, J., Román, G.C., 2011. Citicoline in vascular cognitive impairment and vascular dementia after stroke. *Stroke* 42, S40–S43.
- Alvarez, X.A., Mouzo, R., Pichel, V., Pérez, P., Laredo, M., Fernández-Novoa, L., Corzo, L., Zas, R., Alcaraz, M., Secades, J.J., Lozano, R., Cacabelos, R., 1999. Double-blind placebo-controlled study with citicoline in APOE genotyped Alzheimer's disease patients. Effects on cognitive performance,

- brain bioelectrical activity and cerebral perfusion. *Exp. Clin. Pharmacol.* 21, 633–644.
- Alvin V. and Terry Jr., 2009. Spatial Navigation (Water Maze) Tasks, in: Buccafusco, J.J. (Ed.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, Frontiers in Neuroscience*. CRC Press, Boca Raton (FL).
- Alzheimer's Association, 2011. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 7, 208–244.
- Andersen, P., 2007. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, USA.
- Anderson, J.R., 2013. *Language, Memory, and Thought*. Psychology Press.
- Ansari, M.A., Roberts, K.N., Scheff, S.W., 2008. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 443–452.
- Araújo, C.C., Leon, L.L., 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 723–728.
- Arendt, T., 2009. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta neuropathol. (Berl.)* 118, 167–179.
- Asami, S., Manabe, H., Miyake, J., Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamaguchi, R., Itoh, H., Kasai, H., 1997. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* 18, 1763–1766.
- Ashok, B.T., Ali, R., 1999. The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp. Gerontol.* 34, 293–303.
- Avci, G., Kaçmaz, H., Sehirli, A.O., Bozkurt, S., Guclu, O., Arslan, E., Muratli, S.K., 2012. Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. *J. Surg. Res.* 172, e39–46.
- Awasthi, H., Tota, S., Hanif, K., Nath, C., Shukla, R., 2010. Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. *Life Sci.* 86, 87–94.
- Bagchi, D., Kuszynski, C., Balmoori, J., Bagchi, M., Stohs, S.J., 1998. Hydrogen peroxide-induced modulation of intracellular oxidized states in cultured macrophage J774A.1 and neuroactive PC-12 cells, and protection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Phytother. Res.* 12, 568–571.
- Bahorun, T., Soobrattee, M., Luximon-Ramma, V., Aruoma, O., 2006. Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease. *Internet J. Med. Updates* 1, 25–41.
- Balaban, C.D., O'Callaghan, J.P., Billingsley, M.L., 1988. Trimethyltin-induced neuronal damage in the rat brain: comparative studies using silver degeneration stains, immunocytochemistry and immunoassay for neuronotypic and gliotypic proteins. *Neuroscience* 26, 337–361.
- Bala, K., Gautam, N., Paul, B., 2006. *Pythium rhizo-oryzae* sp. nov. isolated from paddy fields: taxonomy, ITS region of rDNA, and comparison with related species. *Curr. Microbiol.* 52, 102–107.
- Bala, K., Tripathy, B.C., Sharma, D., 2006. Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology* 7, 81–89.
- Baldeiras, I., Santana, I., Proença, M.T., Garrucho, M.H., Pascoal, R., Rodrigues, A., Duro, D., Oliveira, C.R., 2008. Peripheral oxidative damage in mild

- cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 15, 117–128.
- Bär, A., Van Ommen, B., Timonen, M., 1995. Metabolic disposition in rats of regular and enzymatically depolymerized sodium carboxymethylcellulose. *Food Chem. Toxicol.* 33, 901–907.
- Barnes, L.L., Schneider, J.A., Boyle, P.A., Bienias, J.L., Bennett, D.A., 2006. Memory complaints are related to Alzheimer disease pathology in older persons. *Neurology* 67, 1581–1585.
- Barrett, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., Brooks, H.L., 2009. *Ganong's Review of Medical Physiology*, 23 ed. McGraw-Hill Medical.
- Bastianetto, S., Ramassamy, C., Doré, S., Christen, Y., Poirier, J., Quirion, R., 2000. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1882–1890.
- Batish, D.R., Singh, H.P., Setia, N., Kaur, S., Kohli, R.K., 2006. 2-Benzoxazolinone (BOA) induced oxidative stress, lipid peroxidation and changes in some antioxidant enzyme activities in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Plant Physiol. Biochem.* 44, 819–827.
- Bayer, S.A., 1985. Neuron production in the hippocampus and olfactory bulb of the adult rat brain: addition or replacement? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 457, 163–172.
- Beason-Held, L.L., Rosene, D.L., Killiany, R.J., Moss, M.B., 1999. Hippocampal formation lesions produce memory impairment in the rhesus monkey. *Hippocampus* 9, 562–574.
- 5 Begum, A.N., Jones, M.R., Lim, G.P., Morihara, T., Kim, P., Heath, D.D., Rock, C.L., Pruitt, M.A., Yang, F., Hudspeth, B., Hu, S., Faull, K.F., Teter, B., Cole, G.M., Frautschy, S.A., 2008. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 196–208.
- Bengmark, S., 2006. Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFkappaB, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 30, 45–51.
- Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., Caselli, U., Paoloni, R., Meier-Ruge, W., 1995. Vitamin E deficiency as a model of precocious brain aging: assessment by X-ray microanalysis and morphometry. *Scanning Microsc.* 9, 289–302.
- Bild, W., Ciobica, A., Padurariu, M., Bild, V., 2012. The interdependence of the reactive species of oxygen, nitrogen, and carbon. *J. Physiol. Biochem.* 69, 147–154.
- Billingsley, M. I., Yun, J., Reese, B. e., Davidson, C. e., Buck-Koehntop, B. a., Veglia, G., 2006. Functional and structural properties of stannin: Roles in cellular growth, selective toxicity, and mitochondrial responses to injury. *J. Cell. Biochem.* 98, 243–250.

- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19.
- Bishnoi, M., Chopra, K., Kulkarni, S.K., 2008. Protective effect of Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88, 511–522.
- Bizon, J.L., LaSarge, C.L., Montgomery, K.S., McDermott, A.N., Setlow, B., Griffith, W.H., 2009. Spatial reference and working memory across the lifespan of male Fischer 344 rats. *Neurobiol. Aging* 30, 646–655.
- Block, G., Dietrich, M., Norkus, E.P., Morrow, J.D., Hudes, M., Caan, B., Packer, L., 2002. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am. J. Epidemiol.* 156, 274–285.
- 4 Bolton, M.M., Lo, D.C., Sherwood, N.T., 2000. Long-term regulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures by brain-derived neurotrophic factor. *Prog. Brain Res.* 128, 203–218.
- Borson, S., Frank, L., Bayley, P.J., Boustani, M., Dean, M., Lin, P.-J., McCarten, J.R., Morris, J.C., Salmon, D.P., Schmitt, F.A., Stefanacci, R.G., Mendiondo, M.S., Peschin, S., Hall, E.J., Fillit, H., Ashford, J.W., 2013. Improving dementia care: The role of screening and detection of cognitive impairment. *Alzheimers Dement.* 9, 151–159.
- Boyer, I.J., 1989. Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology.* 55, 253–298.
- Braak, H., Braak, E., 1995. Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol. Aging.* 16, 271–278.
- Braga, M.E.M., Leal, P.F., Carvalho, J.E., Meireles, M.A.A., 2003. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6604–6611.
- Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S., 1989. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.* 48, 29–69.
- 2 Broadbent, N.J., Squire, L.R., Clark, R.E., 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14515–14520.
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., Arrighi, H.M., 2007. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 3, 186–191.
- Brown, A.W., Aldridge, W.N., Street, B.W., Verschoyle, R.D., 1979. The behavioral and neuropathologic sequelae of intoxication by trimethyltin compounds in the rat. *Am. J. Pathol.* 97, 59–82.
- Buck, B.A., Mascioni, A., Cramer, C.J., Veglia, G., 2004. Interactions of alkyltin salts with biological dithiols: dealkylation and induction of a regular beta-turn structure in peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 14400–14410.

- Buck-Koehntop, B.A., Mascioni, A., Buffy, J.J., Veglia, G., 2005. Structure, Dynamics, and Membrane Topology of Stannin: A Mediator of Neuronal Cell Apoptosis Induced by Trimethyltin Chloride. *J. Mol. Biol.* 354, 652–665.
- Budson, A.E., Price, B.H., 2005. Memory dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 352, 692–699.
- Bushnell, P.J., Angell, K.E., 1992. Effects of trimethyltin on repeated acquisition (learning) in the radial-arm maze. *Neurotoxicology* 13, 429–441.
- Butterfield, D.A., Castegna, A., Lauderback, C.M., Drake, J., 2002. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol. Aging* 23, 655–664.
- Caamaño, J., Gómez, M.J., Franco, A., Cacabelos, R., 1994. Effects of CDP-choline on cognition and cerebral hemodynamics in patients with Alzheimer's disease. *Exp. Clin. Pharmacol.* 16, 211–218.
- Cacabelos, R., Caamaño, J., Gómez, M.J., Fernández-Novoa, L., Franco-Maside, A., Alvarez, X.A., 1996. Therapeutic Effects of CDP-Choline in Alzheimer's Disease-Cognition, Brain Mapping, Cerebrovascular Hemodynamics, and Immune Factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 777, 399–403.
- Calleo, J., Stanley, M., 2008. Anxiety disorders in later life: Differentiated diagnosis and treatment strategies. *Psychiatr. Times* 25, 24–27.
- Ceriello, A., 2008. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care* 31 Suppl 2, S181–184.
- Chainani-Wu, N., 2003. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J. Altern. Complement. Med.*, 161–168.
- Chang, L.W., 1986. Neuropathology of trimethyltin: a proposed pathogenetic mechanism. *Fundam. Appl. Toxicol.* 6, 217–232.
- Chang, L.W., Tiemeyer, T.M., Wenger, G.R., McMillan, D.E., 1983. Neuropathology of trimethyltin intoxication. III. Changes in the brain stem neurons. *Environ. Res.* 30, 399–411.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Banerjee, R.K., 2004. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. *Curr. Sci.* 87, 44–53.
- Chauhan, D.P., 2002. Chemotherapeutic potential of curcumin for colorectal cancer. *Curr. Pharm. Des.* 8, 1695–1706.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49, 481–493.
- Cheung, T.H., Cardinal, R.N., 2005. Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neurosci.* 6, 1–24.
- Chew, B.P., Park, J.S., 2004. Carotenoid action on the immune response. *J. Nutr.* 134, 257S–261S.
- Christen, Y., 2000. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 621S–629S.

- Clerici, W.J., 1996. Effects of superoxide dismutase and U74389G on acute trimethyltin-induced cochlear dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136, 236–242.
- Cole, G.M., Teter, B., Frautschy, S.A., 2007. Neuroprotective effects of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595, 197–212.
- Colucci, L., Bosco, Amenta, Fasanaro, Ziello, Rea, 2012. Effectiveness of nootropic drugs with cholinergic activity in treatment of cognitive deficit: a review. *J. Exp. Pharmacol.* 163.
- Cook, L.L., Stine, K.E., Reiter, L.W., 1984. Tin distribution in adult rat tissues after exposure to trimethyltin and triethyltin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 76, 344–348.
- Corvino, V., Geloso, M.C., Cavallo, V., Guadagni, E., Passalacqua, R., Florenzano, F., Giannetti, S., Molinari, M., Michetti, F., 2005. Enhanced neurogenesis during trimethyltin-induced neurodegeneration in the hippocampus of the adult rat. *Brain Res. Bull.* 65, 471–477.
- Craig, L.A., Hong, N.S., Kopp, J., McDonald, R.J., 2009. Selective lesion of medial septal cholinergic neurons followed by a mini-stroke impairs spatial learning in rats. *Exp. Brain Res.* 193, 29–42.
- Crespo, J.A., Sturm, K., Saria, A., Zernig, G., 2006. Activation of Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Nucleus Accumbens Core Is Necessary for the Acquisition of Drug Reinforcement. *J. Neurosci.* 26, 6004–6010.
- Darreh-Shori, T., Almkvist, O., Guan, Z.Z., Garlind, A., Strandberg, B., Svensson, A.-L., Soreq, H., Hellström-Lindahl, E., Nordberg, A., 2002. Sustained cholinesterase inhibition in AD patients receiving rivastigmine for 12 months. *Neurology.* 59, 563–572.
- Dávalos, A., Castillo, J., Álvarez-Sabín, J., Secades, J.J., Mercadal, J., López, S., Cobo, E., Warach, S., Sherman, D., Clark, W.M., others, 2002. Oral Citicoline in Acute Ischemic Stroke An Individual Patient Data Pooling Analysis of Clinical Trials. *Stroke* 33, 2850–2857.
- Davidson, C.E., Reese, B.E., Billingsley, M.L., Yun, J.K., 2004. Stannin, A Protein That Localizes to the Mitochondria and Sensitizes NIH-3T3 Cells to Trimethyltin and Dimethyltin Toxicity. *Mol. Pharmacol.* 66, 855–863.
- Davis, H.P., Baranowski, J.R., Pulsinelli, W.A., Volpe, B.T., 1987. Retention of reference memory following ischemic hippocampal damage. *Physiol. Behav.* 39, 783–786.
- Dejneka, N.S., Patanow, C.M., Polavarapu, R., Toggas, S.M., Kyle Krady, J., Billingsley, M.L., 1997. Localization and characterization of stannin: relationship to cellular sensitivity to organotin compounds. *Neurochem. Int.* 31, 801–815.
- Devore, E.E., Grodstein, F., van Rooij, F.J.A., Hofman, A., Stampfer, M.J., Witteman, J.C.M., Breteler, M.M.B., 2010. Dietary antioxidants and long-term risk of dementia. *Arch. Neurol.* 67, 819–825.
- Dhalla, N.S., Temsah, R.M., Netticadan, T., 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* 18, 655–673.

- Dhanasekaran, M., Holcomb, L.A., Hitt, A.R., Tharakan, B., Porter, J.W., Young, K.A., Manyam, B.V., 2009. Centella asiatica extract selectively decreases amyloid beta levels in hippocampus of Alzheimer's disease animal model. *Phytother. Res.* 23, 14–19.
- Dickinson, D.A., Iles, K.E., Zhang, H., Blank, V., Forman, H.J., 2003. Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate-cysteine ligase gene expression. *FASEB J.* 17, 473–475.
- Dohare, P., Garg, P., Jain, V., Nath, C., Ray, M., 2008. Dose dependence and therapeutic window for the neuroprotective effects of curcumin in thromboembolic model of rat. *Behav. Brain Res.* 193, 289–297.
- Dong, L., Wang, W., Wang, F., Stoner, M., Reed, J.C., Harigai, M., Samudio, I., Kladde, M.P., Vyhlidal, C., Safe, S., 1999. Mechanisms of Transcriptional Activation of bcl-2 Gene Expression by 17 β -Estradiol in Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 32099–32107.
- Dopp, E., Hartmann, L.M., von Recklinghausen, U., Florea, A.M., Rabieh, S., Shokouhi, B., Hirner, A.V., Obe, G., Rettenmeier, A.W., 2007. The cyto- and genotoxicity of organotin compounds is dependent on the cellular uptake capability. *Toxicology* 232, 226–234.
- D'Orlando, K.J., Sandage, B.W., 1995. Citicoline (CDP-choline): mechanisms of action and effects in ischemic brain injury. *Neurol. Res.* 17, 281–284.
- 4 Drapeau, E., Mayo, W., Aurousseau, C., Moal, M.L., Piazza, P.-V., Abrous, D.N., 2003. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 14385–14390.
- Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62, 649–671.
- Dröge, W., 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Dut, R., Dizdar, E.A., Birben, E., Sackesen, C., Soyer, O.U., Besler, T., Kalayci, O., 2008. Oxidative stress and its determinants in the airways of children with asthma. *Allergy* 63, 1605–1609.
- Duvernoy, H.M., 2005. *The Human Hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI*. Springer Science & Business Media.
- Dyer, R.S., Walsh, T.J., Wonderlin, W.F., Bercegeay, M., 1982. The trimethyltin syndrome in rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4, 127–133.
- Earley, B., Burke, M., Leonard, B.E., 1992. Behavioural, biochemical and histological effects of trimethyltin (TMT) induced brain damage in the rat. *Neurochem. Int.* 21, 351–366.
- Earley, B., Burke, M., Leonard, B.E., 1992. Behavioural, biochemical and histological effects of trimethyltin (TMT) induced brain damage in the rat. *Neurochem. Int.* 21, 351–366.
- Ekuta, J.E., Hikal, A.H., Matthews, J.C., 1998. Toxicokinetics of trimethyltin in four inbred strains of mice. *Toxicol. Lett.* 95, 41–46.

- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Radwan, F.M.E., 2009. Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food Chem. Toxicol.* 47, 249–254.
- Evans, J.G., Wilcock, G., Birks, J., 2004. Evidence-based pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 7, 351–369.
- Eybl, V., Kotyzova, D., Koutensky, J., 2006. Comparative study of natural antioxidants - curcumin, resveratrol and melatonin - in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology* 225, 150–156.
- Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872–879.
- Farghaly, A. A., & Abo-Zeid, M. A. (2009). Evaluation of the antimutagenic effect of vitamin C against DNA damage and cytotoxicity induced by trimethyltin in mice. *Nat. Sci.* 7(12), 1e7.
- Farmer, E.E., Mueller, M.J., 2013. ROS-Mediated Lipid Peroxidation and RES-Activated Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 429–450.
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Sczufca, M., 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet* 366, 2112–2117.
- Fiacco, T.A., Rosene, D.L., Galler, J.R., Blatt, G.J., 2003. Increased density of hippocampal kainate receptors but normal density of NMDA and AMPA receptors in a rat model of prenatal protein malnutrition. *J. Comp. Neurol.* 456, 350–360.
- Finaud, J., Lac, G., Filaire, E., 2006. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med. Auckl. NZ* 36, 327–358.
- 4 Finkbeiner, S., 2000. CREB Couples Neurotrophin Signals to Survival Messages. *Neuron* 25, 11–14. 1
- Florea, A.-M., Dopp, E., Obe, G., Rettenmeier, A.W., 2004. Genotoxicity of organometallic species, in: Hirner, P.D.A.V., Emons, P.D.H. (Eds.), *Organic Metal and Metalloid Species in the Environment. Springer Berlin Heidelberg*, 205–219.
- Floresco, S.B., Braaksma, D.N., Phillips, A.G., 1999. Thalamic-cortical-striatal circuitry subserves working memory during delayed responding on a radial arm maze. *J. Neurosci.* 19, 11061–11071.
- Forbes-McKay, K.E., Venneri, A., 2005. Detecting subtle spontaneous language decline in early Alzheimer's disease with a picture description task. *Neurol. Sci.* 26, 243–254.
- 5 Frautschy, S.A., Hu, W., Kim, P., Miller, S.A., Chu, T., Harris-White, M.E., Cole, G.M., 2001. Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Aβ-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol. Aging* 22, 993–1005.
- Froemke, R.C., Merzenich, M.M., Schreiner, C.E., 2007. A synaptic memory trace for cortical receptive field plasticity. *Nature* 450, 425–429.
- Fujiwara, H., Tabuchi, M., Yamaguchi, T., Iwasaki, K., Furukawa, K., Sekiguchi, K., Ikarashi, Y., Kudo, Y., Higuchi, M., Saido, T.C., Maeda, S., Takashima, A., Hara, M., Yaegashi, N., Kase, Y., Arai, H., 2009. A

traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid β proteins in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 109, 1648–1657.

- 4 Fukui, K., Omoi, N.-O., Hayasaka, T., Shinnkai, T., Suzuki, S., Abe, K., Urano, S., 2002. Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 275–284.
- Gabbita, S.P., Lovell, M.A., Markesbery, W.R., 1998. Increased Nuclear DNA Oxidation in the Brain in Alzheimer's Disease. *J. Neurochem.* 71, 2034–2040.
- 5 Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J.X., O'Brien, P.J., 2002. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177, 91–104.
- Gandhi, S., Abramov, A.Y., 2012. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, e428010.
- Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., Wardas, P., 2004. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad. Lek. Wars. Pol.* 1960 57, 453–455.
- 2 Geloso, M.C., Corvino, V., Michetti, F., 2011. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes. *Neurochem. Int.* 58, 729–738.
- Geloso, M.C., Giannetti, S., Cenciarelli, C., Budoni, M., Casalbore, P., Maira, G., Michetti, F., 2007. Transplantation of foetal neural stem cells into the rat hippocampus during trimethyltin-induced neurodegeneration. *Neurochem. Res.* 32, 2054–2061.
- Geloso, M.C., Vercelli, A., Corvino, V., Repici, M., Boca, M., Haglid, K., Zelano, G., Michetti, F., 2002. Cyclooxygenase-2 and *Caspase 3* Expression in Trimethyltin-Induced Apoptosis in the Mouse Hippocampus. *Exp. Neurol.* 175, 152–160.
- Genestra, M., 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Signal.* 19, 1807–1819.
- Giacobini, E., Spiegel, R., Enz, A., Veroff, A.E., Cutler, N.R., 2002. Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. *J. Neural Transm.* 109, 1053–1065.
- Gilbert, D.L., 2000. Fifty years of radical ideas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 1–14.
- Giri, R.K., Rajagopal, V., Kalra, V.K., 2004. Curcumin, the active constituent of turmeric, inhibits amyloid peptide-induced cytochemokine gene expression and CCR5-mediated chemotaxis of THP-1 monocytes by modulating early growth response-1 transcription factor. *J. Neurochem.* 91, 1199–1210.
- Good, M.A., 2002. Spatial memory and hippocampal function: Where are we now? *Psicologica* 23, 109–138.
- Greilberger, J., Koidl, C., Greilberger, M., Lamprecht, M., Schroecksnadel, K., Leblhuber, F., Fuchs, D., Oetl, K., 2008. Malondialdehyde, carbonyl

proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free Radic. Res.* 42, 633–638.

- Grieb, P., Gadamski, R., Wojda, R., Janisz, M., 2000. CDP-choline, but not cytidine, protects hippocampal CA1 neurones in the gerbil following transient forebrain ischaemia. *Folia Neuropathol.* 39, 141–145.
- Grieb, P., Rejdak, R., 2002. Pharmacodynamics of citicoline relevant to the treatment of glaucoma. *J. Neurosci. Res.* 67, 143–148.
- Grotto, D., Maria, L.S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S.C., Pomblum, V.J., Rocha, J.B.T., Farina, M., 2009. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Quím. Nova* 32, 169–174.
- Gunasekar, P., Li, L., Prabhakaran, K., Eybl, V., Borowitz, J.L., Isom, G.E., 2001. Mechanisms of the Apoptotic and Necrotic Actions of Trimethyltin in Cerebellar Granule Cells. *Toxicol. Sci.* 64, 83–89.
- Gundersen, H.J.G., 1977. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J. Microsc.* 111, 219–223.
- Gundersen, H.J.G., Jensen, E.B., 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction*. *J. Microsc.* 147, 229–263.
- Gupta, Y.K., Briyal, S., Sharma, M., 2009. Protective effect of curcumin against kainic acid induced seizures and oxidative stress in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 53, 39–46.
- Gurr, M.I., James, A.T., 1980. *Lipid Biochemistry: An Introduction*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., 2001. *Pocket Companion to Textbook of Medical Physiology*. W.B. Saunders.
- Guyton, A., Hall, J.E., 2011. *Textbook of Medical Physiology*. Pa.: Saunders/Elsevier, Philadelphia.
- Haass, C., Selkoe, D.J., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112.
- Halliwell, B., 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 141, 312–322.
- Hariri, A.R., Goldberg, T.E., Mattay, V.S., Kolachana, B.S., Callicott, J.H., Egan, M.F., Weinberger, D.R., 2003. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J. Neurosci.* 23, 6690–6694.
- Harry, G.J., Goodrum, J.F., Krigman, M.R., Morell, P., 1985. The use of synapsin I as a biochemical marker for neuronal damage by trimethyltin. *Brain Res.* 326, 9–18.
- Harry, G.J., Lefebvre d'Hellencourt, C., 2003. Dentate Gyrus: Alterations that Occur with Hippocampal Injury. *Neurotoxicology* 24, 343–356.
- Harry, G.J., McPherson, C.A., Wine, R.N., Atkinson, K., d'Hellencourt, C.L., 2003. Trimethyltin-induced neurogenesis in the murine hippocampus. *Neurotox. Res.* 5, 623–627.

- Harry, G.J., Sills, R., Schlosser, M.J., Maier, W.E., 2001. Neurodegeneration and glia response in rat hippocampus following nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). *Neurotox. Res.* 3, 307–319.
- 1 Hattori, N., Ohta, S., Sakamoto, T., Mishima, S., Furukawa, S., 2011. Royal jelly facilitates restoration of the cognitive ability in trimethyltin-intoxicated mice. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 165968.
- Haxaire, C., Turpin, F.R., Potier, B., Kervern, M., Sinet, P.-M., Barbanel, G., Mothet, J.-P., Dutar, P., Billard, J.-M., 2012. Reversal of age-related oxidative stress prevents hippocampal synaptic plasticity deficits by protecting D-serine-dependent NMDA receptor activation. *Aging Cell* 11, 336–344. x
- Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, S.P., Wu, J.F., Carney, J.M., Lovell, M., Markesbery, W.R., Butterfield, D.A., 1995. Brain Regional Correspondence Between Alzheimer's Disease Histopathology and Biomarkers of Protein Oxidation. *J. Neurochem.* 65, 2146–2156.
- Huang, Y.Q., Wang, X., Li, C., Liu, L., 2000. Clinical significance of nitric oxide level, esophageal pH and esophageal dynamic changes in diabetic patients. *WORLD Chin. J. Dig.* 8, 374–376.
- Imfeld, P., Bodmer, M., Schuerch, M., Jick, S.S., Meier, C.R., 2013. Risk of incident stroke in patients with Alzheimer disease or vascular dementia. *Neurology* 10-1212.
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.-M., Kira, Y., Imada, I., Utsumi, K., 2003. Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. *Curr. Med. Chem.* 10, 2495–2505.
- Ishrat, T., Hoda, M.N., Khan, M.B., Yousuf, S., Ahmad, M., Khan, M.M., Ahmad, A., Islam, F., 2009. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). *Eur. Neuropsychopharmacol. J.* 19, 636–647.
- Ishrat, T., Khan, M.B., Hoda, M.N., Yousuf, S., Ahmad, M., Ansari, M.A., Ahmad, A.S., Islam, F., 2006. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behav. Brain Res.* 171, 9–16.
- Jacotte-Simancas, A., Costa-Miserachs, D., Coll-Andreu, M., Torras-Garcia, M., Borlongan, C.V., Portell-Cortés, I., 2015. Effects of voluntary physical exercise, citicoline, and combined treatment on object recognition memory, neurogenesis, and neuroprotection after traumatic brain injury in rats. *6 Neurotrauma* 32, 739–751.
- Jakubowska-Doğru, E., Gümüşbaş, U., Kara, F., 2003. Individual variation in the spatial reference and working memory assessed under allothetic and idiothetic orientation cues in rat. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 63, 17–23.
- 5 Jana, N.R., Dikshit, P., Goswami, A., Nukina, N., 2004. Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 11680–11685.
- Jaques, J.A. dos S., Rezer, J.F.P., Carvalho, F.B., da Rosa, M.M., Gutierrez, J.M., Gonçalves, J.F., Schmatz, R., de Baires, A.V., Mazzanti, C.M., Rubin,

- M.A., Schetinger, M.R.C., Leal, D.B.R., 2012. Curcumin protects against cigarette smoke-induced cognitive impairment and increased acetylcholinesterase activity in rats. *Physiol. Behav.* 106, 664–669.
- 5 Javed, H., Khan, M.M., Ahmad, A., Vaibhav, K., Ahmad, M.E., Khan, A., Ashafaq, M., Islam, F., Siddiqui, M.S., Safhi, M.M., Islam, F., 2012. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience* 210, 340–352.
- J, C., Mj, G., A, F., R, C., 1994. Effects of CDP-choline on cognition and cerebral hemodynamics in patients with Alzheimer's disease. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 16, 211–218.
- JECFA, 1990. *Toxicological Evaluation of Certain Food Additives*. WHO, Geneva.
- Jenkins, S.M., Barone, S., 2004. The neurotoxicant trimethyltin induces apoptosis via *caspase* activation, p38 protein kinase, and oxidative stress in PC12 cells. *Toxicol. Lett.* 147, 63–72.
- Jenner, P., 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* S36–38.
- Ji, D., Wilson, M.A., 2007. Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep. *Nat. Neurosci.* 10, 100–107.
- Joanna Sekita-Krzak, I.Z.-L., 2003. Neuroprotective effect of ACTH (4-9) in degeneration of hippocampal nerve cells caused by dexamethasone: Morphological, immunocytochemical and ultrastructural studies. *Acta Neurobiol. Exp.* 63, 1–8.
- 4 Jovanovic, J.N., Benfenati, F., Siow, Y.L., Sihra, T.S., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Greengard, P., Czernik, A.J., 1996. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 3679–3683.
- 7 Jung, E.-Y., Lee, M.-S., Ahn, C.J., Cho, S.-H., Bae, H., Shim, I., 2013. The Neuroprotective Effect of Gugijihwang-Tang on Trimethyltin-Induced Memory Dysfunction in the Rat. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.*, 542081.
- 5 Jurenka, J.S., 2009. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* 14, 141–153.
- 5 Kalpana, C., Menon, V.P., 2004. Modulatory effects of curcumin on lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced toxicity. *Pol. J. Pharmacol.* 56, 581–586.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J., 2013. *Principles of Neural Science*. McGraw Hill Professional.
- Kasparová, S., Brezová, V., Valko, M., Horecký, J., Mlynárik, V., Liptaj, T., Vancová, O., Ulicná, O., Dobrota, D., 2005. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem. Int.* 46, 601–611.
- Kassed, C.A., Butler, T.L., Navidomskis, M.T., Gordon, M.N., Morgan, D., Pennypacker, K.R., 2003. Mice expressing human mutant presenilin-1

exhibit decreased activation of NF-kappaB p50 in hippocampal neurons after injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 110, 152–157.

- Kato, M., Kamigaito, M., Sawamoto, M., Higashimura, T., 1995. Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/Dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(II)/Methylaluminum Bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization. *Macromolecules* 28, 1721–1723.
- 4 Kelly, Á., Laroche, S., Davis, S., 2003. Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase in Hippocampal Circuitry Is Required for Consolidation and Reconsolidation of Recognition Memory. *J. Neurosci.* 23, 5354–5360.
- Kelly, M.R., Xu, J., Alexander, K.E., Loo, G., 2001. Disparate effects of similar phenolic phytochemicals as inhibitors of oxidative damage to cellular DNA. *Mutat. Res. Repair* 485, 309–318.
- Kharrazi, H., Vaisi-Raygani, A., Rahimi, Z., Tavilani, H., Aminian, M., Pourmotabbed, T., 2008. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clin. Biochem.* 41, 932–936.
- 5 hopkar, S.M., 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. UI Press, Jakarta.
- Khuwaja, G., Khan, M.M., Ishrat, T., Ahmad, A., Raza, S.S., Ashafaq, M., Javed, H., Khan, M.B., Khan, A., Vaibhav, K., Safhi, M.M., Islam, F., 2011. Neuroprotective effects of curcumin on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: behavioral, neurochemical and immunohistochemical studies. *Brain Res.* 1368, 254–263.
- Knight, J.A., 2000. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30, 145–158.
- 2 Koczyk, D., 1996. How does trimethyltin affect the brain: facts and hypotheses. *Acta Neurobiol. Exp.* 56, 587–596.
- Koda, T., Kuroda, Y., Ueno, Y., Kitadate, K., Imai, H., 2008. Protective effects of buckwheat hull extract against experimental hippocampus injury induced by trimethyltin in rats. *Nihon Eiseigaku Zasshi Jpn. J. Hyg.* 63, 711–716.
- Korbo, L., Ladefoged, O., Lam, H.R., Ostergaard, G., West, M.J., Arlien-Søborg, P., 1996. Neuronal loss in hippocampus in rats exposed to toluene. *Neurotoxicology* 17, 359–366.
- Krupinski, J., Ferrer, I., Barrachina, M., Secades, J.J., Mercadal, J., Lozano, R., 2002. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase activation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neuropharmacology* 42, 846–854.
- Kuhad, A., Chopra, K., 2007. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences. *Eur. J. Pharmacol.* 576, 34–42.
- Kumar, A., Dogra, S., Prakash, A., 2009. Neuroprotective Effects of *Centella asiatica* against Intracerebroventricular Colchicine-Induced Cognitive Impairment and Oxidative Stress. *Int. J. Alzheimer's Dis.* 2009, e972178.

- Kumar, D., Mishra, P.K., Anand, A.V.K., Agrawal, P.K., Mohapatra, R., 2012. Isolation, synthesis and pharmacological evaluation of some novel curcumin derivatives as anticancer agents. *J. Med. Plants Res.* 6(14), 2880-2884.
- Latini, L., Geloso, M.C., Corvino, V., Giannetti, S., Florenzano, F., Viscomi, M.T., Michetti, F., Molinari, M., 2010. Trimethyltin intoxication up-regulates nitric oxide synthase in neurons and purinergic ionotropic receptor 2 in astrocytes in the hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 88, 500–509.
- Lattanzi, W., Corvino, V., Di Maria, V., Michetti, F., Geloso, M.C., 2013. Gene Expression Profiling as a Tool to Investigate the Molecular Machinery Activated during Hippocampal Neurodegeneration Induced by Trimethyltin (TMT) Administration. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 16817–16835.
- Lee, C.-L., Kuo, T.-F., Wang, J.-J., Pan, T.-M., 2007. Red mold rice ameliorates impairment of memory and learning ability in intracerebroventricular amyloid beta-infused rat by repressing amyloid beta accumulation. *J. Neurosci. Res.* 85, 3171–3182.
- Lee, H.S., 2006. Antiplatelet property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived ar-turmerone. *Bioresour. Technol.* 97, 1372–1376.
- Lim, G.P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S.A., Cole, G.M., 2001. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* 21, 8370–8377.
- Lin, H.Q., Ho, M.T., Lau, L.S., Wong, K.K., Shaw, P.C., Wan, D.C.C., 2008. Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease. *Chem. Biol. Interact.* 175, 352–354.
- Linnarsson, S., Björklund, A., Ernfors, P., 1997. Learning Deficit in BDNF Mutant Mice. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2581–2587.
- Li, S., Yuan, W., Deng, G., Wang, P., Yang, P., Aggarwal, B., 2011. *Chemical composition and product quality control of turmeric (Curcuma longa L.)*. Faculty Publications. Paper 1.
- Liu, S.X., Athar, M., Lippai, I., Waldren, C., Hei, T.K., 2001. Induction of oxyradicals by arsenic: Implication for mechanism of genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 58, 76–87.
- Lu, Y., Wang, R., Cicha, M., Chapleau, M., Abboud, F., 2014. Transient acidosis induces a preconditioning chloride conductance that protects mouse nodose neurons from NMDA-induced apoptosis (1132.13). *FASEB J.* 28, 1132–13.
- Lynch, M.A., 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* 84, 87–136.
- Manns, J.R., Hopkins, R.O., Reed, J.M., Kitchener, E.G., Squire, L.R., 2003. Recognition Memory and the Human Hippocampus. *Neuron* 37, 171–180.
- Markesbery, W.R., 1997. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 134–147.
- Mark, R.J., Lovell, M.A., Markesbery, W.R., Uchida, K., Mattson, M.P., 2002. A Role for 4-Hydroxynonenal, an Aldehydic Product of Lipid Peroxidation,

in Disruption of Ion Homeostasis and Neuronal Death Induced by Amyloid β -Peptide. *J. Neurochem.* 68, 255–264.

- Mark, R.J., Pang, Z., Geddes, J.W., Uchida, K., Mattson, M.P., 1997. Amyloid β -Peptide Impairs Glucose Transport in Hippocampal and Cortical Neurons: Involvement of Membrane Lipid Peroxidation. *J. Neurosci.* 17, 1046–1054.
- 4 Martín-Aragón, S., Benedí, J.M., Villar, A.M., 1997. Modifications on antioxidant capacity and lipid peroxidation in mice under fraxetin treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 49–52.
- Martín-Aragón, S., Bermejo-Bescós, P., Benedí, J., Felici, E., Gil, P., Ribera, J.M., Villar, Á.M., 2008. Metalloproteinase's Activity and Oxidative Stress in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* 34, 373–378.
- Mattson, M.P., 1995. Free radicals and disruption of neuronal ion homeostasis in AD: A role for amyloid β -peptide? *Neurobiol. Aging* 16, 679–682.
- Maviel, T., Durkin, T.P., Menzaghi, F., Bontempi, B., 2004. Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory. *Science* 305, 96–99.
- McCord, J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108, 652–659.
- McGleenon, B.M., Dynan, K.B., Passmore, A.P., 1999. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 48, 471–480.
- 2 Meck, W.H., Church, R.M., Matell, M.S., 2013. Hippocampus, time, and memory--a retrospective analysis. *Behav. Neurosci.* 127, 642–654.
- Mega, M.S., Cummings, J.L., Fiorello, T., Gornbein, J., 1996. The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology* 46, 130–135.
- Merry, B.J., 2002. Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1340–1354.
- Miki, T., Satriotomo, I., Li, H.-P., Matsumoto, Y., Gu, H., Yokoyama, T., Lee, K.-Y., Bedi, K.S., Takeuchi, Y., 2005. Application of the physical disector to the central nervous system: estimation of the total number of neurons in subdivisions of the rat hippocampus. *Anat. Sci. Int.* 80, 153–162.
- Miller, D.B., O'Callaghan, J.P., 1984. Biochemical, functional and morphological indicators of neurotoxicity: effects of acute administration of trimethyltin to the developing rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 231, 744–751.
- 5 Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J.M., Díaz-Alperi, J., Ramírez, A., 2002. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 34, 37–46.
- Mk, U., Mn, R., 1995. Inhibition of nitrite induced oxidation of hemoglobin by curcuminoids. *Pharm.* 50, 490–492.
- Moriguchi, S., Tanaka, T., Tagashira, H., Narahashi, T., Fukunaga, K., 2013. Novel nootropic drug sunifiram improves cognitive deficits via CaM kinase II and protein kinase C activation in olfactory bulbectomized mice. *Behav. Brain Res.* 242, 150–157.
- Morita, M., Ishida, N., Uchiyama, K., Yamaguchi, K., Itoh, Y., Shichiri, M., Yoshida, Y., Hagihara, Y., Naito, Y., Yoshikawa, T., Niki, E., 2012. Fatty

- liver induced by free radicals and lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* 46, 758–765.
- Moser, M.-B., Moser, E.I., 1998. Distributed Encoding and Retrieval of Spatial Memory in the Hippocampus. *J. Neurosci.* 18, 7535–7542.
- 4 Mu, J.S., Li, W.P., Yao, Z.B., Zhou, X.F., 1999. Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res.* 835, 259–265.
- Müller, T., 2007. Rivastigmine in the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 3, 211–218.
- Mundy, W.R., Freudenrich, T.M., 2006. Apoptosis of cerebellar granule cells induced by organotin compounds found in drinking water: involvement of MAP kinases. *Neurotoxicology* 27, 71–81.
- Munoz, U., Castilla-Cortazar, I., 2012. Protection Against Oxidative Stress and “IGF-I Deficiency Conditions,” in: El-Missiry, M.A. (Ed.), *Antioxidant Enzyme*. InTech.
- Murray, A.R., Kisin, E., Leonard, S.S., Young, S.H., Kommineni, C., Kagan, V.E., Castranova, V., Shvedova, A.A., 2009. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology* 257, 161–171.
- Musalmah, Rusdiah RJ, Noor Aini AH, 2009. Induction of DNA damage and cell death by Beta Amyloid Peptide and its modification by Tocotrienol Rich Fraction (TRF). *Med. Health* 4, 8–15.
- Mutlu-Türkoğlu, U., İlhan, E., Öztezcan, S., Kuru, A., Aykaç-Toker, G., Uysal, M., 2003. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin. Biochem.* 36, 397–400.
- Myhrer, T., 2003. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res. Rev.* 41, 268–287.
- Nemanic, S., Alvarado, M.C., Bachevalier, J., 2004. The Hippocampal/Parahippocampal Regions and Recognition Memory: Insights from Visual Paired Comparison versus Object-Delayed Nonmatching in Monkeys. *J. Neurosci.* 24, 2013–2026.
- Noland, E.A., Taylor, D.H., Bull, R.J., 1982. Monomethyl- and trimethyltin compounds induce learning deficiencies in young rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4, 539–544.
- O'callaghan, J.P., Niedzwiecki, D.M., Means, J.C., 1989. Variations in the neurotoxic potency of trimethyltin. *Brain Res. Bull.* 22, 637–642.
- Ogita, K., Nishiyama, N., Sugiyama, C., Higuchi, K., Yoneyama, M., Yoneda, Y., 2005. Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model. *J. Neurosci. Res.* 82, 609–621.
- Ogita, K., Nitta, Y., Watanabe, M., Nakatani, Y., Nishiyama, N., Sugiyama, C., Yoneda, Y., 2004. In vivo activation of c-Jun N-terminal kinase signaling cascade prior to granule cell death induced by trimethyltin in the dentate gyrus of mice. *Neuropharmacology* 47, 619–630.

- O'Keefe, J., Nadel, L., 1979. Précis of O'Keefe & Nadel's The hippocampus as a cognitive map. *Behav. Brain Sci.* 2, 487–494.
- Okello, E.J., Savelev, S.U., Perry, E.K., 2004. In vitro anti-beta-secretase and dual anti-cholinesterase activities of *Camellia sinensis* L. (tea) relevant to treatment of dementia. *Phytother. Res. PTR* 18, 624–627.
- Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M., 2004. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J. Neurosci. Res.* 75, 742–750.
- Opacka, J., Sparrow, S., 1985. Nephrotoxic effect of trimethyltin in rats. *Toxicol. Lett.* 27, 97–102.
- Panetta, J.A., Clemens, J.A., 1994. Novel Antioxidant Therapy for Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 723, 239–245.
- Pan, R., Qiu, S., Lu, D., Dong, J., 2008. Curcumin improves learning and memory ability and its neuroprotective mechanism in mice. *Chin. Med. J. (Engl.)* 121, 832–839.
- Pappolla, M.A., Sos, M., Omar, R.A., Bick, R.J., Hickson-Bick, D.L.M., Reiter, R.J., Efthimiopoulos, S., Robakis, N.K., 1997. Melatonin Prevents Death of Neuroblastoma Cells Exposed to the Alzheimer Amyloid Peptide. *J. Neurosci.* 17, 1683–1690.
- Paramasivam, M., Poi, R., Banerjee, H., Bandyopadhyay, A., 2009. High-performance thin layer chromatographic method for quantitative determination of curcuminoids in *Curcuma longa* germplasm. *Food Chem.* 113, 640–644.
- Paravicini, T.M., Touyz, R.M., 2008. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31, S170–S180.
- Parisi, V., Coppola, G., Centofanti, M., Oddone, F., Angrisani, A.M., Ziccardi, L., Ricci, B., Quaranta, L., Manni, G., 2008. Evidence of the neuroprotective role of citicoline in glaucoma patients. *Prog. Brain Res.* 173, 541–554.
- 5 Park, C., Moon, D.-O., Choi, I.-W., Choi, B.T., Nam, T.-J., Rhu, C.-H., Kwon, T.K., Lee, W.H., Kim, G.-Y., Choi, Y.H., 2007. Curcumin induces apoptosis and inhibits prostaglandin E(2) production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 20, 365–372.
- 5 Park, E.J., Jeon, C.H., Ko, G., Kim, J., Sohn, D.H., 2000. Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetrachloride. *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 437–440.
- Park, H.-J., Shim, H.S., Choi, W.K., Kim, K.S., Bae, H., Shim, I., 2011. Neuroprotective Effect of *Lucium chinense* Fruit on Trimethyltin-Induced Learning and Memory Deficits in the Rats. *Exp. Neurobiol.* 20, 137–143.
- 2 Partadiredja, G., Bedi, K.S., 2010. Undernutrition during the gestation and suckling periods does not cause any loss of pyramidal neurons in the CA2-CA3 region of the rat hippocampus. *Nutr. Neurosci.* 13, 102–8.
- Patanow, C.M., Day, J.R., Billingsley, M.L., 1997. Alterations in hippocampal expression of SNAP-25, GAP-43, stannin and glial fibrillary acidic protein

following mechanical and trimethyltin-induced injury in the rat. *Neuroscience* 76, 187–202.

- 4 Patterson, S.L., Abel, T., Deuel, T.A.S., Martin, K.C., Rose, J.C., Kandel, E.R., 1996. Recombinant BDNF Rescues Deficits in Basal Synaptic Transmission and Hippocampal LTP in BDNF Knockout Mice. *Neuron* 16, 1137–1145.
- Pavlaković, G., Kane, M.D., Eyer, C.L., Kanthasamy, A., Isom, G.E., 1995. Activation of protein kinase C by trimethyltin: relevance to neurotoxicity. *J. Neurochem.* 65, 2338–2343.
- Perluigi, M., Joshi, G., Sultana, R., Calabrese, V., De Marco, C., Coccia, R., Cini, C., Butterfield, D.A., 2006. In vivo protective effects of ferulic acid ethyl ester against amyloid-beta peptide 1-42-induced oxidative stress. *J. Neurosci. Res.* 84, 418–426.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* 4, 89–96.
- Philbert, M.A., Billingsley, M.L., Reuhl, K.R., 2000. Mechanisms of Injury in the Central Nervous System. *Toxicol. Pathol.* 28, 43–53.
- Ploughman, M., 2008. Exercise is brain food: the effects of physical activity on cognitive function. *Dev. Neurorehabilitation* 11, 236–240.
- Porter, N., Landfield, P.W., 1998. Stress hormones and brain aging: adding injury to insult? *Nat. Neurosci.* 1, 3–4.
- Powers, S.K., Jackson, M.J., 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 88, 1243–1276.
- Pramila, B., Kalaivani, P., Barathidasan, R., Saravana Babu, C., 2015. Combination of Citicoline and L-NAME Restores Neurological Functions, Reverts Biochemical Alterations and Reduces Neuronal Damage in Transient Focal Cerebral Ischemic Rats. *Indian J. Sci. Technol.* 8, 804.
- Praticò, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2001. Increased Lipid Peroxidation Precedes Amyloid Plaque Formation in an Animal Model of Alzheimer Amyloidosis. *J. Neurosci.* 21, 4183–4187.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H.A., Herms, J., 2006. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 26, 7212–7221.
- Prince, M. and Jackson, J., 2009, Alzheimer's Disease International World Alzheimer Report, in: Prince, M. and Jackson, J., (Eds.), *Alzheimer's Disease International*, 1-96, Alzheimer's Disease International, London.
- Priya Rajan, S., Mohanan, P.V., 2013. *Curcumin and its derivatives as Antioxidants and DNA Intercalators*. Cochin University Of Science And Technology.
- Prusky, G.T., Douglas, R.M., Nelson, L., Shabanpoor, A., Sutherland, R.J., 2004. Visual memory task for rats reveals an essential role for hippocampus and perirhinal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5064–5068.
- 1 Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., Lamantia, A.S., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2004. *Neuroscience*. Sinauer Associates.

- Qiu, C., De Ronchi, D., Fratiglioni, L., 2007. The epidemiology of the dementias: an update. *Curr. Opin. Psychiatry* 20, 380–385.
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., Tramontina, A.C., Wartchow, K.M., Tagliari, B., Souza, D.O., Wyse, A.T.S., Gonçalves, C.-A., 2014. Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/K_A channels in acute hippocampal slices: neuroprotective effect of resveratrol. *Toxicol. In Vitro* 28, 544–551.
- Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging* 2, 219–236.
- Rains, G.D., 2001. *Principles of human neuropsychology*. McGraw-Hill.
- Ramírez-Tortosa, M.C., Mesa, M.D., Aguilera, M.C., Quiles, J.L., Baró, L., Ramírez-Tortosa, C.L., Martínez-Victoria, E., Gil, A., 1999. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 147, 371–378.
- ² Rao, A.M., Hatcher, J.F., Dempsey, R.J., 2000. Lipid alterations in transient forebrain ischemia: possible new mechanisms of CDP-choline neuroprotection. *J. Neurochem.* 75, 2528–2535.
- Rasmussen, H.B., Christensen, S.B., Kvist, L.P., Karazmi, A., 2000. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. *Planta Med.* 66, 396–398.
- Redish, A.D., Touretzky, D.S., 1998. The Role of the Hippocampus in Solving the Morris Water Maze. *Neural Comput.* 10, 73–111.
- Ren, Y., Houghton, P., Hider, R.C., 2006. Relevant activities of extracts and constituents of animals used in traditional Chinese medicine for central nervous system effects associated with Alzheimer's disease. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 989–996.
- Resendes, A.R., Majó, N., Segalés, J., Espadamala, J., Mateu, E., Chianini, F., Nofrarías, M., Domingo, M., 2004. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved *caspase-3* immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99, 203–213.
- Richardson, J.A., Burns, D.K., 2002. Mouse models of Alzheimer's disease: a quest for plaques and tangles. *ILAR J.* 43, 89–99.
- Riley, P.A., 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 27–33.
- Ringman, J.M., Frautschy, S.A., Cole, G.M., Masterman, D.L., Cummings, J.L., 2005. A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2, 131–136.
- ² Robertson, D.G., Gray, R.H., LaGlesia, F.A.D., 1987. Quantitative Assessment of Trimethyltin Induced Pathology of the Hippocampus. *Toxicol. Pathol.* 15, 7–17.
- Roy, A., Agrawal, A.K., Husain, R., Dubey, M.P., Seth, P.K., 1999. Cholinergic and serotonergic alterations in the rat hippocampus following trimethyltin exposure and fetal neural transplantation. *Neurosci. Lett.* 259, 173–176.

- Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R.G., Klauber, M.R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C.W., Pfeiffer, E., Schneider, L.S., Thal, L.J., 1997. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 336, 1216–1222.
- Sayre, L.M., Smith, M.A., Perry, G., 2001. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.* 8, 721–738.
- SCF, 1992. *Minutes of the 84th Meeting of the Scientific Committee for Food*. Brussel (III/3472/92-EN).
- Schuff, N., Woerner, N., Boreta, L., Kornfield, T., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., Thompson, P.M., Jack, C.R., Weiner, M.W., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2009. MRI of hippocampal volume loss in early Alzheimer's disease in relation to ApoE genotype and biomarkers. *Brain J. Neurol.* 132, 1067–1077.
- Scoville, W.B., Milner, B., 2000. Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 12, 103–a.
- Sharma, M., Manoharlal, R., Puri, N., Prasad, R., 2010. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*. *Biosci. Rep.* 30, 391–404.
- Shin, E.-J., Suh, S.K., Lim, Y.K., Jhoo, W.-K., Hjelle, O.P., Ottersen, O.P., Shin, C.Y., Ko, K.H., Kim, W.-K., Kim, D.S., Chun, W., Ali, S., Kim, H.-C., 2005. Ascorbate attenuates trimethyltin-induced oxidative burden and neuronal degeneration in the rat hippocampus by maintaining glutathione homeostasis. *Neuroscience* 133, 715–727.
- Shub, D., Kunik, M., 2009. Psychiatric comorbidity in persons with dementia: assessment and treatment strategies. *Psychiatr. Times* 26, 32–36.
- Shuto, M., Higuchi, K., Sugiyama, C., Yoneyama, M., Kuramoto, N., Nagashima, R., Kawada, K., Ogita, K., 2009. Endogenous and Exogenous Glucocorticoids Prevent Trimethyltin From Causing Neuronal Degeneration of the Mouse Brain In Vivo: Involvement of Oxidative Stress Pathways. *J. Pharmacol. Sci.* 110, 424–436.
- Siswonoto, S., 2008. Hubungan Kadar Malondialdehid Plasma dengan Keluaran Klinis Stroke Iskemik Akut (*masters*). Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
- Smith, M.J., Kwok, J.B.J., McLean, C.A., Kril, J.J., Broe, G.A., Nicholson, G.A., Cappai, R., Hallupp, M., Cotton, R.G.H., Masters, C.L., Schofield, P.R., Brooks, W.S., 2001. Variable phenotype of Alzheimer's disease with spastic paraparesis. *Ann. Neurol.* 49, 125–129.
- Smith, T.E., Hull, J.W., Israel, L.M., Willson, D.F., 2000. Insight, Symptoms, and Neurocognition in Schizophrenia and Schizoaffective Disorder. *Schizophr. Bull.* 26, 193–200.
- Snoeij, N.J., Penninks, A.H., Seinen, W., 1987. Biological activity of organotin compounds--an overview. *Environ. Res.* 44, 335–353.

- Snoeij, N.J., van Iersel, A.A., Penninks, A.H., Seinen, W., 1986. Triorganotin-induced cytotoxicity to rat thymus, bone marrow and red blood cells as determined by several in vitro assays. *Toxicology* 39, 71–83.
- 5 Song, E.K., Cho, H., Kim, J.S., Kim, N.Y., An, N.H., Kim, J.A., Lee, S.H., Kim, Y.C., 2001. Diarylheptanoids with free radical scavenging and hepatoprotective activity in vitro from *Curcuma longa*. *Planta Med.* 67, 876–877.
- Sreejayan, null, Rao, M.N., 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 105–107.
- Sreejayan, null, Rao, M.N., 1994. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 1013–1016.
- Standring, S., 2005. Gray's Anatomy, 39th Edition: The Anatomical Basis of Clinical Practice. *Am. J. Neuroradiol.* 26, 2703–2704.
- Stankovic, I., 2004. *Curcumin, Chemical and Technical Assessment*. 61st JECFA CTA© FAO 1, 1–8.
- Stanton, M.E., 1991. Neonatal exposure to triethyltin disrupts olfactory discrimination learning in preweanling rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 515–524.
- Stanton, P.K., Bramham, C., Scharfman, H.E., 2006. *Synaptic Plasticity and Transsynaptic Signaling*. Springer Science & Business Media.
- 4 Steffenach, H.-A., Sloviter, R.S., Moser, E.I., Moser, M.-B., 2002. Impaired retention of spatial memory after transection of longitudinally oriented axons of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3194–3198.
- 2 Sterio, D.C., 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.* 134, 127–136.
- Stewart, J.T., 2007. Psychiatric and Behavioral Manifestations of Vascular Dementia. *Am. J. Geriatr. Cardiol.* 16, 165–170.
- Subramaniam, R., Koppal, T., Green, M., Yatin, S., Jordan, B., Drake, J., Butterfield, D.A., 1998. The Free Radical Antioxidant Vitamin E Protects Cortical Synaptosomal Membranes from Amyloid β -Peptide(25-35) Toxicity But Not from Hydroxynonenal Toxicity: Relevance to the Free Radical Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* 23, 1403–1410.
- Sultana, R., Ravagna, A., Mohmmad-Abdul, H., Calabrese, V., Butterfield, D.A., 2005. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. *J. Neurochem.* 92, 749–758.
- Sunanda BPV, L.K., 2014. Sunanda BPV, Latha K, Rammohan B, Uma Maheswari MS, Surapaneni Krishna Mohan. Evaluation of the Neuroprotective Effects of Curcumin (Turmeric) Against Scopolamine Induced Cognitive Impairment in Mice. *Int. J. Pharmacogn. and Phytochem. Res.* 6(1); 133-136.
- Sun, Y., 1990. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 583–599.

- Surojanametukul, V., Satmalee, P., Saengprakai, J., Siliwan, D., Wattanasiritham, L., 2010. Preparation of curcuminoid powder from turmeric root (*Curcuma Longa* Linn) for food ingredient Use. *Kasetsart J. (Nat Sci)* 44, 123–30.
- 2 Sutherland, R.J., Wishaw, I.Q., Kolb, B., 1983. A behavioural analysis of spatial localization following electrolytic, kainate- or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat. *Behav. Brain Res.* 7, 133–153.
- Swann, J.W., Brady, R.J., Martin, D.L., 1989. Postnatal development of GABA-mediated synaptic inhibition in rat hippocampus. *Neuroscience* 28, 551–561.
- Takasaki, K., Uchida, K., Fujikawa, R., Nogami, A., Nakamura, K., Kawasaki, C., Yamaguchi, K., Morita, M., Morishita, K., Kubota, K., Katsurabayashi, S., Mishima, K., Fujiwara, M., Iwasaki, K., 2011. Neuroprotective effects of citidine-5-diphosphocholine on impaired spatial memory in a rat model of cerebrovascular dementia. *J. Pharmacol. Sci.* 116, 232–237.
- Tanaka, Y., Minematsu, K., Hirano, T., Hayashida, K., Yamaguchi, T., 1994. Effects of CDP-choline on dynamic changes in LCBF and cognitive function in demented subjects--an H2 15O-PET study. *Rinshō Shinkeigaku Clin. Neurol.* 34, 877–881.
- Tang, Y., Nyengaard, J.R., 2004. Length estimation of nerve fibers in human white matter using IUR sections. *Quant. Methods Neurosci. Neuroanat. Approach N. Y. Oxf. Univ. Press P* 249–263.
- Tariq, M., Ahmad, M., Moutaery, K.A., Deeb, S.A., 2008. Pentoxifylline ameliorates lithium-pilocarpine induced status epilepticus in young rats. *Epilepsy Behav.* 12, 354–365.
- Thompson, T.A., Lewis, J.M., Dejneka, N.S., Severs, W.B., Polavarapu, R., Billingsley, M.L., 1996. Induction of apoptosis by organotin compounds in vitro: neuronal protection with antisense oligonucleotides directed against stannin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276, 1201–1216.
- Tortora, G.J., Derrickson, B., 2006. *Principles of Anatomy and Physiology*. 11th ed.. Wiley.
- Traywick, L., 2007, *Dementia*. University of Arkansas.
- Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P., Abraham, W.C., 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* 70, 1–32.
- Unnikrishnan, M.K., Rao, M.N., 1995. Inhibition of nitrite induced oxidation of hemoglobin by curcuminoids. *Pharm.* 50, 490–492.
- 2 Uygur, E.E., Arslan, M., 2010. Effects of chronic stress on cognitive functions and anxiety related behaviors in rats. *Acta Physiol. Hung.* 97, 297–306.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40.
- Varadarajan, S., Kanski, J., Aksenova, M., Lauderback, C., Butterfield, D.A., 2001. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35). *J. Am. Chem. Soc.* 123, 5625–5631.

- Vasudevan, M., Parle, M., 2009. Antiamnesic potential of *Murraya koenigii* leaves. *Phytother. Res.* 23, 308–316.
- Verdon, C.-M., Fossati, P., Verny, M., Dieudonn, B., Teillet, L., Nadel, J., 2007. Social Cognition: An Early Impairment in Dementia of the Alzheimer Type: *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 21, 25–30.
- Viviani, B., Corsini, E., Pesenti, M., Galli, C.L., Marinovich, M., 2001. Trimethyltin-activated cyclooxygenase stimulates tumor necrosis factor- α release from glial cells through reactive oxygen species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 93–97.
- Walsh, T.J., Gallagher, M., Bostock, E., Dyer, R.S., 1982a. Trimethyltin impairs retention of a passive avoidance task. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4, 163–167.
- Walsh, T.J., Miller, D.B., Dyer, R.S., 1982b. Trimethyltin, a selective limbic system neurotoxicant, impairs radial-arm maze performance. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4, 177–183⁵
- Wang, Q., Sun, A.Y., Simonyi, A., Jensen, M.D., Shelat, P.B., Rottinghaus, G.E., MacDonald, R.S., Miller, D.K., Lubahn, D.E., Weisman, G.A., Sun, G.Y., 2005. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. *J. Neurosci. Res.* 82, 138–148.
- ⁴ Wang, T., Xie, K., Lu, B., 1995. Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. *J. Neurosci.* 15, 4796–4805.
- Wang, X., Cai, J., Zhang, J., Wang, C., Yu, A., Chen, Y., Zuo, Z., 2008. Acute trimethyltin exposure induces oxidative stress response and neuronal apoptosis in *Sebastiscus marmoratus*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 90, 58–64.
- ² Wang, X., Michaelis, E.K., 2010. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front. Aging Neurosci.* 2, 1–13.
- Weiner, M.W., Veitch, D.P., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Cairns, N.J., Green, R.C., Harvey, D., Jack, C.R., Jagust, W., Liu, E., Morris, J.C., Petersen, R.C., Saykin, A.J., Schmidt, M.E., Shaw, L., Siuciak, J.A., Soares, H., Toga, A.W., Trojanowski, J.Q., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2012. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: a review of papers published since its inception. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 8, S1–68.
- Weinert, B.T., Timiras, P.S., 2003. Invited review: Theories of aging. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 95, 1706–1716.
- Wenk, G.L., 2003. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry* 64 Suppl 9, 7–10.
- West, M.J., 2012. Estimating object number in biological structures. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2012, 1049–1066.
- ² Whittington, D.L., Woodruff, M.L., Baisden, R.H., 1989. The time-course of trimethyltin-induced fiber and terminal degeneration in hippocampus. *Neurotoxicol. Teratol.* 11, 21–33.
- Wickens, A.P., 2001. Ageing and the free radical theory. *Respir. Physiol.* 128, 379–391.

- Wijayakusuma, H.M., Hembing, Dalimartha, Setiawan, dan Wirian, A.S., 1992, *Tanaman berkhasiat obat di Indonesia: kunyit, Curcuma longa* Linn (Jiang Huang), Jilid 4, 93-94, Pustaka Kartini, Jakarta.
- Willcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L., 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 275–295.
- 4 Wilson, I.A., Ikonen, S., Gureviciene, I., McMahan, R.W., Gallagher, M., Eichenbaum, H., Tanila, H., 2004. Cognitive Aging and the Hippocampus: How Old Rats Represent New Environments. *J. Neurosci.* 24, 3870–3878.
- Wimo, A., Jönsson, L., Bond, J., Prince, M., Winblad, B., Alzheimer Disease International, 2013. The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 9, 1–11.e3.
- Wimo, A., Winblad, B., Aguero-Torres, H., von Strauss, E., 2003. The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 17, 63–67.
- Winship, K.A., 1988. Toxicity of tin and its compounds. *Adverse Drug React. Acute Poisoning Rev.* 7, 19–38.
- Wu, A., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2006. Dietary curcumin counteracts the outcome of traumatic brain injury on oxidative stress, synaptic plasticity, and cognition. *Exp. Neurol.* 197, 309–17.
- Wuryastuti, H., 2000. The Influence of Dietary Protein and Fats on Plasma Lipids in Sprague-Dawley Rats. *Indones. Food Nutr. Prog.* 7, 37–41.
- Wyss, J.M., Chambless, B.D., Kadish, I., van Groen, T., 2000. Age-related decline in water maze learning and memory in rats: strain differences. *Neurobiol. Aging* 21, 671–681.
- Xu, Y., Lin, D., Li, S., Li, G., Shyamala, S.G., Barish, P.A., Vernon, M.M., Pan, J., Ogle, W.O., 2009. Curcumin reverses impaired cognition and neuronal plasticity induced by chronic stress. *Neuropharmacology* 57, 463–471.
- 4 Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Chen, P.P., Kaye, R., Glabe, C.G., Frautschy, S.A., Cole, G.M., 2005. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 5892–5901.
- Ying, S.-W., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M.J., Hunt, S.P., Bliss, T.V.P., Bramham, C.R., 2002. Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Long-Term Potentiation in Intact Adult Hippocampus: Requirement for ERK Activation Coupled to CREB and Upregulation of Arc Synthesis. *J. Neurosci.* 22, 1532–1540.
- 5 Yoshino, M., Haneda, M., Naruse, M., Htay, H.H., Tsubouchi, R., Qiao, S.L., Li, W.H., Murakami, K., Yokochi, T., 2004. Prooxidant activity of curcumin: copper-dependent formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and induction of apoptotic cell death. *Toxicol. In Vitro* 18, 783–789.
- Young, I.S., McEneaney, J., 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 358–362.
- Yu, J., Liu, C., Zhang, X., Han, J., 2005. Acupuncture improved cognitive impairment caused by multi-infarct dementia in rats. *Physiol. Behav.* 86, 434–441.

- Zafrilla, P., Mulero, J., Xandri, J.M., Santo, E., Caravaca, G., Morillas, J.M., 2006. Oxidative Stress in Alzheimer Patients in Different Stages of the Disease. *Curr. Med. Chem.* 13, 1075–1083.
- 6 Zhang, L., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J.L., Isom, G.E., 2006. Trimethyltin-induced apoptosis is associated with upregulation of inducible nitric oxide synthase and Bax in a hippocampal cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 34–43.
- 5 Zhao, B., Li, X., He, R., Cheng, S., Wenjuan, X., 1989. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophys.* 14, 175–185.
- Zhao, J., Yu, S., Zheng, W., Feng, G., Luo, G., Wang, L., Zhao, Y., 2009. Curcumin Improves Outcomes and Attenuates Focal Cerebral Ischemic Injury via Antiapoptotic Mechanisms in Rats. *Neurochem. Res.* 35, 374–379.
- Zhu, X., Lee, H.-G., Casadesus, G., Avila, J., Drew, K., Perry, G., Smith, M.A., 2005. Oxidative imbalance in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 31, 205–217.
- Zola, S.M., Squire, L.R., Teng, E., Stefanacci, L., Buffalo, E.A., Clark, R.E., 2000. Impaired Recognition Memory in Monkeys after Damage Limited to the Hippocampal Region. *J. Neurosci.* 20, 451–463.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Kelayakan Etik



UNIVERSITAS GADJAH MADA
LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU
KOMISI ETHICAL CLEARANCE UNTUK PENELITIAN PRAKLINIK

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
(Ethical Clearance)

Nomor: 130/KEC-LPPT/XII/2013

Komisi *Ethical Clearance* untuk penelitian praklinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, setelah mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan bahwa penelitian:

Judul penelitian : Efek Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma longa Linn*) Terstandar Kurkumin pada Tikus Model Demensia

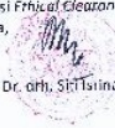
Peneliti Utama : Sapto Yuliani

Asal Instansi : Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

Lokasi Penelitian : Laboratorium Fitokimia dan Farmakologi UAD; LPPT-UGM; PAU-UGM dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

Telah dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk diaksanakan penelitian tersebut pada hewan uji tikus. Komisi *Ethical Clearance* mempunyai hak untuk melakukan pemantauan selama penelitian berlangsung.

Yogyakarta, 11 Desember 2013
Komisi *Ethical Clearance*
Ketua,



Prof. Dr. drh. Sri Tsilina Oktavia Salesia

Lampiran 2. Surat keterangan hasil identifikasi rimpang

 **LABORATORIUM BIOLOGI**
FAKULTAS MIPA
UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN
Jl. Prof. Dr. Soepomo, Yogyakarta Telp. (0274) 563515

SURAT KETERANGAN
Nomor : B/B.12 /974/V/2014

Yang bertanda tangan di bawah ini Kepala Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan menerangkan bahwa :

Nama : Vania Sugestin
No.Mhs : 10023214

Telah melakukan Identifikasi rimpang tanaman dengan Bimbingan Hery Setiyawan, M.Si di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan, pada tanggal 30 April 2014

Rimpang tanaman tersebut adalah :
Curcuma longa L.

Demikian Surat Keterangan ini untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Yogyakarta, 7 Mei 2014
Kepala Laboratorium Biologi

Drs. Hadi Sasongko, M. Si.

Lampiran 3. Skema pembuatan ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.)



Lampiran 4. Standarisasi ekstrak

R_f = Jarak total hingga bercak / jarak total sampai batas elusi

$$= 5 \text{ cm} / 8 \text{ cm}$$

$$= 0,625$$

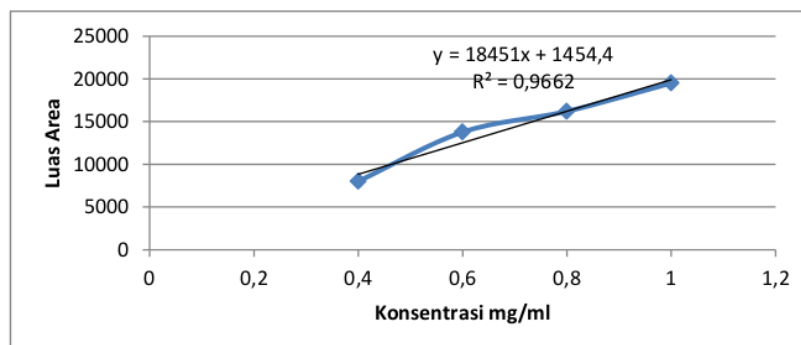
Grafik Luas Area vs konsentrasi pada Plate KLT

No.	Konsentrasi (mg/ml)	Luas Area Kromatogram
1.	Kurva Baku 0,4	8012
2.	Kurva Baku 0,6	13766,48
3.	Kurva Baku 0,8	16200,24
4.	Kurva Baku 1	19501,28
5.	Sampel 1	14812,4
6.	Sampel 2	14431,1
7.	Sampel 3	14284,7
8.	Sampel 4	14184,0
9.	Sampel 5	14566,6

Persamaan Regresi Linear

$$Y = bx + a$$

$$Y = 18450,8x + 1454,4$$



Lanjutan Perhitungan kadar kurkumin

Perhitungan Kadar Sampel $Y = bx + a \rightarrow x = \frac{Y-a}{b}$
--

Sampel 1

$$14812,4 = 18450,8x + 1454,4$$

$$X = \frac{14812,4 - 1454,4}{18450,8} = 0,724 \text{ mg/ml}$$

Sampel 2

$$14431,1 = 18450,8x + 1454,4$$

$$X = \frac{14431,1 - 1454,4}{18450,8} = 0,703 \text{ mg/ml}$$

Sampel 3

$$14284,7 = 18450,8x + 1454,4$$

$$X = \frac{14284,7 - 1454,4}{18450,8} = 0,695 \text{ mg/ml}$$

Sampel 4

$$14184,0 = 18450,8x + 1454,4$$

$$X = \frac{14184,0 - 1454,4}{18450,8} = 0,690 \text{ mg/ml}$$

Sampel 5

$$14566,6 = 18450,8x + 1454,4$$

$$X = \frac{14566,6 - 1454,4}{18450,8} = 0,711 \text{ mg/ml}$$

Perhitungan kadar kurkumin

$$\text{Kadar} = \frac{X \cdot \text{Volume} \cdot Fp}{\text{mg sampel}} \times 100 \%$$

Sampel 1

$$\text{Kadar} = \frac{0,724 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} \times 2}{50,3 \text{ mg}} \times 100 \% = 28,78 \%$$

Sampel 2

$$\text{Kadar} = \frac{0,703 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} \times 2}{50,2 \text{ mg}} \times 100 \% = 28,01 \%$$

Sampel 3

$$\text{Kadar} = \frac{0,695 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} \times 2}{50,1 \text{ mg}} \times 100 \% = 27,74 \%$$

Sampel 4

$$\text{Kadar} = \frac{0,690 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} \times 2}{50,1 \text{ mg}} \times 100 \% = 27,54 \%$$

Sampel 5

$$\text{Kadar} = \frac{0,711 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} \times 2}{50,2 \text{ mg}} \times 100 \% = 28,33 \%$$

Rata-rata Kadar

$$\bar{x} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + X_4 + X_5}{n} = \frac{(28,78 + 28,01 + 27,74 + 27,54 + 28,33)\%}{5}$$

$$= 28,08 \%$$

$$SD = 0,491$$

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% = \frac{0,491}{28,08} \times 100 \% = 1,7 \% < 5 \%$$

Lampiran 5. Perhitungan kadar abu, kadar abu larut asam dan kadar air ekstrak kunyit

Penimbangan	Bobot I (g)	Bobot II (g)	Bobot III (g)
Berat wadah	30,8931	34,2808	35,8514
Wadah + zat	31,8944	35,2811	36,8579
Hari Pertama	30,8971	34,2854	35,8561
Hari Kedua	30,8970	34,2839	35,8547
Hari Ketiga	30,8967	34,2837	35,8545
Selisih hari ketiga – wadah	0,0036	0,0029	0,0031

$$\text{Bobot I} = \frac{0,0036 \text{ gram}}{1,0009 \text{ gram}} = \frac{0,359 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} = 0,359\% \text{ b/b}$$

$$\text{Bobot II} = \frac{0,0029 \text{ gram}}{1,0003 \text{ gram}} = \frac{0,290 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} = 0,290\% \text{ b/b}$$

$$\text{Bobot III} = \frac{0,0031 \text{ gram}}{1,0065 \text{ gram}} = \frac{0,308 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} = 0,308\% \text{ b/b}$$

$$\text{Bobot rata-rata} = \frac{(0,359+0,290+0,308)\%}{3} = 0,319\% \text{ b/b}$$

$$\text{SD} = 0,036$$

$$\text{CV} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100\% = \frac{0,036}{0,319} \times 100\% = 11,29\%$$

Kadar abu larut asam

	Bobot I (g)	Bobot II (g)	Bobot III (g)
Berat wadah	30,8931	34,2808	35,8514
Wadah + zat	31,8944	35,2851	36,8579
Hari Pertama	30,9060	34,2836	35,8538
Hari Kedua	30,9048	34,2829	35,8534
Selisih hari kedua – wadah	0,0017	0,0021	0,0020

$$\text{Bobot I} = \frac{0,0017 \text{ gram}}{1,0009 \text{ gram}} = \frac{0,170 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} = 0,170\% \text{ b/b}$$

$$\text{Bobot II} = \frac{0,0021 \text{ gram}}{1,0003 \text{ gram}} = \frac{0,210 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} = 0,210\% \text{ b/b}$$

$$\text{Bobot III} = \frac{0,0020 \text{ gram}}{1,0065 \text{ gram}} = \frac{0,199 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} = 0,199\% \text{ b/b}$$

$$\text{Bobot rata-rata} = \frac{(0,170 + 0,210 + 0,199)\%}{3} = 0,193\% \text{ b/b}$$

$$\text{SD} = 0,021$$

$$\text{CV} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100\% = \frac{0,021}{0,193} \times 100\% = 10,88\%$$

Kadar air ekstrak kunyit

$$\text{Jumlah filtrat} = 0,05 \text{ ml}$$

$$\text{Wadah + ekstrak kunyit} = 27,3059 \text{ gram}$$

$$\text{Bobot wadah} = 26,3056 \text{ gram}$$

$$\text{Bobot ekstrak} = 1,003 \text{ gram}$$

$$\text{Kadar air} = \frac{0,05 \text{ ml}}{1,0003 \text{ gram}} = \frac{5,0 \text{ ml}}{100 \text{ gram}} = 5\% \text{ v/b}$$

Lampiran 6. Data berat badan tikus setiap minggu selama 5 minggu pada semua kelompok

Kelompok	Minggu ke:						
	0	I	II	III	IV	V	
Normal	1	193	195,5	198	215,5	235	252
	2	183	187,5	190	225,5	239	247
	3	194	210,5	231	242,5	251,5	275
	4	187	190,5	230	246,5	248	253
	5	193	192,5	208	209,5	211,5	233
	6	190	205,5	210	229,5	234,5	260
	7	183	200,5	203	213	245	270
	8	192	195	200	209	264	275
	9	197	185	200	221	232	262
	10	190	192	198	216	254	275
	rerata	190,2	195,45	206,8	222,8	241,45	260,2
	SE	1,46	2,52	4,32	4,17	4,60	4,46
Kontrol	1	189	210	224	229	224	224
	2	183	175	179	179	196	201,3
	3	177	184	197	190	210	215
	4	185	190	202	191	210	210,5
	5	200	204	212	214	213	211
	6	205	245	226	227	235	209
	7	194	198	214	234	230	229
	8	186	187	207	225	227	221
	9	190	190	211	236	241	212
	10	194	200	213	245	236	220
	rerata	190,3	198,3	208,5	217	222,2	215,28
	SE	2,29	5,37	3,77	6,27	3,99	2,27
Sitikolin	1	198,8	236,6	236,2	268,3	277	259,6
	2	200,8	227,6	212,9	230,4	269	273,8
	3	184,5	218,5	217,2	241,3	295	270,5
	4	221,5	248,6	251,2	277,8	281,8	289,9
	5	196	219,2	225,3	243,5	254,2	278,9
	6	205,8	232,3	221,1	253,4	264,4	272,1
	7	174,4	185	188	191	194	200
	8	185	188	196,3	200	201	200,5
	9	167	178,2	180	197,5	202,5	204
	10	191	198	201	205	206	211
	rerata	192,48	213,2	212,92	230,82	244,49	246,03
	SE	4,99	7,69	6,97	9,84	12,38	11,75
Ekstrak	1	201,8	237,6	235,6	225,8	220,7	216,3

kunyit 100 mg/kg BB	2	205,8	231,3	229,4	253,8	244,4	245,1
	3	200,1	240,7	223,7	265,3	227,4	222,5
	4	217	245,5	241	241,8	241,4	212,5
	5	187	214,1	228,9	245,7	283,4	298,9
	6	203,4	235,3	227,2	257,2	287,7	298,3
	7	185	189	191	190	194	194
	8	178	181	189	191	195	200
	9	189,4	190,3	192	200	201,3	200,5
	10	176	179	181	190,4	203	212,2
		rerata	194,35	214,38	213,88	226,1	229,83
	SE	4,19	8,51	7,19	9,66	10,90	12,28
Ekstrak Kunyit 200 mg/kgBB	1	215	199,6	215,1	242,8	280	272,5
	2	216,8	239,7	238,9	254,8	292,1	287,4
	3	205	234,5	256,4	269,9	304,5	312,7
	4	191,6	217,7	221	227,2	255,9	272,1
	5	207,7	247,3	255,3	269,9	298,3	310,5
	6	198,1	226,4	233,4	242,8	282,5	227,5
	7	178	191	200	201	222	212
	8	183	188	201	211,2	210,5	230
	9	186,4	191,2	202	207,4	212,3	233,5
	10	174	181,4	198,9	211	214,3	221
	rerata	195,56	211,68	222,2	233,8	257,24	257,92
	SE	4,83	7,67	7,16	8,20	12,29	11,94
Ekstrak kunyit 300 mg/kgBB	1	190,5	233,5	240,4	264,9	277	254,9
	2	169,5	208,6	197,6	215,1	244,2	275,3
	3	210,9	247,7	251,7	249,8	209,6	223
	4	216,2	236,1	238	257,3	295	248,9
	5	206,1	249,1	239	262,3	281,8	270,1
	6	205	249,6	250,3	238,5	214,4	201
	7	179,4	189,2	201,3	212,1	214,4	223
	8	181	189	190,3	198,2	214	221
	9	176	190,3	201	213	221	224
	10	185,4	190,2	195,3	201	211	242,3
	rerata	192	218,33	220,49	231,22	238,24	238,35
	SE	5,166	8,64	7,98	8,26	10,67	7,56

Lampiran 7. Foto-foto persiapan injeksi TMT dan sitikolin pada tikus



Sitikolin



TMT chloride



Timbangan analitik



Injeksi TMT

Lampiran 8. Gambar alat-alat untuk uji Morris Water maze ⁶



Acquisition Trial

Probe Trial



Uji Kemampuan Sensorimotorik
(ada bendera di atas platform)

Video kamera Uji MWM



Curvimeter

Lampiran 9. Data waktu latensi

1. Data waktu latensi *acquisition trial* kelompok Kontrol Normal pada uji Morris *water maze*

HARI	Tikus	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		WAKTU	WAKTU	WAKTU	WAKTU			
1	1	58,90	60,00	50,00	60,00	57,23	4,84	1,53
	2	30,32	60,00	60,00	18,88	42,30	20,97	6,63
	3	38,95	22,39	13,42	19,46	23,56	10,92	3,46
	4	14,30	22,40	30,22	27,10	23,51	6,93	2,19
	5	60,00	30,29	30,00	58,90	44,80	16,93	5,36
	6	24,35	19,65	10,36	18,54	18,23	5,82	1,84
	7	36,38	37,85	19,37	22,20	28,95	9,52	3,01
	8	31,25	26,10	46,75	30,15	33,56	9,07	2,87
	9	39,46	23,87	17,10	31,14	27,89	9,61	3,04
	10	10,44	15,64	38,72	25,71	22,63	12,46	3,94
Rerata		34,44	31,82	31,59	31,21			
SD		16,37	16,02	16,90	15,55			
SE		5,18	5,07	5,35	4,92			
2	1	36,52	37,72	14,59	60,00	37,21	18,55	5,87
	2	30,49	33,89	27,74	40,62	33,19	5,56	1,76
	3	38,35	48,26	32,71	19,89	34,80	11,84	3,75
	4	16,72	21,56	22,12	13,61	18,50	4,06	1,29
	5	12,95	24,36	23,36	27,97	22,16	6,45	2,04
	6	22,83	24,93	26,10	22,44	24,08	1,74	0,55
	7	49,23	24,35	26,95	15,64	29,04	14,30	4,53
	8	35,09	19,80	12,19	16,47	20,89	9,97	3,15
	9	22,39	16,60	30,37	16,04	21,35	6,66	2,11
	10	30,33	17,35	30,54	19,63	24,46	6,96	2,20
Rerata		29,49	26,88	24,67	25,23			
SD		10,96	10,08	6,78	14,56			
SE		3,47	3,19	2,15	4,61			
3	1	30,00	30,92	37,37	11,49	27,45	11,13	3,52
	2	2,83	46,98	13,07	10,81	18,42	19,54	6,18
	3	30,00	45,11	27,15	25,74	32,00	8,92	2,82
	4	32,43	5,16	16,26	6,70	15,14	12,53	3,97
	5	7,54	5,27	25,71	15,30	13,46	9,23	2,92
	6	23,44	12,07	14,09	27,11	19,18	7,25	2,29
	7	15,71	23,15	17,92	36,70	23,37	9,42	2,98
	8	26,66	25,81	18,22	23,15	23,46	3,80	1,20
	9	49,72	26,05	19,46	24,50	29,93	13,49	4,27
	10	18,32	27,15	18,32	26,70	22,62	4,97	1,57

	Rerata	23,67	24,77	20,76	20,82			
	SD	13,46	14,46	7,36	9,35			
	SE	4,26	4,58	2,33	2,96			
4	1	27,41	4,03	18,76	23,53	18,43	10,23	3,24
	2	10,35	3,72	18,28	12,09	11,11	5,99	1,89
	3	15,96	14,77	17,80	12,65	15,30	2,16	0,68
	4	16,30	13,63	14,71	11,32	13,99	2,09	0,66
	5	37,10	26,63	22,47	15,46	25,42	9,05	2,86
	6	13,12	21,79	11,26	16,55	15,68	4,63	1,46
	7	12,17	28,23	14,00	31,14	21,39	9,69	3,07
	8	29,59	18,28	23,35	22,58	23,45	4,66	1,48
	9	24,44	27,12	20,45	6,98	19,75	8,94	2,83
	10	27,66	29,88	29,90	25,76	28,30	1,99	0,63
	Rerata	21,41	18,81	19,10	17,81			
	SD	9,00	9,66	5,34	7,62			
	SE	2,85	3,06	1,69	2,41			
5	1	42,48	8,57	51,50	19,79	30,59	19,83	6,28
	2	4,33	3,87	4,50	5,46	4,54	0,67	0,21
	3	6,38	6,02	9,63	14,16	9,05	3,78	1,19
	4	10,24	9,41	4,43	17,20	10,32	5,26	1,66
	5	14,73	3,72	28,91	8,54	13,98	10,93	3,46
	6	7,90	2,03	2,58	10,42	5,73	4,10	1,30
	7	5,08	10,13	14,50	10,46	10,04	3,86	1,22
	8	15,00	4,85	7,63	3,65	7,78	5,09	1,61
	9	4,90	38,72	6,95	2,65	13,31	17,03	5,39
	10	6,43	23,25	10,44	4,45	11,14	8,45	2,67
	Rerata	11,75	11,06	14,11	9,68			
	SD	11,47	11,42	15,14	5,89			
	SE	3,63	3,62	4,79	1,86			

2. Data waktu latensi *acquisition trial* kelompok kontrol sakit pada uji Morris water maze

KONTROL SAKIT								
HARI	TIKUS	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		WAKTU	WAKTU	WAKTU	WAKTU			
1	1	48,9	38,24	13,89	16,94	29,49	16,87	5,34
	2	24,67	60	41,43	60	46,53	17,00	5,38
	3	60	60	42,69	34,65	49,34	12,74	4,03
	4	60	40,23	35,1	60	48,83	13,06	4,13
	5	28,18	25,74	14,97	3,44	18,08	11,32	3,58
	6	31,41	40,54	43,12	39,43	38,63	5,05	1,60
	7	11,72	38,2	20,97	13	20,97	12,19	3,86
	8	26,62	17,9	30,38	16,44	22,84	6,75	2,13
	9	36,47	31,93	50,91	60	44,83	12,95	4,10
	10	25,09	39,41	25,09	13,56	25,79	10,58	3,35
	rerata	35,31	39,22	31,86	31,75			
	SD	16,06	13,16	12,84	22,11			
	SE	5,08	4,16	4,06	7,00			
2	1	12,92	24,85	25,01	18,82	20,40	5,76	1,82
	2	15,13	15,43	12,51	3,01	11,52	5,82	1,84
	3	26,15	13,7	60	60	39,96	23,69	7,50
	4	30	7,13	13,5	48,98	24,90	18,72	5,92
	5	60	60	42,54	24,73	46,82	16,87	5,34
	6	60	60	42,7	40	50,68	10,82	3,43
	7	60	57,65	15,1	60	48,19	22,09	6,99
	8	28,2	45,77	44,99	13,45	33,10	15,41	4,88
	9	52,32	31,75	19,12	60	40,80	18,74	5,93
	10	6,3	60	41,45	60	41,94	25,32	8,01
	rerata	35,10	37,63	31,69	38,90			
	SD	18,09	17,93	14,76	20,86			
	SE	5,72	5,68	4,67	6,60			
3	1	28,41	5,56	20,55	6,72	15,31	11,07	3,50
	2	3,52	12,76	8,32	11,73	9,08	4,17	1,32
	3	60	42,27	60	60	55,57	8,86	2,81
	4	15,6	60	60	60	48,90	22,20	7,03
	5	12,21	10,12	19,21	13,66	13,80	3,89	1,23
	6	60	60	8,49	23,41	37,98	26,15	8,28
	7	60	25,78	14,16	21,19	30,28	20,38	6,45
	8	33,65	34,1	42,5	29,31	34,89	5,51	1,74
	9	36,56	23,37	57,15	46,09	40,79	14,34	4,54
	10	30,34	14,59	44,75	25,04	28,68	12,55	3,97

	rerata	34,03	28,86	33,51	29,72	31,53	2,62	0,83
	SD	20,61	19,84	21,54	19,28			
	SE	6,52	6,28	6,82	6,10			
4	1	4,59	45,94	60	22,41	33,24	24,60	7,78
	2	22,65	29,9	17,22	60	32,44	19,09	6,04
	3	60	1,93	60	60	45,48	29,04	9,19
	4	12,1	11,53	18,03	13,46	13,78	2,95	0,93
	5	55,19	31,98	60	28,98	44,04	15,82	5,01
	6	60	60	12,54	24,75	39,32	24,39	7,72
	7	60	27,13	33,6	48,99	42,43	14,88	4,71
	8	15,14	15,43	12,52	3	11,52	5,83	1,85
	9	9,69	60	4,75	19,13	23,39	25,12	7,95
	10	2,93	24,87	5,02	18,82	12,91	10,64	3,37
	rerata	30,23	30,87	28,37	29,95			
	SD	25,21	19,51	23,25	19,70			
	SE	7,98	6,17	7,36	6,23			
5	1	39,8	21,13	37,47	30,41	32,20	8,39	2,66
	2	44,79	46,56	60	60	52,84	8,30	2,63
	3	43	60	60	60	55,75	8,50	2,69
	4	30	20,98	21,76	60	33,19	18,34	5,80
	5	25,13	60	55,87	22,38	40,85	19,84	6,28
	6	60	60	60	60	60,00	0,00	0,00
	7	58	60	23,23	36,97	44,55	17,62	5,58
	8	30	43,56	6,5	10,09	22,54	17,41	5,51
	9	45	3,47	60	45	38,37	24,32	7,69
	10	60	13,22	38,41	32	35,91	19,29	6,11
	rerata	43,57	38,89	42,32	41,69	41,62	1,98	0,63
	SD	12,80	22,14	19,84	18,16			
	SE	4,05	7,01	6,28	5,75			

3. Data waktu latensi *acquisition trial* kelompok kontrol positif pada uji Morris water maze

HARI	TIKUS	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		WAKTU	WAKTU	WAKTU	WAKTU			
1	1	60	60	60	59,1	59,78	0,45	0,14
	2	25,8	33,1	34,75	32,54	31,55	3,94	1,25
	3	44	56,45	28,7	44,5	43,41	11,37	3,60
	4	25,82	28,84	10,62	14,86	20,04	8,69	2,75
	5	34,45	25,43	38,65	30,11	32,16	5,68	1,80
	6	32,14	31,66	22,96	21,86	27,16	5,50	1,74
	7	40,14	37,86	25,96	14,56	29,63	11,81	3,74
	8	18,7	11,64	25,85	23,33	19,88	6,24	1,97
	9	14,2	19,45	23,6	29,66	21,73	6,54	2,07
	10	45,8	33,1	30	28,2	34,28	7,95	2,51
	rerata	34,11	33,75	30,11	29,87			
	SD	13,81	14,96	12,90	13,52			
	SE	4,37	4,73	4,08	4,28			
2	1	16,29	13,53	13,4	30,04	18,32	7,93	2,51
	2	36,26	25,94	15,16	17,06	23,61	9,66	3,06
	3	23,38	23,19	33,55	27,38	26,88	4,85	1,54
	4	10,56	10,7	22,65	11,77	13,92	5,85	1,85
	5	25,81	18,73	23,71	29,05	24,33	4,33	1,37
	6	15,28	27,14	23,19	16,62	20,56	5,59	1,77
	7	18,39	10,07	26,77	5,04	15,07	9,55	3,02
	8	24,5	25,5	20	13,7	20,93	5,38	1,70
	9	27	22,4	20	45,6	28,75	11,60	3,67
	10	40,2	25,8	20,7	26	28,18	8,38	2,65
	rerata	23,77	20,30	21,91	22,23			
	SD	9,27	6,61	5,69	11,69			
	SE	2,93	2,09	1,80	3,70			
3	1	27,7	6,32	51,5	10,17	23,92	20,61	6,52
	2	35,56	18,75	16,93	18,68	22,48	8,76	2,77
	3	15,32	26,63	18,62	25,55	21,53	5,45	1,73
	4	37,97	43,86	7,69	25,18	28,68	16,02	5,07
	5	15,12	16,06	11,39	13,43	14,00	2,05	0,65
	6	16,53	27,08	37,67	17,79	24,77	9,80	3,10
	7	15,98	18,31	15,15	21,1	17,64	2,67	0,84
	8	20,2	23,9	24,1	24,1	23,08	1,92	0,61
	9	26,5	26,6	13,7	30,4	24,30	7,30	2,31
	10	19,5	18,9	23,6	20,2	20,55	2,10	0,67
	Rerata	23,04	22,64	22,04	20,66	22,09	1,04	0,33
	SD	8,49	9,78	13,30	6,02			

	SE	2,69	3,09	4,21	1,90			
	1	16,33	4,02	6,57	3,06	7,50	6,07	1,92
	2	16,07	6,61	6,84	7,29	9,20	4,59	1,45
	3	14,5	27,11	22,99	23,06	21,92	5,31	1,68
	4	27,02	34,5	24,77	33,85	30,04	4,88	1,54
4	5	30	60	18,99	21,33	32,58	18,88	5,98
	6	33,37	7,65	24,12	33,1	24,56	12,06	3,82
	7	32,65	6,61	16,38	9,36	16,25	11,68	3,70
	8	27,1	35	22	19,9	26,00	6,72	2,13
	9	19,8	15	14,2	18,7	16,93	2,74	0,87
	10	27,7	23,5	26,6	22,6	25,10	2,44	0,77
	rerata	24,45	22,00	18,35	19,23			
	SD	7,14	17,79	7,23	10,21			
	SE	2,26	5,63	2,29	3,23			
	1	19,71	11,27	12,43	13,63	14,26	3,76	1,19
	2	14,75	13,25	15,5	5,33	12,21	4,68	1,48
	3	13,62	5,75	14,84	15,32	12,38	4,48	1,42
	4	25,03	16	14,46	6,73	15,56	7,51	2,38
5	5	15,62	14,97	21,67	11,18	15,86	4,34	1,37
	6	16,42	7,11	14,13	29,69	16,84	9,44	2,99
	7	28,2	23,71	14,36	7,66	18,48	9,24	2,92
	8	17,7	12,5	12,5	13,1	13,95	2,52	0,80
	9	13,5	40	17,2	22,2	23,23	11,74	3,71
	10	23,9	8,5	17,4	15,9	16,43	6,32	2,00
	rerata	18,85	15,31	15,45	14,07	15,92	2,05	0,65
	SD	5,19	10,08	2,74	7,42			
	SE	1,64	3,19	0,87	2,35			

**4. Data waktu latensi *acquisition trial* kelompok E100 pada uji Morris
*water maze***

HARI	TIKUS	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		WAKTU	WAKTU	WAKTU	WAKTU			
1	1	31,96	30,04	8,56	59,92	32,62	21,07	6,67
	2	19,26	35,00	24,34	21,90	25,13	6,90	2,18
	3	28,49	34,82	24,98	19,64	26,98	6,37	2,01
	4	45,39	26,37	15,03	8,49	23,82	16,17	5,12
	5	45,42	30,52	26,72	25,27	31,98	9,23	2,92
	6	45,14	38,69	29,79	33,37	36,75	6,68	2,12
	7	31,10	60,00	60,00	60,00	52,78	14,45	4,57
	8	54,30	60,00	60,00	60,00	58,58	2,85	0,90
	9	23,20	47,75	38,19	15,75	31,22	14,44	4,57
	10	40,80	43,00	60,00	12,38	39,05	19,74	6,25
	rerata	36,51	40,62	34,76	31,67			
	SD	11,34	11,99	19,13	20,68			
	SE	3,59	3,79	6,05	6,55			
2	1	34,35	19,58	25,29	24,13	25,84	6,19	1,96
	2	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00	0,00	0,00
	3	27,83	37,24	27,93	18,76	27,94	7,54	2,39
	4	27,05	18,11	10,32	6,22	15,43	9,19	2,91
	5	11,96	44,55	21,98	31,48	27,49	13,89	4,39
	6	28,19	10,56	30,16	8,23	19,29	11,49	3,64
	7	60,00	25,33	44,19	32,71	40,56	15,11	4,78
	8	31,10	13,40	41,30	31,50	29,33	11,62	3,68
	9	19,60	32,90	25,40	44,20	30,53	10,62	3,36
	10	13,60	23,10	16,20	19,10	18,00	4,08	1,29
	rerata	31,37	28,48	30,28	27,63			
	SD	16,74	15,36	14,60	16,25			
	SE	5,30	4,86	4,62	5,14			
3	1	28,72	14,27	27,18	14,13	21,08	7,96	2,52
	2	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00	0,00	0,00
	3	5,65	25,08	18,65	13,00	15,60	8,27	2,62
	4	10,34	19,48	38,39	25,43	23,41	11,76	3,72
	5	16,44	2,11	12,98	16,92	12,11	6,90	2,18
	6	25,23	23,49	21,65	23,36	23,43	1,46	0,46
	7	60,00	17,22	21,54	23,87	30,66	19,75	6,25
	8	16,50	54,60	31,00	60,00	40,53	20,37	6,45
	9	24,20	16,50	27,70	28,80	24,30	5,56	1,76
	10	18,20	27,20	15,60	10,90	17,98	6,85	2,17
	rerata	26,53	26,00	27,47	27,64			
	SD	18,92	17,95	13,69	18,03			

	SE	5,99	5,68	4,33	5,71			
4	1	48,87	21,86	51,22	38,18	40,03	13,38	4,23
	2	50,00	60,00	60,00	60,00	57,50	5,00	1,58
	3	28,64	22,27	15,34	9,36	18,90	8,36	2,65
	4	36,49	7,86	16,72	15,48	19,14	12,21	3,87
	5	29,25	12,27	16,93	15,87	18,58	7,39	2,34
	6	30,00	46,90	3,42	35,82	29,04	18,46	5,84
	7	38,70	19,03	30,66	17,40	26,45	10,08	3,19
	8	12,60	17,90	16,10	28,20	18,70	6,70	2,12
	9	5,70	3,60	17,10	15,00	10,35	6,69	2,12
	10	41,00	41,00	41,30	29,30	38,15	5,90	1,87
	rerata	32,13	25,27	26,88	26,46			
	SD	14,32	18,19	18,29	15,27			
	SE	4,53	5,76	5,79	4,83			
5	1	23,80	37,44	8,72	27,90	24,47	11,95	3,78
	2	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00	0,00	0,00
	3	24,22	26,94	15,15	37,45	25,94	9,18	2,91
	4	5,07	17,72	23,79	13,54	15,03	7,86	2,49
	5	60,00	18,41	23,54	1,89	25,96	24,50	7,75
	6	10,43	26,47	25,31	12,58	18,70	8,36	2,65
	7	41,74	29,28	25,03	31,53	31,90	7,10	2,25
	8	19,30	27,40	24,90	28,50	25,03	4,10	1,30
	9	6,00	24,70	13,30	27,80	17,95	10,12	3,20
	10	6,10	17,90	15,00	6,80	11,45	5,90	1,87
	rerata	25,67	28,63	23,47	24,80			
	SD	21,31	12,58	14,16	17,00			
	SE	6,74	3,98	4,48	5,38			

5. Data waktu latensi *acquisition trial* kelompok E200 pada uji Morris *water maze*

HARI	TIKUS	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		WAKTU	WAKTU	WAKTU	WAKTU			
1	1	24,53	9,69	10,92	11,70	14,21	6,93	2,19
	2	21,47	13,27	11,08	9,65	13,87	5,28	1,67
	3	31,27	8,69	15,82	16,01	17,95	9,51	3,01
	4	40,00	28,20	41,10	21,40	32,68	9,52	3,01
	5	33,95	38,33	26,78	25,59	31,16	6,04	1,91
	6	42,04	25,07	28,33	30,34	31,45	7,39	2,34
	7	60,00	41,28	43,35	29,53	43,54	12,55	3,97
	8	42,02	60,00	17,10	40,00	39,03	21,47	6,79
	9	36,60	24,97	13,50	40,00	28,77	12,04	3,81
	10	25,20	29,30	32,10	48,10	33,68	10,03	3,17
	Rerata	35,01	27,88	24,01	27,23	28,53	4,64	1,47
	SD	11,76	15,82	12,12	12,86			
	SE	3,72	5,01	3,83	4,07			
2	1	9,16	5,35	10,23	9,06	8,45	2,13	0,68
	2	21,00	3,30	24,58	6,48	13,84	10,52	3,33
	3	8,02	2,45	3,06	28,74	10,57	12,37	3,91
	4	45,10	34,10	40,00	15,60	33,70	12,88	4,07
	5	8,07	12,99	6,69	5,11	8,22	3,41	1,08
	6	3,80	16,90	60,00	49,79	32,62	26,60	8,42
	7	60,00	59,75	15,04	44,28	44,77	21,14	6,69
	8	60,00	47,80	6,90	10,50	31,30	26,61	8,42
	9	37,80	28,90	32,70	4,00	25,85	15,02	4,75
	10	16,10	14,80	26,80	19,70	19,35	5,38	1,70
	Rerata	26,91	22,63	22,60	19,33			
	SD	21,99	19,58	18,00	16,46			
	SE	6,96	6,19	5,70	5,21			
3	1	4,51	26,15	29,95	6,54	16,79	13,12	4,15
	2	5,32	31,72	6,56	9,29	13,22	12,44	3,94
	3	8,69	9,20	11,41	2,20	7,88	3,96	1,25
	4	8,90	30,00	28,90	40,90	27,18	13,33	4,22
	5	41,67	6,59	17,40	6,76	18,11	16,50	5,22
	6	15,05	35,16	6,02	9,74	16,49	12,98	4,11
	7	40,00	19,57	18,75	33,79	28,03	10,55	3,34
	8	14,80	25,00	42,60	14,70	24,28	13,14	4,16
	9	29,80	11,20	13,31	42,00	24,08	14,56	4,61
	10	36,80	13,30	6,00	13,60	17,43	13,39	4,24
	Rerata	20,55	20,79	18,09	17,95			
	SD	14,92	10,23	12,25	15,02			

	SE	4,72	3,24	3,88	4,75			
	1	18,90	15,12	4,13	13,65	12,95	6,28	1,99
	2	40,00	11,88	21,87	25,14	24,72	11,64	3,68
	3	6,21	31,09	11,72	20,61	17,41	10,88	3,44
	4	22,20	27,30	8,70	16,90	18,78	7,95	2,51
4	5	24,59	16,07	7,06	8,00	13,93	8,18	2,59
	6	13,56	14,51	60,00	34,75	30,71	21,84	6,91
	7	20,00	18,46	19,51	16,62	18,65	1,50	0,47
	8	14,70	15,50	14,70	16,10	15,25	0,68	0,22
	9	11,00	11,50	19,80	22,80	16,28	5,93	1,88
	10	38,40	22,60	19,30	9,70	22,50	11,93	3,77
	Rerata	20,96	18,40	18,68	18,43			
	SD	11,04	6,56	15,74	7,85			
	SE	3,49	2,08	4,98	2,48			
	1	12,57	19,66	19,10	7,10	14,61	5,95	1,88
	2	11,25	6,06	11,00	15,31	10,91	3,79	1,20
	3	8,04	12,19	20,18	12,31	13,18	5,07	1,60
	4	27,50	23,80	20,70	3,90	18,98	10,43	3,30
5	5	32,32	25,36	3,75	10,29	17,93	13,19	4,17
	6	17,96	10,56	12,21	5,60	11,58	5,10	1,61
	7	19,95	29,32	30,76	8,37	22,10	10,33	3,27
	8	5,00	4,10	3,75	3,90	4,19	0,56	0,18
	9	23,50	15,20	10,40	3,40	13,13	8,44	2,67
	10	39,50	15,20	4,50	11,10	17,58	15,27	4,83
	Rerata	19,76	16,15	13,64	8,13			
	SD	11,08	8,33	8,91	4,06			
	SE	3,50	2,64	2,82	1,28			

6. Data waktu latensi *acquisition trial* kelompok E300 pada uji Morris *water maze*

HAR I	TIKU S	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		WAKT U	WAKT U	WAKT U	WAKTU			
1	1	60,00	24,80	48,56	31,89	41,31	15,95	5,05
	2	20,79	38,29	20,19	28,39	26,92	8,45	2,67
	3	20,49	60,00	35,27	28,57	36,08	17,05	5,40
	4	38,54	45,13	30,38	30,02	36,02	7,24	2,29
	5	20,10	21,55	40,00	38,16	29,95	10,58	3,35
	6	48,82	31,69	28,29	35,73	36,13	8,99	2,84
	7	24,80	37,43	35,60	47,84	36,42	9,44	2,99
	8	33,80	40,00	40,00	53,50	41,83	8,31	2,63
	9	58,30	30,00	40,00	35,40	40,93	12,28	3,89
	10	48,60	59,00	37,10	28,40	43,28	13,35	4,23
	Rerata	37,42	38,79	35,54	35,79			
	SD	15,77	13,01	7,79	8,66			
	SE	4,99	4,12	2,47	2,74			
2	1	52,37	30,92	30,08	30,07	35,86	11,01	3,49
	2	30,06	28,10	24,27	26,93	27,34	2,42	0,77
	3	30,00	21,61	23,82	28,99	26,11	4,04	1,28
	4	11,99	24,51	31,01	26,05	23,39	8,09	2,56
	5	20,00	22,78	32,09	41,47	29,09	9,74	3,08
	6	20,96	21,04	32,28	28,86	25,79	5,70	1,80
	7	30,00	23,75	31,06	32,30	29,28	3,80	1,20
	8	34,90	34,90	22,40	23,30	28,88	6,97	2,20
	9	35,90	38,90	32,20	24,80	32,95	6,09	1,93
	10	60,00	60,00	30,60	16,60	41,80	21,78	6,89
	Rerata	32,62	30,65	28,98	27,94			
	SD	14,52	11,90	3,88	6,44			
	SE	4,59	3,77	1,23	2,04			
3	1	41,87	34,29	60,00	19,26	38,86	16,94	5,36
	2	20,87	27,05	35,37	13,44	24,18	9,31	2,94
	3	57,99	25,10	11,40	14,23	27,18	21,37	6,76
	4	13,64	20,39	26,60	10,99	17,91	7,02	2,22
	5	17,26	37,37	30,44	31,88	29,24	8,53	2,70
	6	19,64	20,29	13,44	13,07	16,61	3,89	1,23
	7	21,45	17,52	14,23	20,57	18,44	3,27	1,04
	8	50,40	31,80	29,00	29,80	35,25	10,17	3,22
	9	36,60	18,70	14,60	22,15	23,01	9,57	3,03
	10	38,90	46,70	60,00	37,60	45,80	10,28	3,25
	Rerata	31,86	27,92	29,51	21,30	27,65	4,53	1,43

	SD	15,36	9,51	18,09	9,07			
	SE	4,86	3,01	5,72	2,87			
	1	25,17	13,20	60,00	10,50	27,22	22,77	7,20
	2	11,90	5,08	14,83	12,13	10,99	4,16	1,31
	3	11,58	35,39	25,40	12,71	21,27	11,31	3,58
	4	12,28	38,02	14,58	48,78	28,42	17,88	5,66
4	5	49,38	31,72	28,62	60,00	42,43	14,86	4,70
	6	34,50	42,95	35,20	12,77	31,36	12,97	4,10
	7	34,01	60,00	23,58	7,64	31,31	21,99	6,96
	8	26,20	12,60	19,80	22,60	20,30	5,76	1,82
	9	39,80	59,40	25,70	34,20	39,78	14,31	4,53
	10	35,80	13,80	10,40	13,90	18,48	11,66	3,69
	Rerata	28,06	31,22	25,81	23,52			
	SD	13,01	19,67	14,10	18,14			
	SE	4,12	6,22	4,46	5,74			
	1	44,11	8,36	14,65	12,20	19,83	16,39	5,19
	2	11,31	12,80	11,65	14,53	12,57	1,45	0,46
	3	17,78	14,18	3,76	7,83	10,89	6,28	1,99
	4	9,39	13,60	22,47	28,83	18,57	8,75	2,77
5	5	16,94	13,88	27,34	5,45	15,90	9,04	2,86
	6	15,69	10,59	10,07	7,83	11,05	3,32	1,05
	7	14,00	19,80	17,26	7,37	14,61	5,38	1,70
	8	35,20	20,80	18,90	26,80	25,43	7,34	2,32
	9	32,90	53,00	31,20	60,00	44,28	14,42	4,56
	10	16,00	14,90	39,40	18,10	22,10	11,61	3,67
	Rerata	21,33	18,19	19,67	18,89	19,52	1,35	0,43
	SD	11,71	12,79	10,70	16,58			
	SE	3,71	4,05	3,39	5,25			

Lampiran 10. Data panjang lintasan (m) *acquisition trial*

1. Data panjang lintasan (m) *acquisition trial* kelompok Kontrol Normal pada uji Morris water maze

HARI	TIKUS	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		JARAK	JARAK	JARAK	JARAK			
1	1	6,27	6,85	3,93	3,16	5,05	1,78	0,56
	2	9,01	3,77	5,58	5,96	6,08	2,17	0,69
	3	2,18	4,00	7,73	2,92	4,21	2,46	0,78
	4	9,78	7,13	2,83	2,98	5,68	3,38	1,07
	5	8,04	4,05	10,23	7,56	7,47	2,56	0,81
	6	3,65	3,50	2,90	4,90	3,74	0,84	0,27
	7	3,04	6,71	8,69	4,80	5,81	2,44	0,77
	8	5,68	5,00	9,89	5,30	6,47	2,30	0,73
	9	4,65	4,50	2,90	4,90	4,24	0,91	0,29
	10	3,04	6,71	8,69	4,80	5,81	2,44	0,77
	rerata	5,53	5,22	6,34	4,73	5,46	0,67	0,21
	SD	2,69	1,46	3,04	1,44			
	SE	0,85	0,46	0,96	0,46			
2	1	5,23	0,52	5,68	8,45	4,97	3,29	1,04
	2	1,72	7,49	4,98	1,83	4,00	2,77	0,88
	3	3,69	4,56	3,67	3,00	3,73	0,64	0,20
	4	2,91	2,90	2,97	3,33	3,03	0,20	0,06
	5	4,95	3,59	3,83	5,65	4,50	0,96	0,30
	6	3,82	6,61	5,76	4,44	5,16	1,26	0,40
	7	9,47	7,62	4,17	2,61	5,97	3,14	0,99
	8	3,46	3,86	3,03	2,90	3,31	0,44	0,14
	9	3,87	3,00	2,80	2,50	3,04	0,59	0,19
	10	7,90	4,45	3,20	3,38	4,73	2,18	0,69
	rerata	4,70	4,46	4,01	3,81			
	SD	2,34	2,24	1,11	1,95			
	SE	0,74	0,71	0,35	0,62			
3	1	0,49	9,48	3,30	2,07	3,84	3,94	1,25
	2	6,06	2,96	1,52	2,25	3,20	2,00	0,63
	3	7,66	4,25	3,65	3,83	4,85	1,89	0,60
	4	1,45	1,02	4,78	2,56	2,45	1,68	0,53
	5	7,99	6,41	6,32	5,41	6,53	1,07	0,34
	6	4,44	3,78	2,36	2,64	3,30	0,97	0,31
	7	1,16	2,59	2,65	2,76	2,29	0,76	0,24
	8	3,69	1,20	3,51	4,15	3,14	1,32	0,42
	9	3,22	2,80	3,65	3,09	3,19	0,35	0,11
	10	2,97	2,50	2,97	3,23	2,92	0,30	0,10

	rerata	3,91	3,70	3,47	3,20			
	SD	2,63	2,55	1,33	1,01			
	SE	0,83	0,81	0,42	0,32			
4	1	2,06	2,77	4,17	3,25	3,06	0,88	0,28
	2	1,90	2,27	2,55	2,41	2,28	0,28	0,09
	3	1,15	2,48	2,82	2,46	2,23	0,74	0,23
	4	2,98	1,61	3,78	2,80	2,79	0,90	0,28
	5	9,31	6,44	5,68	3,88	6,32	2,26	0,71
	6	2,12	2,17	2,24	2,82	2,34	0,33	0,10
	7	3,59	3,77	2,62	4,86	3,71	0,92	0,29
	8	2,55	2,99	2,53	2,05	2,53	0,38	0,12
	9	2,29	2,90	2,34	2,18	2,43	0,32	0,10
	10	4,93	3,06	2,00	1,34	2,83	1,57	0,50
	rerata	3,29	3,05	3,07	2,80			
	SD	2,36	1,33	1,14	1,00			
	SE	0,75	0,42	0,36	0,32			
5	1	3,93	2,61	1,58	1,99	2,53	1,03	0,32
	2	1,10	0,78	1,38	2,42	1,42	0,71	0,22
	3	2,14	1,72	0,86	4,45	2,29	1,53	0,49
	4	2,98	0,84	4,94	3,43	3,05	1,70	0,54
	5	8,21	1,98	9,29	4,32	5,95	3,40	1,08
	6	1,45	0,54	0,48	2,17	1,16	0,81	0,26
	7	1,41	2,00	3,06	2,06	2,13	0,69	0,22
	8	3,45	1,48	0,90	1,02	1,71	1,19	0,38
	9	0,61	8,69	1,17	0,51	2,75	3,97	1,26
	10	1,50	6,75	3,04	1,78	3,27	2,42	0,76
	rerata	2,68	2,74	2,67	2,42			
	SD	2,22	2,74	2,70	1,30			
	SE	0,70	0,87	0,85	0,41			

2. Data panjang lintasan (m) *acquisition trial* kelompok Kontrol Sakit pada uji Morris *water maze*

HARI	TIKUS	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		JARAK	JARAK	JARAK	JARAK			
1	1	8,04	4,65	5,68	7,57	6,49	1,59	0,50
	2	5,43	4,45	9,37	7,54	6,70	2,20	0,70
	3	5,00	4,80	4,24	5,11	4,79	0,39	0,12
	4	9,61	7,45	2,55	5,65	6,31	2,99	0,95
	5	5,54	5,55	5,66	3,36	5,03	1,11	0,35
	6	5,49	6,12	4,89	7,84	6,09	1,27	0,40
	7	3,36	4,55	4,55	5,59	4,51	0,91	0,29
	8	3,48	5,40	6,59	3,65	4,78	1,49	0,47
	9	2,96	7,51	4,33	5,23	5,01	1,91	0,60
	10	5,68	6,45	5,56	4,06	5,44	1,00	0,32
	rerata	5,46	5,69	5,34	5,56	5,51	0,15	0,05
	SD	2,08	1,15	1,79	1,64			
	SE	0,66	0,37	0,57	0,52			
2	1	0,34	5,24	3,97	3,23	3,20	2,08	0,66
	2	3,38	4,35	0,48	0,73	2,23	1,93	0,61
	3	10,56	5,87	1,65	0,44	4,63	4,59	1,45
	4	10,99	1,26	10,71	9,77	8,18	4,64	1,47
	5	12,07	9,72	2,38	4,15	7,08	4,57	1,44
	6	5,00	2,70	6,25	3,11	4,27	1,66	0,53
	7	9,61	11,59	10,57	10,81	10,65	0,82	0,26
	8	3,55	7,61	2,69	0,37	3,56	3,02	0,96
	9	11,43	7,43	2,19	13,65	8,68	5,03	1,59
	10	2,45	5,10	9,40	11,37	7,08	4,05	1,28
	rerata	6,94	6,09	5,03	5,76			
	SD	4,41	3,11	3,91	5,10			
	SE	1,39	0,98	1,24	1,61			
3	1	5,27	1,20	2,55	1,44	2,62	1,86	0,59
	2	4,52	3,34	2,03	2,39	3,07	1,11	0,35
	3	1,57	4,17	2,81	3,51	3,02	1,11	0,35
	4	3,84	4,47	10,35	10,09	7,19	3,51	1,11
	5	4,28	4,71	1,18	0,64	2,70	2,09	0,66
	6	11,71	10,98	1,19	3,98	6,97	5,19	1,64
	7	13,45	5,33	9,51	3,99	8,07	4,29	1,36
	8	8,50	4,98	7,30	11,64	8,11	2,77	0,88
	9	9,45	5,66	14,29	11,27	10,17	3,61	1,14
	10	7,88	5,32	11,90	10,98	9,02	3,01	0,95
	rerata	7,05	5,02	6,31	5,99			
	SD	3,78	2,46	4,94	4,45			

	SE	1,20	0,78	1,56	1,41			
	1	4,88	9,53	11,01	4,30	7,43	3,34	1,06
	2	4,63	1,86	4,12	13,18	5,95	4,97	1,57
	3	2,63	2,17	3,39	3,16	2,84	0,55	0,17
	4	5,59	2,29	11,64	4,71	6,06	3,97	1,26
4	5	5,57	4,39	5,77	6,67	5,60	0,94	0,30
	6	12,07	9,75	2,39	4,17	7,10	4,56	1,44
	7	10,99	8,26	3,73	9,79	8,19	3,18	1,01
	8	3,39	4,36	5,50	3,72	4,24	0,93	0,29
	9	11,74	10,49	9,20	4,19	8,91	3,31	1,05
	10	4,34	5,26	5,98	3,24	4,71	1,19	0,38
	rerata	6,58	5,84	6,27	5,71			
	SD	3,59	3,38	3,25	3,29			
	SE	1,13	1,07	1,03	1,04			
	1	7,90	4,21	6,64	5,04	5,95	1,65	0,52
	2	6,79	10,99	12,90	5,68	9,09	3,42	1,08
	3	1,16	1,48	0,86	6,79	2,57	2,82	0,89
	4	6,13	4,05	4,42	10,59	6,30	3,00	0,95
5	5	4,46	12,85	10,30	4,55	8,04	4,21	1,33
	6	10,40	7,87	13,34	6,42	9,51	3,04	0,96
	7	10,68	7,78	3,99	6,08	7,13	2,83	0,89
	8	8,25	12,70	1,29	2,03	6,07	5,41	1,71
	9	6,56	5,69	10,58	10,66	8,37	2,62	0,83
	10	10,65	3,53	9,87	14,52	9,64	4,55	1,44
	rerata	7,30	7,12	7,42	7,24			
	SD	3,01	4,01	4,61	3,65			
	SE	0,95	1,27	1,46	1,15			

3. Data panjang lintasan (m) *acquisition trial* kelompok Kontrol Positif pada uji Morris water maze

HARI	No.	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		JARAK	JARAK	JARAK	JARAK			
1	1	5,54	6,40	2,85	5,48	5,07	1,54	0,49
	2	6,08	4,62	2,06	4,35	4,28	1,66	0,53
	3	3,04	3,07	5,78	3,46	3,84	1,31	0,41
	4	8,32	4,55	3,46	5,30	5,41	2,08	0,66
	5	5,45	4,96	5,43	3,65	4,87	0,85	0,27
	6	3,77	4,54	4,43	3,76	4,13	0,42	0,13
	7	8,65	4,56	3,03	4,92	5,29	2,39	0,75
	8	2,43	3,62	5,94	4,19	4,05	1,46	0,46
	9	3,39	4,07	5,04	3,82	4,08	0,70	0,22
	10	8,99	7,70	5,33	3,53	6,39	2,43	0,77
rerata		5,57	4,81	4,34	4,25			
SD		2,43	1,34	1,38	0,74			
SE		0,77	0,42	0,44	0,24			
2	1	4,57	3,87	1,73	5,35	3,88	1,56	0,49
	2	3,18	3,03	1,67	3,34	2,80	0,76	0,24
	3	4,77	3,80	1,66	1,25	2,87	1,69	0,54
	4	2,22	5,21	2,75	2,44	3,15	1,39	0,44
	5	3,27	3,82	2,83	2,36	3,07	0,62	0,20
	6	6,14	4,22	1,55	1,90	3,45	2,15	0,68
	7	4,69	2,44	1,34	1,03	2,37	1,66	0,52
	8	7,87	5,32	6,11	0,80	5,03	3,01	0,95
	9	6,59	2,95	5,23	11,54	6,58	3,63	1,15
	10	2,69	6,10	5,33	6,14	5,07	1,63	0,51
rerata		4,60	4,08	3,02	3,61			
SD		1,83	1,16	1,83	3,31			
SE		0,58	0,37	0,58	1,05			
3	1	6,91	1,13	10,13	2,06	5,06	4,22	1,34
	2	6,70	3,49	1,77	3,60	3,89	2,06	0,65
	3	1,07	0,99	1,91	2,75	1,68	0,83	0,26
	4	7,74	9,52	1,72	5,09	6,02	3,39	1,07
	5	2,41	2,64	3,11	2,82	2,75	0,29	0,09
	6	1,01	1,00	1,42	2,73	1,54	0,82	0,26
	7	1,33	1,76	1,11	3,17	1,84	0,93	0,29
	8	5,58	1,02	1,63	3,70	2,98	2,08	0,66
	9	1,74	8,19	4,37	3,39	4,42	2,74	0,87
	10	2,31	2,24	3,93	2,34	2,71	0,82	0,26
rerata		3,68	3,20	3,11	3,17			

	SD	2,71	3,11	2,70	0,86			
	SE	0,86	0,98	0,86	0,27			
	1	4,32	1,05	4,25	2,87	3,12	1,53	0,49
	2	1,87	1,13	3,19	1,61	1,95	0,88	0,28
	3	1,76	1,20	2,19	2,53	1,92	0,57	0,18
	4	1,04	1,91	3,07	2,17	2,05	0,83	0,26
4	5	12,64	11,10	3,57	4,26	7,89	4,64	1,47
	6	1,73	1,91	3,30	4,72	2,92	1,39	0,44
	7	1,70	1,93	3,04	3,57	2,56	0,89	0,28
	8	1,62	6,04	5,40	4,35	4,35	1,95	0,62
	9	4,84	4,46	1,01	2,10	3,10	1,85	0,58
	10	2,14	1,81	1,57	1,24	1,69	0,38	0,12
	rerata	3,37	3,25	3,06	2,94			
	SD	3,49	3,19	1,27	1,22			
	SE	1,10	1,01	0,40	0,39			
	1	1,65	1,23	0,62	0,91	1,10	0,44	0,14
	2	0,92	1,34	1,24	1,00	1,12	0,20	0,06
	3	0,68	1,77	1,77	0,93	1,29	0,56	0,18
	4	0,79	1,31	1,79	1,43	1,33	0,41	0,13
5	5	3,50	3,00	4,65	2,03	3,29	1,09	0,34
	6	1,19	1,24	1,78	4,67	2,22	1,66	0,52
	7	1,68	0,62	2,80	1,72	1,71	0,89	0,28
	8	4,24	0,88	2,90	3,76	2,95	1,48	0,47
	9	4,02	11,22	5,35	3,43	6,01	3,57	1,13
	10	5,76	2,41	1,60	4,26	3,51	1,87	0,59
	rerata	2,44	2,50	2,45	2,42			
	SD	1,79	3,14	1,51	1,47			
	SE	0,57	0,99	0,48	0,46			

4. Data panjang lintasan (m) *acquisition trial* kelompok E100 pada uji Morris water maze

HARI	TIKUS	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		JARAK	JARAK	JARAK	JARAK			
1	1	4,42	3,89	4,46	7,79	5,14	1,78	0,56
	2	6,33	4,48	9,02	8,17	7,00	2,02	0,64
	3	3,86	4,43	3,22	2,10	3,40	1,00	0,32
	4	4,12	3,90	4,83	3,07	3,98	0,72	0,23
	5	3,52	4,15	4,07	2,81	3,64	0,61	0,19
	6	4,50	4,79	4,32	3,39	4,25	0,60	0,19
	7	5,16	3,18	6,84	1,81	4,25	2,21	0,70
	8	7,48	6,78	3,44	7,28	6,25	1,89	0,60
	9	6,53	5,92	8,00	3,36	5,95	1,94	0,61
	10	5,66	4,89	3,15	3,88	4,40	1,10	0,35
	Rerata	5,16	4,64	5,13	4,37			
	SD	1,30	1,05	2,08	2,42			
	SE	0,41	0,33	0,66	0,77			
2	1	6,15	3,35	2,99	0,78	3,32	2,20	0,70
	2	7,57	7,34	4,89	6,66	6,61	1,21	0,38
	3	2,59	5,95	3,56	2,86	3,74	1,53	0,48
	4	1,06	2,23	5,26	2,42	2,74	1,78	0,56
	5	1,76	6,05	6,77	4,94	4,88	2,21	0,70
	6	4,84	2,14	1,65	1,89	2,63	1,48	0,47
	7	7,05	2,58	2,66	1,90	3,55	2,36	0,75
	8	2,51	2,94	3,98	6,51	3,99	1,79	0,57
	9	3,65	4,97	4,13	7,30	5,01	1,62	0,51
	10	3,25	5,60	3,99	5,56	4,60	1,17	0,37
	Rerata	4,04	4,32	3,99	4,08			
	SD	2,26	1,88	1,44	2,37			
	SE	0,71	0,59	0,45	0,75			
3	1	1,56	1,25	0,94	0,61	1,09	0,41	0,13
	2	9,51	10,55	9,58	7,10	9,18	1,47	0,47
	3	3,74	2,42	2,47	1,92	2,64	0,78	0,25
	4	1,68	1,31	4,78	0,45	2,06	1,89	0,60
	5	2,55	0,17	2,40	1,95	1,77	1,09	0,35
	6	4,25	3,15	2,35	2,12	2,97	0,96	0,30
	7	7,08	1,77	4,17	2,39	3,85	2,38	0,75
	8	4,03	11,94	1,59	12,48	7,51	5,52	1,75
	9	4,54	1,97	1,49	1,20	2,30	1,53	0,48
	10	2,24	1,56	3,66	2,84	2,58	0,89	0,28
	Rerata	4,12	3,61	3,34	3,31			
	SD	2,51	4,11	2,51	3,72			

	SE	0,79	1,30	0,79	1,18			
	1	1,27	2,51	6,06	1,27	2,78	2,27	0,72
	2	7,24	7,81	6,10	6,93	7,02	0,72	0,23
	3	4,18	4,85	1,89	2,60	3,38	1,37	0,43
	4	4,63	1,02	2,18	2,91	2,69	1,51	0,48
4	5	3,47	1,19	2,76	2,03	2,36	0,98	0,31
	6	5,48	6,17	2,34	2,59	4,14	1,96	0,62
	7	3,96	3,10	3,25	2,76	3,27	0,50	0,16
	8	2,81	4,32	4,48	6,50	4,53	1,52	0,48
	9	1,10	0,84	3,37	3,92	2,31	1,56	0,50
	10	10,15	8,41	8,43	2,43	7,36	3,38	1,07
	rerata	4,43	4,02	4,08	3,39	3,98	0,43	0,14
	SD	2,72	2,77	2,15	1,87			
	SE	0,86	0,88	0,68	0,59			
	1	4,77	0,86	1,71	2,65	2,50	1,68	0,53
	2	7,74	9,88	9,05	9,58	9,06	0,95	0,30
	3	2,87	1,44	0,77	0,68	1,44	1,01	0,32
	4	1,00	1,25	0,48	2,29	1,25	0,76	0,24
5	5	6,91	4,27	1,71	0,17	3,27	2,96	0,94
	6	2,03	1,07	1,10	2,96	1,79	0,90	0,28
	7	6,98	5,39	4,49	2,35	4,80	1,93	0,61
	8	4,73	6,32	6,20	4,40	5,41	0,99	0,31
	9	1,33	7,24	0,93	7,55	4,26	3,62	1,15
	10	1,76	1,46	0,87	1,65	1,44	0,40	0,13
	Rerata	4,01	3,92	2,73	3,43			
	SD	2,55	3,19	2,89	2,99			
	SE	0,81	1,01	0,92	0,95			

5. Data panjang lintasan (m) *acquisition trial* kelompok E200 pada uji Morris water maze

HAR I	TIKUS	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		JARAK	JARAK	JARAK	JARAK			
1	1	3,68	4,19	5,79	3,79	4,36	0,98	0,31
	2	2,72	2,35	3,86	1,78	2,68	0,88	0,28
	3	4,36	3,06	3,27	2,06	3,18	0,94	0,30
	4	5,49	6,06	2,43	3,91	4,47	1,64	0,52
	5	5,73	2,96	4,35	1,75	3,70	1,72	0,55
	6	8,52	6,31	3,32	1,65	4,95	3,06	0,97
	7	5,11	3,81	7,75	2,02	4,67	2,41	0,76
	8	4,89	9,91	3,37	9,59	6,94	3,31	1,05
	9	8,79	5,89	2,90	12,33	7,48	4,03	1,28
	10	3,59	6,20	5,67	4,92	5,10	1,13	0,36
	Rerata	5,29	5,07	4,27	4,38			
	SD	2,00	2,26	1,65	3,70			
	SE	0,63	0,72	0,52	1,17			
2	1	4,23	4,99	1,74	1,29	3,06	1,82	0,58
	2	2,20	2,49	3,32	1,02	2,26	0,95	0,30
	3	5,62	2,26	2,50	3,97	3,59	1,55	0,49
	4	1,36	4,49	2,66	3,19	2,92	1,30	0,41
	5	2,38	3,81	6,52	7,50	5,05	2,37	0,75
	6	4,90	2,25	2,17	6,64	3,99	2,18	0,69
	7	5,75	2,69	6,59	3,09	5,53	3,64	1,15
	8	13,39	10,66	1,93	3,82	7,45	5,45	1,73
	9	8,61	5,54	8,13	3,98	6,57	2,19	0,69
	10	1,06	2,78	6,89	3,09	3,46	2,46	0,78
	Rerata	4,95	4,20	4,24	3,76			
	SD	3,78	2,56	2,47	2,03			
	SE	1,20	0,81	0,78	0,64			
3	1	5,34	2,28	3,26	4,56	3,86	1,36	0,43
	2	1,96	4,28	1,12	1,07	2,11	1,51	0,48
	3	4,90	1,90	0,17	3,34	2,58	2,02	0,64
	4	4,32	1,56	1,31	1,15	2,09	1,50	0,48
	5	1,54	3,70	0,97	1,83	2,01	1,18	0,37
	6	2,78	1,60	0,17	1,24	1,45	1,08	0,34
	7	6,80	13,75	1,85	7,69	7,52	4,88	1,55
	8	3,44	5,62	8,69	4,82	5,64	2,22	0,70
	9	6,82	2,10	7,00	3,66	4,90	2,41	0,76
	10	5,31	8,11	1,68	5,71	5,20	2,65	0,84
	Rerata	4,32	4,49	2,62	3,51			

	SD	1,86	3,87	2,92	2,23			
	SE	0,59	1,23	0,92	0,71			
	1	2,77	0,63	4,73	1,42	2,39	1,79	0,57
	2	4,58	1,76	2,58	3,60	3,13	1,23	0,39
	3	0,67	4,10	1,91	5,83	3,13	2,30	0,73
	4	2,43	2,17	1,23	1,31	1,78	0,61	0,19
4	5	1,55	2,35	8,23	5,01	4,28	3,02	0,95
	6	5,33	4,41	1,77	4,82	4,08	1,59	0,50
	7	3,46	5,80	1,97	2,21	3,36	1,75	0,55
	8	3,48	2,96	2,99	1,53	2,74	0,84	0,27
	9	1,92	5,16	4,41	10,44	5,48	3,58	1,13
	10	6,75	4,74	1,61	1,68	3,70	2,51	0,79
	Rerata	3,29	3,41	3,14	3,78			
	SD	1,85	1,68	2,14	2,88			
	SE	0,58	0,53	0,68	0,91			
	1	2,41	2,96	2,43	1,01	2,20	0,84	0,26
	2	4,93	4,07	2,58	2,22	3,45	1,27	0,40
	3	2,98	2,17	2,59	1,97	2,43	0,45	0,14
	4	3,41	4,03	0,67	1,72	2,46	1,54	0,49
5	5	1,68	5,72	2,56	0,80	2,69	2,14	0,68
	6	2,38	4,35	1,50	1,45	2,42	1,35	0,43
	7	5,19	1,49	2,68	1,92	2,82	1,65	0,52
	8	3,90	2,99	2,24	2,82	2,99	0,69	0,22
	9	4,91	3,36	3,97	3,71	3,99	0,66	0,21
	10	5,94	5,50	5,10	2,88	4,86	1,36	0,43
	Rerata	3,77	3,66	2,63	2,05			
	SD	1,43	1,35	1,21	0,89			
	SE	0,45	0,43	0,38	0,28			

6. Data panjang lintasan (m) *acquisition trial* kelompok E300 pada uji Morris water maze

HARI	TIKUS	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		JARAK	JARAK	JARAK	JARAK			
1	1	5,08	1,76	4,26	4,17	3,82	1,43	0,45
	2	2,36	1,50	3,08	3,17	2,53	0,77	0,24
	3	8,45	6,99	3,49	3,31	5,56	2,57	0,81
	4	4,73	1,58	3,63	3,71	3,41	1,32	0,42
	5	4,88	2,50	6,60	4,96	4,74	1,69	0,53
	6	3,66	4,37	1,83	3,78	3,41	1,10	0,35
	7	6,16	4,33	2,91	3,48	4,22	1,42	0,45
	8	5,99	10,09	8,29	6,63	7,75	1,84	0,58
	9	4,43	10,83	8,02	4,66	6,99	3,04	0,96
	10	7,84	11,34	7,90	5,53	8,15	2,39	0,76
	Rerata	5,36	5,53	5,00	4,34			
	SD	1,83	3,98	2,44	1,11			
	SE	0,58	1,26	0,77	0,35			
2	1	4,03	5,15	4,81	5,40	4,85	0,60	0,19
	2	4,32	4,52	4,78	4,71	4,58	0,21	0,07
	3	5,08	4,52	1,87	3,07	3,63	1,45	0,46
	4	2,30	2,41	4,50	4,23	3,36	1,16	0,37
	5	4,06	3,70	3,71	6,99	4,61	1,59	0,50
	6	3,97	4,42	3,32	4,42	4,03	0,52	0,17
	7	8,52	2,32	1,72	4,59	4,29	3,08	0,97
	8	7,31	1,88	5,36	3,58	4,53	2,33	0,74
	9	8,21	3,86	7,03	4,63	5,93	2,03	0,64
	10	8,01	10,18	4,01	2,89	6,27	3,41	1,08
	rerata	5,58	4,30	4,11	4,45			
	SD	2,22	2,34	1,59	1,18			
	SE	0,70	0,74	0,50	0,37			
3	1	4,17	3,84	8,78	1,67	4,62	2,99	0,95
	2	1,17	2,80	1,23	2,19	1,85	0,79	0,25
	3	6,79	6,38	3,18	3,75	5,02	1,82	0,58
	4	1,79	3,43	3,89	3,64	3,19	0,95	0,30
	5	2,38	4,93	3,39	4,21	3,72	1,10	0,35
	6	3,17	3,27	3,47	3,97	3,47	0,36	0,11
	7	3,15	2,93	1,31	1,94	2,33	0,86	0,27
	8	7,55	2,14	1,95	5,00	4,16	2,66	0,84
	9	1,53	2,26	3,17	4,16	2,78	1,14	0,36
	10	5,67	4,93	2,54	3,49	4,16	1,41	0,45
	rerata	3,74	3,69	3,29	3,40			
	SD	2,25	1,35	2,14	1,10			

	SE	0,71	0,43	0,68	0,35			
	1	1,15	0,75	8,97	2,14	3,25	3,86	1,22
	2	1,85	0,72	3,55	9,08	3,80	3,71	1,17
	3	1,99	5,38	0,32	0,39	2,02	2,37	0,75
	4	1,92	6,28	2,30	7,16	4,41	2,69	0,85
4	5	8,62	6,50	1,77	9,74	6,66	3,53	1,12
	6	1,81	2,43	2,87	0,17	1,82	1,18	0,37
	7	5,94	6,27	4,34	1,41	4,49	2,22	0,70
	8	6,86	2,94	4,20	5,39	4,85	1,67	0,53
	9	7,86	12,09	4,97	6,22	7,79	3,10	0,98
	10	1,16	3,77	2,00	0,87	1,95	1,30	0,41
	rerata	3,92	4,71	3,53	4,26			
	SD	3,02	3,40	2,37	3,69			
	SE	0,96	1,07	0,75	1,17			
	1	7,55	1,33	0,73	0,27	2,47	3,41	1,08
	2	3,26	2,49	2,55	2,56	2,71	0,37	0,12
	3	1,07	1,97	2,63	1,67	1,83	0,65	0,21
	4	5,69	5,64	4,90	5,52	5,44	0,37	0,12
5	5	2,97	2,79	1,25	1,11	2,03	0,99	0,31
	6	1,04	1,17	1,64	1,69	1,38	0,33	0,10
	7	2,73	2,52	2,38	2,94	2,64	0,24	0,08
	8	8,24	6,27	6,34	5,97	6,71	1,04	0,33
	9	7,77	7,10	6,36	5,67	6,73	0,91	0,29
	10	4,13	4,12	10,62	4,79	5,92	3,15	1,00
	rerata	4,45	3,54	3,94	3,22			
	SD	2,71	2,12	3,09	2,10			
	SE	0,86	0,67	0,98	0,66			

Lampiran 11. Data berapa kali tikus berada di target kuadran kelompok Kontrol Normal dan persentase (%) lama waktu di kuadran target pada probe trial uji Morris *water maze*

Kelompok	No. Tikus	brp x	Lama Waktu	%waktu
Kontrol Normal	1	4	10,34	17,23
	2	8	14,56	24,27
	3	6	13,29	22,15
	4	5	8,52	14,20
	5	4	11,53	19,22
	6	6	16,57	27,62
	7	8	24,52	40,87
	8	3	20,42	34,03
	9	6	20,83	34,72
	10	8	17,58	29,30
	Rerata	5,80	15,82	26,36
	SE	0,57	1,62	2,70
Kelompok	No. Tikus	brp x	Lama Waktu	%waktu
Kontrol Sakit	1	3	6,83	11,38
	2	5	10,81	18,02
	3	4	9,04	15,07
	4	2	3,07	5,12
	5	4	12,47	20,78
	6	2	6,73	11,22
	7	3	3,09	5,15
	8	4	4,78	7,97
	9	3	7,52	12,53
	10	2	5,16	8,60
	Rerata	3,20	6,95	11,58
	SE	0,33	0,99	1,65
Kelompok	No. Tikus	brp x	Lama Waktu	%waktu
Kontrol Obat	1	8	15,57	25,95
	2	5	12,64	21,07
	3	5	17,08	28,47
	4	4	9,19	15,32
	5	5	12,12	20,20
	6	7	10,62	17,70
	7	5	24,52	40,87
	8	6	15,87	26,45
	9	5	10,32	17,20
	10	6	14,65	24,42
	Rerata	5,60	14,26	23,76

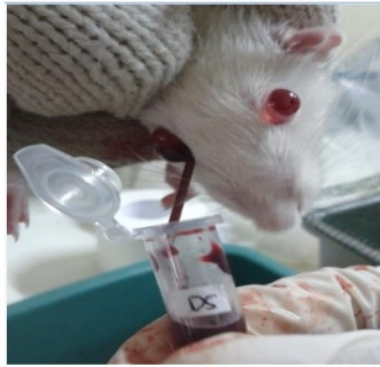
	SE	0,63	1,41	2,35
Kelompok	No. Tikus	brp x	Lama Waktu	%waktu
E100	1	3	19,12	31,87
	2	4	10,87	18,12
	3	5	10,47	17,45
	4	4	7,58	12,63
	5	3	8,50	14,17
	6	3	12,66	21,10
	7	4	10,98	18,30
	8	5	12,59	20,98
	9	4	10,38	17,30
	10	3	6,28	10,47
	Rerata	3,80	10,94	18,24
	SE	0,25	1,12	1,86
Kelompok	No. Tikus	brp x	Lama Waktu	%waktu
E200	1	4	10,14	16,90
	2	5	13,58	22,63
	3	6	9,62	16,03
	4	5	10,27	17,12
	5	5	19,46	32,43
	6	6	17,81	29,68
	7	6	9,56	15,93
	8	4	19,68	32,80
	9	6	16,98	28,30
	10	5	16,28	27,13
	Rerata	5,20	14,34	23,90
	SE	0,25	1,76	2,93
Kelompok	No. Tikus	brp x	Lama Waktu	%waktu
E300	1	4	8,68	14,47
	2	4	7,66	12,77
	3	4	8,89	14,82
	4	3	7,71	12,85
	5	2	4,75	7,92
	6	5	7,41	12,35
	7	3	7,8	13,00
	8	7	14,59	24,32
	9	4	16,79	27,98
	10	4	13,05	21,75
	Rerata	4,00	9,73	16,22
	SE	0,421941	1,71328747	2,86

Lampiran 12. Data waktu latensi (detik) hasil uji sensorimotor

Kelompok	Tikus	TES 1	TES 2	TES 3	TES 4	rerata	SD	SE
		Waktu	Waktu	Waktu	Waktu			
Kontrol Normal	1	24,27	9,68	24,05	12,62	17,66	7,61	2,41
	2	16,7	34,22	12,85	10,04	18,45	10,86	3,44
	3	6,52	3,97	60	30,01	25,13	26,04	8,24
	4	51,71	23,41	27,31	15,86	29,57	15,50	4,91
	5	20,56	17,49	15,69	8,51	15,56	5,11	1,62
	6	42,84	5,76	7,77	8,71	16,27	17,76	5,62
	7	53,47	30,91	37,08	21,44	35,73	13,47	4,26
	8	15,52	13,54	15,78	13,36	14,55	1,28	0,40
	9	10,47	6,87	16,21	13,83	11,85	4,07	1,29
	10	19,82	17,45	9,42	10,47	14,29	5,13	1,62
	rerata	26,19	16,33	22,62	14,49			
	SE	5,09	3,15	4,75	2,00			
Kontrol Sakit	1	17,19	48,59	28,58	1,7	24,02	19,74	6,25
	2	60	60	12,42	60	48,11	23,79	7,53
	3	60	60	60	60	60,00	0,00	0,00
	4	8,06	6,57	5,24	12,1	7,99	2,97	0,94
	5	2,55	6,28	22,3	60	22,78	26,25	8,31
	6	20,42	10,42	9,21	11,02	12,77	5,16	1,63
	7	10,42	12,62	4,18	12,14	9,84	3,89	1,23
	8	9,42	6,52	11,58	9,21	9,18	2,07	0,66
	9	9,21	7,42	5,79	4,09	6,63	2,19	0,69
	10	8,23	6,78	9,41	9,56	8,50	1,29	0,41
	rerata	20,55	22,52	16,87	23,98			
	SE	6,76	7,45	5,39	7,94			
Kontrol Obat	1	27,64	17,8	32,99	12,26	22,67	9,37	2,96
	2	23,61	27,4	18,17	10,6	19,95	7,29	2,31
	3	29,2	25,14	29,88	1,84	21,52	13,28	4,20
	4	29,46	11,76	7,13	6,99	13,84	10,65	3,37
	5	1,96	31,37	5,15	7,43	11,48	13,45	4,26
	6	23,67	18,1	3,93	29,14	18,71	10,84	3,43
	7	11,7	9,01	15,25	2,19	9,54	5,52	1,75
	8	28,4	17,15	14	6,52	16,52	9,09	2,88
	9	39,88	11,56	18,3	7,8	19,39	14,34	4,54
	10	29,42	18,17	5,98	10,48	16,01	10,26	3,25
	Rerata	24,49	18,75	15,08	9,53			
	SE	3,35	2,30	3,22	2,43			
E100	1	3,19	8,08	16,45	14,46	10,55	6,07	1,92
	2	60	60	60	60	60,00	0,00	0,00
	3	4,51	2,6	10,24	5,36	5,68	3,25	1,03

4	29,31	2,73	15,69	10,78	14,63	11,15	3,53	
5	18,77	60	1,44	6,77	21,75	26,51	8,39	
6	7,87	7,6	15,52	3,39	8,60	5,05	1,60	
7	13,94	32,15	13,56	8,24	16,97	10,45	3,31	
8	8,64	22,23	10,91	8,71	12,62	6,49	2,05	
9	34,65	26,4	24,72	12,78	24,64	9,02	2,85	
10	23,26	32,4	24,5	14,79	23,74	7,21	2,28	
rerata	20,41	25,42	19,30	14,53				
SE	5,53	6,80	5,01	5,20				
<hr/>								
E200	1	11,34	48,57	7,33	1,42	17,17	21,33	6,75
	2	2,06	7,85	11,43	2,84	6,05	4,41	1,40
	3	27,22	11,26	4,55	3,15	11,55	11,03	3,49
	4	27,63	14,38	1,27	49,92	23,30	20,75	6,57
	5	19,45	17,12	11,59	15,55	15,93	3,31	1,05
	6	25,27	4,02	31,69	16,64	19,41	11,97	3,79
	7	39,9	14,87	3,74	17,38	18,97	15,16	4,80
	8	20,64	4,2	14,95	11,07	12,72	6,90	2,18
	9	30,52	23,87	20,65	15,09	22,53	6,44	2,04
	10	31,07	25,16	10,09	9,32	18,91	10,90	3,45
rerata	23,51	17,13	11,73	14,24				
SE	3,40	4,18	2,86	4,40				
<hr/>								
E300	1	59,8	14,2	60	1,67	33,92	30,44	9,63
	2	14,81	13,16	10,78	11,7	12,61	1,76	0,56
	3	28,97	19,02	11,43	8,08	16,88	9,27	2,93
	4	60	6,17	7,84	3,49	19,38	27,14	8,59
	5	45,27	5,6	15,03	5,83	17,93	18,75	5,93
	6	3,47	19,28	7,73	10,86	10,34	6,69	2,12
	7	13,2	8,22	10,47	5,98	9,47	3,09	0,98
	8	27,35	20,1	17	10,98	18,86	6,81	2,16
	9	34,27	33,2	60	30,25	39,43	13,82	4,37
	10	20,45	13,5	22,45	14,9	17,83	4,30	1,36
rerata	30,76	15,25	22,27	10,37				
SE	6,10	2,60	6,44	2,55				

Lampiran 13. Foto pengambilan darah pada hewan uji



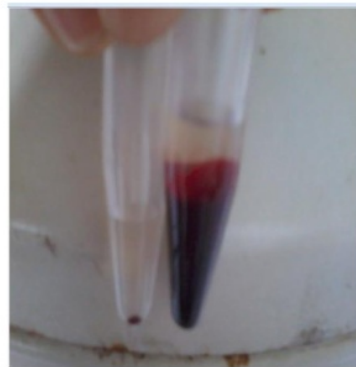
Pengambilan darah melalui sinus orbitalis



Darah ditampung di Eppendorf



Sentrifugasi



Plasma darah

Lampiran 14. Data kadar MDA plasma

	N	KS	KP	E100	E200	E300
Kadar	1,00	5,33	1,44	1,00	1,69	2,87
	1,13	5,50	1,34	1,04	1,90	2,94
	1,03	4,74	1,27	1,14	1,69	2,53
	0,93	4,81	1,20	1,28	1,83	2,39
	1,10	4,16	2,89	0,97	1,76	2,56
	1,13	4,82	1,44	1,28	1,62	2,53
Jml	6,32	29,36	9,58	6,71	10,49	15,82
X	1,05	4,89	1,60	1,12	1,75	2,64
SD	0,08066391	0,47588514	0,64058	0,13776	0,10304	0,21722
SE	0,03292405	0,19423883	0,26146	0,05623	0,04206	0,08866

Lampiran 15. Foto preparasi otak



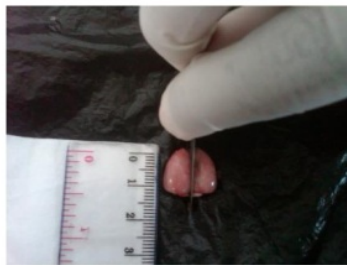
Tabung CO₂



eutanasia



Otak



Pemisahan cerebrum kanan dan kiri



Deep freezer

Lampiran 16. Data kadar MDA otak

Kelompok	Tikus	Kadar	Kelompok	No.	
				Tikus	Kadar
Kontrol Normal	1.	5,41	E100	1.	11,5
	2.	4,85		2.	12,32
	3.	4,29		3.	15,8
	4.	5,59		4.	9,86
	5.	5,97		5.	16,62
	6.	4,67		6.	14,36
	7.	5,04		7.	11,09
	Rerata	5,12		Rerata	13,08
	SD	0,58		SD	2,55
	SE	0,22		SE	0,96
Kontrol Sakit	1.	19,27	E200	1.	5,55
	2.	16,65		2.	5,96
	3.	13,37		3.	8,22
	4.	11,4		4.	10,47
	5.	10,52		5.	6,58
	6.	12,44		6.	5,55
	Rerata	13,94		7.	7,19
	SD	3,36		Rerata	7,074
	SE	1,27		SD	1,779
	Kontrol Positif	1.		3,5	E300
2.		4,12	2.	12,33	
3.		4,53	3.	6,58	
4.		3,3	4.	19,02	
5.		5,14	5.	16,21	
6.		3,71	6.	15,55	
7.		5,76	7.	9,65	
Rerata		4,29	Rerata	12,12	
SD		0,90	SD	5,11	
SE		0,34	SE	1,93	

Lampiran 17. Foto alat dan reagen yang digunakan untuk uji biokimiawi antioksidan



Homogenizer



Sentrifugator



Plate well



Reagen kit



GSH reagen kit



SOD reagen kit



GPx reagen kit



Katalase reagen kit



Plate reader

Lampiran 18. Data aktivitas GPx

Kelompok	No. Tikus	x (nmol)	Kadar Protein	Kadar (μ U/ml)
Kontrol Normal	1	67,193	0,970	554,277
	2	46,459	0,748	496,870
	3	61,596	0,758	650,005
	4	50,771	0,809	502,363
	5	76,275	0,723	844,198
	6	59,578	0,703	678,317
	Rerata	60,312	0,785	621,005
	SE	4,424	0,040	54,112
Kontrol Sakit	1	47,193	0,950	397,561
	2	29,670	1,116	212,689
	3	40,587	0,803	404,120
	4	38,294	0,768	398,796
	5	32,606	0,869	300,167
	6	35,358	1,066	265,454
	Rerata	37,284	0,929	329,798
	SE	2,540	0,058	33,464
Kontrol Obat	1	60,587	1,176	411,993
	2	36,642	0,854	343,303
	3	70,771	0,829	683,221
	4	85,725	0,793	864,393
	5	67,193	0,899	597,774
	6	49,853	1,005	396,806
	Rerata	61,795	0,926	549,582
	SE	6,972	0,058	82,467
E100	1	17,835	1,035	137,809
	2	14,624	0,894	130,833
	3	17,927	1,171	122,425
	4	22,422	0,874	205,227
	5	43,339	1,061	326,924
	6	52,697	0,894	471,459
	Rerata	28,141	0,988	232,447
	SE	6,479	0,049	57,195
E200	1	6,734	1,333	40,422
	2	7,193	1,136	50,646
	3	9,303	1,005	74,045
	4	21,413	1,101	155,608
	5	31,688	1,015	249,716
	6	40,771	1,141	285,812
	Rerata	19,517	1,122	142,708
	SE	5,839	0,048	43,099
E300	1	14,073	1,182	95,291
	2	19,761	1,045	30,245

3	21,229	1,066	31,877
4	22,422	1,071	33,509
5	48,385	1,071	72,310
6	36,550	1,106	52,881
Rerata	27,070	1,090	52,685
SE	5,234	0,020	10,806

Lampiran 19. Data Aktivitas GSH

Kelompok	No. Tikus	x (nmol)	Kadar Protein	Kadar (μ U/ml)
Kontrol Normal	1	0,212	0,970	10,936
	2	0,252	0,758	16,651
	3	0,174	0,809	10,769
	4	0,197	0,723	13,606
	5	0,239	0,703	16,994
	6	0,182	0,703	12,983
	Rerata	0,209	0,777	13,656
	SE	0,013	0,042	1,100
Kontrol Sakit	1	0,196	1,116	8,786
	2	0,196	0,803	12,203
	3	0,166	0,768	10,833
	4	0,174	0,869	10,020
	5	0,134	1,066	6,278
	6	0,192	0,783	12,252
	Rerata	0,176	0,901	10,062
	SE	0,010	0,062	0,929
Kontrol Obat	1	0,205	0,854	12,004
	2	0,245	0,829	14,803
	3	0,162	0,793	10,227
	4	0,208	0,899	11,563
	5	0,233	1,005	11,585
	6	0,212	1,045	10,145
	Rerata	0,211	0,904	11,721
	SE	0,012	0,041	0,691
E100	1	0,195	1,156	8,428
	2	0,188	0,894	10,534
	3	0,203	1,171	8,674
	4	0,189	0,995	9,496
	5	0,167	0,874	9,555
	6	0,187	0,894	10,434
	Rerata	0,188	0,998	9,520
	SE	0,005	0,055	0,355
E200	1	0,322	1,333	12,076
	2	0,204	1,025	9,939
	3	0,232	1,136	10,223
	4	0,270	1,005	13,445
	5	0,274	1,101	12,437
	6	0,261	1,015	12,844
	Rerata	0,260	1,103	11,827
	SE	0,016	0,051	0,584
E300	1	0,226	1,182	9,579
	2	0,250	1,045	11,961
	3	0,273	1,171	11,662

4	0,222	1,066	10,399
5	0,219	1,071	10,211
6	0,218	1,106	9,858
Rerata	0,235	1,107	10,612
SE	0,009	0,023	0,398

Lampiran 20. Data Aktivitas Katalase

Kelompok	No. Tikus	x (nmol)	Kadar Protein	Kadar (μ U/ml)
Kontrol Normal	1	4,105	0,970	7,236
	2	3,696	0,748	8,446
	3	3,754	0,758	8,466
	4	3,462	0,809	7,320
	5	3,725	0,723	8,810
	6	5,480	0,703	13,330
	Rerata	4,037	0,785	8,935
	SE	0,300	0,040	0,918
Kontrol Sakit	1	3,023	0,950	5,442
	2	3,784	1,116	5,796
	3	3,287	0,803	6,992
	4	3,316	0,869	6,522
	5	2,380	1,066	3,818
	6	1,327	0,783	2,897
	Rerata	2,853	0,931	5,245
	SE	0,358	0,056	0,647
Kontrol Obat	1	2,585	1,176	3,756
	2	2,731	0,854	5,467
	3	2,146	0,829	4,427
	4	2,292	0,793	4,939
	5	2,702	0,899	5,136
	6	2,526	1,005	4,297
	Rerata	2,497	0,926	4,670
	SE	0,095	0,058	0,256
E100	1	3,871	1,156	5,723
	2	3,754	1,035	6,199
	3	4,398	0,894	8,407
	4	4,281	1,171	6,247
	5	4,281	0,995	7,354
	6	4,076	0,874	7,972
	Rerata	4,110	1,021	6,984
	SE	0,104	0,051	0,443
E200	1	3,491	1,292	4,618
	2	4,339	1,025	7,235
	3	3,667	1,136	5,517
	4	3,930	1,005	6,684
	5	4,135	1,101	6,420
	6	4,865	1,141	7,288
	Rerata	4,071	1,117	6,293
	SE	0,202	0,042	0,426
E300	1	3,667	1,182	5,305
	2	4,047	1,045	6,617
	3	3,667	1,171	5,351

4	4,310	1,066	6,914
5	3,754	1,071	5,994
6	3,053	1,071	4,874
Rerata	3,750	1,101	5,842
SE	0,173	0,024	0,329

Lampiran 21. Data Aktivitas SOD

Kelompok	No. Tikus	Kadar Protein	% INHIB	SOD (μ U/ml)
Kontrol Normal	1	0,970	124,24	352,304
	2	0,748	239,39	880,099
	3	0,758	269,70	978,319
	4	0,809	151,52	515,352
	5	0,703	157,58	616,707
	6	0,703	130,30	509,970
	Rerata	0,782	178,788	642,125
	SE	0,041	24,799	97,932
Kontrol Sakit	1	0,950	112,12	324,683
	2	0,803	136,36	466,727
	3	0,768	45,45	162,721
	4	0,869	87,88	278,099
	5	1,066	51,52	132,948
	6	0,783	87,88	308,522
	Rerata	0,873	86,869	278,950
	SE	0,047	14,203	49,336
Kontrol Obat	1	1,182	251,52	585,408
	2	1,045	190,91	502,193
	3	1,171	203,03	476,625
	4	1,066	215,15	555,254
	5	1,071	275,76	708,313
	6	1,106	203,03	504,867
	Rerata	1,107	223,232	555,443
	SE	0,023	13,519	34,573
E100	1	1,156	136,36	324,308
	2	1,171	172,73	405,487
	3	0,995	233,33	644,885
	4	0,874	160,61	505,319
	5	1,061	227,27	589,324
	6	0,894	45,450	139,790
	Rerata	1,025	162,626	434,852
	SE	0,052	28,103	75,941
E200	1	1,333	239,39	493,974
	2	1,025	172,73	463,300
	3	1,136	300,00	726,139
	4	1,005	160,61	439,430
	5	1,101	184,85	461,759
	6	1,015	184,85	500,736
	Rerata	1,103	207,071	514,223
	SE	0,051	21,603	43,365
E300	1	1,176	142,42	332,917
	2	0,854	100,00	322,062
	3	0,829	57,58	191,069

4	0,793	63,64	220,573
5	0,864	100,00	318,304
6	1,045	148,48	390,594
Rerata	0,927	102,020	295,920
SE	0,061	15,541	30,646

Lampiran 22. Data Kadar Protein

Kelompok	No. Tikus	Abs	x (mg/ml)
Kontrol Normal	1	0,204	0,970
	2	0,16	0,748
	3	0,162	0,758
	4	0,172	0,809
	5	0,155	0,723
	6	0,151	0,703
	7	0,151	0,703
	8	0,191	0,904
	Rerata	0,168	0,790
	SE	0,007	0,035
Kontrol Sakit	1	0,2	0,950
	2	0,233	1,116
	3	0,159	0,743
	4	0,171	0,803
	5	0,164	0,768
	6	0,184	0,869
	7	0,223	1,066
	8	0,167	0,783
	Rerata	0,188	0,887
	SE	0,010	0,050
Kontrol Obat	1	0,245	1,176
	2	0,181	0,854
	3	0,176	0,829
	4	0,169	0,793
	5	0,190	0,899
	6	0,211	1,005
	7	0,183	0,864
	8	0,219	1,045
	Rerata	0,197	0,933
	SE	0,009	0,046
E100	1	0,241	1,156
	2	0,217	1,035
	3	0,189	0,894
	4	0,244	1,171
	5	0,209	0,995
	6	0,185	0,874
	7	0,222	1,061
	8	0,189	0,894
	Rerata	0,212	1,010
	SE	0,008	0,041
E200	1	0,268	1,292
	2	0,276	1,333
	3	0,215	1,025

	4	0,237	1,136
	5	0,211	1,005
	6	0,23	1,101
	7	0,213	1,015
	8	0,238	1,141
	Rerata	0,236	1,131
	SE	0,009	0,044
E300	1	0,246	1,182
	2	0,271	1,308
	3	0,219	1,045
	4	0,244	1,171
	5	0,223	1,066
	6	0,224	1,071
	7	0,224	1,071
	8	0,231	1,106
		Rerata	0,235
	SE	0,006	0,031

Lampiran 23. Bobot sampel homogenat otak (mg)

Kelompok	No.	Bobot	Kelompok	No.	Bobot
Kontrol Normal	1	100,00	E100	1	100,00
	2	108,00		2	128,00
	3	109,00		3	114,00
	4	102,00		4	118,00
	5	100,00		5	120,00
	6	108,00		6	100,00
	Rerata	104,50		Rerata	113,33
	SE	1,746		SE	4,608
Kontrol Sakit	1	122,00	E200	1	124,00
	2	108,00		2	111,00
	3	111,00		3	123,00
	4	133,00		4	115,00
	5	108,00		5	104,00
	6	121,00		6	124,00
	Rerata	117,167		Rerata	116,833
	SE	4,060		SE	3,380
Kontrol Obat	1	122,00	E300	1	100,00
	2	113,00		2	110,00
	3	109,00		3	114,00
	4	128,00		4	123,00
	5	103,00		5	115,00
	6	120,00		6	112,00
	Rerata	115,83		Rerata	112,333
	SE	3,753		SE	3,062

Lampiran 24. Preparasi penguji histologik



Lampiran 25. Data berat hippocampus setelah perlakuan pada semua kelompok (mg)

No	Kontrol Normal	Kontrol Normal	Kontrol Positif	E100	E200	E300
1	138,60	79,80	107,40	119,10	121,10	106,70
2	129,90	74,10	115,20	85,20	103,50	131,10
3	128,50	75,30	81,90	118,20	111,60	97,40
4	127,50	60,70	88,80	84,70	99,40	101,20
5	118,20	59,60	111,80	103,00	104,90	92,50
6	123,00	78,20	84,80	113,70	104,40	101,20
Rerata	127,62	71,28	98,32	103,98	107,48	105,02
SE	2,81	3,62	3,16	2,81	5,20	5,03

Lampiran 26. Estimasi volume, densitas numerik dan jumlah total sel pyramidal di daerah CA1

	Tikus	V (mm ³)	Nv (/mm ³)	# of CA2-3 cells
Kontrol Normal	1	0,98433228	250444,444	246520,5514
	2	0,91218227	231328,4	211013,6654
	3	0,90187513	285185,2	257201,4385
	4	0,93279656	211799,6	197565,9383
	5	0,86064655	218987,7	188471,0085
	6	1,01010014	252622,2	255173,7202
	rerata	0,93365549	241727,924	225991,1
	SD	0,05516168	26848,3529	30617,77
	SE	0,02081573	10131,4539	12499,6
Kontrol sakit	1	0,48443578	189708,6	91901,63411
	2	0,64935009	150769,2	97901,99383
	3	0,19583574	170995,9	33487,10894
	4	0,55143222	170697,2	94127,93605
	5	0,63904295	182452,7	116595,1111
	6	0,792238	145697,7	115427,2545
	rerata	0,47319068	144331,614	91573,51
	SD	0,26406715	71820,8363	30383,53
	SE	0,11841576	32206,653	12403,97
Kontrol positif	1	1,02556086	156477,366	160477,0621
	2	0,84003226	173314,8	145590,0234
	3	0,88126084	152444,4	134343,2798
	4	0,56689294	145185,2	82304,46445
	5	0,80395726	120615,385	96969,61368
	6	0,623333	182444,4	113723,6152
	rerata	0,67729102	132925,936	104772,5798
	SD	0,3364637	61900,6228	53644,8139
	SE	0,15088058	27758,1268	24055,97036
E100	1	0,3710572	128246,914	47586,94005
	2	0,45866792	150464,646	69013,30671
	3	0,52566436	217777,778	114478,0161
	4	0,56173936	81666,6667	45875,38147
	5	0,56689294	236444,444	134038,6856
	6	0,602317	190769,3	114903,5925
	rerata	0,44090554	143624,25	87649,32
	SD	0,21582743	87742,5921	38241,09
	SE	0,0967836	39346,4539	15611,79

E 200	1	0,44320721	80888,8889	35850,53839
	2	0,87610727	164888,889	144460,3537
	3	0,44836078	157629,63	70674,9433
	4	0,71119296	165287,749	117551,4832
	5	0,36590362	120987,654	44269,82106
	6	0,8751073	194369	170093,7308
	rerata	0,5314113	147341,969	97150,15
	SD	0,30196591	65206,5141	55190,84
	SE	0,13541072	29240,5893	22531,47
E300	1	0,74211439	195340,067	144964,675
	2	0,57720008	147604,938	85197,58239
	3	0,56689294	174222,222	98765,34727
	4	0,61842866	127037,037	78563,34442
	5	0,44836078	116148,148	52076,27401
	6	0,5772001	145604,94	84043,18593
	rerata	0,50431385	129422,479	90601,73
	SD	0,25898943	68660,2916	30735,41
	SE	0,11613876	30789,3684	12547,63

Lampiran 27. Penghitungan presisi volume CA-1

Kel	V	CE	Kel.	V	CE	Kel.	V	CE
KN	0.984	0.139	KS	0.484	0.117	KP	1.026	0.083
	0.912	0.088		0.649	0.097		0.840	0.033
	0.902	0.099		0.196	0.077		0.881	0.030
	0.933	0.077		0.551	0.042		0.567	0.128
	0.861	0.063		0.639	0.038		0.804	0.031
	1.010	0.063		0.792	0.040		0.623	0.048
mean	0.934	0.088	mean	0.552	0.068	mean	0.790	0.059
SD	0.055	0.029	SD	0.203	0.034	SD	0.170	0.039
CV	0.059		CV	0.368		CV	0.215	
meanCE/ group		0.092	meanCE/ group		0.075	meanCE/ group		0.069

Kel	V	CE	Kel.	V	CE	Kel.	V	CE
E100	0.371	0.148	E200	0.443	0.123	E300	0.742	0.122
	0.459	0.052		0.876	0.077		0.577	0.038
	0.526	0.142		0.448	0.120		0.567	0.129
	0.562	0.141		0.711	0.098		0.618	0.136
	0.567	0.181		0.366	0.052		0.448	0.175
	0.602	0.035		0.875	0.034		0.577	0.034
mean	0.514	0.117	mean	0.620	0.084	mean	0.588	0.106
SD	0.085	0.059	SD	0.230	0.036	SD	0.095	0.057
CV	0.166		CV	0.371		CV	0.161	
meanCE/ group		0.128	meanCE/ group		0.090	meanCE/ group		0.118

Lampiran 28. Penghitungan Presisi Jumlah sel pyramidal daerah CA-1

Kel	CA1	CE	Kel	CA1	CE	Kel	CA1	CE
	246520.551	0.135		91901.634	0.112		160477.062	0.076
	211013.665	0.093		97901.994	0.092		145590.023	0.104
KN	257201.439	0.079	KS	33487.109	0.198	KP	134343.280	0.086
	197565.938	0.106		94127.936	0.119		82304.464	0.190
	188471.008	0.065		116595.111	0.072		96969.614	0.154
	255173.720	0.123		115427.254	0.153		113723.615	0.138
mean	225991.054	0.100	mean	91573.506	0.124	mean	122234.676	0.125
SD	30617.771	0.026	SD	30383.529	0.045	SD	29865.545	0.044
CV	0.135		CV	0.332		CV	0.244	
meanCE/ group		0.103	meanCE/ group		0.131	meanCE/ group		0.131

Kel.	CA3-2	CE	Kel.	CA3-2	CE	Kel.	CA3-2	CE
	60905,28	0,231402		110138,3	0,171104		135082,2	0,115206
	62252,07	0,142578		128129,6	0,122574		101402,9	0,158408
E100	123706,1	0,094603	E200	92377,38	0,110322	E300	62383,06	0,105182
	134320,9	0,150823		135508,8	0,099324		138271,5	0,195853
	102716	0,142078		87888,86	0,178278		35895,96	0,180732
	69743,08	0,070876		156938,3	0,097869		68873,69	0,102766
mean	92273,89	0,138727	mean	118496,9	0,129912	mean	90318,21	0,143024
SD	32428,09	0,055339	SD	26641,64	0,035878	SD	41540,88	0,040684
CV	0,351433		CV	0,22483		CV	0,459939	
meanC E/group		0,147638	mean CE/gr oup		0,133977	mean CE/gr oup		0,147768

Lampiran 29. Estimasi volume, densitas numerik, dan jumlah total sel pyramidal di daerah CA2-CA3

	No Tikus	V (mm ³)	Nv (/mm ³)	# of CA2-3 cells
Kontrol normal	1	1,16986088	153251	179282,3496
	2	1,11317159	155236,5	172804,8608
	3	1,13677062	134814,8	153253,5043
	4	1,25747161	141313,6	177697,8395
	5	1,08192643	110868,7	119951,7765
	6	1,19771087	169135,8	202575,786
	Rerata	1,15948533	144103,4	167594,4
	SD	0,06300231	20163,5905	28160,31
	SE	0,02377446	7608,90208	11496,35
	Kontrol sakit	1	0,62358223	134017,1
2		0,67511795	149144,8	100690,332
3		0,41743934	159703,7	66666,60786
4		0,75757511	134538,3	101922,867
5		0,69573224	133086,4	92592,49932
6		0,4273393	144538,3	61766,89595
Rerata		0,5138266	122146,943	84534,98
SD		0,25634086	58974,2756	17128,06
SE		0,11495106	26445,8635	6992,471
Kontrol positif		1	1,11832516	112188,6
	2	1,05132872	124617,3	144005,9244
	3	1,07709658	176862	190497,4554
	4	1,11832516	138585,9	154984,0985
	5	0,92764299	146505,1	135904,4287
	6	0,6550966	98505,2	64530,4216
	Rerata	0,84968789	113894,871	135897,6
	SD	0,43782217	61136,5408	41505,02
	SE	0,19633281	27415,4891	16944,28
	E100	1	0,57204651	106469,1
2		0,5359715	116148,1	62252,07186
3		0,63904295	193580,2	123706,0615
4		0,9070287	148088,9	134320,8824
5		0,68027152	150992,6	102715,9662
6		0,6490433	107455,2	69743,07761
Rerata		0,55572686	119213,15	92273,89
SD		0,30177968	65966,3262	32428,09
SE		0,13532721	29581,3122	13238,66
E200		1	0,82972512	132740,7
	2	1,06678944	120107,7	128129,6256

	3	0,61327509	150629,6	92377,38097
	4	1,11317159	121732,2	135508,8261
	5	0,89682506	98000	87888,85549
	6	1,0432251	150435,7	156938,2982
	Rerata	0,92716856	128940,983	118496,9
	SD	0,41019295	53714,3042	26641,64
	SE	0,18394303	24087,1319	10876,36
E 300	1	0,73696082	183296,3	135082,1912
	2	0,71634653	141555,6	101402,8628
	3	0,5926608	105259,3	62383,06072
	4	0,68027152	203259,3	138271,5139
	5	0,52051079	68962,96	35895,96463
	6	0,6801715	101259,3	68873,68997
	Rerata	0,56098885	114798,966	90318,21
	SD	0,27724111	75595,2729	41540,88
	SE	0,12432337	33899,2255	16958,92

Lampiran 30. Penghitungan Presisi Volume sel pyramidal daerah CA3-CA2

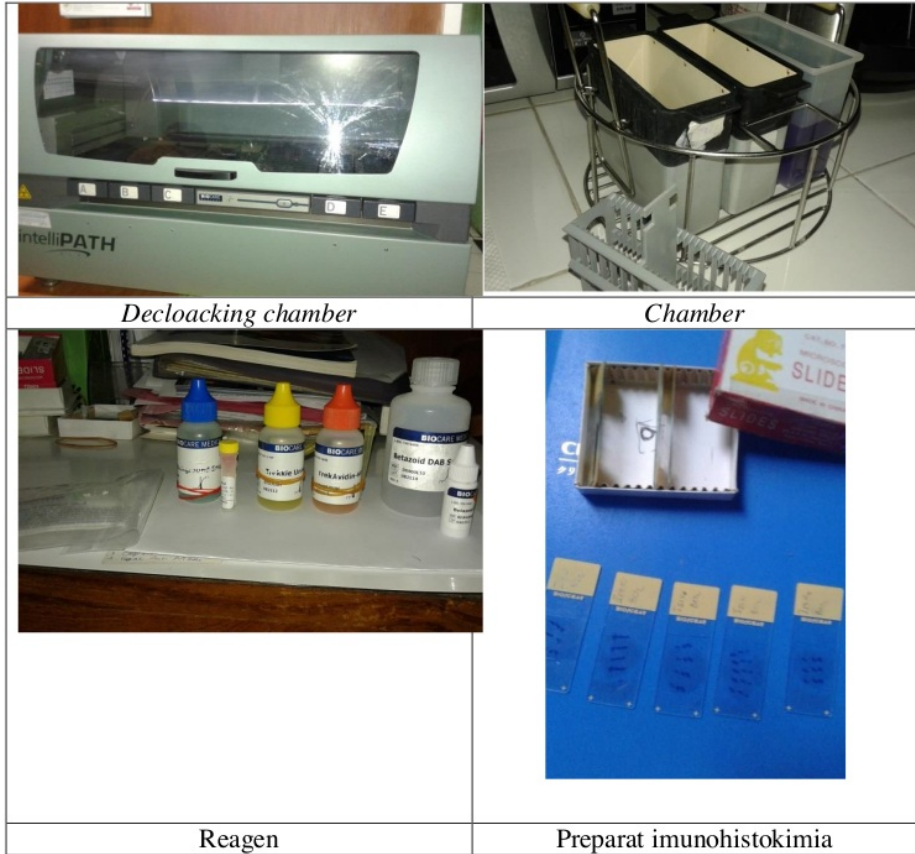
Kel	V	CE	Kel	V	CE	Kel	V	CE
KNL	1.170	0.027	KS	0.624	0.097	KP	1.118	0.025
	1.113	0.065		0.675	0.136		1.051	0.034
	1.137	0.022		0.417	0.195		1.077	0.030
	1.257	0.100		0.758	0.160		1.118	0.128
	1.082	0.026		0.696	0.036		0.928	0.029
	1.198	0.026		0.427	0.041		0.655	0.034
mean	1.159	0.044	mean	0.599	0.111	mean	0.991	0.046
SD	0.063	0.032	SD	0.144	0.065	SD	0.179	0.040
CV	0.054		CV	0.240		CV	0.181	
meanCE/ group		0.053	meanCE/ group		0.126	meanCE/ group		0.059

Kel	V	CE	Kel	V	CE	Kel	V	CE
E100	0.572	0.041	E200	0.830	0.126	E300	0.737	0.035
	0.536	0.059		1.067	0.026		0.716	0.124
	0.639	0.139		0.613	0.139		0.593	0.038
	0.907	0.071		1.113	0.071		0.680	0.035
	0.680	0.205		0.897	0.205		0.521	0.039
	0.649	0.064		1.043	0.027		0.680	0.034
mean	0.664	0.097	mean	0.927	0.099	mean	0.654	0.051
SD	0.130	0.063	SD	0.188	0.071	SD	0.082	0.036
CV	0.196		CV	0.203		CV	0.125	
meanCE/ group		0.112	meanCE/ group		0.118	meanCE/ group		0.060

Lampiran 31. Penghitungan Presisi Jumlah sel pyramidal di daerah CA3-CA2

Kel.	CA3-2	CE	Kel.	CA3-2	CE	Kel.	CA3-2	CE
	179282.35	0.07488		83570.6822	0.175026		125463.3	0.108826
	172804.86	0.13176		100690.332	0.175026		144005.9	0.134031
KN	153253.50	0.11063	KS	66666.6079	0.216230	KP	190497.5	0.139946
	177697.84	0.13356		101922.867	0.247433		154984.1	0.144514
	119951.78	0.10924		92592.4993	0.110103		135904.4	0.095963
	202575.79	0.09527		61766.8959	0.179732		64530.42	0.166856
mean	167594.35	0.109223	mean	84534.9807	0.183925	mean	135897.6	0.131689
SD	28160.31	0.022254	SD	17128.0581	0.046266	SD	41505.02	0.025589
CV	0.17		CV	0.20261504		CV	0.305414	
mean CE/group		0.111096	mean CE/group		0.188712	mean CE/group		

Kel.	CA3-2	CE	Kel.	CA3-2	CE	Kel.	CA3-2	CE
	60905.28	0.231402		110138.3	0.171104		135082.2	0.115206
	62252.07	0.142578		128129.6	0.122574		101402.9	0.158408
E100	123706.1	0.094603	E200	92377.38	0.110322	E300	62383.06	0.105182
	134320.9	0.150823		135508.8	0.099324		138271.5	0.195853
	102716	0.142078		87888.86	0.178278		35895.96	0.180732
	69743.08	0.070876		156938.3	0.097869		68873.69	0.102766
mean	92273.89	0.138727	mean	118496.9	0.129912	mean	90318.21	0.143024
SD	32428.09	0.055339	SD	26641.64	0.035878	SD	41540.88	0.040684
CV	0.351433		CV	0.22483		CV	0.459939	
mean CE/group		0.147638	mean CE/group		0.133977	mean CE/group		0.147768

Lampiran 32. Foto-foto pemeriksaan imunohistokimia

The effect of tumeric rhizome (*Curcuma longa* L) on radial arm maze and passive avoidance test in trimethyltin-induced rat models

Sapto Yuliani*¹, Leni Setiani¹

¹Faculty of Pharmacy, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia

Original Article

ABSTRACT

ARTICLE INFO

Keywords:

Turmeric (*Curcuma longa* L.), radial arm maze, passive avoidance, trimethyltin

*Corresponding author:

yuliani@yahoo.com

DOI : 10.20885/JKKI.Vol8.Iss1.art2

History:

Received : May 27, 2016

Accepted : November 12, 2016

Online : April 26, 2017

Background: Oxidative stress can cause death of hippocampal cells associated to the deficit of learning and memory function. Turmeric rhizome contains curcuminoid which has antioxidant activity that can prevent oxidative stress, thus it was expected to prevent the deficit of learning and memory function on trimethyltin (TMT)-induced rat models. **Objective:** This study aimed to determine the effect of turmeric rhizome extract on cognitive learning and memory function which was tested using radial arm maze and passive avoidance tests on Wistar rats injected with TMT.

Methods: A total of 30 Wistar rats, male, 8-12 weeks of age were divided into 6 groups. The first (normal) group was given CMC-Na, the second (TMT) group was given CMC-Na, the third-the fifth groups were given turmeric rhizome extract (TRE) orally in the dosage of 120mg/kgBW (TRE120), 240 mg/kgBW (TRE240) and 480 mg/kgBW (TRE480), respectively. The sixth (P500) group was given piracetam in the dosage of 500 mg/kgBW. Treatments were given for 8 days orally. At day-9th, excluding the first group, all rats were injected with 12 mg/kgBW TMT solution intraperitoneally. One day after TMT injection, the cognitive learning and memory function was measured using radial maze and passive avoidance tests. The data of cognitive function tests were analyzed statistically by ANOVA test followed by LSD test at significance level 0.05.

Results: The results of radial maze and passive avoidance tests showed that the TRE240 group was not statistically significant different with TMT group ($p > 0.05$). However there were significant difference between TRE120 and TMT groups, as well as between TRE480 and TMT groups ($p < 0.05$). The administration of 480 mg/kgBW of TRE showed that its cognitive function was not significantly different with the administration of Piracetam ($p > 0.05$).

Conclusion: It can be concluded that the administration of 480 mg/kgBW of TRE can improve cognitive learning and memory function of Wistar rats injected by TMT.

Latar Belakang: Stres oksidatif dapat menyebabkan terjadinya kematian sel hippocampus yang dapat berakibat terhadap penurunan fungsi kognitif belajar dan mengingat. Rimpang kunyit (*Curcuma longa* L) mengandung kurkuminoid yang memiliki aktifitas antioksidan sehingga dapat mencegah stres oksidatif dan diharapkan dapat mencegah penurunan kemampuan belajar dan mengingat pada tikus yang diinduksi zat neurotoksik trimethyltin (TMT).

Tujuan Penelitian: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak rimpang kunyit (ER) terhadap fungsi kognitif belajar dan mengingat pada tikus yang diinduksi TMT menggunakan uji radial arm maze dan passive avoidance.

Metode: Sebanyak 30 ekor tikus Wistar, jantan, umur 8-12 minggu dibagi menjadi 6 kelompok. Kelompok I (normal) diberi CMC-Na, kelompok II (TMT) diberi CMC-Na, kelompok III diberi ekstrak rimpang kunyit (ER) dosis 120mg/kgBB (ER120), kelompok IV diberi ER dosis 240mg/kgBB (ER240), kelompok V diberi ER dosis 480mg/kgBB (ER480), serta kelompok VI diberi Piracetam dosis 500 mg/kg BB (P500). Pemberian perlakuan dilakukan selama 8 hari secara oral. Pada hari ke 9 tikus (kecuali kelompok normal) diinjeksi TMT dosis tunggal 12 mg/kg BB. Satu hari kemudian tikus diuji fungsi kognitifnya dengan uji radial maze dan uji passive avoidance. Data yang diperoleh dianalisis statistik dengan uji Anova kemudian dilanjutkan uji LSD dengan tingkat signifikansi 0,05.

Hasil: Hasil uji radial maze dan passive avoidance tikus kelompok ER240 tidak berbeda bermakna dengan kelompok TMT ($p>0,05$), namun ada perbedaan bermakna pada kelompok ER120 dan ER480 ($p<0,05$) dengan kelompok TMT ($p<0,05$). Pemberian ER dosis 480 mg/kg BB menunjukkan fungsi kognitif yang tidak berbeda bermakna dengan piracetam ($p>0,05$).

Kesimpulan: Ekstrak rimpang kunyit dosis 480 mg/kg BB dapat meningkatkan fungsi kognitif belajar dan mengingat pada tikus Wistar yang diinjeksi TMT.

INTRODUCTION

Memory is one example of cognitive functions that involve brain in order to store previously learned knowledge and to recall previously stored information. Memory is formed through learning process. New informations and knowledge that are received by the neural system could be observed through behavioral changes.^{1,2} Hippocampus is a part of the brain that contributes in the formation of learning and navigation. Hippocampus and the cortex are the areas of the brain prone to oxidative stress. Neural cell death in hippocampus due to oxidative stress could alter the process of memory formation.³

Trimetiltin (TMT) is a neurotoxic organometal.⁴ One of the neurons prone

to TMT toxic effect are those located in the hippocampus which contributed in the process and consolidation of memories.⁵ Trimetiltin could alter the cholinergic system which would disturb memory processing.⁶ TMT intoxication in rat modes is coherent with neurodegenerative models of memory disturbance, thus it would be beneficial for the study of Alzheimer dementia.⁷

A lot of herbal plants with high antioxidant content had been empirically proven to be beneficial in preventing neurodegenerative diseases. Tumeric (Curcuma longa L.) is one example of herbal plant that has high antioxidant content.⁸ Tumeric contains a component called curcumin which has high potential as neuroprotecting agent.⁸⁻¹⁰ Curcumin could also normalize the spatial memory in dementia rat models induced with intracerebroventricular streptozotocin.^{9,10} The objective of this study is to determine the effect of tumeric rhizome in improving cognitive learning and memory function of TMT-induced rat models through radial arm maze and passive avoidance test. It is hoped that this research would trigger the utilization of tumeric extract in preventing memory degeneration (dementia).

METHODS

The production of tumeric rhizome ethanolic extract

The powder of tumeric rhizome was obtained from CV. Merapi Farma (Yogyakarta). The production of tumeric extract was done using maseration method. As much as 500 gram tumeric powder was maserated in 1,25 L ethanol 96% for 24 hours. Maseration was done two times. Obtained maserat was filtrated, and the filtrat was evaporated in evaporator then continued in stainless steel pan that was placed above water bath until thick extract was gained. Next, extract was suspended into CMC-Na before being used in animal models.

Standardization of tumeric rhizome ethanolic extract using TLC -Densitometry.

Extract standarization was initiated by making curcumin standard in the concentration

of 1 mg/ml. Next, it was made into standard solution in the concentration of 0.125 ; 0.25 ; 0.5; 1; 2; and 4 mg/ml, as well as sample solution by diluting 100 mg of extract in 10 ml ethanol 96%. The solutions was spotted in Thin layered chromatography (TLC) plate. Stationery phase used Silica Gel 60 F 254, while mobile phase used the mixture of chloroform and methanol in 9:1 ratio. After filtrat was eluted, the intensity of the color formed was counted in term of curcumin concentration using TLC-densitometry in 426 nm wavelength.

Intervention of animal models

The design and procedure of animal models intervention in this research has been approved by Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM with certification number 130/KEC-LPPT/XII/2013. There were 30 adult male Wistar rats, which weigh between 180-200 gram and were divided into 6 groups. Group I (Normal) was given CMC-Na 0,5% solution orally. Group II (TMT) was given CMC-Na 0,5% solution orally. Group III, IV and V were each given tumeric rhizome ethanolic extract (TRE) in the dosage of 120 mg/kgBW (TRE120), 240 mg/kgBW (TRE240) and 480 mg/kgBW (TRE480) orally. And group VI was given piracetam solution in the dosage of 500 mg/kgBW orally. Interventions were given for 8 days. On day- 9, all rat models were injected with Trimethyltin chloride (Sigma) single dose 12 mg/kgBW intraperitoneal, except for group I (normal).

The next day, rats learning and memory

capabilities were tested using passive avoidance test. The measurement consist of learning trial (LT) and retention trial (RT). The duration of retention would determine the learning and memory capability, and was counted by measuring the margin between RT and LT. After passive avoidance test was finished, it was then continued with radial maze test by measuring the duration of rat error when entering test equipment.

Data Analysis

The data of latent period results of passive avoidance test were statistically analyzed with Kruskal-Wallis test, and continued with Mann-Whitney test. While the data of numerical error in radial maze test was statistically analyzed with One way ANOVA test continued with Post Hoc LSD test. Significancy was determined when p value <0,05.

RESULTS

Tumeric rhizome extract

From 1000 gram tumeric rhizome powder, 297,7 gram extract was obtained with 29,77% yield. The results of TLC showed that tumeric extract produced three different chromatogram, which were curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. Standard curcumin had Rf 0,75, which was the same as tumeric extract Rf 0,75. The result of TLC-desitometry showed that the concentration of curcumin in the extract was 27,3 %. The result of TLC test could be seen in Figure 1.

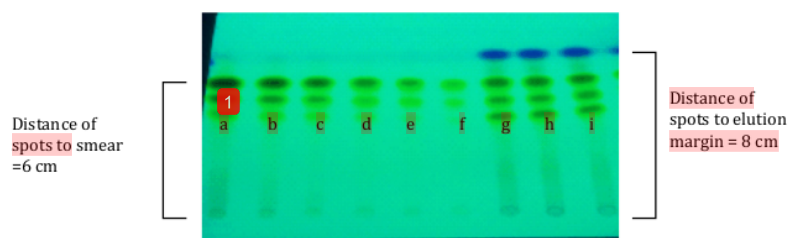


Figure 1. The results of thin layer chromatography (a = standard curcumin, b - f = standard curve with concentration variation, g - i = ethanolic extract of tumeric rhizome samples) stationery phase used silica gel 60 F254 and mobile phase used chloroform : methanol (9 : 1), showed the measurement of Rf = the distance of spots to smear/the distance of spots to elution margin. Rf standard curcumin: 6cm/8 cm = 0,725; Rf extract : 6cm/8 cm = 0,725

The results of learning and memory test in passive avoidance and radial maze test. Passive avoidance and radial maze test was done to measure the learning and memory capabilities of animal models. The results of

retention trial in passive avoidance test could be seen in Figure 2, while the error of entering the arm in radial maze test could be seen in Figure 3.

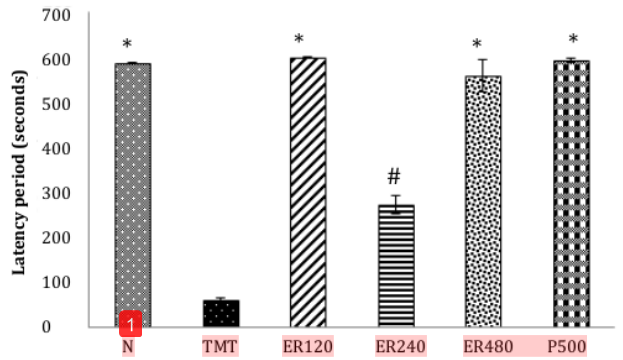


Figure 2. The length of retention period of learning and memory capability in passive avoidance test in all intervention groups. **Note:** N, normal; TMT, trimetiltin; ER, tumeric rhizome extract; *p<0,05 compare to TMT; #p<0,05 compare to N.

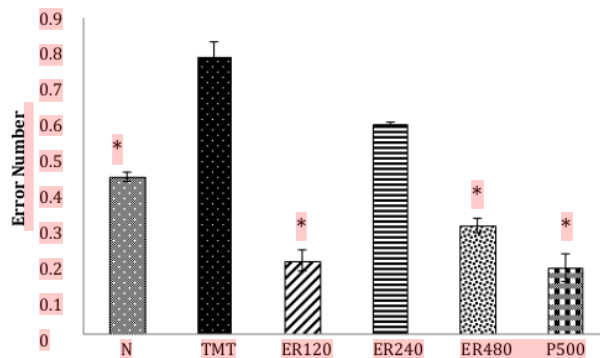


Figure 3. The number of error in radial maze test of all intervention groups. Note.: N, normal; TMT, trimetiltin; ER,tumeric rhizome extract;*p<0,05 compare to TMT group

DISCUSSION

Statistical analysis showed significant difference between latency period and error of entering the test equipment in radial maze test between TMT and normal group. Rats that was induced with only TMT showed significantly smaller retention period and error number (p<0,05) compared to normal group. This showed that the administration of TMT could affect learning process and memory of animal models. Trimetiltin injection would cause

brain cells degeneration in rat models through oxidative stress mechanism. Neurons located in the hippocampus, piriformis cortex, entorinal cortex, amygdala, neocortex, and olfactory tubercle are sensitive to the toxic effect of TMT.⁵ TMT could alter the cholinergic system, thus causing disturbance in memory processing.⁶ TMT could increase the formation of reactive oxigen species (ROS) and increase the formation of free radicals like hidroxyyl, malondialdehyde and carbonil protein in the hippocampus.^{11,12}

Hippocampus is the selective target of TMT toxicity, thus when neuron cell death occurs in the hippocampus, memory capability would decrease.¹³

The administration of tumeric rhizome extract in the dosage of 120 and 480 mg/kg BW showed significantly prolonged latency period and smaller error numbers ($p < 0,05$) compared to TMT group. This result was different when compared to the administration of tumeric rhizome extract in the dosage of 240 mg/kg BW which showed no statistically significant difference of retention period of learning and memory in passive avoidance test and number of error in radial maze test ($p > 0,05$). This indicates a non-proportional response to dosage increase. Tumeric contains curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin which is potential as antioxidant and neuroprotective agent.^{8,14,15} Its highly lipophilic character would increase curcumin disposition in the brain.¹⁶ In vitro and in vivo studies showed that curcumin could prevent neurodegenerative process caused by oxidative stress.^{17,18} Curcumin in vitro could inhibit lipid peroxidation process in the brain.¹⁹ Other studies also showed that in vivo curcumin could inhibit the increase of malondialdehyde formation which is a side product of lipid peroxidation, it could also improve glutathion decrease in oxidative stress-induced rat models with kainat acid.²⁰ Curcumin could also normalize spatial memory of dementia rat models induced with intracerebroventricular streptozotocin.^{9,10} However, there are other studies who found oxidant activity of curcumin in certain dosage which could contradict its antioxidant activity. This might be what causes the effect differences between the administration of TRE/dose 240 mg/kg BW with dose 120 mg/kg BW and 480 mg/kg BW. Nonetheless, further research is needed to determine the appropriate dose of tumeric extract in order to achieve its pro-oxidant activity.

This research used piracetam as comparison. Piracetam is a drug that commonly use as standard medicine in the management of cognitive disorder such as cognitive impairment

or dementia. In this study, the administration of piracetam in the dosage of 500 mg/kgBW showed no statistically significant difference in learning and memory capability when compare to normal group. Piracetam (2-oxo-1-pyrrolidine-acetamide) is a gamma-aminobutyric acid analog that has been used as standard drug in order to improve memory function of dementia patients. The administration of piracetam has been proven to decrease malondialdehyde concentration and increase superoxidedismutase (SOD) and glutathion peroxydase (GPx), thus it could prevent oxidative stress.²¹

The limitation of this research is the absence of passive avoidance and radial maze test prior to intervention, hence the initial data of leaning and memory capability of rat models could not be determined.

CONCLUSION

Ethanollic extract of tumeric rhizome could enhance cognitive learning and memory function of trimetiltin-induced Wistar rats (as dementia model) and the dosage of the extract that can improve cognitive learning and memory function in this study are 120 mg/kgBW and 480 mg/kg BW.

Suggestion

Further research about the effect of ethanollic extract of tumeric rhizome using other learning and memory function test method is needed to be done. Other tests could include Morris water maze test. Furthermore, further research on the hystopathological figure of hippocampus is needed.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to deliver our gratitude to Samidi and Hamam Hudaya (Laboran of Pharmacology Laboratorium UAD) who had assisted the technical execution of learning and memory test in this research.

REFERENCES

1. Budson AE, Price BH. Memory dysfunction. New England Journal of Medicine.

- 2005;352(7):692-9.
2. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, McNamara JO, et al. Neuroscience. Sinauer Associates; 2004. 773 p.
 3. Fukui M, Choi HJ, Zhu BT. Rapid generation of mitochondrial superoxide induces mitochondrion-dependent but caspase-independent cell death in hippocampal neuronal cells that morphologically resembles necroptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012;262(2):156-66.
 4. Hattori N, Ohta S, Sakamoto T, Mishima S, Furukawa S. Royal jelly facilitates restoration of the cognitive ability in trimethyltin-intoxicated mice. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*. 2011;165968.
 5. Balaban CD, Callaghan JPO, Billingsle ML. Trimethyltin-induced neuronal damage in the rat brain: Comparative studies using silver degeneration stains, immunocytochemistry and immunoassay for neurotypic and gliotypic proteins. *Neuroscience*. 1988;26(1):337-61.
 6. Geloso MC, Giannetti S, Cenciarelli C, Budoni M, Casalbore P, Maira G, et al. Transplantation of foetal neural stem cells into the rat hippocampus during trimethyltin-induced neurodegeneration. *Neurochemical Research*. 2007;32(12):2054-61.
 7. Kassed CA, Butler TL, Navidomskis MT, Gordon MN, Morgan D, Pennypacker KR. Mice expressing human mutant presenilin-1 exhibit decreased activation of NF-kappaB p50 in hippocampal neurons after injury. *Brain research Molecular brain research*. 2003;110(1):152-7.
 8. Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Protective effect of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes in rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2008;88(4):511-22.
 9. Agrawal R, Mishra B, Tyagi E, Nath C, Shukla R. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacological Research*. 2010;61(3):247-52.
 10. Ishrat T, Hoda MN, Khan MB, Yousuf S, Ahmad M, Khan MM, et al. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). *European Neuropsychopharmacology*. 2009;19(9):636-47.
 11. Porter N, Landfield PW. Stress hormones and brain aging: Adding injury to insult? *Nature Neuroscience*. 1998;1(1):3-4.
 12. Shin EJ, Suh SK, Lim YK, Jhoo WK, Hjelle OP, Ottersen OP, et al. Ascorbate attenuates trimethyltin-induced oxidative burden and neuronal degeneration in the rat hippocampus by maintaining glutathione homeostasis. *Neuroscience*. 2005;133(3):715-27.
 13. Geloso MC, Corvino V, Michetti F, Budoni M, Casalbore P, Maira G, et al. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes. *Neurochem Int*. 2011;58(7):729-38.
 14. Bala K, Tripathy BC, Sharma D. Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology*. 2006;7(2):81-9.
 15. Dohare P, Garg P, Jain V, Nath C, Ray M. Dose dependence and therapeutic window for the neuroprotective effects of curcumin in thromboembolic model of rat. *Behavioural Brain Research*. 2008;193(2):289-97.
 16. Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubada OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, et al. Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(7):5892-901.
 17. Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Journal of Neuroscience Research*. 2004;75(6):742-50.
 18. Sultana R, Ravagna A, Mohammad-Abdul H, Calabrese V, Butterfield DA. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: Relationship to antioxidant activity. *Journal of Neurochemistry*. 2005;92(4):749-58.

19. Sreejayan, Rao MN. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1994;46(12):1013-6.
20. Gupta YK, Briyal S, Sharma M. Protective effect of curcumin against kainic acid induced seizures and oxidative stress in rats. *Indian journal of physiology and pharmacology*. 53(1):39-46.
21. He Z, Hu M, Zha Y, Li Z, Zhao B, Yu L, et al. Piracetam ameliorated oxygen and glucose deprivation-induced injury in rat cortical neurons via inhibition of oxidative stress, excitatory amino acids release and P53/Bax. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2014;34(4):539-47.

HASIL CEK_ARTIKEL 8 VS DISERTASI

ORIGINALITY REPORT

9%

SIMILARITY INDEX

9%

INTERNET SOURCES

4%

PUBLICATIONS

1%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	media.neliti.com Internet Source	4%
2	www.tandfonline.com Internet Source	2%
3	Submitted to Hoa Sen University Student Paper	1%
4	www.physci.ucla.edu Internet Source	1%
5	www.nlm.nih.gov Internet Source	1%
6	journal.uad.ac.id Internet Source	1%
7	kjif.unjani.ac.id Internet Source	1%

Exclude quotes On

Exclude bibliography On

Exclude matches < 1%

