

Perbaikan Respons Seluler pada Penuaan Hipokampus yang Diperantarai *Glutation* Hasil Pemberian Alanin-glutamin Dipeptida

(IMPROVEMENTS CELLULAR RESPONSES IN AGED HIPPOCAMPUS RELATED
GLUTATHIONE RESULT OF THE ADMINISTRATION OF
ALANINE-GLUTAMINE DIPEPTIDE)

Sunarno¹, Wasmen Manalu², Nastiti Kusumorini³, Dewi Ratih Agungpriyono⁴

¹) Program Doktor Mayor Ilmu-Ilmu Faal dan Khasiat Obat, Sekolah Pascasarjana,
Institut Pertanian Bogor, Lab. Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Jurusan Biologi
Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto, SH Kampus Undip Tembalang Semarang, 50275
Email: soena17@yahoo.com, HP. 085693142989, 085225501147

^{2,3}) Bagian Fisiologi Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, FKH, IPB

⁴) Bagian Patologi Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, FKH IPB

ABSTRAK

Penuaan fisiologi dan penuaan akibat stres oksidatif menyebabkan penurunan tingkat *glutation* yang berdampak pada gangguan respons seluler hipokampus. Gangguan respons seluler hipokampus ditandai dengan penurunan viabilitas, peningkatan mortalitas, dan pemendekan akson neuron. Salah satu cara memperbaiki respons seluler hipokampus adalah meningkatkan *glutation* dan konsentrasi prekursor *glutation*. Salah satu senyawa penyedia prekursor *glutation* adalah alanin-glutamin dipeptida. Penelitian ini dirancang untuk memperoleh gambaran perbaikan respons seluler hipokampus hasil pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7%, baik pada tikus yang mengalami penuaan fisiologi atau penuaan akibat stres oksidatif. Perbaikan respons seluler menunjukkan perbaikan fungsi hipokampus. Tikus-tikus percobaan didesain dengan menggunakan rancangan acak lengkap faktorial yang terdiri atas tiga faktor dengan ukuran 2x2x2. Faktor pertama adalah umur tikus percobaan yang terdiri atas dua level, yaitu 12 dan 24 bulan. Faktor kedua adalah stres oksidatif yang terdiri atas dua level, yaitu tanpa atau dengan stres oksidatif. Faktor ketiga adalah pemberian alanin-glutamin dipeptida yang terdiri atas dua konsentrasi, yaitu 0% dan 7%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7% memberi perbaikan tingkat *glutation* hipokampus, baik pada tikus umur muda (58,76%) atau tua (125,81%), tikus normal (76,47%) atau stres oksidatif (97,26%). Antioksidan ini memperantarai perbaikan respons viabilitas, mortalitas, dan panjang akson neuron hipokampus, baik pada tikus muda (4,11%, 37,07%, 12,58%) atau tua (6,91%, 37,85%, dan 32,84%), tikus normal (3,25%, 29,21%, dan 21,04%) atau stres oksidatif (7,80%, 43,01%, dan 25,56%). Simpulan penelitian ini adalah bahwa pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida memberi perbaikan tingkat *glutation* yang memperantarai perbaikan respons seluler pada penuaan hipokampus, baik pada penuaan fisiologi atau penuaan akibat stres oksidatif.

Kata-kunci: alanin-glutamin dipeptida, viabilitas neuron, mortalitas neuron, akson neuron, *glutation*, penuaan fisiologi, penuaan akibat stres oksidatif, fungsi hipokampus

ABSTRACT

Physiological aging or aging due to oxidative stress decrease glutathione level in the hippocampus which impacts the responses impaired hippocampus cellular. Hippocampus cellular responses disorders characterized with decreased viability, increased mortality, and the shortening of the axons of neurons. One way to improve hippocampus cellular responses is to increase the levels of glutathione and the concentration of glutathione precursor. One compound that provides glutathione precursors is alanine-glutamine dipeptide. This research was designed to obtain the improve of hippocampus cellular responses result from the administration of 7% alanine-glutamine dipeptide concentration of aged or oxidative-stressed rats. The improvement of hippocampus cellular responses affect the improvement of the hippocampus

function. The experimental rats were assigned into a completely randomized design consisted of three factors with 2x2x2 factorial arrangement. The first factor was the age of the experimental rats, consisted of two levels i.e., 12 and 24 months. The second factor was oxidative stress consisted of two levels, i.e., without and with oxidative stress. The third factor was alanine-glutamine dipeptide administration consisted of 2 concentrations, i.e. 0% and 7%. The results showed that administration of 7% alanine-glutamine dipeptide improved level of glutathione in the hippocampus either in younger (58,76%) or aged (125,81%) rats or in normal (76,47%) and in oxidative-stressed rats (97,26%). These antioxidant had mediated the response improve viability, mortality, and long axons responses of neurons at younger (4,11%, 37,07%, and 12,58%) or aged (6,91%, 37,85%, and 32,84%) rats, in normal (3,25%, 29,21%, and 21,04%) and oxidative stress (7,80%, 43,01%, dan 25,56%) rats. This research concluded that the alanine-glutamine dipeptide 7% increased glutathione levels. This increased level affected the improvement of cellular response in aging hippocampus, physiological aging, or aging due to oxidative stress in rats.

Key words: alanine-glutamine dipeptide, viability neuron, mortality neuron, neuron axon, glutathione, physiological aging, stress oxidative aging, hippocampus functions

PENDAHULUAN

Penuaan fisiologi dan penuaan akibat stres oksidatif menyebabkan penurunan tingkat *glutathione* yang memperantarai gangguan respons seluler di hipokampus (Reddy, 2009). Gangguan respons seluler di hipokampus ditandai dengan penurunan viabilitas, peningkatan mortalitas, dan pemendekan aksion neuron pada bagian tanduk ammon atau *cornu ammonis* (Rosenzweig dan Barnes, 2003; Reddy, 2009; Anonim, 2001). Dalam jangka panjang, gangguan respons seluler tersebut dapat menyebabkan penuaan pada hipokampus dan kepikunan (Xavier dan Costa, 2009; Ito dan Schuman, 2011).

Penuaan merupakan salah satu masalah kesehatan bagi masyarakat. Selain dapat menurunkan kinerja, penuaan dapat menurunkan daya tahan tubuh, menyebabkan gangguan koordinasi dan regulasi, serta meningkatkan kerentanan sistem tubuh terhadap berbagai gangguan dari lingkungan. Penuaan tidak dapat dihindari tetapi dapat diperlambat. Salah satu cara penanganan penuaan adalah mengenal indikator-indikator yang berhubungan dengan penuaan. Salah satu indikator penting penuaan adalah *glutathione*. Seiring dengan penuaan tingkat *glutathione* dalam tubuh semakin menurun, terutama tingkat *glutathione* hipokampus. Pada umur tua dan stres oksidatif, tingkat *glutathione* hipokampus dapat menurun di bawah ambang batas normal. Dringen *et al.*, (2000) melaporkan bahwa penuaan dapat menurunkan tingkat *glutathione* hipokampus mencapai 30-40% dari kondisi normal.

Berdasarkan hal tersebut salah satu cara untuk menangani penuaan hipokampus adalah memperbaiki tingkat *glutathione* hipokampus.

Berbagai pilihan bahan antipenuaan telah dilakukan untuk memperlambat penuaan hipokampus. Salah satu cara kerja bahan antipenuaan adalah menyediakan asam amino yang dapat digunakan untuk meningkatkan laju sintesis *glutathione* sehingga tingkat *glutathione* di hipokampus dapat diperbaiki. Senyawa yang memiliki potensi tersebut adalah alanin-glutamin dipeptida (Berg *et al.*, 2006).

Alanin-glutamin dipeptida adalah bentuk lain dari glutamin yang diketahui sebagai penyedia prekursor *glutathione* di dalam tubuh dan hipokampus. (Daren *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2010; Jun *et al.*, 2006). Sebagai penyedia prekursor *glutathione*, alanin-glutamin dipeptida mempunyai peran menyediakan asam amino glutamin. Glutamin dapat dikonversi menjadi glutamat dan bersama-sama dengan sistein dan glisin digunakan untuk sintesis *glutathione* di hipokampus (Dringen *et al.*, 2000). *Glutathione* hipokampus berfungsi mempertahankan integritas seluler, meminimalisasi kerusakan membran biologi sel akibat radikal bebas, dan meningkatkan respons seluler (Schulz *et al.*, 2000). Alanin-glutamin dipeptida bersifat stabil, lebih cepat mengalami proses hidrolisis, efektif melintasi sawar darah otak, dapat memberi nutrisi neuron, dan meningkatkan tingkat *glutathione* di hipokampus (Berg *et al.*, 2006). Sunarno *et al.*, (2012) melaporkan bahwa konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7% dengan dosis 1,66 g/kg bb/hari memberi pengaruh paling optimal terhadap tingkat *glutathione* di hipokampus, baik pada tikus umur 12 atau 24 bulan, tikus normal atau stres oksidatif. Mengacu pada laporan tersebut, penelitian ini dilakukan dengan menggunakan konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7%. Pemberian konsentrasi asam amino ini diharapkan dapat memberi perbaikan respons

seluler pada penuaan hipokampus yang ditandai dengan peningkatan viabilitas neuron, penurunan mortalitas neuron, dan peningkatan panjang akson neuron.

Tujuan penelitian ini adalah memperoleh gambaran perbaikan respons seluler pada penuaan hipokampus hasil pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7%, baik pada tikus yang mengalami penuaan fisiologi atau penuaan akibat stres oksidatif.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial yang terdiri atas tiga faktor dengan ukuran 2x2x2 dan tiga kali ulangan. Faktor pertama adalah umur tikus yang terdiri atas dua tingkat, yaitu 12 dan 24 bulan. Faktor kedua adalah stres oksidatif yang terdiri atas dua tingkat, yaitu tanpa atau dengan stres oksidatif. Faktor ketiga adalah alanin-glutamin dipeptida yang terdiri atas dua konsentrasi, yaitu 0% dan 7%. Hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan strain *Sprague dawley*. Penelitian diawali dengan aklimasi tikus selama satu minggu. Selama aklimasi, tikus-tikus percobaan diberi pakan pelet komersial dan air minum secara *ad libitum*. Pembuatan hewan model penuaan fisiologi dilakukan dengan cara tanpa memberi perlakuan tikus dengan perlakuan stres oksidatif. Adapun pembuatan hewan model penuaan akibat stres oksidatif dilakukan dengan cara tidak memberi pakan pada tikus selama tujuh hari, tikus hanya diberi air minum secara *ad libitum*, dan setiap hari tikus diberi perlakuan aktivitas berenang dalam air pada suhu 25°C di ember tertutup selama 15 menit. Alanin-glutamin dipeptida diberikan secara intravena selama 12 hari dengan cara menyuntikkan alanin-glutamin dipeptida dengan dosis 1,66 g/kg bb/hari pada vena ekor setelah tikus diberi perlakuan tanpa atau dengan stres oksidatif. Stok larutan dipersiapkan setiap hari, disimpan pada suhu 4°C dalam lemari es. Di akhir perlakuan, tikus-tikus dikorbankan nyawanya dan dilanjutkan dengan pengambilan hipokampus. Preparasi dan prosedur penentuan tingkat *glutathion* hipokampus dilakukan sesuai metode yang telah dilakukan oleh Feoli *et al.*, (2010). Untuk memperoleh gambaran viabilitas dan mortalitas neuron hipokampus, dilakukan pembuatan sediaan histologi dengan metode pewarnaan hematoksilin-eosin (Humason, 1967).

Metode pewarnaan perak nitrat Bielschowsky untuk memperoleh gambaran perubahan panjang akson neuron hipokampus (Lourbopoulos *et al.*, 2007).

Prosedur pemrosesan sediaan histologi hipokampus dengan pewarnaan hematoksilin-eosin diawali dengan pengambilan dan penyiapan sampel hipokampus. Sampel hipokampus difiksasi dalam larutan *buffer formalin* 10% selama 24 jam, diikuti proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat masing-masing selama dua jam dan *clearing* dengan silol minimal dua jam sebelum dilakukan *embedding* dalam parafin. Blok jaringan dipotong setebal 10 µm menggunakan mikrotom, kemudian diletakkan di atas gelas objek sehingga diperoleh irisan jaringan yang dikehendaki.

Irisan jaringan pada gelas objek selanjutnya dideparafinasi pada silol dengan tiga kali ulangan masing-masing selama tiga menit, diikuti rehidrasi dengan memasukkan ke dalam alkohol bertingkat. Tahap selanjutnya adalah pencucian dengan air mengalir selama satu menit diikuti pencelupan singkat ke dalam akuades. Pewarnaan preparat dengan prosedur pewarnaan hematoksilin-eosin meliputi, pencelupan ke dalam larutan hematoksilin, pencucian dengan air, dan dilanjutkan pencelupan ke dalam pewarna eosin selama 0,25-2,00 menit. Kemudian dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat, diikuti dengan pencelupan ke dalam silol tiga kali ulangan masing-masing selama 20 detik, kemudian ditetesi dengan *entelan* dan ditutup dengan gelas penutup.

Pemrosesan sediaan histologi hipokampus dengan pewarnaan khusus perak nitrat Bielschowsky diawali dengan pembuatan larutan stok dan reagen. Larutan stok dan reagen yang dipersiapkan meliputi, larutan stok perak nitrat (perak nitrat 5 g dengan akuades 50 mL), larutan amonium hidroksida 1% (ammonium hidroksida 1 mL dengan akuades 100 mL), larutan stok pengembang (formaldehid 20 mL, asam sitrat atau trisodium dihidrat 0,5 g, asam nitrat dua tetes, akuades 100 ml), dan larutan kerja pengembang (larutan stok pengembang delapan tetes, ammonium hidroksida delapan tetes, akuades 50 mL).

Tahap selanjutnya adalah mempersiapkan irisan jaringan pada gelas objek dengan ketebalan 10 µm. Proses selanjutnya adalah deparafinasi dan rehidrasi dengan menggunakan silol tiga kali ulangan, alkohol absolut,

alkohol 96%, alkohol 70% dilanjutkan dicuci tiga kali dalam akuades masing-masing selama tiga menit. Pewarnaan preparat dengan prosedur pewarnaan perak nitrat Bielschowsky, meliputi perendaman ke dalam 50 mL larutan perak nitrat 10% hangat pada temperatur 40°C (dalam inkubator) dan dibiarkan selama semalam sampai muncul warna cokelat terang atau gelap. Kemudian dilakukan pencucian ke dalam akuades sebanyak tiga kali, masing-masing selama tiga menit. Ke dalam larutan perak nitrat ditambahkan amonium hidroksida setetes demi setetes secukupnya sampai terbentuk presipitasi dan warna abu-abu. Irisan jaringan pada gelas objek dimasukkan kembali ke dalam larutan perak nitrat yang sudah ditambah amonium hidroksida dan diinkubasi kembali dalam inkubator pada temperatur 40°C selama 1-2 jam. Tahap selanjutnya adalah perendaman ke dalam larutan kerja pengembang kurang lebih selama satu menit (reaksi akan terjadi sangat cepat, setiap irisan jaringan pada gelas objek diamati di bawah mikroskop). Kemudian dilakukan pencelupan ke dalam larutan amonium hidroksida 1% selama satu menit untuk menghentikan reaksi perak nitrat, diikuti pencucian ke dalam akuades sebanyak tiga kali ulangan, masing-masing selama tiga menit. Irisan jaringan pada gelas objek didehidrasi dan dijernihkan dengan alkohol 70%, 96%, alkohol absolut, dan silol tiga kali ulangan masing-masing dua menit dan kemudian *mounting* dengan entelan.

Sediaan yang sudah diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin-eosin atau perak nitrat Bielschowsky diamati dan didokumentasikan dengan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan kamera. Penentuan viabilitas, mortalitas, dan pengukuran akson dengan menggunakan *software MacBiophotonics ImageJ* pada lima lapang pandang di bagian *cornu ammonis* hipokampus dengan luas setiap lapang pandang $\pm 0,1 \text{ mm}^2$. Viabilitas neuron ditentukan berdasarkan afinitas optimal neuron pada pewarnaan hematoksilin-eosin yang memberi respons warna ungu atau biru pada bagian inti dan merah muda pada sitoplasma. Mortalitas neuron ditentukan berdasarkan afinitas pada satu pewarnaan saja yaitu hematoksilin yang memberi respons warna biru pada seluruh bagian neuron. Pengukuran panjang akson dilakukan terhadap lima neuron pada lima lapang pandang di bagian *cornu ammonis* hipokampus sehingga total neuron yang diukur berjumlah 25. Pengukuran panjang

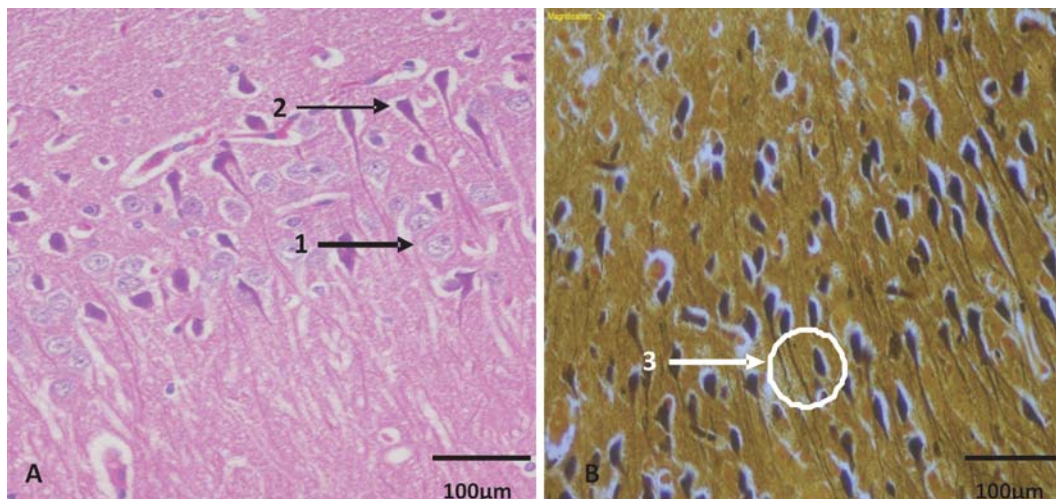
akson dimulai dari bagian akson hiloka sampai dengan terminal akson. Penentuan viabilitas, mortalitas, dan panjang akson neuron hipokampus disajikan pada Gambar 1.

Hasil penentuan viabilitas, mortalitas, dan panjang akson neuron hipokampus dianalisis dengan analisis ragam pada taraf 5% dengan menggunakan *software The SAS System* versi 9. Perbaikan viabilitas, mortalitas, dan panjang akson neuron hipokampus diperantarai dengan peningkatan tingkat *glutation* dan menunjukkan perbaikan respons seluler pada penuaan hipokampus, baik pada tikus yang mengalami penuaan fisiologi atau penuaan akibat stres oksidatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hipokampus merupakan bagian otak yang paling rentan mengalami penurunan fungsi akibat penuaan. Penurunan fungsi hipokampus menunjukkan penuaan hipokampus yang ditandai dengan penurunan tingkat *glutation* dan respons seluler. Dalam penelitian ini digunakan alanin-glutamin dipeptida konsentrasi 7% dengan harapan dapat memperbaiki tingkat *glutation* sekaligus memperbaiki respons seluler pada penuaan hipokampus. Hasil pengamatan tingkat *glutation* dan respons seluler pada penuaan hipokampus hasil pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7% disajikan pada Tabel 1 dan 2.

Berdasarkan data pada Tabel 1 terlihat bahwa peningkatan umur dan stres oksidatif berpengaruh nyata pada penurunan tingkat *glutation* hipokampus dan ditemukan interaksi antara keduanya. Pada tikus umur tua (24 bulan), tingkat *glutation* hipokampus lebih rendah dibanding tikus umur muda (12 bulan) dan mengalami penurunan mencapai 26,34%. Penurunan tingkat *glutation* juga terjadi pada tikus dengan stres oksidatif, dengan penurunan mencapai 7,05% jika dibanding tikus tanpa stres oksidatif. Stres oksidatif pada tikus umur 24 bulan menghasilkan penurunan tingkat *glutation* hipokampus 24,77%, lebih rendah dibanding tikus normal pada umur yang sama. Bukti ini memberi gambaran secara jelas bahwa penuaan akibat peningkatan umur (penuaan fisiologi) atau stres oksidatif dapat menurunkan tingkat *glutation* hipokampus. Beberapa hasil penelitian menguatkan pendapat ini. Dringen *et al.*, (2000) melaporkan bahwa penuaan



Gambar 1 Metode penentuan viabilitas (tanda panah angka 1), mortalitas (tanda panah angka 2) neuron pada pewarnaan hematoksin-eosin (A), dan pengukuran panjang akson (tanda panah angka 3) neuron pada pewarnaan perak nitrat Bielschowsky (B). Gambar dengan perbesaran 40x.

Tabel 1. Tingkat glutation (rata-rata ± standar deviasi) hipokampus pada tikus yang mengalami penuaan fisiologis dan penuaan akibat stres oksidatif hasil pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7%

	Stres oksidatif	Alanin-glutamin dipeptida (%)	Tingkat glutation (mg/mg jaringan)
Umur (bulan)	12	TS	0,0105 ± 0,00016
		S	0,0158 ± 0,00056
	24	TS	0,0088 ± 0,00065
		S	0,0149 ± 0,00027
Faktor utama		TS	0,0065 ± 0,00039
		S	0,0142 ± 0,00038
		U	0,0058 ± 0,00045
		A	0,0138 ± 0,00053
		U-S	*
		A-U	*
		A-S	*
Interaksi	A-U-S	TN	

Keterangan: TS: tanpa stres oksidatif, S: stres oksidatif, A: alanin-glutamin dipeptida, U: umur. Tanda * (0,05 < P): berpengaruh nyata, TN: tidak berpengaruh nyata.

memberi penurunan tingkat *glutation* otak mencapai 30%-40% dibanding tikus normal. Schulz *et al.*, (2000) melaporkan sebanyak 40% tingkat *glutation* otak mengalami penurunan seiring dengan penuaan.

Penurunan tingkat *glutation*, baik yang disebabkan oleh peningkatan umur, stres oksidatif, atau interaksi antara keduanya dapat menyebabkan gangguan respons seluler

hipokampus yang ditandai dengan penurunan viabilitas, peningkatan mortalitas, dan berkurangnya panjang akson neuron. Berdasarkan data pada Tabel 2 terlihat bahwa respons viabilitas, mortalitas, dan panjang akson neuron hipokampus pada tikus umur 24 bulan lebih rendah dibanding tikus umur 12 bulan. Respons viabilitas, mortalitas, dan panjang akson neuron pada tikus umur 24 bulan

berturut-turut 4,77%, 53,8%, dan 16,71%. Stres oksidatif juga menyebabkan penurunan viabilitas, peningkatan mortalitas, dan berkurangnya panjang akson neuron, secara berturut-turut 3,83%, 40,84%, dan 8,39%. Adapun stres oksidatif pada tikus umur 24 bulan menyebabkan penurunan viabilitas, peningkatan mortalitas, dan berkurangnya panjang akson, berturut-turut 2,25%, 18,07%, dan 15,90%. Bukti ini menguatkan pendapat dari beberapa penelitian sebelumnya bahwa neuron pada bagian *cornu ammonis* hipokampus sangat rentan terhadap stres metabolik, baik yang disebabkan oleh peningkatan umur, stres oksidatif, atau interaksi antara keduanya.

Gangguan respons seluler pada hipokampus diawali penurunan fungsi mitokondria. Tanpa adanya penanganan, gangguan ini dapat menyebabkan penurunan energi seluler, akumulasi metabolit yang bersifat neurotoksik, dan pembentukan radikal bebas. Produksi radikal bebas yang berlebihan akibat stres oksidatif berdampak pada kerusakan komponen neuron, atrofi neuron, reduksi cabang dendrit atau akson neuron, dan kematian neuron (Markham, 2005; Bjork *et al.*, 2006; Kujoth *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010). Bukti-bukti penelitian ini semakin memperjelas bahwa umur tua dan stres oksidatif berpotensi menurunkan tingkat *glutation* hipokampus,

mengganggu integritas neuron, dan respon seluler hipokampus.

Pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida dan interaksi antara alanin-glutamin dipeptida dengan umur atau stres oksidatif mampu memperbaiki tingkat *glutation* dan respons seluler pada penuaan hipokampus. Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7% memberi perbaikan tingkat *glutation* hipokampus. Tingkat *glutation* mengalami peningkatan 85,76% dibanding kontrol. Perbaikan tingkat *glutation* hipokampus mempunyai korelasi dengan perbaikan respons seluler hipokampus, walaupun perbaikan respons seluler hipokampus juga dapat terjadi melalui jalur metabolisme glutamin secara terpisah tanpa melibatkan metabolisme *glutation*. Data pada Tabel 2 terlihat bahwa konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7% memberi perbaikan respons seluler hipokampus dengan peningkatan viabilitas, penurunan mortalitas, dan peningkatan panjang akson secara berturut-turut 5,46%, 37,54%, dan 23,17%, lebih baik dibanding kontrol. Perbaikan respons seluler hipokampus memberi bukti bahwa konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7% mampu menjamin ketersediaan glutamin intraseluler yang dapat digunakan untuk mendukung dua proses metabolisme yang berlangsung secara terpisah

Tabel 2. Respons selluler (rata-rata \pm standar deviasi) hipokampus pada tikus yang mengalami penuaan fisiologis dan penuaan akibat stres oksidatif hasil pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7%.

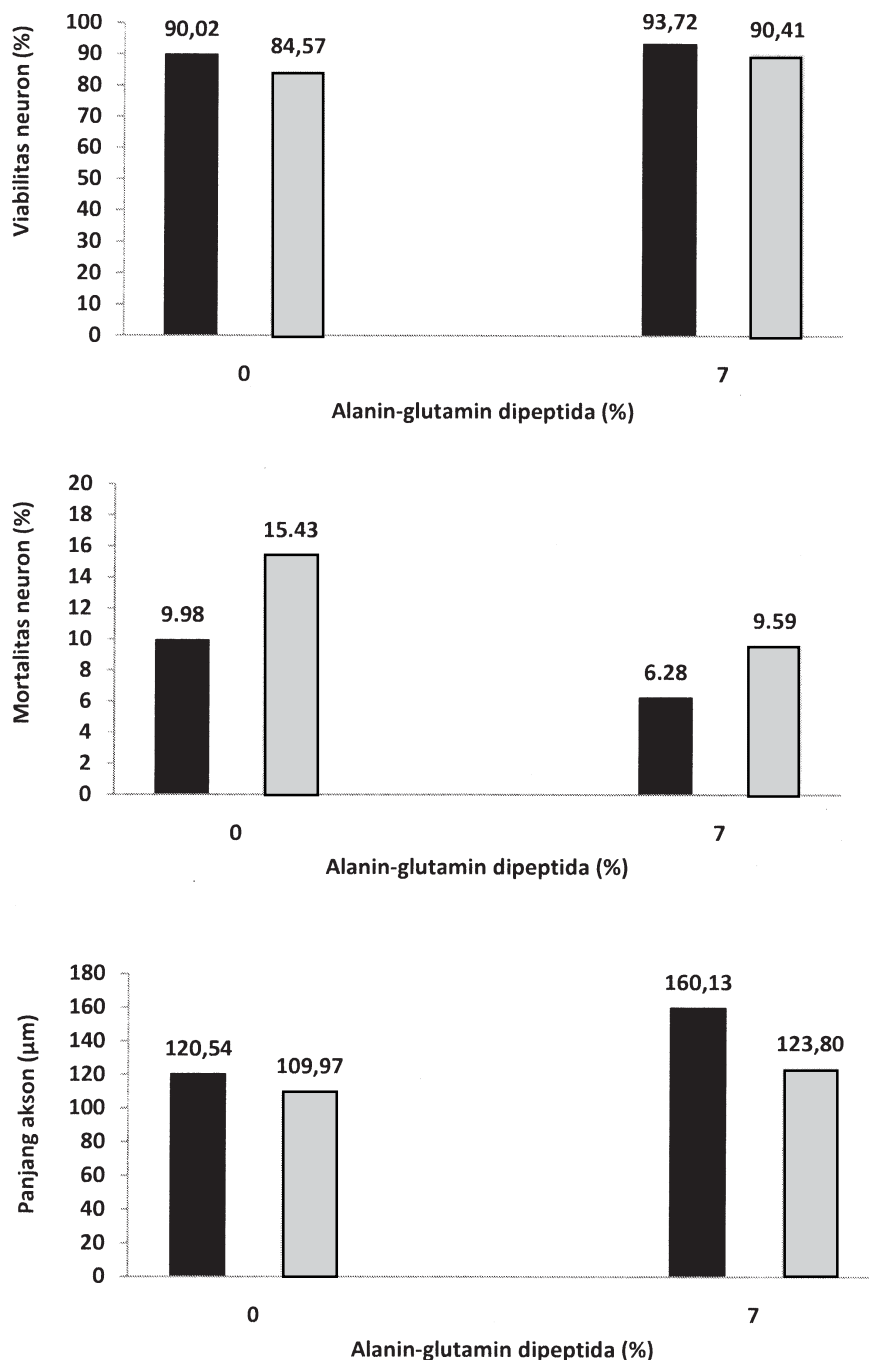
	Stres	Alanin-glutamin dipeptida (%)	Viabilitas (%)	Mortalitas (%)	Panjang akson (μ m)	
Umur (bulan)	12	TS	0	94,4 \pm 2,1	5,6 \pm 3,2	128,3 \pm 3,9
		7	95,2 \pm 3,1	4,8 \pm 0,9	166,2 \pm 4,2	
	S	0	85,6 \pm 2,6	14,4 \pm 3,6	112,8 \pm 3,9	
		7	92,2 \pm 3,9	7,8 \pm 2,7	154,1 \pm 3,6	
	24	TS	0	85,5 \pm 3,1	14,5 \pm 3,1	114,6 \pm 2,4
			7	90,6 \pm 4,6	9,4 \pm 1,1	127,8 \pm 4,9
S		0	83,6 \pm 3,6	16,4 \pm 2,5	105,3 \pm 4,5	
		7	90,2 \pm 3,6	9,8 \pm 2,9	119,8 \pm 2,1	
Faktor utama		U	*	*	*	
		S	*	*	*	
		A	*	*	*	
		U-S	*	*	*	
	Interaksi		A-U	*	*	*
			A-S	*	*	*
		A-U-S	TN	TN	TN	

Keterangan: TS: tanpa stres oksidatif, S: stres oksidatif, A: alanin-glutamin dipeptida, U: umur.

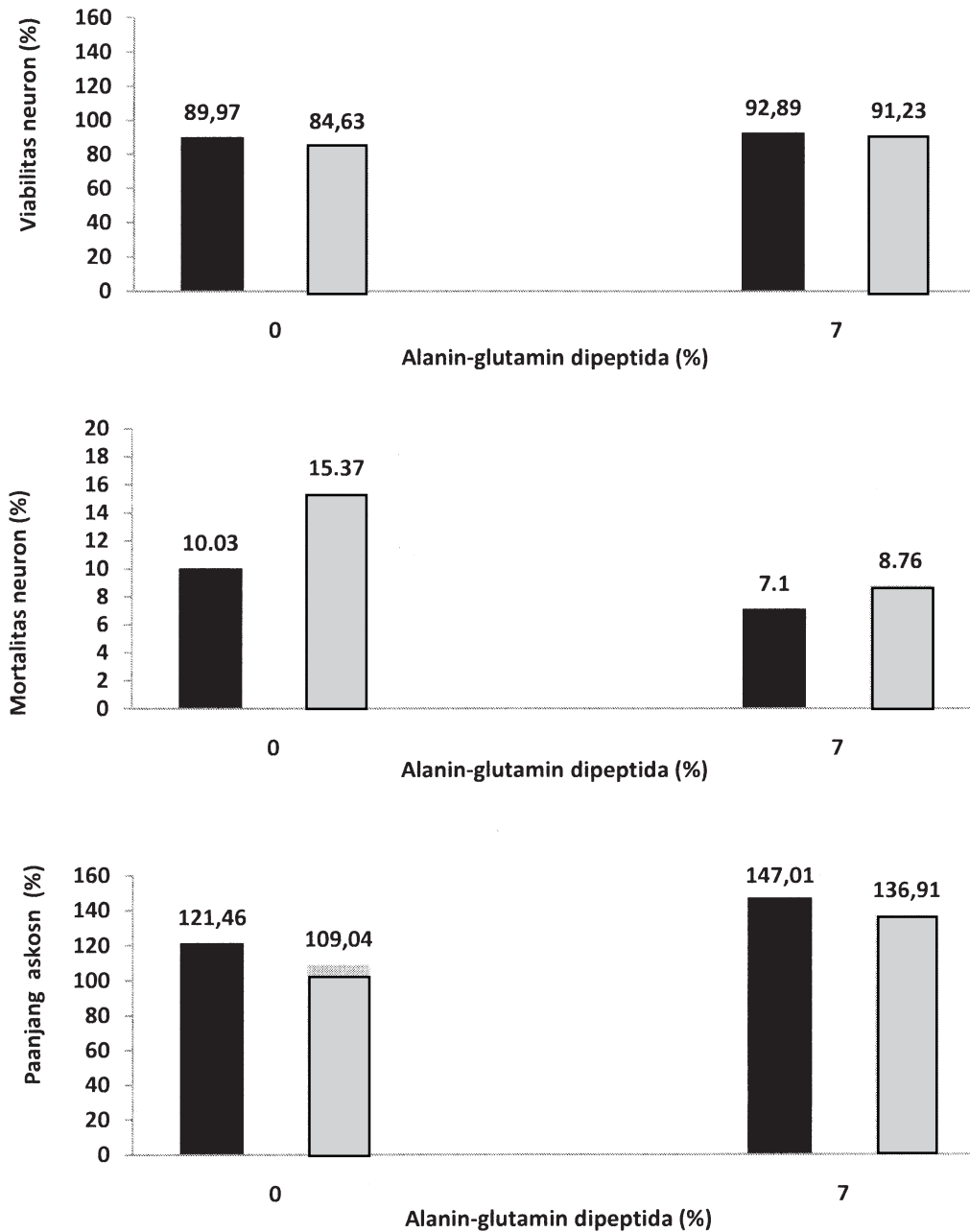
Tanda * (0,05 < P): berpengaruh nyata, TN: tidak berpengaruh nyata.

dan kedua proses metabolisme tersebut berperan penting pada perbaikan respons seluler hipokampus. Beberapa bukti penelitian memperkuat pendapat ini. Berg *et al.*, (2006) melaporkan bahwa alanin-glutamin dipeptida dihidrolisis oleh ektopeptidase neuron menjadi glutamin dan secara bertahap diambil sebagai

prekursor untuk sintesis *glutathione* (Dringen *et al.*, 2000). Ketersediaan glutamin di hipokampus hasil konversi dari alanin-glutamin dapat memelihara homeostasis glutamat di hipokampus untuk mencegah efek neuroeksitotoksik (Cruzat *et al.*, 2007). Ketersediaan glutamin juga dapat meningkatkan sintesis



Gambar 2. Respons viabilitas, mortalitas, dan panjang akson neuron hipokampus pada tikus umur 12 bulan (warna abu-abu) dan 24 bulan (warna hitam) hasil pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7%.



Gambar 3. Respons seluler hipokampus pada tikus tanpa (warna hitam) atau dengan stres oksidatif (warna abu-abu) hasil pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7%.

protein yang digunakan untuk mendukung regenerasi sel-sel neuron di hipokampus (Andreasen *et al.*, 2009; Schade *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010).

Selain terbukti dapat meningkatkan level *glutathion* hipokampus, konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7% mampu memberi perbaikan respons seluler hipokampus pada tikus umur 12 bulan dan 24 bulan yang ditandai dengan peningkatan viabilitas, penurunan

mortalitas, dan peningkatan panjang akson neuron. Respons ketiga parameter seluler pada tikus umur 12 bulan lebih tinggi dibanding tikus umur 24 bulan, namun memiliki tingkat perbaikan yang lebih rendah. Pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7% memberi perbaikan respons ketiga parameter seluler, berturut-turut 4,11%, 37,07%, dan 12,58%, lebih baik dibanding kontrol, sedangkan tikus umur 24 bulan memiliki tingkat perbaikan

yang lebih tinggi, berturut-turut 6,91%, 37,85%, dan 32,84% (Gambar 2). Perbaikan respons seluler diduga terkait dengan upaya pemulihan homeostasis *glutation* untuk meminimalisasi resiko metabolik yang disebabkan oleh kerusakan oksidatif. Hal tersebut berakibat sebagian besar substrat metabolik yang berhubungan dengan sintesis *glutation* dan perbaikan respons seluler bergerak ke arah hipokampus untuk mempertahankan keseimbangan kapasitas antara antioksidan dan oksidan sehingga tingkat mortalitas dapat ditekan, viabilitas dan panjang akson dapat dipertahankan atau ditingkatkan. Beberapa hasil penelitian memperkuat pendapat ini. Jun *et al.*, (2006) melaporkan bahwa alanin-glutamin dipeptida mempunyai kemampuan meningkatkan respons sel dan mempertahankan tingkat *glutation* dalam jaringan tubuh. Alanin-glutamin dipeptida juga berpengaruh pada peningkatan energi seluler, melindungi struktur dan fungsi mitokondria, melindungi granula-granula sitoplasma, retikulum endoplasma kasar, dan menurunkan produksi radikal-radikal bebas. Cruzat dan Terapegui (2009) melaporkan bahwa glutamin dilibatkan dalam pemeliharaan dan sintesis *glutation* yang berfungsi mempertahankan keseimbangan kapasitas antara antioksidan dengan oksidan, mempertahankan integritas seluler, dan mencegah kerusakan jaringan.

Pada penelitian ini juga diamati tingkat *glutation* dan respons seluler hipokampus hasil pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7% pada tikus tanpa atau dengan stres oksidatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat *glutation* hipokampus pada tikus tanpa stres oksidatif lebih tinggi dibanding tikus dengan stres oksidatif. Pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7% pada tikus tanpa stres oksidatif mampu memperbaiki tingkat *glutation* mencapai 76,47%, lebih tinggi dibanding kontrol. Perbedaan perbaikan tingkat *glutation* pada tikus tanpa atau dengan stres oksidatif menunjukkan adanya interaksi antara kedua faktor tersebut.

Perbaikan tingkat *glutation* hipokampus berbanding lurus dengan respons seluler hipokampus. Respons seluler hipokampus juga mengalami perbaikan setelah diberi konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7%. Tikus tanpa stres oksidatif menunjukkan respons seluler yang lebih baik dibanding tikus stres oksidatif, namun memiliki tingkat perbaikan yang lebih rendah.

Tingkat perbaikan respons viabilitas, mortalitas, dan akson neuron pada tikus tanpa stres oksidatif, berturut-turut 3,25%, 29,21%, dan 21,04%, sedangkan pada tikus stres oksidatif berturut-turut 7,80%, 43,01%, dan 25,56% (Gambar 3). Perbedaan perbaikan respons seluler hasil pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida 7% pada tikus tanpa atau stres oksidatif menunjukkan adanya interaksi antara kedua faktor tersebut. Beberapa hasil penelitian sejalan dengan penelitian ini. Jun *et al.*, (2006) melaporkan bahwa alanin-glutamin dipeptida yang diberikan pada tikus stres oksidatif dapat memperbaiki tingkat *glutation*, meningkatkan energi seluler, dan mencegah penurunan fungsi sel. Lebih lanjut dilaporkan bahwa alanin glutamin dipeptida dapat mendukung pemenuhan kebutuhan glutamin intraseluler neuron hipokampus yang digunakan untuk sintesis asam nukleat yang diperlukan untuk regenerasi. Regenerasi akson melibatkan pengaturan ion kalsium melalui Ca^{2+} -ATPase, pengaktifan cAMP atau pensinyalan protein kinase intraseluler yang berpengaruh pada ekspresi gen, perubahan protein sitoskelet, dan molekul-molekul intraseluler (Neumann *et al.*, 2011; Jun *et al.*, 2006). Molekul-molekul intraseluler terlibat dalam mempertahankan kehidupan neuron melalui mekanisme umum yang melibatkan molekul perantara intraseluler. Perubahan yang terjadi pada molekul perantara intraseluler dapat memengaruhi fosforilasi protein sitoskelet dan menyebabkan pertumbuhan akson neuron yang mengalami disfungsi (Horner dan Gage, 2000).

SIMPULAN

Pemberian konsentrasi alanin-glutamin dipeptida memberi perbaikan tingkat *glutation* yang memperantarai perbaikan respons seluler pada penuaan hipokampus, baik pada penuaan fisiologi atau penuaan akibat stres oksidatif.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang profil protein intraseluler hasil ekspresi gen dan protein sitoskelet yang terlibat dalam perbaikan respons seluler neuron pada penuaan hipokampus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (Dirjen Dikti) Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberi Beasiswa Program Pascasarjana (BPPS) sehingga penelitian dan penulisan artikel ini dapat diselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Andreasen AS, Skovsgaard PT, Mortensen OH, van Hall G, Moseley PL, Pedersen BK. 2009. The effect of glutamine infusion on the inflammatory response and HSP70 during human experimental endotoxaemia. *Critical Care* 13(10): 1186-7696.
- Berg A, Rooyackers O, Norberg A, Wernerman J. 2006. Elimination kinetics of L-alanyl-L-glutamine in ICU patients. *Biomedical and Life Science* 29(3): 221-228.
- Bjork K, Saarikoski ST, Arlinde C, Kovanen L, Osei-Hyiaman D, Ubaldi M, Reimers M, Hyytia P, Heilig M, Sommer WH. 2006. Glutathione-S-transferase expression in the brain: possible role in ethanol preference and longevity. *The FASEB Journal* 4: 1826-1835
- Cruzat VF, Tirapegui JO. 2009. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. *Nutrition* 25: 428-435.
- Cruzat VF, Rogero MM, Borges MC, Tirapegui J. 2007. Current aspects about oxidative stress, physical exercise and supplementation. *Rev Bras Med Esporte* 13(5): 304e-210e.
- Daren KH, Dhaliwalm R, Andrew Day RD, Drover J, Cote H, Wischmeyer P. 2007. Optimizing the dose of glutamine dipeptides and antioxidants in critically III patients: a phase I dose-finding study. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 31(2): 109-118.
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. 2000. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267: 4912-4916.
- Feoli AM, Sequiera I, Almeida LMV, Tramontina AC, Battu C, Wofchuk ST, Gottfried C, Perry ML, Goncalves CA. 2010. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. *J Nutr* 36: 2357-2361.
- Fernandes V, Rogero MM, Tirapegui J. 2010. Effects of supplementation with free glutamine and the peptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to prolonged exercise. *Cell Biochem Funct* 28: 24-30.
- Horner PJ, Gage FH. 2000. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407: 963-970.
- Humason GL. 1967. *Animal Tissue Techniques*. 2nd ed. San Fransisco. Freeman and Company.
- Ito HT, Schuman EM. 2011. Functional division of hippocampal area CA1 via modulatory gating of entorhinal cortical inputs. *Hippocampus* 9: 1-15.
- Jun C, Dai CL, Zhang X, Cui K, Xu F, Xu YQ. 2006. Alanyl-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 12(9): 1373-1378.
- Kujoth GC, Bradshaw PC, Haroon S, Prolla TA. 2007. The role of mitochondrial DNA mutations in mammals aging. *PLoS Genet* 23: e24.
- Liu J, Wanga A, Li L, Huang Y, Xue P, Hao A. 2010. Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Seizure* 19: 165-172
- Lourbopoulos A, Grigoriadis S, Symeonidou C, Deretzi G, Taskos N, Shohami E, Grigoriadis N. 2007. Modified Bielschowsky silver impregnation combined with hematoxylin or cresyl violet counterstaining as a potential tool for the simultaneous study of inflammation and axonal injury in the central nervous system. *Aristotle University Medical Journal* 34(1): 31-39
- Markham JA. 2005. Sexually dimorphic aging of dendritic morphology in CA1 of hippocampus. *Hippocampus* 15: 97
- Neumann B, Nguyen KCQ, Hall DH, Yakar AB, Hilliard MA. 2011. Axonal regeneration proceeds through specific axonal fusion in transected *C. elegans* neurons. *Developmental Dynamics* 240: 1365-1372.

- Reddy PH. 2009. Amyloid beta, mitochondrial structural, and functional dynamics in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology* 218: 286-292.
- Rosenzweig ES, Barnes CA. 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* 69: 143.
- Schade RSM, Grundling M, Pavlovic D, Starke K, Wendt M, Retter S, Murphy M, Suchner U, Spassov A, Gedrange T, Lehmann CH. 2009. Glutamine and alanyl-glutamine dipeptide reduce mesenteric plasma extravasation, leukocyte adhesion and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) release during experimental endotoxemia. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60(8): 19-24.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. 2000. Glutathione, oxidative stress, and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem* 267: 4904-4911.
- Sunarno, Manalu W, Kusumotini N, Dewi Ratih A. 2012. Perbaikan level glutation hipokampus pada tikus yang mengalami penuaan fisiologis dan penuaan akibat stres oksidatif dengan pemberian alanin-glutamin dipeptida. *Sains Medika* 3(2): 157-165
- Xavier GF, Costa VCI. 2009. Dentate gyrus and spatial behaviour. *Neuroscience* 33: 768-769.