

# Peran spesifik Bifidobacteria dalam perkembangan perilaku dan kecerdasan anak

*by Ahmad Suryawan*

---

**Submission date:** 13-Sep-2022 12:09PM (UTC+0800)

**Submission ID:** 1898589145

**File name:** 20\_Peran\_spesifik\_Bifidobacteria\_dalam\_perkembangan\_perilaku.pdf (580.06K)

**Word count:** 2758

**Character count:** 16851

## **Peran spesifik *Bifidobacteria* dalam perkembangan perilaku dan kecerdasan anak**

Ahmad Suryawan\*

\*Departemen Ilmu Kesehatan Anak,  
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, RSUD Dr. Sutomo, Surabaya

### **Pendahuluan**

Perhatian para ahli yang semakin tinggi selama satu dekade terakhir ini dan munculnya berbagai bukti studi tentang peran mikrobiota pada perkembangan otak yang berbasis paradigma *microbiota-gut-brain axis*,<sup>1-3</sup> menimbulkan implikasi semakin banyak pula studi yang ingin membuktikan adanya peran dari mikrobiota saluran cerna pada perilaku dan kecerdasan anak.<sup>4-7</sup>

Perkembangan perilaku dan kecerdasan anak berjalan paralel dengan perkembangan otak anak, yang berlangsung sejak di dalam kandungan dan harus melalui periode kritis pada awal kehidupan anak. Oleh karena itu, tidak mengherankan bila dalam hal ini semua peristiwa yang terjadi paralel dengan priode kritis perkembangan otak anak akan menjadi perhatian khusus dalam pembentukan kecerdasan dan perilaku anak. Demikian pula dengan komposisi mikrobiota di awal kehidupan anak, khususnya dengan salah satu jenis mikrobiota yaitu *Bifidobacteria*, yang mendapatkan perhatian khusus dalam kaitan dengan perkembangan otak anak, perkembangan perilaku dan kecerdasan anak.<sup>8</sup>

Kolonisasi *Bifidobacteria* bukan hanya mendominasi komposisi mikrobiota saluran cerna pada saat anak baru lahir, namun juga terjadi paralel dengan periode kritis perkembangan otak anak usia dini.<sup>9-10</sup> Para ahli secara umum juga mempunyai pendapat yang sama bahwa standar perkembangan kolonisasi mikrobiota saluran cerna dikatakan normal dan sehat bila bayi lahir

normal per-vaginam, cukup bulan dan sehat, mendapat ASI eksklusif, dan mikrobiota saluran cerna didominasi oleh spesies tertentu dari genus *Bifidobacterium*.<sup>11</sup>

Proses perjalanan pembuktian adanya peran spesifik dari *Bifidobacteria* pada perkembangan perilaku dan kecerdasan anak berawal dari bukti studi eksperimental binatang coba.<sup>12,13</sup> Translasi ke studi klinis pada bayi atau anak tidak mudah dan masih menghadapi berbagai kendala yang bersifat teknis maupun etis.<sup>14</sup> Hasil studi klinis yang ada, pada subyek anak dan bayi, masih menunjukkan hasil yang tidak konsisten dan heterogen dengan mayoritas masih bersifat studi observasional. Bukti klinis dari studi klinis yang bersifat acak-terkontrol sampai saat ini masih sangat terbatas. Namun demikian, dari hasil awal studi tentang peran spesifik *Bifidobacteria* pada perkembangan kecerdasan dan perilaku anak menunjukkan adanya potensi positif yang menjanjikan. Pada masa mendatang, dengan semakin meningkatnya pemahaman paradigma *microbiota-gut-brain axis*, diharapkan akan semakin jelas untuk dapat membuat sebuah kesimpulan yang konklusif tentang peran peran spesifik *Bifidobacteria* pada perkembangan kecerdasan dan perilaku anak.

#### **Peran spesifik *Bifidobacteria* pada perkembangan perilaku anak**

Perkembangan perilaku anak yang paling sering dikaitkan dengan kolonisasi mikrobiota, terutama dari genus *Bifidobacterium* adalah dalam hal gangguan temperamen pada usia bayi, perilaku kecemasan, *Autism Spectrum Disorders* (ASD) dan *Attention Deficit Hyperactive Disorders* (ADHD).

Studi oleh Partty dkk, tahun 2012 membuktikan bahwa proporsi jumlah *Bifidobacterium* terhadap jumlah total mikrobiota di dalam saluran cerna berbanding terbalik dengan frekuensi rewel dan menangis ( $p=0,03$ ) pada saat bayi berusia 3 bulan pertama, meskipun pada studi ini

belum terungkap strain dari *Bifidobacterium* tersebut.<sup>15</sup> Studi ini membuktikan bahwa kolonisasi *Bifidobacteria* saluran cerna diawal kehidupan anak mempunyai keterkaitan dengan kondisi stres pada bayi, dalam hal rewel dan menangis.

Studi investigasi keterkaitan mikrobiota saluran cerna pada masa bayi dengan temperamen bayi pada usia 12 bulan yang diukur dengan *Infant Behavior Questionnaire-Revised* (IBQ-R), menunjukkan hasil bahwa adanya asosiasi positif antara kolonisasi *Bifidobacterium* pada usia bayi 1-3 minggu setelah lahir dengan skor temperamen pada dimensi operasi/ekstraversi pada usia 12 bulan.<sup>16</sup> Dimensi operasi/ekstraversi terdiri dari enam subskala yang menilai model pendekatan, reaktivitas vokal, kesenangan berintensitas tinggi, tersenyum/tertawa, tingkat aktivitas, dan kepekaan persepsi dari bayi. Kolonisasi *Bifidobacterium* di awal kelahiran nampaknya menjadi prediktor penting untuk temperamen bayi, karena studi yang lain oleh Aatsinki dkk, tahun 2019, juga menunjukkan hasil yang serupa, dimana terbukti adanya hubungan positif signifikan antara kolonisasi *Bifidobacterium* di usia 2,5 bulan dan skor temperamen dimensi operasi/ekstraversi di usia 6 bulan.<sup>17</sup>

Kolonisasi *Bifidobacteria* dalam saluran cerna di awal kehidupan anak ternyata mempunyai dampak jangka panjang terhadap perilaku di usia lebih lanjut. Hal ini terbukti dari studi eksperimental,<sup>18</sup> maupun studi klinis pada bayi.<sup>19</sup> Bila bayi pada usia 6 bulan pertama mempunyai kolonisasi *Bifidobacteria* saluran cerna yang lebih rendah dibandingkan bayi sehat dan normal, maka pada usia 13 tahun nantinya bayi tersebut mempunyai risiko lebih tinggi untuk mengalami gangguan perilaku *Attention Deficit Hyperactive Disorders* (ADHD) atau *Asperger Syndrome*.<sup>19</sup>

Anak dengan gangguan perilaku *Autism Spectrum Disorders* (ASD) selain menunjukkan gejala defisit dalam komunikasi dan interaksi sosial, serta perilaku stereotipi yang khas, seringkali juga mempunyai komorbiditas kuat adanya disfungsi saluran cerna. Sehingga anak dengan ASD akan menunjukkan karakteristik yang selektif terhadap makanan atau nutrisi tertentu, yang dapat mempengaruhi kolonisasi mikrobiota di dalam saluran cerna.<sup>20</sup> Suplementasi nutrisi berbasis mikrobiota dipandang oleh beberapa ahli menjadi salah satu pilihan yang berpotensi sebagai terapi anak ASD di masa depan. Namun demikian, para ahli sampai saat ini masih belum dapat mencapai kesepakatan mengenai strain mikrobiota tertentu yang mengalami perubahan ataupun yang paling mendominasi pada anak ASD.

Studi observasional pada individu ASD yang hidup dalam lingkungan keluarga tertentu menunjukkan bahwa anggota keluarga yang tidak ASD mempunyai diversitas mikrobiota saluran cerna yang lebih beragam dibandingkan individu ASD dalam keluarga tersebut.<sup>21</sup> Sedangkan pada komunitas anak usia 2-7 tahun, anak ASD terbukti mempunyai kolonisasi *Bifidobacteria* saluran cerna yang lebih rendah ( $p=0.04$ ) dibandingkan anak normal.<sup>22</sup> Analisis dari sebuah tinjauan sistematis memperlihatkan bahwa komposisi mikrobiota saluran cerna anak ASD dibandingkan anak yang normal perkembangannya menunjukkan jumlah yang lebih rendah untuk kolonisasi *Bifidobacterium*, namun lebih tinggi untuk kolonisasi *Faecalibacterium* dan *Lactobacillus*.<sup>23</sup>

Namun demikian, hasil analisis tinjauan sistematis dari 10 studi observasional (dua studi ADHD dan delapan studi ASD),<sup>24</sup> dan 26 studi disbiosis mikrobiota saluran cerna pada anak ASD,<sup>25</sup> tidak menghasilkan kesimpulan yang konklusif dan definitif mengenai komposisi mikrobiota yang khas dan spesifik untuk anak ASD. Didapatkan heterogenitas yang signifikan dalam parameter besar subyek, parameter klinis, jenis kelamin, dan jenis kelompok yang

digunakan sebagai kontrol.<sup>24</sup> Masih didapatkan inkonsistensi hasil tentang perubahan mikrobiota saluran cerna yang dapat digunakan sebagai prediktor khas untuk anak ASD, kecuali dalam hal perubahan kolonisasi spesies yang termasuk dalam genus *Bifidobacterium*.<sup>25</sup> Tidak mengherankan bila para ahli juga masih belum dapat menentukan standarisasi strain, dosis, dan durasi pemberian regimen probiotik untuk anak ASD.<sup>26</sup> Sehingga, walaupun pada beberapa studi pre-klinis dan uji klinis menampakkan hasil yang menjanjikan, namun bukti efikasi penggunaan regimen berbasis mikrobiota dalam manajemen gangguan perilaku ASD masih sangat terbatas.

Demikian pula studi mikrobiota *Bifidobacteria* saluran cerna pada anak ADHD, yang menunjukkan hasil relatif sama dengan studi pada anak ASD, yaitu belum sampai pada kesimpulan yang konklusif dan definitif. Mikrobiota *Bifidobacteria* dikatakan terlibat dalam sistem produksi neurotransmitter dopamin, sehingga sangat mungkin akan mempunyai peran penting dalam patogenesis ADHD. Bukti awal didapatkan dari populasi anak ADHD yang mempunyai kolonisasi *Bifidobacteria* lebih rendah dibandingkan populasi anak normal. Namun penggunaan mikrobiota *Bifidobacteria* sebagai biomarker di masa depan masih menemui tantangan dalam hal adanya perbedaan konsentrasi kolonisasi *Bifidobacteria* yang cukup bervariasi pada saluran cerna anak ADHD.<sup>27</sup>

### **Peran spesifik *Bifidobacteria* pada perkembangan kecerdasan dan kualitas hidup anak**

Studi tentang peran spesifik *Bifidobacteria* untuk perkembangan kecerdasan dan kualitas hidup anak masih sangat terbatas, karena jarang digunakan sebagai luaran primer. Sebagian besar studi yang menyangkut hal tersebut umumnya dilakukan sebagai luaran sekunder dalam sebuah

penelitian. Dan, yang digunakan dalam studi tersebut sebagian besar bukan berupa regimen tunggal *Bifidobacteria*, namun berupa campuran dengan mikrobiota jenis yang lain.<sup>28-30</sup>

Pada studi acak-kontrol tentang efek suplementasi campuran probiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium infantis*,<sup>31</sup> atau campuran *Bifidobacterium infantis*, *Streptococcus thermophilus* dan *Bifidobacterium lactis*,<sup>32</sup> pada bayi berat lahir sangat rendah yang lahir prematur, terhadap status perkembangan dan kecerdasan, yang dinilai menggunakan instrumen Bayley Scales of Infant Development (BSID) II,<sup>31</sup> atau BSID- III dan Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence (WPPSI).<sup>32</sup> Kedua studi tersebut melaporkan hasil tidak ada efek yang signifikan pemberian campuran mikrobiota yang diberikan terhadap status perkembangan dan kecerdasan anak.

Demikian pula studi pada bayi cukup bulan, yang diberikan campuran probiotik *Lactobacillus rhamnosus* dan *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* pada usia gestasi 37 minggu hingga anak berusia 2 tahun, dan dinilai luaran kecerdasannya pada usia 11 tahun,<sup>33</sup> atau pada studi yang diberikan campuran probiotik *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus rhamonosus* pada anak berusia 12-24 bulan, dan dinilai luaran kognitifnya pada usia 24 bulan.<sup>34</sup> Kedua studi tersebut juga menyimpulkan tidak ada efek positif yang signifikan dari pemberian probiotik terhadap kecerdasan atau kognitif anak.

Studi dilakukan oleh Sordillo, tahun 2019, untuk menganalisis adanya hubungan antara komposisi mikrobiota saluran cerna pada bayi berusia 3-6 bulan dengan status perkembangan anak ketika berusia 3 tahun yang dinilai dengan instrumen *Ages and Stages Questionnaire*, edisi ke-3 (ASQ-3). Studi ini menunjukkan hasil yang cukup menarik, dimana ketika komposisi mikrobiota saluran cerna dibedakan menjadi beberapa kelompok berdasarkan skor

koabundansi, ternyata skor abundansi dengan dominasi jenis mikrobiota tertentu mempunyai hubungan dengan domain perkembangan tertentu pada ASQ. Sementara skor abundansi dengan dominasi *Bifidobacteria* yang paling rendah terbukti mempunyai hubungan dengan rendahnya skor ASQ pada domain motorik halus.<sup>35</sup>

Sebuah studi yang menilai kualitas hidup anak sebagai luaran sekunder dari efek suplementasi berbasis mikrobiota *Bifidobacteria* menggunakan campuran dari *Bifidobakterium longum* BB536 (3x10<sup>9</sup> CFU), *Bifidobakterium infantis* M-63 (1x10<sup>9</sup> CFU), dan *Bifidobakterium breve* M-16 V (1x10<sup>9</sup> CFU), yang diberikan sekali per hari selama 8 minggu, kepada anak usia 9 tahun yang mengalami rinitis alergi dan asma, ternyata mempunyai efek positif sekunder berupa peningkatan skor kualitas hidup (P<0,001) yang diukur dengan instrumen *Mini Rhinoconjunctivitis quality of life questionnaire*.<sup>36</sup>

### **Kesimpulan**

Sejak para ahli menaruh perhatian yang besar terhadap efek kolonisasi mikrobiota saluran cerna pada perkembangan otak, maka beberapa jenis mikrobiota khususnya peran *Bifidobacteria* terhadap perilaku dan kecerdasan anak. Meskipun studi pre-klinis dan beberapa uji klinis pada bayi dan anak menunjukkan hasil yang positif, namun efikasi penggunaan suplementasi berbasis mikrobiota *Bifidobacteria* dalam manajemen anak dengan gangguan perilaku masih sangat terbatas, dan masih menghadapi banyak tantangan akan adanya hasil studi yang bervariasi dan tidak konsisten. Hal yang sama juga didapatkan pada studi efek *Bifidobacteria* terhadap kecerdasan anak. Di masa depan masih diharapkan akan muncul berbagai eksplorasi terutama pada tingkat studi acak-terkontrol yang dapat mengungkap lebih detail tentang berbagai efek *Bifidobacteria* dari terhadap perilaku dan kecerdasan anak. Maka,



tidak mustahil akan dapat dilakukan standarisasi dalam hal strain, dosis, dan durasi pemberian suplementasi *Bifidobacteria* yang konklusif dan definitif.

### Daftar Pustaka

1. Codagnone MG, Spichak S, O'Mahony SM, dkk. Programming bugs: microbiota and the developmental origins of brain health and disease. *Biol Psychiatry*. 2019;85(2):150–63.
2. Liu L, Huh JR, Shaha K. Microbiota and the gut-brain-axis: Implications for new therapeutic design in the CNS. *eBioMedicine* 2022;77:103908. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103908>
3. Chakrabarti A, Geurts L, Hoyles L, dkk. The microbiota–gut–brain axis: pathways to better brain health. Perspectives on what we know, what we need to investigate and how to put knowledge into practice. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2022;79:80 <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04060-w>.
4. Codagnone MG, Stanton C, O'Mahony SM, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and Neurodevelopmental Trajectories: Role of Maternal and Early-Life Nutrition. *Ann Nutr Metab* 2019;74(suppl 2):16–27.
5. Streit F, Prandovszky E, Send T, dkk. Microbiome profiles are associated with cognitive functioning in 45-month-old children. *Brain, Behavior, and Immunity* 2021;98:151–160.
6. Ou Y, Belzer C, Smidt H, de Weerth C. Development of the gut microbiota in healthy children in the first ten years of life: associations with internalizing and externalizing behavior. *Gut Microbes* 2022;14(1):2038853. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2038853>
7. Laue HE, Coker MO, Madan JC. The Developing Microbiome From Birth to 3 Years: The Gut-Brain Axis and Neurodevelopmental Outcomes. *Front Pediatr* 2022;10:815885. doi: 10.3389/fped.2022.815885
8. Saturio S, Nogacka AM, Alvarado-Jasso GM, Salazar N, de los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M, Arboleya S. Role of Bifidobacteria on Infant Health. *Microorganisms* 2021;9: 2415. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122415>
9. Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM and Finlay B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol* 2014;5:427.
10. Wang A, Harvey L, Martin R, dkk. Targeting the gut microbiota to influence brain development and function in early life. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2018;95:191–201.
11. Karlsson CLJ, Molin G, Cilio CM, Ahrné S. The Pioneer Gut Microbiota in Human Neonates Vaginally Born at Term—A Pilot Study. *Pediatr Res* 2011;70: 282–286.
12. Cerdó T, Ruíz A, Suárez A, Campoy C. Probiotic, Prebiotic, and Brain Development. *Nutrients* 2017;9:1247.
13. Skonieczna-Zydecka K, Marlicz W, Misera A, Koulaouzidis A, Łoniewski I. Microbiome - The Missing Link in the Gut-Brain Axis: Focus on Its Role in Gastrointestinal and Mental Health. *J Clin Med* 2018; 7:521.
14. Lowry CA, Smith DG, Siebler PH., dkk. The Microbiota, Immunoregulation, and Mental Health: Implications for Public Health. *Curr Envir Health Rpt*. 2016;3:270–286.

15. Partty A, Kalliomaki M, Endo A, Salminen S, Isolauri E. Compositional Development of Bifidobacterium and Lactobacillus Microbiota Is Linked with Crying and Fussing in Early Infancy. *PLoS One* 2012;7(3):e32495.
16. Fox M, Lee SM, Wiley KS, Lagishetty V, Sandman CA, Jacobs JP, Glynn LM. Development of the infant gut microbiome predicts temperament across the first year of life. *Development and Psychopathology* 2021;1–12. <https://doi.org/10.1017/S0954579421000456>
17. Aatsinki AK, Lahti L, Uusitupa HM, dkk. Gut microbiota composition is associated with temperament traits in infants. *Brain, Behavior, and Immunity* 2019;80, 849–858.
18. Luk B, Veeraragavan S, Engevik M, dkk. Postnatal colonization with human "infant-type" Bifidobacterium species alters behavior of adult gnotobiotic mice. *PLoS One* 2018;13(5): e0196510.
19. Pärtty A, Kalliomäki M, Wacklin P, Salminen S, Isolauri E. A possible link between early probiotic intervention and the risk of neuropsychiatric disorders later in childhood: a randomized trial. *Pediatr Res* 2015;77(6):823-828.
20. Ristori MV, Quagliariello A, Reddel S, dkk. Autism, Gastrointestinal Symptoms and Modulation of Gut Microbiota by Nutritional Interventions. *Nutrients* 2019;11:2812.
21. Razafindralambo A, Razafindralambo H. Gut Microbiota Profile Autism Spectrum Disorder Relationship: Diversity and Imbalance in Probiotics. *J Prob Health* 2019;7:209.
22. Berding K, Donovan SM. Diet Can Impact Microbiota Composition in Children With Autism Spectrum Disorder. *Front Neurosci* 2018;12:515.
23. Xu M, Xu X, Li J, Li F. Association Between Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Psychiatry* 2019;10:473.
24. Lacorte E, Gervasi G, Bacigalupo I, dkk. A Systematic Review of the Microbiome in Children With Neurodevelopmental Disorders. *Front Neurol* 2019;10:727.
25. Ho LKH, Tong VJW, Syn N, dkk. Gut microbiota changes in children with autism spectrum disorder: a systematic review. *Gut Pathog* 2020;12:6.
26. Ng QX, Loke W, Venkatanarayanan N, Lim DY, Soh AYS, Yeo WS. A Systematic Review of the Role of Prebiotics and Probiotics in Autism Spectrum Disorders. *Medicina* 2019;55:129.
27. Bull-Larsen S, Mohajeri MH. The Potential Influence of the Bacterial Microbiome on the Development and Progression of ADHD. *Nutrients* 2019;11:2805.
28. Rianda D, Agustina R, Setiawan EA, Manikam NRM. Effect of probiotic supplementation on cognitive function in children and adolescents: a systematic review of randomised trials. *Beneficial Microbes*, 2019; 10(8): 873-882.
29. Eastwood J, Walton G, Van Hemert S, Williams C, Lamport D. The effect of probiotics on cognitive function across the human lifespan: A systematic review *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2021;128: 311–327.
30. Basso M, Johnstone N, Knytl P, Nauta A, Groeneveld A, Cohen Kadosh KA. Systematic Review of Psychobiotic Interventions in Children and Adolescents to Enhance Cognitive Functioning and Emotional Behavior. *Nutrients* 2022;14:614. <https://doi.org/10.3390/nu14030614>
31. Chou IC, Kuo HT, Chang JS, dkk. Lack of effects of oral probiotics on growth and neurodevelopmental outcomes in preterm very low birth weight infants. *J Pediatr* 2010;156 (3):393–396.

32. Jacobs SE, Hickey L, Donath S, dkk. Probiotics, prematurity and neurodevelopment: follow-up of a randomised trial. *Bmj Paediatr Open* 2017;1:e000176. doi:10.1136/bmjpo-2017-000176
33. Slykerman RF, Kang J, Van Zyl N, dkk. Effect of early probiotic supplementation on childhood cognition, behaviour and mood a randomised, placebo-controlled trial. *Acta Paediatr* 2018;107 (12):2172.
34. Firmansyah A, Dwipoerwantoro PG, Kadim M, dkk. Improved growth of toddlers fed a milk containing synbiotics. *Asia Pac J Clin Nutr* 2011;20 (1):69.
35. Sordillo JE, Korrick S, Laranjo N, dkk. Association of the Infant Gut Microbiome With Early Childhood Neurodevelopmental Outcomes. An Ancillary Study to the VDAART Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* 2019;2(3):e190905.
36. Del Giudice MM, Indolfi C, Capasso M, dkk. Bifidobacterium mixture (B longum BB536, B infantis M-63, B breve M-16V) treatment in children with seasonal allergic rhinitis and intermittent asthma. *Ital J Pediatr* 2017;43:25.

# Peran spesifik Bifidobacteria dalam perkembangan perilaku dan kecerdasan anak

## ORIGINALITY REPORT

5%

SIMILARITY INDEX

5%

INTERNET SOURCES

5%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1

Anshula Mehra, Geetakshi Arora, Gaurav, Manmohit Kaur, Hasandeep Singh, Balbir Singh, Sarabjit Kaur. "Gut microbiota and Autism Spectrum Disorder: From pathogenesis to potential therapeutic perspectives", Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2022

Publication

5%

Exclude quotes Off

Exclude matches < 5%

Exclude bibliography Off

# Peran spesifik Bifidobacteria dalam perkembangan perilaku dan kecerdasan anak

---

GRADEMARK REPORT

---

FINAL GRADE

**/0**

GENERAL COMMENTS

**Instructor**

---

PAGE 1

---

PAGE 2

---

PAGE 3

---

PAGE 4

---

PAGE 5

---

PAGE 6

---

PAGE 7

---

PAGE 8

---

PAGE 9

---

PAGE 10

---