

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Autism Spectrum Disorder (ASD) adalah gangguan *neurodevelopment* pada anak dengan ciri adanya gangguan pada komunikasi dan interaksi sosial, yang diikuti dengan pola perilaku yang stereotipe dan *repetitive*. Prevalensi ASD tiap tahun di dunia semakin meningkat. Hal ini mempengaruhi *cost* yang harus dikeluarkan keluarga maupun pemerintah untuk pengobatan dan pendidikan anak-anak dengan ASD. WHO menyebutkan bahwa prevalensi ASD adalah 0,76% dari 16 % populasi anak di dunia atau satu banding 21 kelahiran (1). Sedangkan penelitian sistematik review oleh Nader Salari dan kolega (tahun 2022) menyebutkan bahwa prevalensi ASD di Cina antara tahun 2018 sampai tahun 2020 meningkat dari 0,08 persen menjadi 0,29 persen; prevalensi di US antara tahun 2019 dan 2020 meningkat dari 1,7 persen menjadi 1,8 persen; prevalensi di Swedia antara tahun 2012 dan 2021 meningkat dari 0,8 persen menjadi 3,66 persen (2). Prevalensi laki – laki menderita empat sampai lima kali dibanding perempuan (1).

Peningkatan kelahiran anak dengan gejala ASD tersebut diduga karena meningkatnya faktor resiko pada ibu selama kehamilan. Menurut penelitian, faktor resiko tersebut adalah adanya masalah selama pembuahan sehingga pembuahan dilaksanakan dengan bantuan teknik reproduksi, penggunaan dan durasi kontrasepsi oral, jumlah kehamilan sebelumnya, kematian janin saat kehamilan, jarak kehamilan (dalam bulan), riwayat penyakit mental dan meminum obat, riwayat penyakit kronis (hipertensi, diabetes, obesitas, hipotiroid, dan epilepsi).

Faktor resiko terbesar dalam penelitian tersebut (80% dari faktor resiko yang lain) adalah riwayat penyakit kronis seperti hipotiroid, *cardiovascular disease*, diabetes dan epilepsi yang mengharuskan penderitanya minum obat yang tidak boleh putus (3,4).

Asam Valproat merupakan asam lemak rantai pendek yang dikonsumsi untuk mengatasi epilepsi dan penyakit psikiatri seperti bipolar. Mekanisme anti epilepsi dan anti bipolar ini adalah karena asam valproate meningkatkan jumlah neuron inhibisi dengan cara meningkatkan produksi *Gamma aminobutyric Acid* (GABA) dan mencegah degradasinya dengan menghambat enzim GABA transaminase (GABA-T) dan enzim Succinic semialdehyde dehydrogenase (5). Mekanisme ini telah terbukti aman dikonsumsi baik anak – anak maupun dewasa dan merupakan obat *gold standar*.

Manfaat asam valproate melalui mekanisme tersebut di atas, akan berbeda bila ibu hamil mengkonsumsinya selama kehamilan. Hal tersebut dikarenakan asam valproate dapat mempengaruhi proses organogenesis dan perkembangan sistem saraf janin yang dikandung. Konsumsi asam Valproat pada saat awal prenatal dapat mempengaruhi proses organogenesis sehingga janin dapat mengalami malformasi kongenital (6). Penelitian membuktikan adanya malformasi kongenital seperti pada jantung (38%), *neural tube defect* (8,76%), hipospadia (14,5%), bibir sumbing (4,53%), polidaktili (4,53%), malformasi ginjal (12,08%), malformasi tractus digestifus (6,65%), dan *multiple congenital malformation* (10,88%) (7). Frank J.Vajda et al (tahun 2013) meneliti apakah malformasi kongenital terjadi karena *dose dependent*. Hasil penelitian diketahui bahwa tidak ada konsistensi dosis maksimal yang dapat diberikan untuk mencegah malformasi kongenital. Namun

pada penelitian Frank, disarankan bahwa konsumsi asam valproate tidak boleh melebihi 700 mg per hari. (8). Konsumsi asam Valproat pada prenatal trimester selanjutnya dapat mempengaruhi proses perkembangan sistem saraf sehingga janin beresiko mengalami ASD (9,10).

Urgensi penelitian ini dilakukan karena berdasarkan fakta dari *The Quebec pregnancy registry* dan *Australia Pregnancy Registre*, bahwa asam valproate tetap digunakan oleh wanita hamil yang menderita epilepsi baik sebagai monoterapi (37,8%) ataupun sebagai politerapi (30,5%) (6,11,12). Hal inilah yang menyebabkan resiko tinggi kelahiran ASD.

Berdasarkan data tersebut, maka timbul adanya pemikiran pentingnya tindakan preventif kelahiran ASD pada ibu hamil dengan mengkonsumsi obat neuroprotektor bersamaan dengan asam valproate sebelum kehamilan dan selama kehamilan. Ekstrak biji klabet adalah salah satu obat yang telah terbukti sebagai antidiabetes dan neuroprotektor (13).

Ekstak biji klabet sebagai antidiabetic menurut beberapa penelitian disebabkan oleh kandungan bahan steroid saponin, flavonoid dan karbohidrat galactomannan yang mayoritas diperoleh dengan ekstraksi ethanol 70 %. Efek dari ketiga bahan aktif tersebut sebagai antidiabetic karena mengurangi ambilan glukosa dari usus halus, meningkatkan sensitifitas insulin yang pada organ perifer sehingga berefek pada ambilan glukosa untuk dijadikan glikogen serta pada otak berefek ambilan glukosa untuk dijadikan energi (14,15). Pemenuhan energi yang baik diduga dapat mencegah apoptosis selama neurogenesis serta menjaga fungsi sel neuron dalam meneruskan sinyal elektrik melalui pembentukan neurotransmitter (16).

Ekstrak biji klabet telah diketahui sebagai neuroprotektor pada beberapa penelitian seperti keracunan arsenic dan Alzheimer yang keduanya menunjukkan adanya pemulihan pada memori. Mekanisme ekstrak biji klabet memulihkan memori tersebut masih belum dipastikan karena parameter yang diukur hanya kemampuan ekstrak biji klabet dalam menginduksi enzim antioksidan dan menurunkan produksi ROS (17,18). Sedangkan mekanisme ekstrak biji klabet dalam menjaga struktur dan fungsi sel neuron masih belum ditemukan.

Asam valproate sebagai modelling ASD bila diminum saat prenatal dapat menyebabkan gangguan hambatan enzim *Histon deasetylase* (HDAC) pada janin yang secara langsung dapat mengganggu proses proliferasi *Neuron Stem Cell* (NSC), *Neuron Proliferating Cell* (NPC), sel neuron, sel *Oligodendrocyte Proliferating Cell* (OP) dan sel oligodendrosit. Selain itu hambatan HDAC akan menyebabkan peningkatan transkripsi beberapa protein intrasel seperti *Phosphodiesterase 1* (PDE 1) yang pro terhadap apoptosis (19). Asam valproate juga mengganggu pemenuhan energi karena memiliki kemampuan *Warburg effect* yaitu pemenuhan energi lebih banyak dari proses anaerob sehingga energi yang dihasilkan lebih sedikit karena inhibisi ATPase (20). Inhibisi ATPase tersebut mengakibatkan ATP induce cascade kematian sel yaitu apoptosis (21,22).

Berdasarkan analisa dari beberapa penelitian tersebut di atas, maka kemungkinan ekstrak biji klabet dapat menjadi neuroprotektor pada model ASD karena ada kaitannya dengan fungsi antidiabetic yang dapat menjaga pemenuhan energi untuk menjaga struktur dan fungsi sel neuron.

Glukosa adalah nutrisi yang dibutuhkan otak untuk diubah menjadi energi untuk proses organogenesis, neurogenesis, mielinisasi, synaptogenesis, serta

sintesa neurotransmitter. Keseluruhan proses tersebut terjadi selama dalam kehamilan (23,24).

Pemenuhan glukosa pada otak tergantung dari *Glucose transporter* (GLUT) terutama family GLUT 1 dan GLUT 3. GLUT 1 merupakan transporter yang berada di membrane sel endotel BBB untuk meningkatkan ambilan glukosa di parenkim otak serta berada di membrane sel oligodendrosit dan sel astrosit. Sedangkan GLUT 3 adalah transporter untuk meningkatkan ambilan glukosa di sel neuron. Sel neuron juga menerima laktat sebagai sumber energi dari sel astrosit. Ambilan glukosa ini jika di otak akan diubah seluruhnya menjadi energi oleh bantuan ATP ase di dalam mitokondria melalui fosforilasi oksidatif (14). Ekstrak biji klabet diharapkan dapat meningkatkan ekspresi GLUT 1 dan ATPase.

Energi yang didapat sel digunakan untuk proses neurogenesis yaitu peristiwa pembentukan sel neuron yang meliputi proliferasi *Neuron Stem Cell* (NSC) menjadi *Neuron Proliferating Cell* (NPC) yang dimulai pada fase embrionik atau trimester pertama setelah area otak terbentuk sekaligus berdiferensiasi menjadi sel neuron. Sel neuron yang terbentuk akan bermigrasi ke seluruh area otak, menyebabkan jumlah sel viable meningkat di daerah seperti cerebrum, hippocampus CA1 dan cerebellum (24).

Energi yang didapat sel juga digunakan untuk membentuk sel oligodendrosit dari proliferasi dan diferensiasi sel *Oligodendrocyte Proliferating Cell* (OPC). Sel oligodendrosit yang terbentuk akan membentuk mielin yang ditandai dengan meningkatnya ekspresi *Myelin Basic Protein* (MBP) yang merupakan salah satu protein yang membentuk membran mielin. MBP dapat dijadikan salah satu pertanda fungsi otak dalam kondisi optimal untuk *learning and*

memory, planning complex cognitive behavior, and moderating social behavior (25,26).

Jumlah sel neuron viable dan mielin yang meningkat pada masa perkembangan sistem saraf yang dimulai saat post natal akan meningkatkan respon pada stimulus oleh lingkungan. Stimulus akan diterima oleh sel neuron sensoris pada cortex cerebrum yang selanjutnya diproses pada sistem limbik yang salah satunya adalah hippocampus untuk kemudian di respon dengan sel neuron motoric yang salah satunya adalah pada cerebellum (24). Pada tikus, sel sensoris yang pertama bertumbuh dan berkembang adalah sel pembau. Menurut penelitian sel pembau berkembang untuk mengenal lingkungan, membentuk perilaku dan bersosialisasi (27).

Untuk mengetahui kemampuan sosialisasi dan perilaku dalam menilai ada tidaknya gejala ASD dapat digunakan dua tes, yaitu tes *social novelty preference index* (SNI) dan *Marble burying test* (MBT). Tes SNI untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan oleh tikus untuk bermain bersama kelompok lain dibandingkan dengan kelompoknya, sedangkan tes MBT adalah tes untuk mengetahui berapa jumlah kelereng yang terkubur karena perilaku berulang dari tikus (11).

Namun sebelum kami melanjutkan penelitian efek neuroprotektor ekstrak biji klabet tersebut, maka diperlukan penelitian pendahuluan untuk mengetahui keamanan ekstrak untuk sistem reproduksi. Penelitian dilakukan pada induk sebelum bunting dengan asam valproate dan ekstrak biji klabet selama sepuluh hari. Pengujian dilakukan pada fase proestrus kedua. Hasil menunjukkan bahwa asam valproate menurunkan jumlah corpus luteum dan meningkatkan folikel atretic, namun hal tersebut dapat diperbaiki dengan ekstrak biji klabet pada dosis 200

mg/kg yang diminum sekali sehari (28). Corpus luteum adalah bentukan pada ovarium yang menandakan bahwa apabila ada pembuahan maka zigot yang terbentuk di tuba falopii akan mendapatkan nutrisi dari corpus luteum sebelum plasenta terbentuk. Sedangkan folikel atretic adalah bentukan dari growing follikel yang membawa ovum mengalami atresia (29). Dengan adanya penelitian ini maka ekstrak biji klabet secara tidak langsung dapat diikuti pada penelitian selanjutnya yaitu pada induk bunting.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi dampak neuroprotektif pemberian ekstrak biji klabet pada model ASD, pada gambaran histologi otak yaitu jumlah sel neuron dan pembentukan mielin serta gejala ASD dari hasil pengamatan SNI dan MBT.

1.2 RUMUSAN MASALAH

1. Apakah ada peningkatan nilai *social novelty preference index* (SNI) dan penurunan *Marble burying test* (MBT) oleh anak tikus model ASD yang saat prenatal induk diberi ekstrak biji klabet dosis 0, 100 mg/kg, 200 mg/dl atau 300 mg/kg?
2. Apakah ada peningkatan intensitas *Myelin basic protein* (MBP) cerebrum, hippocampus CA1 dan cerebellum otak anak tikus model ASD yang saat prenatal induk diberi ekstrak biji klabet dosis 0, 100 mg/kg, 200 mg/dl atau 300 mg/kg?
3. Apakah ada peningkatan jumlah sel piramida normal lapis ke lima pada cerebrum, jumlah sel pyramid hippocampus CA1 dan jumlah sel purkinje cerebellum otak anak tikus model ASD yang saat prenatal

induk diberi ekstrak biji klabet dosis 0, 100 mg/kg, 200 mg/dl atau 300 mg/kg?

4. Apakah ada peningkatan intensitas ATP ase otak anak tikus model ASD yang saat prenatal induk diberi ekstrak biji klabet dosis 0, 100 mg/kg, 200 mg/dl atau 300 mg/kg?
5. Apakah ada peningkatan intensitas GLUT 1 otak anak tikus model ASD yang saat prenatal induk diberi ekstrak biji klabet dosis 0, 100 mg/kg, 200 mg/dl atau 300 mg/kg?
6. Apakah ada hubungan antara peningkatan jumlah sel piramida normal lapis ke lima pada cereberum, jumlah sel pyramid hippocampus CA1 dan jumlah sel purkinje cerebellum otak; peningkatan intensitas *Myelin basic protein* (MBP) cerebrum, hippocampus CA1 dan cerebellum otak; peningkatan intensitas GLUT 1 dan ATP ase otak dengan nilai *social novelty preference index* (SNI) dan *Marble burying test* (MBT) anak tikus model ASD yang saat prenatal induk diberi ekstrak biji klabet dosis 0, 100 mg/kg, 200 mg/dl atau 300 mg/kg?

1.3 TUJUAN PENELITIAN

1.3.1 TUJUAN UMUM

Menganalisa efek neuroprotector ekstrak biji klabet pada anak tikus model autism spektrum disorder

1.3.2 TUJUAN KHUSUS

1. Menganalisa peningkatan nilai *social novelty preference index* (SNI) dan penurunan *Marble burying test* (MBT) oleh anak tikus model ASD yang saat prenatal induk diberi ekstrak biji klabet dosis 0, 100 mg/kg, 200 mg/dl atau 300 mg/kg.
2. Menganalisa peningkatan intensitas *Myelin basic protein* (MBP) cerebrum, hippocampus CA1 dan cerebellum otak anak tikus model ASD yang saat prenatal induk diberi ekstrak biji klabet dosis 0, 100 mg/kg, 200 mg/dl atau 300 mg/kg.
3. Menganalisa peningkatan jumlah sel piramida normal lapis ke lima pada cereberum, jumlah sel pyramid hippocampus CA1 dan jumlah sel purkinje cerebellum otak anak tikus model ASD yang saat prenatal induk diberi ekstrak biji klabet dosis 0, 100 mg/kg, 200 mg/dl atau 300 mg/kg.
4. Menganalisa peningkatan intensitas ATP ase otak anak tikus model ASD yang saat prenatal induk diberi ekstrak biji klabet dosis 0, 100 mg/kg, 200 mg/dl atau 300 mg/kg.
5. Menganalisa peningkatan intensitas GLUT 1 otak anak tikus model ASD yang saat prenatal induk diberi ekstrak biji klabet dosis 0, 100 mg/kg, 200 mg/dl atau 300 mg/kg.
6. Menganalisa hubungan antara peningkatan jumlah sel piramida normal lapis ke lima pada cereberum, jumlah sel pyramid hippocampus CA1 dan jumlah sel purkinje cerebellum otak; peningkatan intensitas *Myelin basic protein* (MBP) cerebrum, hippocampus CA1 dan cerebellum otak;

peningkatan intensitas GLUT 1 dan ATP ase otak dengan nilai *social novelty preference index* (SNI) dan *Marble burying test* (MBT) anak tikus model ASD yang saat prenatal induk diberi ekstrak biji klabet dosis 0, 100 mg/kg, 200 mg/dl atau 300 mg/kg.

1.4 MANFAAT PENELITIAN

1.4.1 MANFAAT TEORITIS

1. Penelitian ini mengkonfirmasi bahwa ekstrak biji klabet dapat memberi manfaat neuroprotektor pada subjek hewan.
2. Penelitian ini sebagai pilot atau eksplorasi dosis-respon ekstrak biji klabet terhadap neurodevelopmental hewan model autism

1.4.2 MANFAAT PRAKTIS

Penelitian ini dapat dipakai sebagai dasar pengembangan pengobatan pencegahan Autis pada hewan model dengan biji klabet.