

RESEARCH ARTICLE

EFEK BETA GLUCAN PADA SACCHAROMYCES CEREVISAE TERHADAP PENURUNAN EKSPRESI ALPHA SYNUCLEIN PADA BAGIAN SUBSTANTIA NIGRA OTAK TIKUS (*RATTUS NOVERGICUS*) STRAIN WISTAR MODEL PARKINSON YANG DIINDUKSI ROTENONE

*THE EFFECT OF BETA GLUCAN OF SACCHAROMYCES CEREVISAE ON THE DECREASE OF ALPHA SYNUCLEIN EXPRESSION IN THE BRAIN SUBSTANTIA NIGRA OF PARKINSON'S WISTAR STRAIN RATS (*RATTUS NOVERGICUS*) MODEL INDUCED WITH ROTENONE*

Masruroh Rahayu*, Shahdevi Nandar Kurniawan*, Machlusil Husna*, Hanesty Oky Hermawan**

*Laboratorium Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

**Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

pISSN : 2407-6724 • eISSN : 2442-5001 • <http://dx.doi.org/10.21776/ub.mnj.2016.002.01.2> • MNJ.2016;2(1):9-13

• Received 10 May 2015 • Reviewed 10 July 2015 • Accepted 10 September 2015

ABSTRAK

Latar belakang. Salah satu modalitas terapi regeneratif pada Parkinson adalah menggunakan beta glucan yang terkandung dalam *Saccharomyces cerevisiae*.

Tujuan. Mengidentifikasi adanya efek penurunan ekspresi alpha synuclein pada bagian substantia nigra otak tikus model Parkinson paska pemberian *Saccharomyces cerevisiae*.

Metode. Eksperimen murni secara in vivo dengan rancangan *randomized post test only controlled group design*. Sampel dibagi ke dalam lima kelompok dan masing-masing terdiri dari 5 tikus. Variabel yang diukur adalah tingkat penurunan ekspresi alpha synuclein pada bagian substantia nigra otak.

Hasil. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol positif dengan kontrol negatif.

Simpulan. Pemberian *Saccharomyces cerevisiae* menurunkan ekspresi alpha synuclein pada substantia nigra otak tikus strain Wistar model parkinson dengan hasil maksimal pada dosis 72 mg/kgBB.

Kata kunci: Alpha synuclein, Beta glucan, Parkinson, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Background. One of the regenerative therapy modalities in Parkinson is using the beta glucan effect contained in *Saccharomyces cerevisiae*.

Objective. To identify the effect of reduction in alpha synuclein expression on the brain substantia nigra in Parkinson's rat model after given *Saccharomyces cerevisiae*.

Methods. This research applied true experimental design by in vivo with draft randomized post test only controlled group design. The sample was divided into five groups, each of them consisted of 5 rats. Variables measured were the decreasing level of alpha synuclein.

Results. There was a significant difference between positive control and negative control group.

Conclusion. The addition of *Saccharomyces cerevisiae* is able to lower the alpha synuclein expression in Parkinson's Wistar strain rat models significantly with maximum at the dose of 72 mg/kgBB.

Keywords: Alpha synuclein, Beta glucan, Parkinson, *Saccharomyces cerevisiae*

Korespondensi: masruorahayu@yahoo.com

PENDAHULUAN

Penyakit Parkinson merupakan penyakit neurodegeneratif kedua terbanyak di dunia setelah penyakit Alzheimer.¹ Penyakit Parkinson menyebabkan disabilitas yang serius dan memengaruhi kualitas hidup penderita. Parkinson merupakan suatu penyakit gangguan saraf kronis dan progresif dengan gejala gemetar, kekakuan, melambatnya gerakan, dan hilangnya ekspresi wajah seperti menggunakan topeng dengan sekresi air liur yang tidak terkontrol.²

Secara umum penyebab penyakit ini adalah rusaknya saraf yang memproduksi dopamin di otak tepatnya di bagian substantia nigra pars compacta, yang menyebabkan penurunan drastis pada pengeluaran dopamin di *striatum*.³ Protein *alpha synuclein* merupakan protein spesifik yang dapat menyebabkan kerusakan saraf penghasil dopamin pada otak.⁴

Stem cell adalah sel yang memiliki ciri khas terus tumbuh dan berkembang serta dapat tumbuh menjadi bentuk sel apapun.⁵ *Multipotent Stem cell* secara tidak langsung dapat didapatkan dari ekstrak organ manusia maupun tikus.⁶ Sebagian besar stem cell terdapat pada *bone marrow*. Hematopoietic *Stem cells* (HSCs) dan progenitor yang terdapat pada *bone marrow* ini akan membentuk sel darah matur.⁷ *Hematopoietic Stem Cells* (HSCs) termobilisasi meninggalkan *bone marrow* sebagai respon dari *Granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF).⁸ *Granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) adalah protein khusus yang diproduksi di dalam tubuh yang telah diketahui dapat meningkatkan jumlah HSCs di dalam darah.⁹ Beberapa studi terdahulu menunjukkan bahwa G-CSF berperan besar dalam pelepasan ikatan *reseptor-ligan CXCR4* dan *SDF-1* HSCs pada *bone marrow* sehingga HSCs dapat bermigrasi menuju ke aliran darah.¹⁰ *Hematopoietic Stem Cells* (HSCs) mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel penyusun jaringan pembuluh darah, saraf dan sel-sel otak.¹¹ *Hematopoietic Stem Cells* (HSCs) telah diketahui dapat bermigrasi dari *bone marrow* menuju aliran darah sebagai respon terjadinya kerusakan pada saraf otak. Penambahan jumlah HSCs di sirkulasi berhubungan dengan perbaikan fungsi neurologis pada Parkinson.¹²

Beta Glucan mampu meningkatkan kadar G-CSF dalam tubuh. Peningkatan kadar G-CSF pada tubuh akan memberikan efek terhadap meningkatnya

mobilisasi HSCs dari *bone marrow* ke aliran darah.¹³ *Beta Glucan* dapat ditemukan dalam jumlah yang banyak pada jamur, oats, beras dan tumbuhan lainnya. Jamur dengan kandungan *Beta Glucan* yang tinggi adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Kadar *isolated beta-glucan Saccharomyces cerevisiae* dapat mencapai 98% dry weight. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan jamur bersel satu dari divisi *Ascomycota*. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan jamur yang relatif mudah didapat dan sering dimanfaatkan di Indonesia.¹⁴

Berdasarkan fakta diatas, diperlukan suatu penelitian yang dapat membuktikan bahwa *Beta Glucan* dalam *Saccharomyces cerevisiae* dapat menurunkan ekspresi protein *alpha synuclein* melalui perbaikan kerusakan saraf otak pada penyakit Parkinson.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Waktu dilaksanakannya penelitian adalah pada bulan Maret sampai dengan Mei tahun 2013.

Desain Penelitian. Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

Adaptasi hewan percobaan. Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan tikus jenis *Rattus norvegicus* jantan yang berusia 6-7 minggu atau 1 bulan 2-3 minggu. Penyesuaian atau adaptasi dari hewan percobaan dilaksanakan selama kurang lebih 7 hari dan diberi makan standar.

Induksi parkinson. Induksi Parkinson yang terdapat pada hewan percobaan menggunakan rotenone yang sudah menjadi standar sebagai bahan penginduksi penyakit parkinson yang terdapat di berbagai penelitian. Rotenone dimasukkan secara subkutan setiap 2 hari sekali selama 2 minggu. Dosis yang diberikan sebanyak 3 mg/kgBB setiap injeksi.¹⁵

Pembuatan *Saccharomyces cerevisiae* dalam bentuk larutan. *Saccharomyces cerevisiae* dengan banyak dosis sebanyak 18 mg/kgBB; 36 mg/kgBB; 72 mg/kgBB untuk setiap kelompok I, II, dan III

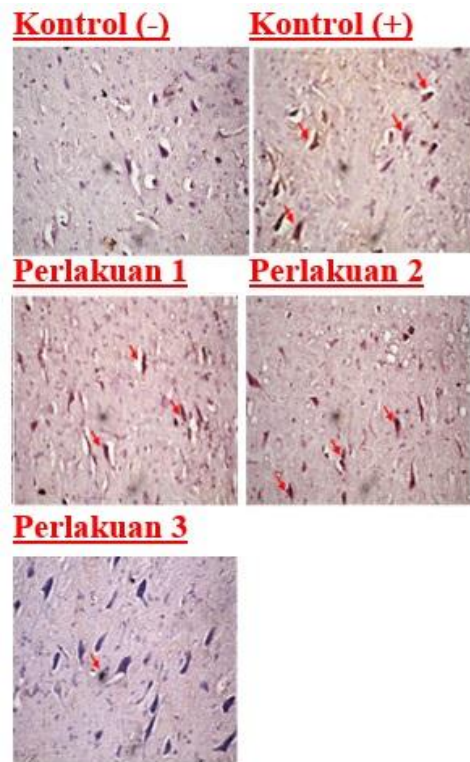
kemudian dilarutkan dalam aquades. Pada waktu pemberian dosis perlakuan pada satu hewan percobaan, *Saccharomyces cerevisiae* dicairkan dalam jumlah 2 cc aquades lalu diberikan ke tikus memakai sonde makan tikus.

Imunohistokimia. Preparat blok parafin yang sudah di proses akan dilakukan deparafinisasi dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit. Selanjutnya dilakukan rehidrasi preparat dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95 % dan etanol 70% masing-masing selama dua menit, dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit. Preparat direndam dalam *peroxidase blocking solution* pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya preparat diinkubasi dalam *prediluted blocking serum* 25°C selama 10 menit. Preparat direndam di dalam antibodi monoklonal anti-*alpha synuclein* 25°C selama 10 menit. Preparat dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) selama 5 menit kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder 25°C selama 10 menit lalu cuci preparat dengan PBS selama 5 menit. Preparat kemudian diinkubasi kembali dengan peroksidase 25°C selama 10 menit lalu cuci preparat dengan PBS selama 5 menit. Inkubasi preparat yang terakhir menggunakan kromogen DAB (*Diaminobenzinidine*) 25°C selama 10 menit. Hasil semua inkubasi preparat diwarnai dengan Hematoxylin Eosin. Preparat kemudian dibersihkan dan ditetesi dengan *mounting media*. Preparat yang telah jadi ditutup menggunakan coverslip.

Sel saraf yang mengekspresikan *alpha synuclein* (warna coklat) (gambar 1) diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Setiap pengamatan pada seluruh kelompok didokumentasikan menggunakan foto mikroskop. Sel otak yang mengekspresikan *alpha synuclein* dihitung pada tiap perlakuan sebanyak 4 lapang pandang.¹⁶ Kemudian jumlah sel otak pada masing-masing lapang pandang yang mengekspresikan *alpha synuclein* dihitung dengan persamaan:

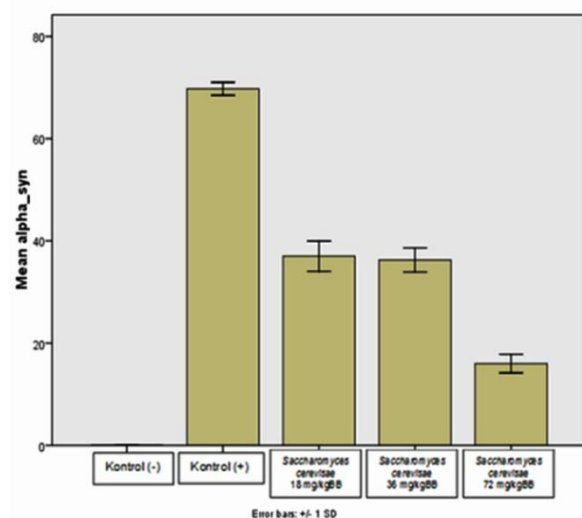
$$\frac{\text{Jumlah sel otak dengan ekspresi } \alpha \text{ synuclein positif}}{\text{Jumlah sel otak dalam 1 lapang pandang}} \times 100$$

HASIL PENELITIAN



Gambar 1. *Alpha synuclein* pada sel otak tikus.

Sel dengan *Alpha synuclein* positif tampak berwarna kecoklatan pada sitoplasmanya. Sel dengan *Alpha synuclein* positif ditunjukkan oleh tanda panah merah. Pada kontrol negatif tidak didapatkan sel dengan *Alpha synuclein* positif sedangkan pada kontrol positif didapatkan sel dengan *Alpha synuclein* positif. Sel dengan *Alpha synuclein* positif juga terlihat pada perlakuan 1, 2 dan 3. Hasil perhitungan ekspresi *alpha synuclein* ditunjukkan pada diagram dibawah ini.



Gambar 2. Diagram ekspresi *Alpha synuclein*

Pada diagram gambar 2 menunjukkan adanya peningkatan ekspresi *Alpha synuclein* yang signifikan pada kontrol positif jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Peningkatan tersebut menunjukkan bahwa tikus telah terinduksi Parkinson. Pada perlakuan 1, 2 dan 3 ekspresi *Alpha synuclein* mengalami penurunan signifikan jika dibandingkan dengan kontrol positif. Pada perlakuan 3 terjadi penurunan paling signifikan jika dibandingkan dengan perlakuan 2 dan 3.

DISKUSI

Beta Glucan telah diketahui sebagai agen yang dapat meningkatkan sistem imun tubuh (*imunomodulator*). *Beta Glucan* dapat memengaruhi peningkatan *granulosit* dan mobilisasi *granulosit* serta progenitornya dengan menstimulasi produksi *Granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) oleh *makrofag*. Stimulasi ini melibatkan reseptor *dectin-1* pada *makrofag*.¹⁴ *Granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) merupakan protein tubuh yang menginduksi *proliferasi* dan *diferensiasi* pada proses *hematopoiesis*. *Granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) juga berperan dalam mobilisasi produk *hematopoiesis* ke sirkulasi. Selain *granulosit*, G-CSF juga terbukti dapat memicu mobilisasi *hematopoietic stem cell* (HSCs) dari *bone marrow* ke sirkulasi.¹⁷

Mekanisme mobilisasi HSCs dari *bone marrow* ke sirkulasi adalah dengan mendegradasi ikatan *ligand-receptor* antara CXCR4 dan (*stromal cell-derived factor*) SDF-1 yang berada pada *bone marrow*. Degradasi ikatan ini disebabkan oleh adanya produksi enzim *metallic metallo-proteinase* (MMP-4) yang dipicu oleh peningkatan G-CSF. *Hematopoietic stem cell* (HSCs) yang sebelumnya berada di *bone marrow* akibat ikatan *ligand-receptor* CXCR4-SDF-1 akan bermigrasi ke sirkulasi. Kejadian penurunan ekspresi *alpha synuclein* pada otak tikus Wistar yang diinduksi Parkinson diduga terjadi karena adanya perbaikan maupun regenerasi saraf dan sel-sel otak oleh HSCs. Perbaikan tersebut diawali dengan termobilisasinya HSCs dari sirkulasi ke otak. *Hematopoietic stem cell* (HSCs) yang berada di sirkulasi akan bergerak menuju otak akibat adanya peningkatan produksi CXCL12 yang sebagian besar dihasilkan oleh sel-sel otak dan saraf yang rusak pada penyakit Parkinson. CXCL12 berfungsi sebagai sinyal untuk memicu mobilisasi HSCs dari sirkulasi ke otak *Hematopoietic stem cell* (HSCs) yang telah

termobilisasi ke otak akan membentuk dan memperbaiki sel-sel dan saraf pada otak.¹⁸

Penelitian sebelumnya menggunakan berbagai macam flavonoid untuk menurunkan *alpha synuclein* secara langsung. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa flavonoid *luteolin* dapat menurunkan ekspresi *alpha synuclein* di otak paling signifikan dibandingkan dengan flavonoid lain. Aktivitas penurunan ekspresi *alpha synuclein* diduga akibat aktivitas antioksidan pada flavonoid. Aktivitas antioksidan dari flavonoid secara langsung dapat mendegradasi *alpha synuclein* sehingga ekspresinya menurun.¹⁹ Sedangkan pada penelitian ini, *beta glucan* menurunkan ekspresi *alpha synuclein* secara tidak langsung melalui regenerasi sel-sel otak. Penurunan jumlah ekspresi *alpha synuclein* diduga berhubungan dengan aktivitas mikroglia. Mikroglia merupakan salah satu sel yang berada pada bagian *substantia nigra* yang teregenerasi setelah pemberian *beta glucan*. Mikroglia berfungsi untuk mendegradasi bahan asing maupun sel-sel yang telah mati pada otak. Mikroglia yang telah mengalami perbaikan atau regenerasi melalui mekanisme yang telah dijelaskan sebelumnya diduga mampu mendegradasi *alpha synuclein* melalui aktivitas fagositosis. Mikroglia diduga mampu memfagositosis protein *alpha synuclein* yang terdapat pada sitoplasma sel neuron.¹⁶

Pada penelitian ini, pengamatan ekspresi *alpha synuclein* hanya menggunakan 4 lapang pandang sehingga hasil pengamatan ekspresi *alpha synuclein* belum mencakup seluruh bagian *substantia nigra* otak. Peneliti berharap, pengamatan ekspresi *alpha synuclein* dihitung dengan jumlah lapang pandang yang lebih banyak pada penelitian selanjutnya sehingga dapat mencakup seluruh bagian *substantia nigra* otak.

SIMPULAN

Saccharomyces cerevisiae dapat menurunkan ekspresi *alpha synuclein* pada bagian *substantia nigra* otak tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar model Parkinson yang diinduksi rotenone.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lau, de LM, Breteler MM.. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006. 5: 525-35.
2. Dorsey, ER, Kollet, O, Farke, Christian. 2007. Projected Number of People with Parkinson

- Disease in the Most Populous Nations, 2005 through 2030. Rochester, USA : Department of Neurology University of Rochester Medical Center. 2007 Jan 30; 68(5):384-386.
3. LeWitt, Peter A.. Levodopa for the Treatment of Parkinson's Disease. Massachusetts: New England Journal Medicine. 2008. 359:2468-2476.
 4. Lotharius, Julie, Brundin, Patrik. Pathogenesis Of Parkinson's Disease : Dopamine, Vesicles and α -Synuclein. Nature Reviews : Neuroscience. 2002. Vol. 3;1 – 11.,
 5. Dauer, William, Przedborski, Serge. Parkinson's Disease : Mechanisms and Models. Neuron. 2003.Vol. 39, 889–909.
 6. Corselli, Mirko, Crisan, Mihaela, Lazzari, Lorenza Kovack. Perivascular Ancestor of Multipotent Stem cells.American Heart Association Journal Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010. 30:1104-1109.
 7. Smith, Clayton. 2003. Hematopoietic Stem cells and Hematopoiesis. Blood marrow and transplant program. Florida: H.Lee Moffitt Cancer Center.
 8. Gierying A, Bogunia-Kubik K.. The role of the SDF-1-CXCR4 axis in hematopoiesis and the mobilization of hematopoietic stem cells to peripheral blood. Postepy Hig Med Dosw [Online]. 2007. 61:369–83.
 9. Franzke A..The role of G-CSF in adaptive immunity. Cytokine Growth Factor Rev.2006. 17:235–44.
 10. Afzal, Aqeela, and Mocco, J. 2012. The Promise of Hematopoietic Stem cell Therapy for Stroke: Are We There Yet?, Advances in the Treatment of Ischemic Stroke, Dr. Maurizio Balestrino (Ed.), ISBN: 978-953-51-0136-9, InTech.
 11. Hennemann, B., Ickenstein, G., Sauerbruch, S., Luecke, K., Haas, S., Horn, M., Andreesen, R., Bogdahn, U., Winkler, J.. Mobilization of CD34+ hematopoietic cells, colonyforming cells and long-term culture-initiating cells into the peripheral blood of patients with an acute cerebral ischemic insult. Cytotherapy.2008. 10(3):303-11.
 12. Pawitan, Jeanne Adiwinata. Prospect of Cell Therapy For Parkinson's Disease. Acb Journal: Anat Cell Biol. 2011. 44:256-264.
 13. Fardiaz, Srikandi. 1992. Mikrobiologi pangan 1. Jakarta : PT Gramedia Pustaka Utama ; 1992 : 254.
 14. Sumarsih, Sri. 2003. Diktat Kuliah Mikrobiologi Dasar. Jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian Universitas UPN "Veteran". Yogyakarta.
 15. Sharma, Neha, & Bafna, Pallavi. Effect of *Cynodon dactylon* on rotenone induced Parkinson's disease. Orient Pharm Exp Med. 2012. 12:167–175.
 16. Yamada, M., Iwatsubo, T., Mizuno, Y., and Mochizuki, H.. Overexpression of α -synuclein in rat substantia nigra results in loss of dopaminergic neurons, Phosphorylation of α -synuclein and activation of caspase-9: resemblance to pathogenetic changes in Parkinson's disease. Journal of Neurochemistry. 2004. 91, 451-461.
 17. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature. 1996. 380(6573):435-439.
 18. Brazelton, T.R., Rossi, F.M., Keshet, G.I., and Blau, H.M.. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science. 2000. 290, 1775–1779.
 19. Meng, Xiaoyun, Munishkina, Larissa A., Fink, Anthony L., Uversky, Vladimir N..Effects of Various Flavonoids on the α -Synuclein Fibrillation Process. SAGE-Hindawi Access to Research Parkinson's Disease. 2010. Volume 2010 Article ID 650794.