

EFEK EKSTRAK DAUN GAMBIR (*Uncaria Gambir* Roxb)
TERHADAP TINGKAT STRESS OKSIDATIF DAN EKSPRESI
SIRTUIN 3 PADA HIPOKAMPUS MENCIT BETINA
MODEL PENUAAN YANG DIINDUKSI
D-GALAKTOSA

Inda Meirani H Sinaga,¹ Mutiara Indah Sari,²
Muhammad Ichwan³

MAGISTER BIOMEDIK, FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SUMATERA UTARA
JI. DOKTER MANSYUR NO.05, PADANG BULAN, MEDAN
SUMATERA UTARA
e-mail : indamhs@yahoo.com

DOI : <https://doi.org/10.35451/jfm.v3i1.473>

Abstract

The aging process must be experienced by all living things, the body's tissues will not be able to maintain its function so that pathological conditions occur. Some things can cause aging, Free radical factors are external and internal factors that can trigger aging. Induce of d-galactose continuously one of the factors that can increase oxidative stress. This study was design to assess the effect of gambir leaf extract on oxidative stress and expression of the sirtuin 3 gene in the hippocampus of female mice induced intraperitoneally by d-galactose 150 mg/kgbb. Researchers conducted a post test only control group study with a sample of 24 female mice aged 10 - 12 weeks with the inclusion criteria an average body weight of 25-35 grams, obtained from the same breeding place, maintained at the same place and time and never as research material. Mice were divided into 4 groups with 6 mice each , group (C) female mice induced only d-galactose 150 mg / kg and in sonde aquabidest 0,1%/body weight, mice induced by d-galactose and sonde gambir leaf extract at a dose of 100 mg / kg bw group (C1), group (C2) 200 mg/kgbw, and 400 mg/kgbw group (C3). Blood samples were collected to determine the increase in oxidative stress levels of malondealdehyde (MDA) through spectrophotometry, and hippocampal tissue collected for PCR method so that the expression of the sirtuin 3 gene can be seen. Increased levels of MDA are associated with increased oxidative stress. This study reported the results of MDA levels were not significant (p value <0.05). The results of the PCR reported an increase in expression 2 times higher than the control at a dose of gambier leaf extract 200 mg / kgbw

Keywords: D-Galactose, Malondealdehyd, Sirtuin 3, Cathechin.

1. PENDAHULUAN

Penuaan terjadi akibat hilangnya integritas fisiologis secara progresif yang akhirnya menyebabkan kerusakan dan gangguan fungsi organ tubuh sehingga terjadi penurunan kualitas hidup. Terdapat sembilan tanda umum dari penuaan pada mamalia, yakni; ketidak stabilan genom, atrisi telomer, perubahan epigenetik, hilangnya proteostasis, deregulasi penginderaan nutrisi, disfungsi mitokondria, penuaan seluler, kelelahan sel punca dan perubahan komunikasi antar sel. Penyakit neurodegenerative, seperti Alzheimer maupun Parkinson dan masih banyak lagi merupakan salah satu akibat dari gangguan fungsi tersebut (López et al., 2013).

Berdasarkan data penduduk, tahun 2017 jumlah penduduk usia lansia di Indonesia diperkirakan 23,66 juta jiwa (9,03%). Pada tahun 2020 akan terjadi peningkatan hingga menjadi 27,08 juta, pada prediksi pada tahun 2025 jumlahnya menjadi 33,69 juta, tahun 2030 sebanyak 40,95 juta dan pada tahun 2035 menjadi 48,19 juta (Kesehatan and Indonesia, 2017).

Stress oksidatif adalah keadaan dalam proses metabolisme sel dimana peningkatan produksi radikal bebas dan ROS yang melebihi antioksidan (Marius et al., 2010).

Seiring dengan peningkatan jumlah penduduk yang pada masanya akan memasuki usia lanjut, dan secara fisiologis akan mengalami proses penuaan otak. Stres oksidatif, peroksidasi lipid, disfungsi mitokondria, penurunan tingkat neurotransmitter dan kelebihan produksi beta amiloid (A β) menjadi mediator utama terjadinya penuaan otak dan gangguan neurologis terkait usia (Sadigh-eteghad et al., 2017). Kondisi ini menyebabkan produktifitas dan kemandirian lansia menurun. Jika penurunan kemampuan

ini dapat diperlambat, maka masa produktifitas dan kualitas hidup lansia juga akan meningkat (Blondell, et al., 2014).

Penuaan dini disebabkan oleh beberapa faktor internal dan eksternal. Faktor internal juga bisa berupa faktor kondisi kejiwaan, penyakit turunan dan daya tahan tubuh. Faktor internal merupakan proses alami pada manusia, sehingga keberadaannya sulit dihindari, yang memicu terjadinya perubahan hormonal dan tingkat stres. Untuk faktor eksternal dapat melibatkan paparan sinar matahari, asap rokok, konsumsi minuman alkohol yang berlebihan, diet yang buruk, dan radikal bebas. Radikal bebas juga dapat dihasilkan dari produk metabolisme tubuh dan juga dari beberapa faktor eksternal.

Radikal bebas bersifat sangat reaktif dan cenderung bereaksi dengan molekul lain terutama lipid membrane, protein, dan DNA, sehingga dapat merubah struktur dan fungsinya, yang menyebabkan berbagai penyakit degeneratif hingga menyebabkan kematian sel. Mitokondria sebagai pusat daya seluler dan melakukan banyak fungsi biokimia mulai dari produksi energi juga menghasilkan radikal bebas hingga berlanjut pada kematian sel yang terprogram (Nunnari and Suomalainen, 2012).

Mitokondria merupakan sumber dan target utama pembuatan ROS yang merupakan produk sampingan dari proses rantai transport electron. Elektron yang dihasilkan berasal dari Nicotinamida Adenosin dinucleotide hydrogen (NADH) pada kompleks I dan Flavin Adenine Dinucleotide Hidrogen (FADH) pada kompleks III. Rantai transport elektron pada mitokondria memainkan peran terhadap produksi Adenosin Trifosfat (ATP). Dalam proses pembentukan ATP, Mitokondria membutuhkan 85% oksigen (Ames, et

al., 1993). Diperkirakan bahwa 0,2-2% oksigen diambil oleh sel lalu diubah oleh mitokondria menjadi ROS melalui produksi anion superoksida (O_2^-). ROS primer yang dihasilkan mitokondria adalah (O_2^-) lalu diubah menjadi H_2O_2 oleh superoksida dismutase (SOD). H_2O_2 dipecah menjadi air (polar) oleh glutathione peroxidase atau katalase (Paradies et al., 2011). Setiap ROS yang terbentuk akan memulai suatu reaksi berantai dan akan terus berlanjut sampai ROS itu dihilangkan oleh ROS yang lainnya atau sistem antioksidannya.

Reactive oxygen species merupakan oksidator kuat dan sangat reaktif berikatan dengan molekul disekitarnya sehingga dapat merusak sel dengan mengoksidasi hampir semua biomolekul termasuk protein, DNA (baik inti dan mitokondria), lipid dan karbohidrat (Valko et al., 2007).

Radikal bebas yang berlebihan akan mengakibatkan kerusakan komponen seluler secara permanen sehingga terjadi kematian sel melalui jalur apoptosis intrinsik pada mitokondria, keadaan ini akan memicu kerusakan DNA mitokondria, sehingga terjadi disfungsi, dan peningkatan apoptosis sel. Peningkatan apoptosis sel tentunya berhubungan dengan perombakan sel dan pemendekan telomer - ujung DNA yang membatasi jumlah mitosis sel. Peningkatan jumlah telomer yang hilang karena produksi ROS yang tidak seimbang menjadi salah satu faktor dalam proses penuaan (Wang et al., 2013)

D-galaktosa banyak digunakan dalam beberapa penelitian untuk model penuaan pada hewan coba. Induksi D-galaktosa menyebabkan stress oksidatif pada berbagai jaringan dengan meningkatnya produksi ROS dan AGEs yang juga terjadi pada penuaan normal

Penelitian model penuaan dengan pemberian d-galaktosa dapat juga

digunakan untuk mempelajari penuaan pada otak. Hal ini merupakan alternatif yang efektif untuk mempercepat proses penuaan (Sadigh et al, 2017).

Penurunan fungsi otak, seperti demensia dan gangguan kognitif dapat disebabkan karena disfungsi mitokondria (Ali et al., 2015).

Gangguan respons seluler di hipokampus ditandai dengan penurunan viabilitas, peningkatan mortalitas, dan pemendekan akson neuron pada bagian tanduk ammon atau cornu ammonis (Rosenzweig and Barnes, 2003).

Enzim sirtuin adalah keluarga dari tujuh deasetilase protein yaitu sirtuin 1 hingga sirtuin 7, Enzim sirtuins berada dalam kompartemen yang berbeda di dalam sel, dimana aktivitas enzimatisnya membutuhkan kofaktor nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) (Sidorova et al, 2018).

Enzim sirtuin 3 berada pada mitokondria dan berfungsi sebagai deasetilase protein NAD^+ -dependen yang menargetkan protein histone dan non-histone. Sirtuin 3 diidentifikasi untuk menargetkan protein yang menurunkan kadar ROS yang timbul sebagai akibat dari peningkatan oksidasi asam lemak. Sirtuin 3 secara langsung menargetkan superoksida dismutase 2 (SOD2) untuk aktivitas antioksidannya (Iwahara et al., 2012).

Ekspresi yang berlebihan dari sirtuin 3 akan menekan produksi ROS, sehingga akan mencegah kematian neuron (Ansari et al., 2017).

Akibat dari timbulnya peroksidasi lipid pada rantai asam lemak di membran sel akan terbentuk suatu produk marker, salah satunya malondialdehyde (MDA) yang kadarnya relatif lebih stabil. MDA merupakan produk akhir peroksidasi lemak tak jenuh jamak (asam arakhidonat) dalam tubuh oleh radikal bebas. Peningkatan kadar MDA dalam jaringan dan plasma

darah, menjadi ukuran dimana terjadi peningkatan radikal bebas dan penurunan antioksidan dalam tubuh (Kedokteran and Udayana, 2018).

Pada keadaan stress oksidatif yang tinggi, akan terjadi peningkatan kadar MDA serum secara signifikan, namun bila keadaan stress oksidatif teratasi, tidak akan terjadi peningkatan kadar MDA (Talarowska et al., 2012)

Penelitian tentang penggunaan bahan-bahan alami yang memiliki efek sebagai antioksidan sedang berkembang pesat saat ini, selain lebih aman penggunaan antioksidan sintesis sudah dibatasi oleh pemerintah.

Gambir merupakan komoditi berupa rempah yang biasa dikonsumsi bersamaan dengan daun sirih. Ekstrak dari daun gambir (*Uncaria Gambir Roxb*) yang mengandung senyawa polifenol adalah katekin, berperan sebagai senyawa antimikroba dan antioksidan (Ariyanti and Aditya, 2016).

Berdasarkan latar belakang diatas peneliti tertarik untuk mengetahui efek ekstrak daun gambir terhadap stress oksidatif pada hewan mencit model penuaan yang diinduksi d-galaktosa dengan mengukur kadar MDA dan ekspresi sirtuin 3 pada hipokampus. Model penuaan dengan pemberian d-galaktosa menjadi alternatif yang efektif untuk dapat mempercepat proses penuaan.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dirancang menggunakan jenis penelitian eksperimental dalam bentuk *in vivo* dengan desain penelitian *post test only control group* (Dahlan, 2013).

Pada penelitian ini, peneliti ingin mengetahui efek ekstrak daun gambir terhadap kadar MDA hewan coba penuaan yang diinduksi d-galaktosa serta hubungannya dengan ekspresi sirtuin 3 pada hipokampus, selanjutnya dilakukan pengukuran variable setelah

pemberian perlakuan pada kelompok eksperimen.

Sample yang digunakan sebanyak 24 ekor mencit betina sesuai dengan kriteria inklusi yaitu mencit betina yang berusia 10-12 minggu dengan berat badan rata-rata 25-35 gram, diperoleh dari tempat pembiakan yang sama, dipelihara pada tempat dan waktu yang sama dan belum pernah sebagai bahan penelitian. Sample akan dibagi menjadi 4 group, masing-masing group terdiri dari 6 ekor mencit di,ana masing-masing akan mendapat perlakuan kontrol,induksi d-galaktosa tanpa

Penelitian dilaksanakan setelah mendapat persetujuan Komisi Etik Penelitian FMIPA Universitas Sumatera Utara. Pelaksanaan penelitian ini berlangsung selama 6 minggu.

2.1 pengukuran MDA

kadar MDA diukur dari hasil sample serum dengan menggunakan Thyobarbituric Acid (TBA) dan dibaca pada alat spektrofotometri

2.2 Isolasi RNA

Isolasi RNA dengan menggunakan Kit Tiangen Cat No. 419, dan dibaca hasil pada nanophotometer

2.3 Ekspresi Sirtuin 3

Menggunakan sample jaringan hipokampus mencit betina dan Ssofast Ssofast Evagreen® supermix qPCR universal master mix 200 μ .

2.4 Analysis statistic

Data di catat dan di tampilkan dalam bentuk rata-rata dan standart deviasi, dimana uji -T tidak berpasangan digunakan untuk ukuran level MDA.

Uji normalitas dan homogenitas dengan uji annova (-value 0.05) digunakan untuk melihat ekspresi sirtuin 3. Hasil uji statistik diambil pada tingkat signifikan 5% (-value = 0.05)

jika $p < 0.05$ dianggap signifikan.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil

3.1.1 Perubahan berat badan

Berat badan (g) rata-rata berat badan mencit betina yang digunakan dalam penelitian ini dianalisa sebelum dan sesudah perlakuan. Tujuannya adalah untuk memantau perubahan berat badan mencit betina sebelum dan sesudah diberikan perlakuan yang terkait dengan takaran pakan standart, pemberian galaktosa dan ekstrak daun gambir. Rata-rata berat badan mencit betina sebelum dilakukan intervensi berkisar antara 26,20 g – 27,20 g. Berdasarkan uji Kolmogorov - Smirnov tidak ada perbedaan yang bermakna berat badan mencit betina antar perlakuan sebelum dilakukan intervensi. Sedangkan setelah dilakukan intervensi selama 6 minggu, rata-rata berat badan mencit betina kelompok kontrol meningkat berkisar 27,20 g - 33,20 g dengan menggunakan uji Kolmogorov – Smirnov.

Dari tabel 1 hasil uji normalitas dengan menggunakan Kolmogorov - Smirnov didapati adanya data tidak terdistribusi normal pada kelompok kontrol di awal penelitian (C) ($P=0,0468$) dan diakhir penelitian juga didapati data tidak terdistribusi normal pada kelompok perlakuan (C4) ($P=0,0005$).

Dengan demikian untuk uji hipotesis selanjutnya kami menggunakan uji multivariate yang non parametrik (Kruskal -Wallis).

Tabel 1. Uji normalitas terhadap berat badan mencit betina (g)

| | | | | | |
|--|--|-------------|----------|----------|----------|
| | | Kon trol | C 100 | C 200 | C 400 |
|--|--|-------------|----------|----------|----------|

| | | | | | |
|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Awal pen eliti an | Nilai median (min- max) | 27 (26 - 30) | 26 (25- 28) | 28 (25 - 28) | 28 (25- 28) |
| | Nilai Mean (±SD) | 27, 20 ± 1,6 43 | 26,2 0 ± 1,30 4 | 26, 60 ± 4,5 17 | 26,6 0 ± 1,14 0 |
| | Nilai *P | 0,0 468 | >0,1 00 | >0, 100 | >0,1 00 |
| Ak Hir | Nilai median (min- max) | 33 (3- 35) | 28 (25- 31) | 29 (25 30) | 28 (28- 29) |
| | Nilai Mean (±SD) | 33, 20 ± 1,9 24 | 27,6 0 ± 2,30 2 | 28 ± 2,3 45 | 28,2 0 ± 0,44 72 |
| | Nilai *P | >0, 100 | >0,1 00 | >0, 100 | >0,0 005 |
| Seli sih () | Nilai median (min- max) | 6 (5- 7) | 2 (0- 3) | 1 (0- 2) | 0 (0- 4) |
| | Nilai Mean | 6± 1 | 1,4± 1,11 4 | 1,4 ±0, 89 | 1,6± 1,51 |
| | Nilai *p | >0, 100 | >0,1 00 | 0,0 46 | >0,1 00 |

Dari table 1 dijumpai kenaikan berat badan pada semua kelompok setelah diberikan perlakuan. Perbedaan berat badan awal dan akhir perlakuan ditampilkan pada tabel 2 dengan menggunakan uji multivariate non parametric kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji Dunn dan didapati adanya kenaikan berat badan yang bermakna pada kelompok kontrol ($p < 0,05$) dibanding dengan kelompok perlakuan.

Dari tabel 2 pada pengamatan dari selisih berat badan sebelum dan sesudah perlakuan, di dapati kenaikan berat badan pada semua kelompok. Rerata kenaikan berat badan pada awal hingga akhir penelitian pada kelompok kontrol lebih tinggi dibandingkan

kelompok yang diberikan perlakuan ekstrak daun gambir. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ($p=0,0111$).

Tabel 2. Kenaikan berat badan mencit setelah diberikan perlakuan

| KELOMPOK | Rerata kenaikan BB | *P |
|-------------|--------------------|--------|
| KONTROL (C) | 6 ± 1 | 0,0111 |
| C100 (C1) | 1,4 ± 1,14 | |
| C200 (C2) | 1,4 ± 0,8944 | |
| C400 (C4) | 1,6 ± 1,517 | |

*Uji anova non parametrik Kruskal Wallis

Uji normalitas untuk data kadar MDA dari seluruh perlakuan dilakukan dengan menggunakan uji Shapiro-Willk. Didapati bahwa data terdistribusi normal. Kemudian dilakukan analisis multivariate dengan menggunakan uji anova untuk melihat perbedaan antar kelompok dapat dilihat pada table 3, didapati $P > 0,05$.

Table 3. Hasil rerata kadar MDA mencit betina setelah perlakuan.

| Kelompok | Kadar MDA (nmol/ml) Rat a-rata ± SD | *P |
|----------|-------------------------------------|--------|
| Control | 13,68 ± 5,858 | 0,8911 |
| C100 | 15,45 ± 8,082 | |
| C200 | 13,15 ± 4,420 | |
| C400 | 15,15 ± 2,738 | |

*one way anova

Kuantitas mRNA dalam sel merupakan parameter jumlah gen yang terekspresi. Untuk menganalisa tingkat ekspresi gen, cDNA yang telah disintesis dari mRNA diuji secara kuantitatif menggunakan RT-PCR. Pada tabel

dibawah ini memberikan gambaran nilai CT(cycle threshold) dengan metode Livak. Nilai CT didapat dari jumlah siklus pada proses RT-PCR yang berpotongan dengan garis threshold. Hasil data seluruh perlakuan dilakukan uji normalitas dengan metode Shapiro-Willk test. Didapati bahwa data terdistribusi normal sehingga dapat dilakukan analisis multivariate dengan menggunakan uji Anova untuk melihat perbedaan antar kelompok. Didapati nilai p tidak signifikan , $p > 0,05$ ($p = 0,7203$).

Tabel 4. Rerata nilai CT SIRT3 mencit betina setelah perlakuan

| Kelompok perlakuan | CT SiRT3 Rata-rata ± SD | *p |
|--------------------|-------------------------|--------|
| Kontrol | 6,512 ± 0,4137 | 0,7203 |
| C100 | 7,653 ± 1,471 | |
| C200 | 5,497 ± 1,378 | |
| C400 | 6,025 ± 3,681 | |

Ekspresi gen SIRT3 dianalisis dengan membandingkan nilai CT (cycle threshold) gen target dengan housekeeping gen sebagai nilai CT. Untuk mendapatkan tingkat ekspresi gen target relative terhadap control maka dicari fold change dengan menggunakan rumus Livak. Ekspresi gen relative dianalisis dengan menggunakan referensi gen (beta aktin) berdasarkan persamaan:

$$R = 2^{-CT} / 2^{-(CT \text{ target gen} - CT \text{ reference gene})}$$

dan dianalisis secara kualitatif. Hasil dari data dengan uji Shapiro menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun gambir dengan dengan dosis 200 mg/kgbb secara oral menunjukkan

adanya peningkatan ekspresi SIRT3 dibandingkan kelompok lainnya.

3.2. PEMBAHASAN

Pada kelompok kontrol mengalami kenaikan yang signifikan ($p < 0,05$). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian (Chinedu et al., 2018), yang mendapati terjadinya kenaikan berat badan berkaitan dengan penambahan usia. Dimana pemberian D-galaktosa 150mg/kgbb pada penelitian ini bertujuan untuk induksi penuaan.

Dalam hal ini pemberian D-galaktosa secara terus menerus mengakibatkan terakumulasinya galaktosa dalam jaringan, dengan pemberian ekstrak daun gambir dapat menekan kenaikan bb pada mencit betina yang diinduksi penuaan dengan d-galaktosa. Dimana ekstrak daun gambir kandungan utamanya adalah katekin, yang merupakan senyawa metabolit skunder turunan flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai antiobesitas dan antihiperlipidemia (Kobayashi et al., 2011)

Tingkat stress oksidatif kelompok perlakuan (C2) didapati kadar MDA lebih rendah dari kadar MDA kontrol. Pada konsentrasi yang tinggi, aktivitas dari antioksidan berubah menjadi prooksidan sehingga menghasilkan pembentukan radikal anion superoksida dan ROS lainnya (Kadji, et al., 2013)

Dari hasil data ekspresi SIRT3 dengan menggunakan analisis kuantitatif real time PCR secara umum menunjukkan bahwa konsentrasi gen SIRT3 pada kelompok C2 lebih tinggi di bandingkan kelompok kontrol. Peningkatan ekspresi gen SIRT3 tersebut menunjukkan akumulasi peningkatan enzim antioksidan, terbukti dengan meningkatnya ekspresi gen SIRT 3 pada kelompok C2 pemberian dosis ekstrak daun gambir 200 mg/kgbb. Maryadhi et al., 2014 dalam penelitiannya terhadap hewan coba

mencit, juga menemukan bahwa minuman gambir dengan dosis 200 mg/kgbb merupakan dosis yang efektif untuk meningkatkan daya ingat mencit ($p < 0,05$). Dengan demikian kelompok ekstrak gambir dosis 200 mg/kgbb dapat mengurangi kerusakan mitokondria hipokampus karena gambir mempunyai kandungan katekin yang dapat menembus sawar darah otak dan dapat menghambat kenaikan stress oksidatif yang disebabkan induksi D-galaktosa.

4. KESIMPULAN

Pemberian D-galaktosa selama 6 minggu berturut-turut dapat meningkatkan berat badan secara signifikan. Pemberian ekstrak daun gambir dengan dosis 100mg/kgbb, 200 mg/kgbb, dan 400 mg/kgbb selama 6 minggu berturut-turut, mampu menghambat kenaikan berat badan pada mencit betina yang diinduksi d-galaktosa selama 6 minggu.

Pemberian ekstrak katekin gambir dengan dosis 100 mg/kgbb, 200 mg/kgbb, dan 400 mg/kgbb selama 6 minggu tidak efektif dalam menghambat proses lipid peroksidasi pada mencit betina yang diinduksi d-galaktosa.

Pemberian ekstrak daun gambir dengan dosis 200 mg/kgbb lebih efektif dalam meningkatkan ekspresi SIRT 3.

DAFTAR PUSTAKA

- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993) 'Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), pp. 7915–7922. doi: 10.1073/pnas.90.17.7915.
- Ansari, A. et al. (2017) 'Aging Cell', pp. 4–16. doi: 10.1111/accel.12538.
- Ariyanti, P. R. and Aditya, M. (2016) 'Manfaat Gambir (*Uncaria gambir* Roxb) sebagai Antioksidan', *Majority*, 5(3), pp. 129–133.
- Ariyanti, P. R. and Aditya, M. (2016) 'Manfaat Gambir (*Uncaria gambir* Roxb) sebagai Antioksidan', *Majority*, 5(3), pp. 129–133.
- Blondell, S. J., Hammersley-mather, R. and Veerman, J. L. (2014) 'Does physical activity prevent cognitive decline and dementia?: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies', 14(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/1471-2458-14-510.
- Dahlan, M. Sopiudin (2013) 'Besarnya sampel dalam penelitian kedokteran dan kesehatan (seri evidence based medicine)', seri 2. Jakarta: Arkans
- Iwahara, T. et al. (2012) 'SIRT3 Functions in the Nucleus in the Control of Stress-Related Gene Expression', 32(24), pp. 5022–5034. doi: 10.1128/MCB.00822-12.
- Kedokteran, F. and Udayana, U. (2018) 'Kadar malondialdehid serum tinggi meningkatkan faktor risiko gangguan kognitif pada penderita hiv dengan haart
- Kementrian kesehatan RI. Gambaran Kesehatan Lanjut Usia di Indonesia. Bul jendela Data dan Inf Kesehat. 2013.
- Lopez, O. et al. (2013) 'the hallmark of aging, volume 153, issue 6, p1194-1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- López-otín, C. et al. (2013) 'Europe PMC Funders Group The Hallmarks of Aging', 153(6), pp. 1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- Marius-Daniel R, Stelian S, Dragomir C. The effect of acute physical exercise on the antioxidant status of the skeletal and cardiac muscle in the Wistar rat. *Rom Biotechnol Lett.* 2010; 15(SUPPL.3):56-61.
- Nunnari, J. and Suomalainen, A. (2012) 'Review Mitochondria : In Sickness and in Health', *Cell*. Elsevier Inc., 148(6), pp. 1145–1159. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035.
- Paradies, G. et al. (2011) 'Mitochondrial dysfunction in brain aging: Role of oxidative stress and cardiolipin', *Neurochemistry International*. Elsevier Ltd, 58(4), pp. 447–457. doi: 10.1016/j.neuint.2010.12.016.
- Sidorova-darmos, E., Sommer, R. and Eubanks, J. H. (2018) 'The Role of SIRT3 in the Brain Under Physiological and Pathological Conditions', 12(July), pp. 1–16. doi: 10.3389/fncel.2018.00196.
- Sadigh-eteghad, S. et al. (2017) 'Correction : D-galactose-induced brain ageing model : A systematic review and meta-analysis on cognitive outcomes and oxidative stress indices', p. 190328
- Talarowska, M. et al. (2012) 'Malondialdehyde plasma concentration correlates with declarative and working memory in patients with recurrent depressive disorder', pp. 5359–5366. doi: 10.1007/s11033-011-1335-8.
- Valko, M. et al. (2007) 'Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*,

39(1), pp. 44–84. doi:
10.1016/j.biocel.2006.07.001.

Wang, C. H. et al. (2013) 'Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: Implication in the pathophysiology of aging', *Experimental Biology and Medicine*, 238(5), pp. 450–460. doi: 10.1177/1535370213493069.