

TESIS
PENGARUH POLA MAKAN RESTRIKSI KALORI
DAN OLAHRAGA TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3
PADA OTAK TIKUS PENGONSUMSI ALKOHOL

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Biomedik (M. Biomed)



IRENE RUTH SAPUTRA
04112622327004

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
2025

HALAMAN PENGESAHAN

PENGARUH POLA MAKAN RESTRIKSI KALORI DAN OLAHRAGA TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 PADA OTAK TIKUS PENGONSUMSI ALKOHOL

TESIS

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Magister Biomedik (M.Biomed)

Oleh :

Irene Ruth Saputra

04112622327004

Palembang, 22 April 2025

Pembimbing I



Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO., M.Pd.Ked
NIP 197306131999031001

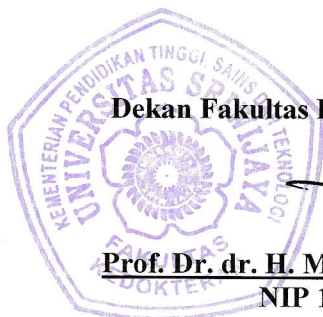
Pembimbing II



dr. Eka Febri Zulissetiana, M.Bmd
NIP 198802192010122001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya



Prof. Dr. dr. H. Muhammad Irsan Saleh, M.Biomed
NIP 1966092919960110001

HALAMAN PERSETUJUAN

Karya tulis ilmiah berupa laporan akhir tesis dengan judul “Pengaruh Pola Makan Restriksi Kalori dan Olahraga Terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Otak Tikus Pengonsumsi Alkohol” telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Sriwijaya pada tanggal 22 April 2025.

Palembang, 22 April 2025

Tim Penguji Karya Ilmiah berupa Laporan Akhir Tesis.

Ketua :

1. Dr. dr. Zen Hafy, M.Biomed
NIP 197212291998031002

Anggota :

2. Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO., M.Pd.Ked
NIP 197306131999031001
3. dr. Eka Febri Zulissetiana, M.Bmd
NIP 198802192010122001
4. Dr. dr. Siti Sarahdeaz Fazzaura Putri, M.Biomed
NIP 198901122020122009
5. Dr. dr. Evi Lusiana, M.Biomed
NIP 198607112015042004
6. Arwan Bin Laeto, S.Pd., M.Kes
NIP 198701292019031004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Unsri


Prof. Dr. dr. H. Muhammad Irsan Saleh, M.Biomed
NIP 1966092919960110001

Koordinator Program Studi


Dr. dr. Zen Hafy, M.Biomed
NIP 197212291998031002

HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Irene Ruth Saputra
NIM : 04112622327004
Judul : Pengaruh Pola Makan Restriksi Kalori dan Olahraga Terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Otak Tikus Pengonsumsi Alkohol

Menyatakan bahwa Tesis saya merupakan hasil karya sendiri didampingi tim pembimbing dan bukan hasil penjiplakan/plagiat. Apabila ditemukan unsur penjiplakan/plagiat dalam Tesis ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik dari Universitas Sriwijaya sesuai aturan yang berlaku.

Demikian, pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa ada paksaan dari siapapun.



Inderalaya, 22 April 2025

Irene Ruth Saputra

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Irene Ruth Saputra
NIM : 04112622327004
Judul : Pengaruh Pola Makan Restriksi Kalori dan Olahraga Terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Otak Tikus Pengonsumsi Alkohol

Memberikan izin kepada Pembimbing dan Universitas Sriwijaya untuk mempublikasikan hasil penelitian saya untuk kepentingan akademik apabila dalam waktu 1 (satu) tahun tidak mempublikasikan karya penelitian saya. Dalam kasus ini saya setuju untuk menempatkan Pembimbing sebagai penulis korespondensi (*Corresponding author*).

Demikian, pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa ada paksaan dari siapapun.

Inderalaya, 22 April 2025



Irene Ruth Saputra

ABSTRAK

PENGARUH POLA MAKAN RESTRIKSI KALORI DAN OLAHRAGA TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 PADA OTAK TIKUS PENGONSUMSI ALKOHOL

Penyalahgunaan alkohol adalah masalah kesehatan global yang merusak otak, terutama korteks prefrontal, melalui peningkatan inflamasi dan apoptosis yang dimediasi oleh Caspase-3. Intervensi gaya hidup seperti restriksi kalori (RK) dan olahraga berpotensi memberikan efek neuroprotektif. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh RK dan olahraga terhadap ekspresi Caspase-3 pada otak tikus pengonsumsi alkohol. Penelitian eksperimental ini menggunakan desain *post-test only controlled group* dengan 30 tikus Wistar yang dibagi dalam lima kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok alkohol, kelompok alkohol dan RK, kelompok alkohol dan olahraga, dan kelompok perlakuan alkohol, RK dan olahraga. Perlakuan alkohol diberikan sebagai etanol 20% v/v dalam air minum, RK berupa pengurangan 20% dari diet standar, dan olahraga merupakan olahraga aerobik involuntary motored hurdle running wheel dengan kecepatan 10-12 m/menit selama 30 menit per sesi. Perlakuan dilakukan selama enam minggu sebelum sampel otak diambil dan dianalisis secara imunohistokimia. Data dihitung dengan ImageJ dan dianalisis secara statistik. Hasil menunjukkan alkohol meningkatkan ekspresi Caspase-3 secara signifikan (selisih rata-rata 15.586; $p = 0.000$). Baik RK maupun olahraga masing-masing menurunkan ekspresi Caspase-3 akibat alkohol ($p = 0.000$, selisih -16.428 AU), sementara kombinasi keduanya memberikan efek penurunan lebih besar ($p = 0.000$, selisih -24.954 AU). Namun, kombinasi RK dan olahraga tidak sepenuhnya menghilangkan dampak alkohol. Ini menunjukkan bahwa meskipun intervensi gaya hidup ini memberikan perlindungan, konsumsi alkohol tetap berdampak negatif signifikan pada kesehatan otak.

Kata kunci: caspase-3, alkohol, restriksi kalori, olahraga, otak

ABSTRACT

EFFECT OF CALORIE RESTRICTION DIET AND EXERCISE ON CASPASE-3 EXPRESSION IN BRAINS OF ALCOHOL- CONSUMING RATS

Alcohol abuse is a global health problem that damages the brain, particularly the prefrontal cortex area, through increased inflammation and apoptosis mediated by Caspase-3. Lifestyle interventions such as calorie restriction (CR) and exercise have the potential to provide neuroprotective effects. This study aims to evaluate the effect of CR and exercise on Caspase-3 expression in the brains of alcohol-consuming rats. This experimental study used a post-test only controlled group design with 30 Wistar rats divided into five groups: control group, alcohol group, alcohol and CR group, alcohol and exercise group, and alcohol, CR and exercise group. Alcohol treatment was given as 20% v/v ethanol in drinking water, CR was a 20% reduction of the standard diet, and exercise was involuntary motorised hurdle running wheel aerobic exercise at a speed of 10-12 m/min for 30 minutes per session. Experiments were carried out for six weeks when brain samples were harvested and analysed immunohistochemically. Data were measured using ImageJ and analysed statistically. The results showed that alcohol significantly increased Caspase-3 expression (mean difference 15.586; $p = 0.000$). Both CR and exercise individually reduced alcohol-induced Caspase-3 expression ($p = 0.000$, difference -16.428 AU), while the combination of both interventions resulted in an even greater reduction ($p = 0.000$, difference -24.954 AU). However, the combination of CR and exercise did not eliminate the effects of alcohol. These findings indicate that although these lifestyle interventions provide a neuroprotective effect, alcohol consumption still has a significant negative impact on brain health.

Keywords: caspase-3, alcohol, calorie restriction, exercise, brain

RINGKASAN

PENGARUH POLA MAKAN RESTRIKSI KALORI DAN OLAHRAGA TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 PADA OTAK TIKUS PENGONSUMSI ALKOHOL

Karya tulis ilmiah berupa tesis, 22 April 2025

Irene Ruth Saputra, dibimbing oleh Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO., M.Pd.Ked dan dr. Eka Febri Zulissetiana, M.Bmd.

Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya

xvi+80 halaman, 7 tabel, 7 gambar, dan 13 lampiran

Penggunaan alkohol yang berbahaya adalah risiko kesehatan global, dengan peningkatan konsumsi alkohol sejak tahun 2000 di sebagian besar wilayah dunia. Penyalahgunaan alkohol kronis menyebabkan peningkatan inflamasi yang dapat menyebabkan kerusakan otak terutama pada korteks prefrontal. Paparan etanol menyebabkan produksi radikal hidroksil reaktif yang mengakibatkan disfungsi dan kematian sel yang berkontribusi terhadap neurotoksisitas yang dapat diamati saat terjadinya peningkatan ekspresi protein apoptosis seperti Caspase-3. Pola makan Restriksi Kalori (RK) dan Olahraga menawarkan beragam manfaat kesehatan dan memiliki potensi dalam melindungi neuron dari kerusakan seperti yang diakibatkan oleh alkohol. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh RK dan olahraga terhadap ekspresi Caspase-3 pada otak tikus pengonsumsi alkohol. Penelitian eksperimental ini menggunakan desain *post-test only controlled group* dengan 30 tikus Wistar yang dibagi dalam lima kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok alkohol, kelompok alkohol dan RK, kelompok alkohol dan olahraga, dan kelompok perlakuan alkohol, RK dan olahraga. Perlakuan alkohol diberikan sebagai etanol 20% v/v dalam air minum, RK berupa pengurangan 20% dari diet standar, dan olahraga merupakan olahraga aerobik involuntary motored hurdle running wheel dengan kecepatan 10-12 m/menit selama 30 menit per sesi. Perlakuan dilakukan selama enam minggu sebelum sampel otak diambil dan dianalisis secara imunohistokimia. Data dihitung dengan ImageJ dan dianalisis secara statistik. Hasil menunjukkan alkohol meningkatkan ekspresi Caspase-3 secara signifikan (selisih rata-rata 15.586; $p = 0.000$). Baik RK maupun olahraga masing-masing menurunkan ekspresi Caspase-3 akibat alkohol ($p = 0.000$, selisih -16.428 AU), sementara kombinasi keduanya memberikan efek penurunan lebih besar ($p = 0.000$, selisih -24.954 AU). Namun, kombinasi RK dan olahraga tidak sepenuhnya menghilangkan dampak alkohol. Ini menunjukkan bahwa meskipun intervensi gaya hidup ini memberikan perlindungan, konsumsi alkohol tetap berdampak negatif signifikan pada kesehatan otak.

Kata kunci: caspase-3, alkohol, restriksi kalori, olahraga, otak

SUMMARY

EFFECT OF CALORIE RESTRICTION DIET AND EXERCISE ON CASPASE-3 EXPRESSION IN BRAINS OF ALCOHOL-CONSUMING RATS

Scientific Paper in the form of Thesis, 22 April 2025

Irene Ruth Saputra, supervised by Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO., M.Pd.Ked and dr. Eka Febri Zulissetiana, M.Bmd.

Biomedical Science Program, Faculty of Medicine, Sriwijaya University

xvi+80 pages, 7 tables, 7 figures, and 13 attachments

Hazardous alcohol use is a global health risk, with increasing alcohol consumption since 2000 in most regions of the world. Chronic alcohol abuse leads to increased inflammation that can lead to brain damage, particularly in the prefrontal cortex. Ethanol exposure induces the production of reactive hydroxyl radicals, resulting in cell dysfunction and death, contributing to neurotoxicity, which can be observed through increased expression of apoptotic proteins such as Caspase-3. Calorie Restriction (CR) and exercise offer a variety of health benefits and have the potential to protect neurons from damage, such as the one caused by alcohol. This study aims to evaluate the effect of CR and exercise on Caspase-3 expression in the brains of alcohol-consuming rats. This experimental study used a post-test only controlled group design with 30 Wistar rats divided into five groups: control group, alcohol group, alcohol and CR group, alcohol and exercise group, and alcohol, CR and exercise group. Alcohol treatment was given as 20% v/v ethanol in drinking water, CR was a 20% reduction of the standard diet, and exercise was involuntary motorised hurdle running wheel aerobic exercise at a speed of 10-12 m/min for 30 minutes per session. Experiments were carried out for six weeks when brain samples were harvested and analysed immunohistochemically. Data were measured using ImageJ and analysed statistically. The results showed that alcohol significantly increased Caspase-3 expression (mean difference 15.586; $p = 0.000$). Both CR and exercise individually reduced alcohol-induced Caspase-3 expression ($p = 0.000$, difference -16.428 AU), while the combination of both interventions resulted in an even greater reduction ($p = 0.000$, difference -24.954 AU). However, the combination of CR and exercise did not eliminate the effects of alcohol. These findings indicate that although these lifestyle interventions provide a neuroprotective effect, alcohol consumption still has a significant negative impact on brain health.

Keywords: caspase-3, alcohol, calorie restriction, exercise, brain

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan kasihnya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah berupa laporan akhir tesis yang berjudul "Pengaruh Pola Makan Restriksi Kalori dan Olahraga terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Otak Tikus Pengonsumsi Alkohol," sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik (M.Biomed.) di Universitas Sriwijaya.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis dengan terbuka menerima kritik dan saran yang bersifat membangun demi perbaikan dan penyempurnaan di masa mendatang.

Penyelesaian karya tulis ilmiah berupa laporan akhir tesis ini tidak terlepas dari bantuan, bimbingan, dan arahan dari berbagai pihak, baik secara lisan maupun tulisan. Penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, M.Pd.Ked, selaku Pembimbing 1, dan dr. Eka Febri Zulissetiana, M. Bmd, selaku Pembimbing 2, atas saran, masukan, dan dukungan yang diberikan selama proses penyusunan tesis ini.
2. Tim penguji usulan penelitian tesis: Dr. dr. Siti Sarahdeaz Fazzaura Putri, M.Biomed., Arwan Bin Laeto, S.Pd., M.Kes., dan Dr. dr. Evi Lusiana, M.Biomed., yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan yang sangat berharga selama tahap penelitian tesis.
3. Seluruh staf dan konsultan Laboratorium Patologi Klinik Barokah Palembang, khususnya Prof. dr. Krisna Murti, Sp.PA., M.Biotech.Stud., Ph.D., dan dr. Nyiyau Fauziah Kurniawati, Sp.PA., yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama proses analisis hasil penelitian.
4. Seluruh staf Animal House Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, serta Abduh Tikus, atas bantuan dalam penyediaan fasilitas dan dukungan teknis selama pelaksanaan penelitian.
5. Yayasan Universitas Advent Indonesia yang telah memberikan kesempatan untuk upgrading dan didukung secara finansial kepada penulis selama masa studi.
6. Seluruh pihak lainnya yang telah terlibat, baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penyelesaian tesis ini. Doa serta dukungan yang telah diberikan memiliki peran penting dalam keberhasilan penulis.

Penulis berharap agar karya tulis ilmiah berupa laporan akhir tesis ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca dan menjadi kontribusi yang berarti di bidang ilmu biomedik.

Palembang, 22 April 2025

Penulis

DAFTAR ISI

SAMPUL DAN JUDUL TESIS	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	ix
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR ISTILAH	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Hipotesis	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Penyalahgunaan Alkohol dan Otak	6
2.1.1 Epidemiologi Penyalahgunaan Alkohol	6
2.1.2 Dampak Metabolisme Alkohol Pada Kerusakan dan Peradangan Saraf	7
2.1.2 Dampak Alkohol Terhadap Jaringan Korteks Prefrontal Otak	9
2.2 Caspase-3 dan Otak Tikus Terinduksi Alkohol	10
2.3 Korteks Prefrontal Tikus	12
2.4 Jalur PI3K/Akt dan <i>Neuronal Survival</i>	14
2.5 Sirtuin dan Neurogenesis	15
2.6 Restriksi Kalori	16
2.6.1 Restriksi Kalori dan Manfaatnya Bagi Tubuh	16
2.6.2 Restriksi Kalori dan <i>Neuronal Survival</i>	17
2.7 Olahraga	19
2.7.1 Olahraga dan Manfaatnya bagi Tubuh	19
2.7.2 Olahraga dan <i>Neuronal Survival</i>	21
2.7.3 Olahraga dan <i>Alcohol Use Disorder</i>	22
2.8 Hewan Coba Tikus	22
2.9 Kerangka Teori	25
2.10 Kerangka Konsep	26
BAB III METODE PENELITIAN	27
3.1 Jenis Penelitian	27

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	27
3.3 Populasi dan Sampel	27
3.3.1 Populasi	27
3.3.2 Sampel	27
3.3.2.1 Kriteria Inklusi	27
3.3.2.2 Kriteria Eksklusi	27
3.3.3 Besar Sampel Penelitian	28
3.3.4 Cara Pengambilan Sampel	28
3.4 Variabel Penelitian	28
3.4.1 Variabel Bebas (<i>Independent Variable</i>)	28
3.4.2 Variabel Terikat (<i>Dependent Variable</i>)	29
3.5 Definisi Operasional	29
3.6 Alat dan Bahan	31
3.6.1 Alat dan Bahan untuk Perlakuan Konsumsi Alkohol pada Hewan Coba	31
3.6.2 Alat dan Bahan untuk Perlakuan Pola Makan Restriksi Kalori pada Hewan Coba	31
3.6.3 Alat dan Bahan untuk Perlakuan Olahraga pada Hewan Coba ...	31
3.6.4 Alat dan Bahan untuk Pengambilan Organ Hewan Coba	31
3.6.5 Alat dan Bahan untuk Pemeriksaan Imunohistokimia	32
3.7 Prosedur Penelitian	32
3.7.1 Penyediaan Hewan Coba	32
3.7.2 Pengelompokan Hewan Coba	32
3.7.3 Pengambilan Organ Otak	33
3.7.4 Pemeriksaan Imunohistokimia	34
3.8 Analisis Data	35
3.9 Alur Penelitian	36
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1 Hasil Penelitian	37
4.1.1 Ekspresi dan Distribusi Caspase-3 pada Korteks Prefrontal Tikus	37
4.1.2 Uji Normalitas	39
4.1.3 Analisis Uji One Way Anova	41
4.1.4 Hasil Uji Post Hoc Bonferroni	42
4.2 Pembahasan	43
4.3 Keterbatasan Penelitian	49
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1 Kesimpulan	51
5.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	61
RIWAYAT HIDUP	79

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel Penelitian	29
Tabel 3.2 Pengelompokan Hewan Coba	32
Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Ekspresi Caspase-3 di Korteks Prefrontal Otak Tikus Pengonsumsi Alkohol	39
Tabel 4.2 Hasil Uji Normalitas Shapiro-Wilk	40
Tabel 4.3 Hasil Uji Homogenitas Varians Densitas Caspase-3 pada Jaringan Otak Tikus Pengonsumsi Alkohol	41
Tabel 4.4 Analisis Uji One Way ANOVA	41
Tabel 4.5 Tabel Ringkasan Hasil Uji Post Hoc Bonferroni	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Persilangan antara sistem kekebalan perifer dan pusat pada gangguan penggunaan Alkohol (AUD) yang menyebabkan Kematian Sel	8
Gambar 2.2 Mekanisme kematian sel pada korteks prefrontal	9
Gambar 2.3 Korteks Prefrontal Tikus	13
Gambar 2.4 Mekanisme molekuler yang mendasari efek restriksi kalori pada kompartemen seluler	18
Gambar 2.5 Kerangka Teori Penelitian	25
Gambar 4.1 Hasil Imunohistokimia jaringan korteks prefrontal di otak	38
Gambar 4.2 Perbedaan rata-rata densitas Caspase-3 pada otak tikus pengonsumsi Alkohol	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel pengukuran berat badan tikus	61
Lampiran 2. Tabel statistik deskriptif berat badan tikus	62
Lampiran 3. Tabel master penghitungan densitas caspase-3	62
Lampiran 4. Tabel perhitungan statistik tabel master	63
Lampiran 5. Tabel lengkap hasil uji post hoc Bonferroni	65
Lampiran 6. Sertifikat Persetujuan Etik	66
Lampiran 7. Surat Hewan Uji	67
Lampiran 8. Surat Perizinan Penggunaan <i>Animal House</i> FK UNSRI	69
Lampiran 9. Surat Perizinan Penelitian di Lab. Patologi Anatomi Barokah	70
Laporan 10. Surat Keterangan Selesai Penelitian <i>Animal House</i> FK UNSRI	71
Laporan 11. Surat Keterangan Selesai Penelitian Lab. Patologi Antomi Barokah	72
Lampiran 12. <i>Data sheet</i> antibody caspase-3 (IHK)	73
Lampiran 11. Dokumentasi Penelitian	76

DAFTAR ISTILAH

AUD	<i>Alcohol Use Disorder (Gangguan Penggunaan Alkohol)</i>
ADH	<i>Alkohol dehidrogenase</i>
Akt	<i>Ak strain transforming (Protein Kinase B)</i>
ALDH	<i>Aldehida dehidrogenase</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BBB	<i>Blood-Brain Barrier (Sawar darah otak)</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor (faktor neurotropik yang diturunkan dari otak)</i>
BPS	<i>Larutan phosphate buffer saline</i>
FAS	<i>Fetal Alcohol Syndrome (Sindrom Alkohol Fetal)</i>
FFPE	<i>Fixed and Paraffin-embedded</i>
GLUT	<i>Glucose Transporters</i>
GSH	<i>Glutathione Peroksidase</i>
GSK-3 β	<i>Glycogen synthase kinase-3 beta</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IHK	<i>Imunohistokimia</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IRS	<i>Immunoreactive Score</i>
LiCo3	<i>Larutan Litium Karbonat</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NMDAR	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>
PA	<i>Patologi anatomi</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
RK	<i>Restriksi Kalori</i>
ROS	<i>Spesies Oksigen Reaktif</i>
Ser9	<i>Serine 9</i>
SOD	<i>Superoksida dismutase</i>
SSP	<i>Sistem saraf pusat</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TrkB	<i>Reseptor Tirosin Kinase B</i>
TRS	<i>Target Retrieval Solution</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor (Faktor pertumbuhan endotel vaskular)</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penggunaan alkohol yang berbahaya adalah risiko kesehatan global, dengan peningkatan konsumsi alkohol sejak tahun 2000 di sebagian besar wilayah dunia. Pada tahun 2016, penyalahgunaan alkohol menyebabkan sekitar 3 juta kematian (5.3% dari seluruh kematian dunia). Angka kematian alkohol ini melebihi angka kematian yang disebabkan oleh penyakit seperti tuberkulosis, HIV/AIDS, dan diabetes.¹ Masalah akibat penggunaan alkohol mempengaruhi 17% wanita dan 86% pria di seluruh dunia, dengan frekuensi tertinggi terjadi di negara-negara berpenghasilan tinggi dan menengah ke atas.²

Rata-rata konsumsi alkohol murni per kapita di Indonesia adalah 0.3 liter di tahun 2016, dan berdasarkan data WHO, Asia Tenggara memiliki tingkat penggunaan alkohol tertinggi dibanding wilayah lain di Asia, dengan total konsumsi alkohol per kapita berkisar antara 7.6-8.3 liter alkohol murni di tahun 2016,¹ menjadikan penelitian berkenaan pengaruh penyalahgunaan alkohol menjadi topik yang penting untuk dipelajari.

Penyalahgunaan alkohol kronis menyebabkan peningkatan inflamasi yang dapat menyebabkan kerusakan otak.^{3,4} Penggunaan alkohol jangka panjang dapat menyebabkan kerusakan otak serius, mempengaruhi tingkah laku dan keterampilan motorik, serta mengakibatkan perubahan sel otak.^{5,6}

Korteks prefrontal (KP) adalah wilayah penting otak yang memegang peranan penting seperti fungsi eksekutif, pengaturan perilaku, memori kerja, ekspresi kepribadian dan fleksibilitas kognitif. Paparan etanol meningkatkan ekspresi aktivator transkripsi TIEG2 yang pada gilirannya meningkatkan aktivasi monoamine oksidase B (MAO B). Enzim ini mendegradasi amina biogenik dan menghasilkan hidrogen peroksida yang dapat menyebabkan produksi radikal hidroksil reaktif. Radikal ini menyebabkan disfungsi dan kematian sel yang berkontribusi terhadap neurotoksisitas yang diamati pada paparan alkohol. Paparan

etanol ini menyebabkan peningkatan ekspresi protein apoptosis seperti caspase-3, sekaligus mengurangi ekspresi protein antiapoptotik seperti Bcl2. Pergeseran ke arah sinyal proapoptotik ini menunjukkan bahwa etanol menginduksi apoptosis di korteks prefrontal yang dimediasi oleh kaskade kematian sel.⁷

Pola makan Restriksi Kalori (RK) menawarkan beragam manfaat kesehatan yang secara signifikan berdampak pada berbagai proses fisiologis dan seluler. Pola makan ini didapati memperpanjang umur rata-rata dan maksimum pada hewan dan meningkatkan sensitivitas insulin, yang merupakan manfaat penting untuk menjaga kesehatan metabolisme.⁸ RK juga mengurangi stres oksidatif dan kerusakan mitokondria, yang merupakan faktor kunci penuaan dan terjadinya penyakit.^{9,10}

Restriksi kalori menawarkan manfaat neuroprotektif dengan mencegah kerusakan saraf dan meningkatkan kelangsungan hidup neuron baru, yang membantu dalam menangani kondisi neurodegeneratif.^{8,10} RK mengurangi peradangan, menghambat jalur apoptosis, dan menurunkan kematian sel di otak, jantung dan jaringan lain.^{9,10} RK juga mencegah peningkatan sel-sel senesens yang terkait dengan penuaan dan penyakit yang terkait usia.⁸ Meninjau manfaat-manfaat ini, RK memiliki potensi dalam melindungi neuron dari kerusakan yang diakibatkan alkohol.

Aktifitas tubuh yang baik seperti olahraga aerobik, didapati dapat mendorong terjadinya neurogenesis dan peningkatan aliran darah di otak.^{11,12} Olahraga membantu peningkatan ketahanan otak terhadap stress, yang berkontribusi dalam pertumbuhan neuron dan fungsi kognitif.¹¹ Olahraga juga dikaitkan dengan penurunan neuroinflamasi dan peningkatan plastisitas simpatik yang berkontribusi terhadap kesehatan otak secara keseluruhan.^{13,14}

Olahraga membantu neurogenerasi dengan mengaktifkan jalur pelindung seperti jalur PI3K/Akt yang membantu mengurangi stres oksidatif dan meningkatkan kesehatan seluler pada individu.¹⁵ Jalur PI3K/Akt membantu sel bertahan dari stres oksidatif dan mencegah apoptosis, sehingga penting untuk perlindungan dan kelangsungan hidup sel.^{16,17} Baik olahraga dan restriksi kalori dapat mengaktifkan jalur PI3K/Akt yang dapat menekan apoptosis.^{15,18} Hal ini menunjukkan bahwa baik olahraga dan restriksi dapat memiliki potensi dalam melindungi neuron dari kerusakan yang diakibatkan alkohol.

Meninjau paparan di atas, penting untuk mengeksplorasi lebih lanjut intervensi yang dapat mengurangi dampak negatif dari konsumsi alkohol kronis terhadap otak. Dengan meninjau potensi pendekatan restriksi kalori dan olahraga dalam mencegah kerusakan neuorn akibat alkohol, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji dampak intervensi tersebut dalam mengurangi neurotoksisitas dan meningkatkan kesehatan otak pada tikus yang terpapar alkohol. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru dan kontribusi signifikan dalam pengembangan strategi pencegahan dan pengobatan untuk mengatasi kerusakan otak yang diakibatkan oleh penyalahgunaan alkohol.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah Konsumsi Alkohol berpengaruh terhadap Ekspresi Caspase-3 di otak tikus.
2. Apakah Konsumsi Alkohol dan Restriksi Kalori berpengaruh terhadap Ekspresi Caspase-3 di otak tikus.
3. Apakah Konsumsi Alkohol dan Olahraga berpengaruh terhadap Ekspresi Caspase-3 di otak tikus.
4. Apakah Konsumsi Alkohol, Restriksi kalori dan Olahraga berpengaruh terhadap Ekspresi Caspase-3 di otak tikus.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui signifikansi pengaruh perlakuan olahraga dan restriksi kalori terhadap ekspresi Caspase-3 di otak tikus yang mengonsumsi alkohol.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengidentifikasi pengaruh konsumsi alkohol terhadap ekspresi Caspase-3 di otak tikus
2. Mengidentifikasi pengaruh restriksi kalori terhadap ekspresi Caspase-3 di otak tikus yang terpapar alkohol

3. Mengidentifikasi pengaruh olahraga terhadap ekspresi Caspase-3 di otak tikus yang terpapar alkohol
4. Mengidentifikasi pengaruh restriksi kalori dan olahraga terhadap ekspresi Caspase-3 di otak tikus yang terpapar alkohol

1.4. Hipotesis

1. Konsumsi Alkohol berpengaruh terhadap Ekspresi Caspase-3 di otak tikus
2. Konsumsi Alkohol dan Restriksi Kalori berpengaruh terhadap Ekspresi Caspase-3 di otak tikus
3. Konsumsi Alkohol dan Olahraga berpengaruh terhadap Ekspresi Caspase-3 di otak tikus
4. Konsumsi Alkohol, Restriksi kalori dan Olahraga berpengaruh terhadap Ekspresi Caspase-3 di otak tikus

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini dapat memberikan kontribusi penting terhadap pemahaman mekanisme biologis di balik efek perlindungan restriksi kalori dan olahraga terhadap kerusakan otak yang terpapar alkohol. Ini akan memperkaya literatur ilmiah di bidang neurobiologi dan kesehatan otak.

1.5.2. Manfaat Praktis

1. Temuan penelitian ini dapat digunakan untuk mengembangkan intervensi kesehatan baru yang menggabungkan restriksi kalori dan olahraga untuk melindungi otak dari efek merusak alkohol, yang dapat diterapkan pada manusia setelah uji klinis lebih lanjut.
2. Hasil penelitian ini bisa menjadi dasar rekomendasi gaya hidup sehat yang mencakup restriksi kalori dan olahraga untuk individu yang berisiko mengalami kerusakan otak akibat konsumsi alkohol.

3. Jika terbukti efektif, strategi kombinasi restriksi kalori dan olahraga dapat diintegrasikan ke dalam program rehabilitasi bagi individu dengan gangguan penggunaan alkohol.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva; 2018.
2. Carvalho AF, Heilig M, Perez A, Probst C, Rehm J. Alcohol use disorders. *The Lancet*. 2019;394:781–92.
3. Vore AS, Deak T. Alcohol, inflammation, and blood-brain barrier function in health and disease across development. In: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc.; 2022. p. 209–49.
4. Teixeira FB, Santana LNDS, Bezerra FR, De Carvalho S, Fontes EA, Prediger RD, et al. Chronic ethanol exposure during adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress. *PLoS One*. 2014 Jun 26;9(6).
5. Qin L, Zou J, Barnett A, Vetreno RP, Crews FT, Coleman LG. Trail mediates neuronal death in aud: A link between neuroinflammation and neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 1;22(5):1–23.
6. Nutt D, Hayes A, Fonville L, Zafar R, Palmer EOC, Paterson L, et al. Alcohol and the brain. *Nutrients*. 2021 Nov 1;13(11).
7. Ou XM, Johnson C, Lu D, Johnson S, Paul IA, Austin MC, et al. Ethanol increases TIEG2-MAO B cell death cascade in the prefrontal cortex of ethanol-preferring rats. *Neurotox Res*. 2011;19(4):511–8.
8. Apple DM, Mahesula S, Fonseca RS, Zhu C, Kokovay E. Calorie restriction protects neural stem cells from age-related deficits in the subventricular zone. *Aging*. 2019;11(1):115–26.
9. Guccione L, Djouma E, Penman J, Paolini AG. Calorie restriction inhibits relapse behaviour and preference for alcohol within a two-bottle free choice paradigm in the alcohol preferring (iP) rat. *Physiol Behav*. 2013 Feb 7;110–111:34–41.
10. Gültekin F, Nazıroğlu M, Savaş HB, Çiğ B. Calorie restriction protects against apoptosis, mitochondrial oxidative stress and increased calcium signaling through inhibition of TRPV1 channel in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metab Brain Dis*. 2018 Oct 1;33(5):1761–74.
11. Wang Z, Van Praag H. Exercise and the brain: Neurogenesis, synaptic plasticity, spine density, and angiogenesis. In: *Functional Neuroimaging in Exercise and Sport Sciences*. Springer New York; 2012. p. 1–24.

12. Mee-Inta O, Zhao ZW, Kuo YM. Physical exercise inhibits inflammation and microglial activation. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
13. Mattson MP, Moehl K, Ghena N, Schmaedick M, Cheng A. Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health. Vol. 19, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2018. p. 81–94.
14. Wang M, Zhang H, Liang J, Huang J, Chen N. Exercise suppresses neuroinflammation for alleviating Alzheimer's disease. Vol. 20, *Journal of Neuroinflammation*. BioMed Central Ltd; 2023.
15. Pahlavani HA. Exercise therapy to prevent and treat Alzheimer's disease. Vol. 15, *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers Media SA; 2023.
16. Li D, Ni S, Miao KS, Zhuang C. PI3K/Akt and caspase pathways mediate oxidative stress-induced chondrocyte apoptosis. *Cell Stress Chaperones*. 2019 Jan 1;24(1):195–202.
17. Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas JM, Hernández-Damián J, Pedraza-Chaverri J. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. Vol. 26, *Cellular Signalling*. Elsevier Inc.; 2014. p. 2694–701.
18. Granado M, Amor S, Martín-Carro B, Guerra-Menéndez L, Tejera-Muñoz A, González-Hedström D, et al. Caloric restriction attenuates aging-induced cardiac insulin resistance in male Wistar rats through activation of PI3K/Akt pathway. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2019 Jan 1;29(1):97–105.
19. Kranzler HR, Soyka M. Diagnosis and pharmacotherapy of alcohol use disorder a review. Vol. 320, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2018. p. 815–24.
20. Kamal H, Tan GC, Ibrahim SF, Shaikh MF, Mohamed IN, Mohamed RMP, et al. Alcohol Use Disorder, Neurodegeneration, Alzheimer's and Parkinson's Disease: Interplay Between Oxidative Stress, Neuroimmune Response and Excitotoxicity. Vol. 14, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2020.
21. Simon L, Souza-Smith FM, Molina PE. Alcohol-Associated Tissue Injury: Current Views on Pathophysiological Mechanisms. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2022; Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-060821->
22. Peng H, Geil Nickell CR, Chen KY, McClain JA, Nixon K. Increased expression of M1 and M2 phenotypic markers in isolated microglia after four-day binge alcohol exposure in male rats. *Alcohol*. 2017 Aug 1;62:29–40.

23. Mayfield J, Ferguson L, Harris RA. Neuroimmune signaling: A key component of alcohol abuse. Vol. 23, *Current Opinion in Neurobiology*. 2013. p. 513–20.
24. Coleman LG, Crews FT. Innate Immune Signaling and Alcohol Use Disorders. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer New York LLC; 2018. p. 369–96.
25. Doremus-Fitzwater TL, Gano A, Paniccia JE, Deak T. Male adolescent rats display blunted cytokine responses in the CNS after acute ethanol or lipopolysaccharide exposure. *Physiol Behav*. 2015 Sep 1;148:131–44.
26. Liu Y, Chen G, Ma C, Bower KA, Xu M, Fan Z, et al. Overexpression of glycogen synthase kinase 3 β sensitizes neuronal cells to ethanol toxicity. *J Neurosci Res*. 2009 Sep;87(12):2793–802.
27. Luo J. GSK3 β in ethanol neurotoxicity. Vol. 40, *Molecular Neurobiology*. Humana Press Inc.; 2009. p. 108–21.
28. Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, et al. Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *Journal of Neuroscience*. 2004 Nov 3;24(44):9993–10002.
29. Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, et al. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol*. 2005 Jul;7(7):665–74.
30. Ou XM, Lu D, Johnson C, Chen K, Youdim MBH, Rajkowska G, et al. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase-Monoamine Oxidase B-Mediated Cell Death-Induced by Ethanol is Prevented by Rasagiline and 1-R-Aminoindan. *Neurotox Res*. 2009 Aug;16(2):148–59.
31. Ou XM, Stockmeier CA, Meltzer HY, Overholser JC, Jurjus GJ, Dieter L, et al. A Novel Role for Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Monoamine Oxidase B Cascade in Ethanol-Induced Cellular Damage. *Biol Psychiatry*. 2010 May 1;67(9):855–63.
32. Yoon Han J, Joo Y, Sook Kim Y, Ki Lee Y, Joon Kim H, Jae Cho G, et al. Ethanol Induces Cell Death by Activating Caspase-3 in the Rat Cerebral Cortex. Vol. 20, *Mol. Cells*.
33. Johansson S, Ekström TJ, Marinova Z, Ökvist A, Sheedy D, Garrick T, et al. Dysregulation of cell death machinery in the prefrontal cortex of human alcoholics. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2009 Feb;12(1):109–15.
34. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: Not only cell death. Vol. 17, *Cell Death and Differentiation*. 2010. p. 1104–14.

35. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. MAMMALIAN CASPASES: STRUCTURE, ACTIVATION, SUBSTRATES, AND FUNCTIONS DURING APOPTOSIS [Internet]. 1999. Available from: www.annualreviews.org
36. Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis: Life and death decisions. Vol. 299, *Science*. 2003. p. 214–5.
37. Gilbert K, Godbout R, Rousseau G. Caspase-3 activity in the rat amygdala measured by spectrofluorometry after myocardial infarction. *Journal of Visualized Experiments*. 2016 Jan 12;2016(107).
38. Jarskog LF, Gilmore JH, Glantz LA, Gable KL, German TT, Tong RI, et al. Caspase-3 activation in rat frontal cortex following treatment with typical and atypical antipsychotics. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Jan 1;32(1):95–102.
39. Tang H, Wang Y, Xie L, Mao XO, Won SJ, Galvan V, et al. Effect of neural precursor proliferation level on neurogenesis in rat brain during aging and after focal ischemia. *Neurobiol Aging*. 2009 Feb;30(2):299–308.
40. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's [Internet]. Vol. 4, *International Journal of Preventive Medicine*. 2013. Available from: www.ijpm.ir
41. Kolb B, Gibb R. Plasticity in the prefrontal cortex of adult rats. *Front Cell Neurosci*. 2015 Feb 3;9(FEB).
42. Leonard CM. Finding prefrontal cortex in the rat. Vol. 1645, *Brain Research*. Elsevier B.V.; 2016. p. 1–3.
43. Bedwell SA, Billett EE, Crofts JJ, Tinsley CJ. The topology of connections between rat prefrontal, motor and sensory cortices. *Front Syst Neurosci*. 2014 Sep 17;8.
44. De Araujo EG, Da Silva GM, Dos Santos AA. Neuronal cell survival: The role of interleukins. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc.; 2009. p. 57–64.
45. Pfisterer U, Khodosevich K. Neuronal survival in the brain: Neuron type-specific mechanisms. Vol. 8, *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group; 2017.
46. Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M. Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Mol Med Rep*. 2013;8(4):1011–6.
47. Chen S Der, Wu CL, Hwang WC, Yang DI. More insight into BDNF against neurodegeneration: Anti-apoptosis, anti-oxidation, and suppression of

- autophagy. Vol. 18, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2017.
48. Li D, Ni S, Miao KS, Zhuang C. PI3K/Akt and caspase pathways mediate oxidative stress-induced chondrocyte apoptosis. *Cell Stress Chaperones*. 2019 Jan 1;24(1):195–202.
 49. Wu QJ, Zhang TN, Chen HH, Yu XF, Lv J Le, Liu YY, et al. The sirtuin family in health and disease. Vol. 7, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2022.
 50. Mormone E, Iorio EL, Abate L, Rodolfo C. Sirtuins and redox signaling interplay in neurogenesis, neurodegenerative diseases, and neural cell reprogramming. Vol. 17, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2023.
 51. Jęsko H, Wencel P, Strosznajder RP, Strosznajder JB. Sirtuins and Their Roles in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders. *Neurochem Res*. 2017 Mar 1;42(3):876–90.
 52. Napoleão A, Fernandes L, Miranda C, Marum AP. Effects of calorie restriction on health span and insulin resistance: classic calorie restriction diet vs. Ketosis-inducing diet. Vol. 13, *Nutrients*. MDPI AG; 2021.
 53. Bagherniya M, Butler AE, Barreto GE, Sahebkar A. The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature. Vol. 47, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. 183–97.
 54. Most J, Tosti V, Redman LM, Fontana L. Calorie restriction in humans: An update. Vol. 39, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2017. p. 36–45.
 55. Khanna A, Muthusamy S, Liang R, Sarojini H, Wang E. Gain of survival signaling by down-regulation of three key miRNAs in brain of calorie-restricted mice. *Aging*. 2011;3(3):223–36.
 56. Zullo A, Simone E, Grimaldi M, Musto V, Mancini FP. Sirtuins as mediator of the anti-ageing effects of calorie restriction in skeletal and cardiac muscle. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018.
 57. Silva De Carvalho T, Sanchez-Mendoza EH, Schultz Moreira AR, Nascentes Melo LM, Wang C, Sardari M, et al. Hypocaloric Diet Initiated Post-Ischemia Provides Long-Term Neuroprotection and Promotes Peri-Infarct Brain Remodeling by Regulating Metabolic and Survival-Promoting Proteins. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2021;58:1491–503. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02207-7>
 58. Cerqueira FM, Cunha FM, Laurindo FRM, Kowaltowski AJ. Calorie restriction increases cerebral mitochondrial respiratory capacity in a NO •-

- mediated mechanism: Impact on neuronal survival. *Free Radic Biol Med*. 2012 Apr 1;52(7):1236–41.
59. Ferreira-Marques M, Carvalho A, Cavadas C, Aveleira CA. PI3K/AKT/MTOR and ERK1/2-MAPK signaling pathways are involved in autophagy stimulation induced by caloric restriction or caloric restriction mimetics in cortical neurons. *Aging*. 2021;13(6):7872–82.
 60. Sandrow-Feinberg HR, Houlé JD. Exercise after spinal cord injury as an agent for neuroprotection, regeneration and rehabilitation. Vol. 1619, *Brain Research*. Elsevier B.V.; 2015. p. 12–21.
 61. Kim SH, Ko IG, Jin JJ, Hwang L, Yoon HS, Baek SS. Treadmill exercise ameliorates ethanol with lipopolysaccharide and carbon tetrachloride-mediated liver injury in mice. *J Exerc Rehabil*. 2022;18(1):28–33.
 62. Zhao JL, Jiang WT, Wang X, Cai ZD, Liu ZH, Liu GR. Exercise, brain plasticity, and depression. Vol. 26, *CNS Neuroscience and Therapeutics*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 885–95.
 63. Vangeison G, Carr D, Federoff HJ, Rempe DA. The good, the bad, and the cell type-specific roles of hypoxia inducible factor-1 α in neurons and astrocytes. *Journal of Neuroscience*. 2008 Feb 20;28(8):1988–93.
 64. Smeyne M, Sladen P, Jiao Y, Dragatsis I, Smeyne RJ. HIF1 α is necessary for exercise-induced neuroprotection while HIF2 α is needed for dopaminergic neuron survival in the substantia nigra pars compacta. *Neuroscience*. 2015 Jun 4;295:23–38.
 65. Barnes MJ. Alcohol: Impact on sports performance and recovery in male athletes. Vol. 44, *Sports Medicine*. Springer International Publishing; 2014. p. 909–19.
 66. Fitria L, Lukitowati F, Kristiawati D. NILAI RUJUKAN UNTUK EVALUASI FUNGSI HATI DAN GINJAL PADA TIKUS (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) GALUR WISTAR. *Jurnal Pendidikan Matematika dan IPA*. 2019 Jul 19;10(2):81.
 67. Hogan MC, Norton JN, Reynolds RP. Environmental Factors: Macroenvironment versus Microenvironment. In: *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing* 2nd edition [Internet]. 2nd Ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; [cited 2025 Mar 7]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500431/>
 68. Rejeki PS, Putri EAC, Prasetya RE. OVARIKTOMI PADA TIKUS DAN MENCIT. Pratiwi NL, editor. Surabaya: Airlangga University Press;

69. Otto GM, Franklin CL, Clifford CB. Chapter 4 - Biology and Diseases of Rats. In: *Laboratory Animal Medicine: Third Edition*. Elsevier Inc.; 2015. p. 151–207.
70. Leary SL. AVMA guidelines for the euthanasia of animals : 2020 edition. American Veterinary Medical Association; 2020. 121 p.
71. Shomer NH, Worthington KHA, Hickman DL, Jonnalagadda M, Newsome JT, Slate AR, et al. Review of rodent euthanasia methods. Vol. 59, *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. American Association for Laboratory Animal Science; 2020. p. 242–53.
72. Yoon Han J, Joo Y, Sook Kim Y, Ki Lee Y, Joon Kim H, Jae Cho G, et al. Ethanol Induces Cell Death by Activating Caspase-3 in the Rat Cerebral Cortex. *Mol Cells*. 2005;20(2):189–95.
73. Irfannuddin I, Santoso B, Hidayati Zein R, Faris Naufal A. The Effect of Aerobic Exercise and Caloric Restriction on Mice's Brain Tissue PGC-1 α Levels and Their Memory Abilities. In: *Journal of Physics: Conference Series*. Institute of Physics Publishing; 2019.
74. Irfannuddin I, Sarahdeaz SFP, Murti K, Santoso B, Koibuchi N. The effect of ketogenic diets on neurogenesis and apoptosis in the dentate gyrus of the male rat hippocampus. *Journal of Physiological Sciences*. 2021 Dec 1;71(1).
75. Abernathy K, Chandler LJ, Woodward JJ. Alcohol and the Prefrontal Cortex. In: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc.; 2010. p. 289–320.
76. Tajuddin NF, Przybycien-Szymanska MM, Pak TR, Neafsey EJ, Collins MA. Effect of repetitive daily ethanol intoxication on adult rat brain: Significant changes in phospholipase A2 enzyme levels in association with increased PARP-1 indicate neuroinflammatory pathway activation. *Alcohol*. 2013 Jan;47(1):39–45.
77. Dikranian K, Qin YQ, Labruyere J, Nemmers B, Olney JW. Ethanol-induced neuroapoptosis in the developing rodent cerebellum and related brain stem structures. *Developmental Brain Research*. 2005 Mar 22;155(1):1–13.
78. Martin B, Mattson MP, Maudsley S. Caloric restriction and intermittent fasting: Two potential diets for successful brain aging. Vol. 5, *Ageing Research Reviews*. 2006. p. 332–53.
79. Mayor E. Neurotrophic effects of intermittent fasting, calorie restriction and exercise: a review and annotated bibliography. Vol. 4, *Frontiers in Aging*. Frontiers Media S.A.; 2023.
80. Khalil H, Peltzer N, Walicki J, Yang JY, Dubuis G, Gardiol N, et al. Caspase-3 Protects Stressed Organs against Cell Death. *Mol Cell Biol*. 2012 Nov 1;32(22):4523–33.

81. Loncarevic-Vasiljkovic N, Pesic V, Todorovic S, Popic J, Smiljanic K, Milanovic D, et al. Caloric restriction suppresses microglial activation and prevents neuroapoptosis following cortical injury in rats. *PLoS One*. 2012;7(5).
82. Zhang L, Xu H, Ding N, Li X, Chen X, Chen Z. Beneficial Effects on Brain Micro-Environment by Caloric Restriction in Alleviating Neurodegenerative Diseases and Brain Aging. Vol. 12, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2021.