

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ALGA COKLAT (*Sargassum sp.*)  
TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$  PADA HEPAR TIKUS WISTAR DENGAN  
DIET ATEROGENIK**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

**Faizna Ikhsani Medisa Putri**

**NIM. 155070101111021**

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

## DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Gambar.....	xi
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Singkatan.....	xiii
Daftar Lampiran.....	xv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Luaran yang Diharapkan.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademik.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1 <i>Non Alcoholic Fatty Liver Disease</i> (NAFLD).....	6
2.1.1 Definisi.....	6
2.1.2 Patofisiologi.....	7
2.1.3 Manifestasi Klinis.....	9
2.1.4 Terapi.....	9
2.2 Diet Aterogenik.....	10

2.3	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-<math>\alpha</math>)</i> .....	12
2.3.1	Peran <i>Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-<math>\alpha</math>)</i> .....	12
2.3.2	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-<math>\alpha</math>)</i> pada <i>Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)</i> .....	13
2.4	<i>Sargassum sp</i> .....	15
2.4.1	Taksonomi <i>Sargassum sp</i> .....	15
2.4.2	Kandungan <i>Sargassum sp</i> .....	16
2.4.3	Efek Terapi <i>Sargassum sp</i> .....	17
	<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	18
3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	18
3.2	Deskripsi Kerangka Konsep.....	19
3.3	Hipotesis Penelitian .....	20
	<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b> .....	21
4.1	Desain Penelitian .....	21
4.2	Populasi dan Sampel Penelitian.....	21
4.2.1	Populasi.....	21
4.2.2	Sampel.....	21
4.2.2.1	Kriteria Inklusi.....	21
4.2.2.2	Kriteria Eksklusi.....	22
4.3	Tempat dan Waktu Penelitian .....	22
4.4	Variabel Penelitian .....	23
4.4.1	Variabel Bebas.....	23
4.4.2	Variabel Terikat.....	23
4.5	Definisi Operasional.....	23
4.6	Alat dan Bahan Penelitian.....	24
4.7	Prosedur Penelitian.....	25
4.7.1	Pembuatan Diet Aterogenik .....	25
4.7.2	Pembuatan Ekstrak <i>Sargassum sp</i> .....	26
4.7.3	Pemberian Ekstrak <i>Sargassum sp</i> .....	28
4.7.4	Pembedahan Tikus dan Pengambilan Organ Hepar.....	28
4.7.5	Pengecatan Ekspresi TNF- $\alpha$ dengan Imunohistokimia.....	29
4.7.6	Penghitungan Ekspresi TNF- $\alpha$ .....	30

4.8 Metode Pengumpulan dan Pengolahan Data.....	31
4.9 Jadwal Kegiatan .....	31
4.10 Alur Penelitian.....	32
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA .....</b>	<b>33</b>
5.1 Hasil Penelitian.....	33
5.2 Analisis Data.....	37
5.2.1 Uji Normalitas Data dan Uji Homogenitas.....	37
5.2.2 Uji <i>One-Way Anova</i> .....	38
5.2.3 Uji <i>Post-Hoc Tukey</i> .....	39
5.2.4 Hasil Uji Korelasi.....	40
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>41</b>
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian .....	43
6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran.....	46
6.3 Keterbatasan Penelitian.....	46
<b>BAB 7 PENUTUP .....</b>	<b>47</b>
7.1 Kesimpulan.....	47
7.2 Saran.....	47
Daftar Pustaka .....	48
Lampiran .....	54

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b> Patogenesis NAFLD Berdasarkan <i>3-hit Hypothesis</i> .....	8
<b>Gambar 2.2</b> <i>Sargassum sp</i> .....	15
<b>Gambar 3.1</b> Skema Kerangka Konsep Penelitian.....	18
<b>Gambar 4.1</b> Skema Alur Penelitian .....	32
<b>Gambar 5.1</b> Gambaran Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$ pada Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik, Kontrol Negatif .....	34
<b>Gambar 5.2</b> Gambaran Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$ pada Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik, Kontrol Positif .....	34
<b>Gambar 5.3</b> Gambaran Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$ pada Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik, Dosis 150mg/KgBB .....	34
<b>Gambar 5.4</b> Gambaran Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$ pada Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik, Dosis 300mg/KgBB .....	35
<b>Gambar 5.5</b> Gambaran Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$ pada Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik, Dosis 600mg/KgBB .....	35
<b>Gambar 5.6</b> Gambaran Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$ pada Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik, Pemberian Simvastatin 4mg/KgBB.....	35
<b>Gambar 5.7</b> Grafik Perbandingan Rerata Ekspresi TNF- $\alpha$ Hepar Tikus .....	36

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 4.1</b> Jadwal Kegiatan Penelitian.....	31
<b>Tabel 5.1</b> Rerata Ekspresi TNF- $\alpha$ Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik dengan Terapi Ekstrak <i>Sargassum sp.</i> Tiap Kelompok Perlakuan.....	36
<b>Tabel 5.2</b> Hasil Uji Normalitas TNF- $\alpha$ Hepar Tiap Kelompok Tikus Wistar Diet Aterogenik dengan Pemberian Ekstrak <i>Sargassum sp.</i> .....	38
<b>Tabel 5.3</b> Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> Ekspresi TNF- $\alpha$ Hepar Tiap Kelompok Tikus Diet Aterogenik dengan Pemberian Ekstrak <i>Sargassum sp.</i> .....	39
<b>Tabel 5.4</b> Hasil Uji Korelasi <i>Pearson</i> Ekspresi TNF- $\alpha$ Hepar Tiap Kelompok Tikus Diet Aterogenik dengan Pemberian Ekstrak <i>Sargassum sp.</i> .....	40



## DAFTAR SINGKATAN

ALT	: Aminotransferase
CRH	: corticotropin releasing hormon
DAB	: Diarninobenzidine
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	: Extracellular Signal-Regulated Kinase
FFA	: Free Fatty Acid
GH	: Growth Hormone
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hydrogen peroxide
HSC	: Hepatic Stellate Cell
IL-6	: Interleukin-6
IL-8	: Interleukin-8
IRS-1	: Insulin Receptor Substrate-1
IGF-1	: Insulin-Like Growth Factor 1
JNK	: c-Jun N-terminal kinases
LDL	: Low Density Lipoproteins
MCP-1	: Monocyte Chemoattractant Protein-1
MDA	: Malondialdehyd
Na-alginat	: Natrium Alginat
NAFLD	: Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH	: Non Alcoholic Steato Hepatitis
NF- $\kappa$ B	: Nuclear Factor- Kappa B
NK cell	: Natural Killer Cell
NO	: Nitric Oxide
oxLDL	: Oxidied Low-density Lipoprotein

PAI1 : *Plasminogen Activator Inhibitor 1*

PBS : *Phosphate Buffer Saline*

PGE<sub>2</sub> : *Prostaglandin E<sub>2</sub>*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

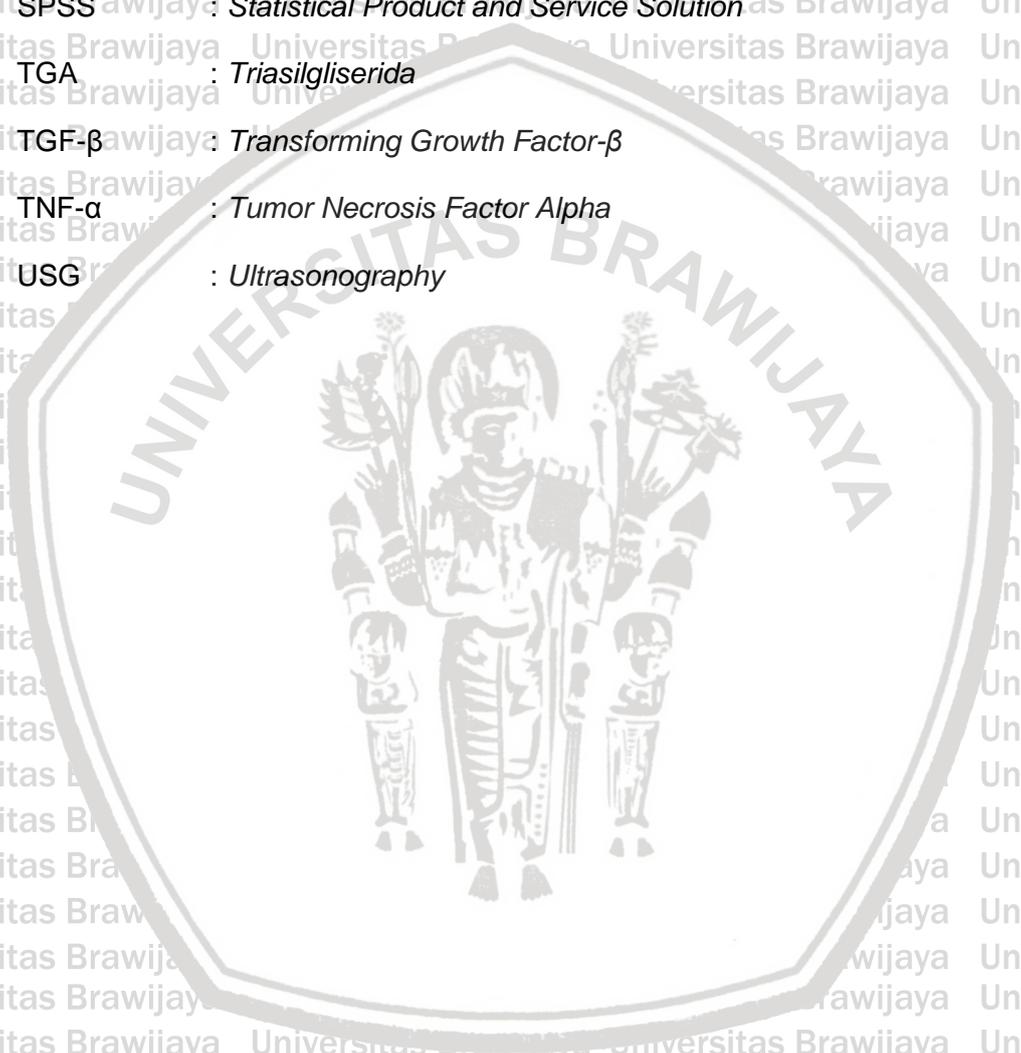
SPSS : *Statistical Product and Service Solution*

TGA : *Triasilgliserida*

TGF- $\beta$  : *Transforming Growth Factor- $\beta$*

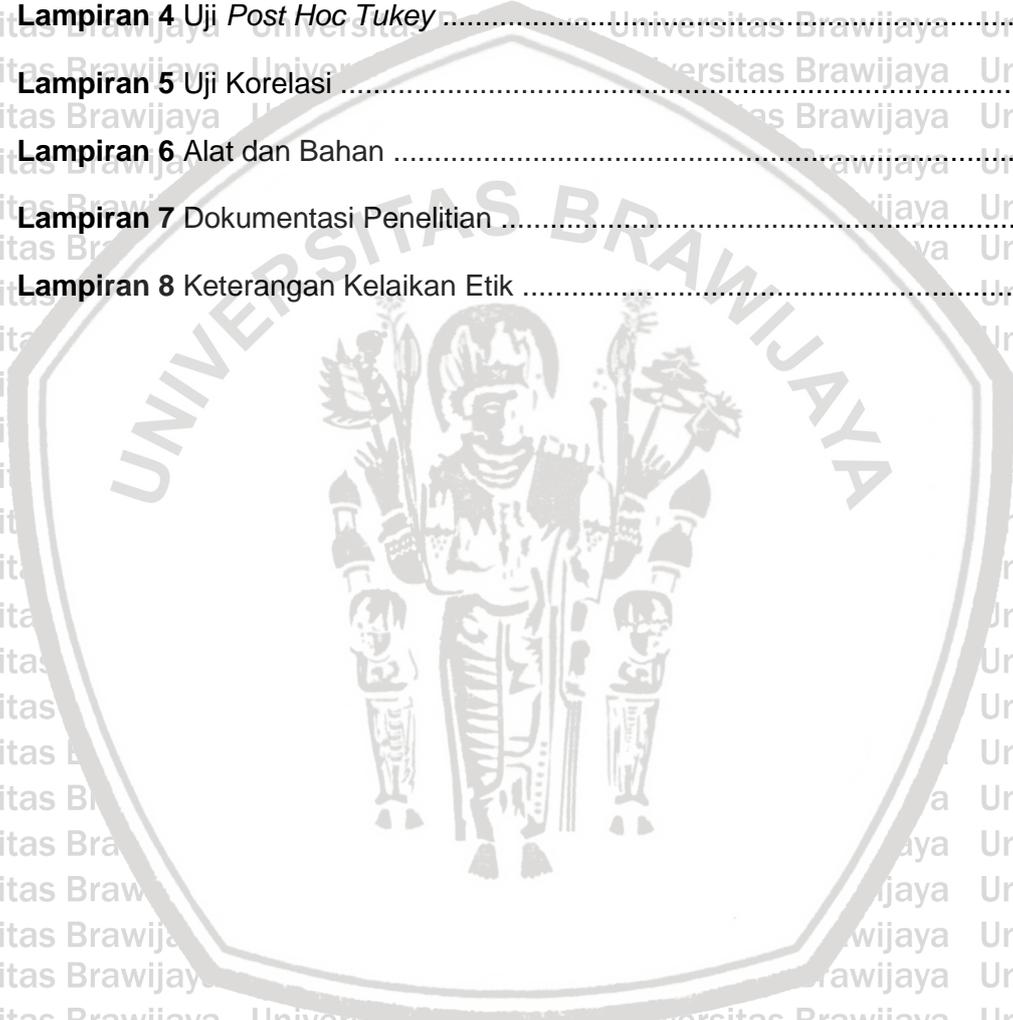
TNF- $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor Alpha*

USG : *Ultrasonography*



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Uji Normalitas .....	54
Lampiran 2 Uji Homogenitas .....	54
Lampiran 3 Uji <i>One-Way Anova</i> .....	54
Lampiran 4 Uji <i>Post Hoc Tukey</i> .....	55
Lampiran 5 Uji Korelasi .....	56
Lampiran 6 Alat dan Bahan .....	56
Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian .....	58
Lampiran 8 Keterangan Kelaikan Etik .....	59



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ALGA COKLAT (*Sargassum sp.*)  
TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$  PADA HEPAR TIKUS DENGAN  
DIET ATEROGENIK

Oleh :

Faizna Ikhsani Medisa Putri

NIM. 155070101111021

Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 28 Desember 2018

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

  
dr. Aina Angelina, Sp.PA

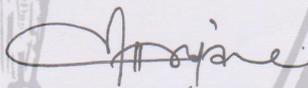
NIK. 2012088509032001

Pembimbing I/Penguji II

  
dr. Bayu Lestari, M.Biomed

NIP. 198602012010121004

Pembimbing II/Penguji III

  
dr. Elly Mayangsari, M.Biomed

NIP. 198405162009122005

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran

  
dr. Triwahjii Astuti, M.Kes, Sp.P(K)

NIP. 19631022199601200

## ABSTRAK

Putri, Faizna Ikhsani Medisa. 2018. **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ALGA COKLAT (*Sargassum sp.*) TERHADAP KADAR TNF- $\alpha$  PADA HEPAR TIKUS WISTAR DENGAN DIET ATEROGENIK.** Tugas Akhir Program Studi S1 Pendidikan dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Bayu Lestari, M.Biomed. (2) dr. Elly Mayangsari, M.Biomed.

Diet aterogenik memiliki risiko meningkatkan beberapa faktor metabolit tubuh, seperti menyebabkan resisten insulin di jaringan perifer maupun ketidakseimbangan profil lipid yang berakibat pada ketidaknormalan sintesis trigliserida. Bila trigliserida terakumulasi pada organ hepar, maka dapat menyebabkan terjadinya perlemakan hati, salah satunya *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD). Derajat keparahan NAFLD berkaitan dengan peningkatan kadar mediator inflamasi, salah satunya TNF- $\alpha$ . Alga (*Sargassum sp.*) mengandung beragam zat bioaktif, seperti fucoidan, flavonoid, triterpenoid, tannin, phlorotannin, dan polifenol, di mana dalam kandungannya ada yang mampu bersifat sebagai antioksidan, anti-inflamasi, anti-bakteri, dan anti-tumor. Penelitian ini menggunakan metode *randomized post test only controlled group design* yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) terhadap ekspresi kadar TNF- $\alpha$  hepar pada tikus wistar dengan diet aterogenik. Sampel yang digunakan berjumlah 30 ekor tikus wistar berjenis kelamin jantan dan dibagi menjadi enam kelompok, yaitu Kelompok Negatif (diet normal), Kelompok Positif (diet aterogenik), Kelompok Dosis Perlakuan 1, Dosis Perlakuan 2, dan Dosis Perlakuan 3 yang diinduksi diet aterogenik dan ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) dosis 150mg/kgBB, 300mg/kgBB, dan 600mg/kgBB, serta Kelompok Simvastatin yang diberi simvastatin dosis 4mg/kgBB mulai dari minggu ke-5 penelitian. Penelitian dilakukan selama 12 minggu dengan parameter mengacu pada ekspresi TNF- $\alpha$ . Pengukuran ekspresi TNF- $\alpha$  menggunakan imunohistokimia (IHK). Hasil uji statistik *One-Way Anova* didapatkan nilai  $p=0,000$  ( $p < 0,05$ ) yang berarti terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan. Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  hepar pada tikus wistar dengan diet aterogenik.

**Kata Kunci:** Alga coklat (*Sargassum sp.*), diet aterogenik, hepar, TNF- $\alpha$

## ABSTRACT

Putri, Faizna Ikhsani Medisa. 2018. **EFFECT OF ALGAE EXTRACTS (*Sargassum sp.*) ADMINISTRATION ON TNF- $\alpha$  LEVELS OF ATHEROGENIC DIET WISTAR RAT.** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Bayu Lestari, M.Biomed. (2) dr. Elly Mayangsari, M.Biomed

Atherogenic diets increase the risk of several metabolic disorders such as insulin resistance in peripheral tissues and imbalance of lipid profiles that cause abnormal triglyceride synthesis. As triglycerides accumulates in the liver, it can causes fatty liver, as seen in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The severity of NAFLD is associated with an elevation of inflammatory mediator level, including TNF- $\alpha$ . *Sargassum sp.* contains various bioactive substances, such as fucoidan, flavonoids, triterpenoids, tannins, phlorotannins, and polyphenols, which act as antioxidants, anti-inflammatory, anti-bacterial, and anti-tumor. This study was designed as a randomized post-test only controlled group aimed to investigate the effect of brown algae extract (*Sargassum sp.*) administration toward hepatic TNF- $\alpha$  expression in atherogenic diet Wistar rats. As many as 30 male Wistar rats were divided into six groups as follows: negative control (normal diet), positive control (atherogenic diet), treatment 1, 2, and 3 (atherogenic diet + brown algae extract (*Sargassum sp.*) dosage 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, and 600 mg/kgBB, respectively), and simvastatin (atherogenic diet + simvastatin dosage 4 mg/kgBB). Atherogenic diet was administered for 12 weeks and all treatments were started from the 5th week of the study. Measurement of TNF- $\alpha$  expression using immunohistochemistry (CPI). The results showed that there were treatment of *Sargassum sp.* extract attenuates the elevation of TNF- $\alpha$  expression caused by atherogenic diet ( $p < 0.05$ ) and this finding was not significantly different with simvastatin-treated group ( $p > 0.05$ ). We concluded that brown algae extract (*Sargassum sp.*) potential for reducing hepatic TNF- $\alpha$  expression in atherogenic diet Wistar rats.

**Keywords:** Brown algae (*Sargassum sp.*), atherogenic diet, hepar, TNF- $\alpha$

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

*Non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) atau penyakit perlemakan hati non alkoholik tergolong dalam penyakit gangguan hepar tidak menular yang paling umum ditemukan di dunia, diperkirakan prevalensi di negara-negara Barat sebanyak 20% - 30% dan 15% - 20% di Asia (Ashtari *et al.*, 2015). Sampai sekarang di Indonesia baru memiliki beberapa data prevalensi penderita NAFLD pada populasi umum, dengan prevalensi sekitar 30%. Penyakit ini berkorelasi dengan penyakit yang dimanifestasi klinis akibat pengaruh sindroma metabolik, seperti diabetes mellitus tipe 2, penyakit jantung koroner, gangguan ginjal, hiperlipidemia, dan sebagainya. Obesitas berperan juga sebagai faktor risiko akan NAFLD.

Adapun terkait patogenesis dari NAFLD bersifat multifaktorial. Dislipidemia yang berasal dari diet kolesterol tak terkontrol pada obesitas merupakan faktor penting dalam patogenesis dari NAFLD (Chatrath *et al.*, 2012). Akumulasi lemak pada sel-sel hepatosit menghambat kapasitas oksidatif dari mitokondria khususnya kompleks rantai transpor elektron sehingga terstimulasi jalur peroksisomal dan mikrosomal dalam oksidasi lemak dan terjadi peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) sebagai pencetus adanya stress oksidatif (Rolo *et al.*, 2012) yang merefleksikan ketidakseimbangan antara agen prooksidan dan antioksidan, baik enzimatik maupun non-enzimatik, hati tidak berhasil untuk mengurangi jejas yang terjadi pada sel hati maupun teraktivasi kaskade inflamasi dengan melibatkan berbagai macam sitokin.

Sitokin yang terlibat diantaranya adalah sitokin proinflamasi dan adipokin, derivat sitokin yang berasal dari sekresi primer sel adiposit. Adipokin tidak hanya mempengaruhi metabolisme lipid, tetapi juga proses inflamasi dan fibrosis (Marra dan Bertolani, 2009) diantaranya yaitu adiponektin, leptin, resistin, *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) dan adipokin lainnya. Sitokin TNF- $\alpha$  yang terlibat dalam NAFLD menyebabkan resistensi insulin di jaringan perifer dengan meningkatkan fosforilasi reseptor insulin dan inhibisi translokasi transporter glukosa (Plomgaard *et al.*, 2005). Selain itu, *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) juga memperantai terjadinya stress oksidatif. Peningkatan lanjut TNF- $\alpha$  penderita NAFLD maupun NASH pada serum dan jaringan hati dapat menyebabkan fibrosis hatinya. Fibrosis hati dapat ditandai dengan adanya aktivasi dari *hepatic stellate cell* (HSC) disertai sintesis kolagen yang tidak seimbang dan diperantarai oleh peningkatan ekspresi proinflamasi yang akan menyebabkan terjadinya fibrosis hepar. Hingga saat ini belum ada terapi yang efektif dalam menghambat fibrosis hepar, sehingga fibrosis dapat berkembang secara progresif menjadi sirosis kemudian menyebabkan kegagalan hati hingga menyebabkan kematian (Karadeniz *et al.*, 2008). Berbagai upaya terapi digunakan sebagai tatalaksana penyakit ini, baik secara farmakologi maupun non-farmakologi. Hingga saat ini, penggunaan terapi farmakologi guna pengobatan dislipidemia dilakukan dengan pemberian simvastatin. Namun, penggunaan simvastatin memiliki beragam dampak efek samping, sehingga perlu adanya terapi alternatif lain yang efektif dalam pengobatan dislipidemia.

Indonesia merupakan negara kepulauan yang memiliki keanekaragaman jenis rumput laut yang sangat tinggi. Salah satu jenis alga yang banyak terdapat di Indonesia adalah jenis alga coklat seperti *Sargassum sp* (Putri, 2011). Studi

telah menunjukkan potensi berbagai jenis senyawa yang berasal dari alga dapat berfungsi sebagai agen anti obesitas (Chater *et al.*, 2015). *Sargassum sp.* memiliki banyak komponen bioaktif dengan spektrum aktivitas biologi yang luas sebagai antioksidan, anti bakteri, dan antitumor (Palanisamy *et al.*, 2017). Salah satu senyawa dalam *Sargassum sp.* adalah fucoidan, suatu polisakarida tinggi sulfat yang umumnya ditemukan pada matriks ekstraseluler alga coklat. Studi pada hewan coba menunjukkan fucoidan dapat menurunkan akumulasi lipid dan spesies oksigen reaktif di sel adiposit (Park *et al.*, 2011), mensupresi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , MCP-1 dan *plasminogen activator inhibitor* (PAI1) pada adiposit 3T3-L1 (Kim *et al.*, 2008), dan menurunkan kadar kolesterol, trigliserida, serta kolesterol LDL dalam darah tikus model obesitas (Cuong *et al.*, 2014). Selain itu, fucoidan dapat meningkatkan mobilisasi HSC pada area tubuh yang mengalami kerusakan jaringan dengan menurunkan ekspresi *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), menurunkan kadar MDA, dan meningkatkan aktivitas *neutrophil elastase* (Petit, 2002; Jensen, 2007). Fucoidan memiliki kemampuan sebagai anti inflamasi dengan menghambat produksi *nitric oxide* (NO) dan prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Fucoidan bersifat anti inflamasi dengan menghambat aktivasi *nuclear faktor-kappa B* (NF- $\kappa$ B), menurunkan regulasi dari *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *c-Jun N-terminal kinase* (Park *et al.*, 2011).

Oleh karena itu, penting untuk mengetahui efek pemberian ekstrak *Sargassum sp.* dalam menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  hepar yang merupakan pencetus terjadinya fibrosis pada hepar sebagai pengembangan terapi alternatif lain bagi penderita NAFLD.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada hepar tikus wistar dengan diet aterogenik?

## 1.3 Tujuan

### 1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan pengaruh ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) terhadap penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  pada hepar tikus wistar yang diberi diet aterogenik.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh dosis ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) dalam menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  hepar pada tikus yang diberi diet aterogenik.
2. Mengetahui korelasi dosis ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  hepar pada tikus yang diberi diet aterogenik.

## 1.4 Luaran yang Diharapkan

1. Pengembangan metode pengobatan perlemakan hati non alkoholik yang efektif dengan menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada inflamasi hepar akibat diet aterogenik.
2. Peluang publikasi dalam jurnal-jurnal ilmiah dan mendapatkan paten tentang produksi anti fibrosis pada penyakit perlemakan hati non alkoholik.

## 1.5 Manfaat Penelitian

### 1.5.1 Manfaat Akademik

1. Peneliti mendapatkan pengalaman dan pembelajaran dalam pengembangan suatu ide penelitian yang bermanfaat bagi pengembangan profesi.
2. Menambah literatur ilmu pengetahuan mengenai potensi ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) sebagai antiinflamasi.
3. Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk menambah wawasan ilmu pengetahuan sekaligus sebagai dasar untuk pengembangan penelitian selanjutnya dalam bidang kesehatan, khususnya tentang pengaruh penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  hepar pada penyakit perlemakan hati non alkoholik maupun penyakit hati lain menggunakan ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*).

### 1.3.1 Manfaat Praktis

1. Dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan untuk inovasi menciptakan produk kesehatan baru dalam terapi pencegahan perlemakan hati non alkoholik melalui pengaruh ekspresi TNF- $\alpha$  hepar menggunakan ekstrak *Sargassum sp.*
2. Memberi kontribusi dalam upaya pencegahan, sehingga menurunkan angka kematian akibat kejadian penyakit kasus perlemakan hati.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Non Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD)

Menurut *World Gastroenterology Organisation*, NAFLD menjadi penyebab utama penyakit hati di negara-negara Barat selama beberapa dekade terakhir ini.

Sebenarnya prevalensi NAFLD di negara-negara Asia lebih rendah dibandingkan di negara barat, namun akhir-akhir ini menjadi meningkat dikarenakan peningkatan insiden dari faktor risiko NAFLD. Prevalensi di negara-negara Barat sebanyak 20-30% sedangkan di Asia mencapai angka 15-30% (Asthari *et al.*, 2015). Angka tersebut meningkat seiring dengan meningkatnya angka obesitas.

Selain itu, terdapat juga peningkatan kejadian NAFLD hingga 70-90% pada penderita diabetes mellitus tipe 2 (Ajmal *et al.*, 2014). Di Indonesia sendiri memiliki prevalensi NAFLD pada tahun 2007 sebesar 30%. Faktor risiko NAFLD berkaitan dengan gangguan metabolik antara lain obesitas, diabetes mellitus tipe 2, dan dislipidemia (Chalasan *et al.*, 2012).

##### 2.1.1 Definisi

Menurut *American Association for the Study of Liver Disease* (AASLD), NAFLD merupakan penyakit yang ditandai dengan beberapa syarat yaitu:

adanya bukti terdapat *steatosis hepatic* (akumulasi lemak dalam sel hepatosit) dan tidak adanya penyebab sekunder akumulasi lemak pada hati seperti konsumsi alkohol, penggunaan obat-obat bersifat steatogenik, maupun kelainan herediter. Sebagian populasi penderita NAFLD, sekitar 20-30%, berkembang menjadi *nonalcoholic steatohepatitis* (NASH) yang kemudian

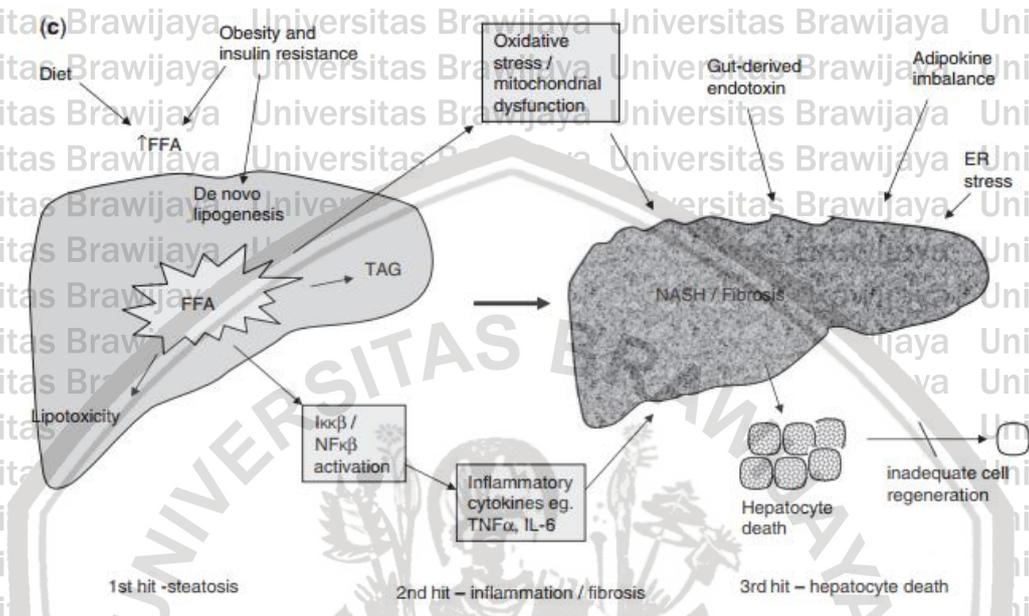
secara progresif menjadi fibrosis hati, sirosis hingga karsinoma hepar. NASH adalah 20% penyebab sirosis kriptogenik (Dyson *et al.*, 2014).

### 2.1.2 Patofisiologi

Hepar merupakan pusat regulasi terjadinya proses lipogenesis, glukoneogenesis, dan metabolisme. Kadar lipid dan glukosa dalam hepar sangat berkorelasi satu sama lain terkait patogenesis suatu kelainan di hepar dan memiliki peran yang signifikan pada induksi inflamasi, proliferasi, dan jalur signaling apoptosis pada hepar (Bechmann *et al.*, 2012). Teori pada umumnya menyatakan bahwa sindrom metabolik sangat erat kaitannya dengan NAFLD dan terlibat dalam progresivitas *steatosis* menjadi *steatohepatitis*. Awalan yang cukup sering terjadinya NAFLD ditandai dengan adanya akumulasi lemak, yaitu trigliserida di hepar di mana berasal dari asam lemak bebas (berasal dari hidrolisis trigliserida, sumber diet, dan *de novo lipogenesis*) dan gliserol di dalam sel hepatosit. Selain disebabkan oleh resistensi insulin juga dapat disebabkan oleh dislipidemia, aterogenik, hipertensi, dan stase hepar yang proinflamasi maupun protrombotik (Koek *et al.*, 2011).

Patofisiologi terjadinya NAFLD bersifat kompleks dan multifaktorial. Teori awal tentang patogenesis NAFLD oleh *2-hit hypothesis* di mana *first hit* adalah akumulasi trigliserida di hepar atau *steatosis* dan *second hit* adalah meningkatnya kecenderungan kerusakan hepar oleh sitokin inflamasi, disfungsi mitokondria, dan stres oksidatif yang mengarah ke *Non Alcoholic Steatohepatitis* (NASH) atau fibrosis (Aditya dan Lesmana, 2013). Setelah itu, teori tersebut berkembang dengan adanya *third hit* yaitu stres oksidatif

menekan hepatosit matur untuk berproliferasi yang akan menyebabkan sirosis yang irreversible (Dowman *et al.*, 2010).



Gambar 2.1 Patogenesis NAFLD Berdasarkan 3-hit Hypothesis (Dowman *et al.*, 2010)

NAFLD merupakan penyakit hati yang ditunjukkan dari adanya *hepatic stellate cell* (HSC). Aktivasi HSC dan inisiasi dari sintesis kolagen yang tidak seimbang akan menyebabkan terjadinya liver fibrosis. Pada NAFLD terjadi akumulasi dari sel inflamasi yang terdiri dari peningkatan TNF-α, IL-6, peningkatan leptin, dan osteopontin pada jaringan hati yang akan menyebabkan insulin resisten (Dowman *et al.*, 2010). Diet tinggi lemak yang akan menyebabkan obesitas dan penumpukkan dari oxLDL berperan dalam regulasi imun inflamasi pada NAFLD dan jika terjadi akumulasi akan menyebabkan fibrosis hati. Sehingga fibrosis hati akan berkembang secara progresif menjadi sirosis yang akan menyebabkan kegagalan hati hingga menyebabkan kematian (Karadeniz *et al.*, 2008).

### 2.1.3 Manifestasi Klinis

NAFLD biasanya bersifat asimtomatik. Penegakan diagnosis diraih bila pada pemeriksaan fisik maupun pemeriksaan laboratorium terdapat tanda-tanda abnormalitas, misalnya peningkatan kadar aminotransferase (ALT).

Keluhan yang menyertai dapat berupa nyeri kuadran kanan atas, hepatomegali, atau penampang hepar yang abnormal saat dilakukan prosedur operasi abdomen. Selain itu, beberapa juga mengalami gejala khas pada penyakit liver kronis seperti *spider angiomata*, *palmar erythema*, splenomegali. Sebagian kecil dijumpai *jaundice* dan *acites* (Longo, 2012).

### 2.1.4 Terapi

Tujuan terapi NAFLD untuk mencegah progresivitas kerusakan hepar menuju tahap NASH atau sirosis (Croke dan Sampson, 2012). Beragam strategi terapi digunakan sebagai tatalaksana pasien NAFLD, baik melalui perubahan pola gaya hidup sehat dengan melakukan aktivitas fisik, memperbaiki komponen dari sindroma metabolik, farmakoterapi yang ditujukan untuk pasien berisiko tinggi, dan mengatasi komplikasi sirosis.

Intervensi farmakologis untuk terapi NAFLD antara lain *insulin sensitizer*, *lipid-lowering agent*, dan antioksidan (Ahmed *et al.*, 2015). Simvastatin yang termasuk dalam *lipid-lowering agent* bekerja dengan cara menghambat sintesis kolesterol dengan menghambat enzim *HMG-coA-reduktase* yang berperan dalam sintesis kolesterol sehingga LDL yang beredar pun berkurang (Farinde, 2016). Selain menghambat kolesterol, simvastatin dapat menghambat produksi radikal bebas dari leukosit melalui penghambatan

enzim *NADHP* oksidase sehingga peroksidasi lipid terhambat (Parizadeh *et al.*, 2011).

Studi terkait antioksidan dan agen sitoprotektif sebagai agen terapeutik pada NAFLD telah dilakukan dengan kaitannya peroksidasi lipid dan aktivitas radikal bebas sebagai mediator kunci pada progresivitas penyakit NAFLD.

Antioksidan untuk terapi NAFLD, telah dilakukan uji terhadap vitamin E, betaine, *n*-asetil sistein, probucol dan vitamin C. Antioksidan memiliki peran untuk menghambat ROS dari suatu penyakit liver yang kronis melalui mekanisme kimiawi. Mekanisme antioksidan untuk mengontrol pembentukan ROS didapatkan dari diet yang kemudian diformasi secara endogen (Koek *et al.*, 2011).

## 2.2 Diet Aterogenik

Proses metabolisme lemak di dalam tubuh telah diatur keseimbangannya dengan beragam mekanisme baik sintesis maupun oksidasi. Keseimbangan ini bisa terganggu bila terjadi penambahan berlebih *intake* lemak, seperti diet tinggi lemak atau diet aterogenik. Jumlah lemak tersebut tidak langsung digunakan untuk metabolisme, namun disimpan di jaringan dalam bentuk trigliserida.

Kelebihan lemak dalam bentuk trigliserida pada jaringan inilah yang menyebabkan terjadinya peningkatan berat badan. Selain itu, diet tinggi lemak dapat menyebabkan perubahan metabolik seperti *hyperphagia* (nafsu makan berlebih), berkurangnya lipolisis, berkurangnya sekresi dan sensitivitas leptin, apoptosis neuron hipotalamus, gangguan metabolisme mitokondria, resistensi insulin, dan obesitas (Coelho *et al.*, 2011). Perubahan metabolik tersebut berperan dalam patogenesis NAFLD, NASH, dan sirosis irreversibel. Adapun

penelitian yang dilakukan Carmiel-Haggai *et al.* (2005) menunjukkan bahwa diet tinggi lemak dapat menyebabkan perkembangan NASH menjadi fibrosis, sehingga diet tinggi lemak banyak digunakan untuk model steatosis hepar dan NASH pada hewan percobaan. Namun, pada tikus yang diberi diet tinggi lemak, hasil yang diberikan bisa bervariasi tergantung dari derajat keparahan steatosis, inflamasi, fibrosis, komposisi lemak yang digunakan, serta durasi perlakuan.

Berdasarkan studi yang menggunakan hewan coba model aterogenik atau tinggi lemak, komposisi diet yang digunakan untuk menginduksi kondisi hiperkolesterolemia adalah pemberian pakan yang terdiri atas makanan standar, terigu, kolesterol, asam kolat, minyak babi, dan air. Pemakaian kolesterol, minyak babi dan asam kolat digunakan untuk menginduksi peningkatan *low density lipid* (LDL) darah. Kandungan kolesterol dalam minyak babi lebih tinggi dibandingkan dengan minyak hewani lainnya dan minyak nabati. Asam kolat (*cholic acid*) diperlukan untuk mengubah gambaran lipoprotein agar menjadi lebih aterogenik dengan menurunkan kadar *high density lipid* (HDL) dan meningkatkan kadar LDL dalam plasma. Asam kolat diduga dapat menurunkan kadar HDL melalui aktivasi reseptor B1 (SR-B1) yang meningkatkan ambilan *HDL-cholesteryl ester* (HDL-CE) ke sel parenkim hepar (Srivastava *et al.*, 2000).

Diet tinggi lemak berpengaruh pada metabolisme lemak dalam hepar, sebab memiliki korelasi akan peningkatan kadar asam lemak bebas dalam plasma yang terjadi akibat dari mobilisasi lemak dari jaringan adiposa. Peningkatan asam lemak bebas yang masuk ke dalam hepar diikuti dengan peningkatan trigliserida di dalam hepar. Semakin tinggi konsumsi lemak maka semakin tinggi pula sintesa triasil gliserol di hepar dan semakin tinggi kadar

trigliserida dalam darah. Asam lemak bebas yang diambil dan disintesis dalam hepar tidak seluruhnya mengalami oksidasi di mitokondria namun sebagian besar diesterifikasi menjadi trigliserida yang kemudian terakumulasi dalam sitoplasma sel-sel hepatosit di hepar. Hal ini kemudian juga memicu adanya stres oksidatif yang mempengaruhi peroksidasi lipid sehingga dapat menimbulkan gangguan fungsi dan integritas sel hepar (Li *et al.*, 2015). Oleh karena itu, diet tinggi lemak atau diet atherogenik akan memicu terjadinya suatu kondisi hiperkolesterolemia yang berdampak pada hepar sebagai perlemakan hepar.

### **2.3 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ )**

Sitokin adalah molekul yang dihasilkan oleh berbagai jenis sel di tubuh, khususnya di sel hepar, bersifat mudah larut dan berperan dalam komunikasi interseluler (Montecucco dan Mach, 2008). *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) merupakan salah satu sitokin yang dapat menginduksi terjadinya kematian pada sel target sehingga memiliki peran dalam berbagai kondisi yang melibatkan proses inflamasi (sebagai mediator inflamasi atau proinflamasi). Produksi TNF- $\alpha$  utamanya dihasilkan oleh makrofag, dan beberapa sel lain seperti limfosit CD4+, *NK cell*, neutrofil, *mast cell*, jaringan adiposa, miosit jantung, eosinofil dan neuron. Respon terhadap produk bakteri seperti lipopolisakarida menyebabkan produksi TNF- $\alpha$  dalam jumlah besar.

#### **2.3.1 Peran Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ )**

TNF- $\alpha$  memiliki fungsi biologis pada beberapa organ bersamaan dengan sekresi interleukin-1 (IL-1) dan interleukin-6 (IL-6). Sekresi TNF- $\alpha$  pada hipotalamus menyebabkan stimulasi pelepasan *corticotropin releasing*

*hormon* (CRH), mensupresi nafsu makan, dan terlibat dalam proses demam. Pada organ hepar, sitokin ini berperan dalam proses inflamasi sistemik yaitu berperan dalam menghasilkan *acute phase protein* (*C-reactive protein*), untuk opsonisasi komplemen serta menginduksi resistensi insulin dengan fosforilasi serin reseptor insulin, *insulin receptor substrate* (*IRS-1*) yang mengganggu *signaling* insulin. TNF- $\alpha$  mengatur respon inflamasi dengan meregulasi TNF *signaling*. Pengikatan TNF reseptor dapat mengaktifkan suatu kaskade apoptosis ketika reseptor asosiasi dengan reseptor terkait domain kematian TNF- $\alpha$  TRADD, aktivasi jalur NF- $\kappa$ B yang mengakibatkan aktivasi gen, aktivasi JNK jalur mengarah pada kelangsungan hidup sel dengan mengatur c-Jun dan kematian sel dengan peraturan c-myc dan aktivitas p53. Peningkatan TNF- $\alpha$  secara lokal juga dapat menyebabkan terjadinya tanda-tanda kardinal inflamasi; panas, pembengkakan (*swelling*), kemerahan (*redness*), dan hilangnya fungsi (*functio laesa*). TNF- $\alpha$  merupakan kemoatraktan pada neutrofil melalui ekspresi molekul adhesi pada sel endotel untuk membantu migrasi neutrofil. Sekresi TNF- $\alpha$  pada makrofag menstimulasi fagositosis, produksi oksidan IL-1, dan prostaglandin (Abbas et al., 2012).

### **2.3.2 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) pada Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)**

*Tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) berperan dalam patogenesis NAFLD. Pada sel-sel hati, tempat diproduksi biomarker inflamasi dan disfungsi endotel, studi menunjukkan bahwa TNF- $\alpha$  terlibat dalam patogenesis terjadinya jejas pada hati dengan menginduksi kematian sel-sel hati sehingga mencetuskan terjadinya inflamasi dan resistensi insulin (Schwabe, 2006).

TNF- $\alpha$  juga berasosiasi dengan adanya resistensi insulin dan berperan sebagai penanda adanya progresivitas keparahan NAFLD. TNF- $\alpha$  terlibat dalam resistensi insulin di jaringan perifer dengan peningkatan fosforilasi reseptor insulin dan inhibisi translokasi transporter glukosa. Selain itu, TNF- $\alpha$  menstimulasi hormon sensitif lipase yang meningkatkan kadar serum asam lemak bebas (FFA) dan menyebabkan proses *influx* lipid ke hepar. Akumulasi lipid pada hepar juga mencetuskan aktivasi *nuclear factor-kappaB* (NF- $\kappa$ B) di sel hepatosit yang dapat meningkatkan ekspresi gen yang bersifat proinflamasi dalam hal ini adalah TNF- $\alpha$ . Berhubungan dengan stress oksidatif, formasi spesies oksigen reaktif (ROS) terjadi oleh karena adanya TNF- $\alpha$  sehingga terjadi apoptosis pada sel hepar (Kodama *et al.*, 2009). Asam lemak jenuh dapat menginduksi terjadinya peningkatan produksi TNF- $\alpha$  di sel hepatosit secara *in vitro*. Kerusakan pada sel hati dan adanya peroksidasi lemak menimbulkan respon inflamasi dengan adanya peningkatan regulasi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6 dan IL-1 yang berperan untuk mengarahkan sel-sel leukosit polimorfonuklear dan mononuklear menuju yang mengalami inflamasi (Koek *et al.*, 2011).

Penderita NAFLD dan atau NASH menunjukkan kadar TNF- $\alpha$  yang meningkat pada serum (Manco *et al.*, 2007; Jarrar *et al.*, 2007; Das dan Balakrishnan, 2011) dan jaringan hati (Crespo *et al.*, 2001). Hal ini dibuktikan pada hewan coba NAFLD yang diinduksi dengan diet tinggi lemak menunjukkan peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada serum dan jaringan adiposa (Tan *et al.*, 2015).

## 2.4 *Sargassum* sp.

Rumput laut merupakan salah satu sumber daya hayati berupa makroalga yang hidup di laut maupun di air payau. Berdasarkan identifikasi penelitian terdapat sekitar 555 jenis rumput laut yang tumbuh di perairan Indonesia. Salah satu jenis alga yang banyak terdapat di Indonesia adalah jenis alga coklat (Putri, 2011).

*Sargassum* didominasi oleh warna coklat dengan bentuk talus silindris. Tubuh utama bersifat diploid atau merupakan sporofit dengan talus yang mempunyai cabang yang menyerupai tumbuhan *angiospermae*. Rumput laut jenis ini memiliki penampakan bentuk agak gepeng, licin, dan batang utama agak kasar. Adapun untuk *Sargassum polycystum* memiliki *air badder* yang berfungsi mengapung jika terendam air pada saat air di daerah intertidal pasang, kemudian juga sebagai cadangan air saat terhempas ke tepi pantai (Sulisetijono, 2009).

### 2.4.1 Taksonomi *Sargassum* sp.

Berikut adalah klasifikasi *Sargassum* sp. (Guiry, 2014):

Kingdom : *Chromista*  
 Divisio : *Phaeophyta*  
 Class : *Phaeophyceae*  
 Ordo : *Fucales*  
 Family : *Sargassaceae*  
 Genus : *Sargassum*  
 Spesies : *Sargassum* sp.



Gambar 2.2 *Sargassum* sp. (Guiry, 2014)

#### 2.4.2 Kandungan *Sargassum sp.*

*Sargassum sp.* mengandung natrium alginat (Na-alginat), laminarin, fucoidan, selulosa, manitol dan mengandung antioksidan (polifenol), zat besi, iodium, vitamin C dan mineral seperti Ca, K, Mg, Na, Fe, Cu, Zn, S, P, Mn serta mineral-mineral lainnya. Kandungan gizi per 2 gram bubuk kering

*Sargassum sp.* adalah karbohidrat 17,835 %, protein 0,776 %, dan polifenol 24,58 % (491,5 mg). Selain itu, *Sargassum sp.* juga mengandung senyawa fitokimia seperti flavanoid, triterpenoid, tanin dan saponin yang dipercaya dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengobatan herbal (Putri, 2011).

Kemampuan *Sargassum sp.* sebagai obat berhubungan dengan bidang farmakologi disebabkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan *bioactive substances* yang dikembangkan melalui berbagai penelitian untuk dijadikan obat alternatif, misalnya fucoidan.

Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui dari banyaknya jenis *Sargassum sp.* yang ada di Indonesia, *Sargassum polycystum* merupakan alga coklat yang memiliki kandungan fucoidan paling banyak (Sugiono *et al.*, 2014). Fucoidan dapat diekstraksi dari *Sargassum sp.* menggunakan metode *ultrasonic filtration*, kombinasi metode ekstraksi menggunakan degradasi melalui gelombang ultrasonic diikuti pemanasan menggunakan *waterbath* (Sugiono *et al.*, 2014).

Studi pada hewan coba menunjukkan fucoidan dapat menurunkan akumulasi lipid dan spesies oksigen reaktif di sel adiposit (Park *et al.*, 2011), mensupresi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , MCP-1 dan *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI1) pada adiposit 3T3-L1 (Kim *et al.*, 2008), dan

menurunkan kadar kolesterol, trigliserida dan kolesterol LDL dalam darah tikus model obesitas (Cuong *et al.*, 2014).

#### 2.4.3 Efek Terapi *Sargassum sp.*

Senyawa fucoidan yang terdapat pada *Sargassum sp.* merupakan salah satu jenis polisakarida sulfat yang strukturnya terdiri dari *L-fucose* dan *sulfate ester*. Fucoidan banyak terkandung dalam ganggang coklat yang telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional China. Dari berbagai penelitian, diketahui bahwa fucoidan memiliki banyak manfaat di bidang kedokteran, diantaranya adalah sebagai antiinflamasi, antioksidan, antitumor, imunomodulator, dan banyak pula digunakan sebagai bahan suplemen makanan (Teng *et al.*, 2015).

Fucoidan memiliki kemampuan sebagai anti inflamasi dengan menghambat produksi *nitric oxide* (NO) dan prostaglandin  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>). Fucoidan juga mampu mengurangi ekspresi dari *cyclooxygenase-2* (COX-2), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), dan sitokin pro-inflamasi, diantaranya interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) dan *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ). Lebih lanjutnya, fucoidan bersifat anti inflamasi dengan menghambat aktivasi dari *nuclear faktor-kappa B* (NF- $\kappa$ B), menurunkan regulasi dari *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *c-Jun N-terminal kinase* (Park *et al.*, 2011). Pada penelitian lain dengan menggunakan *zebrafish*, fucoidan juga menunjukkan potensi sebagai anti inflamasi (Lee *et al.*, 2013). Dengan demikian, fucoidan berpotensi sebagai substansi terapi pada penyakit-penyakit dengan inflamasi (Park *et al.*, 2011).



### 3.2 Deskripsi Kerangka Konsep

Diet aterogenik atau disebut diet tinggi lemak memiliki risiko meningkatkan beberapa faktor metabolit tubuh, seperti menyebabkan resisten insulin di jaringan perifer maupun ketidakseimbangan profil lipid yang keduanya bisa berakibat pada ketidaknormalan sintesis trigliserida sehingga kadarnya meningkat. Bila terdapat akumulasi lipid pada organ hepar, maka ketidakresponsifan sel hepar terhadap insulin bisa saja terjadi.

Pada kejadian resistensi insulin ini akan berpengaruh meningkatkan sintesis dan transpor trigliserida menuju hati, selain itu terjadi lipolisis yang menjadi stimulus kadar *free fatty acid* pada hati meninggi. Akumulasi lemak pada sel-sel hepatosit menghambat kapasitas oksidatif dari mitokondria khususnya kompleks rantai transpor elektron sehingga terstimulasi jalur peroksisomal dan mikrosomal dalam oksidasi lemak dan terjadi peningkatan spesies oksigen reaktif sebagai pencetus adanya stress oksidatif (Rolo *et al.*, 2013).

Stress oksidatif merefleksikan ketidakseimbangan antara agen prooksidan dan antioksidan dengan adanya peningkatan spesies oksigen reaktif.

Berkurangnya kapasitas antioksidan, baik enzimatis maupun non-enzimatis, menyebabkan ketidakberhasilan hati untuk mengurangi jejas yang terjadi pada sel hati. Ketidakseimbangan tersebut juga menyebabkan teraktivasinya

kaskade inflamasi dengan melibatkan berbagai macam sitokin (Bian dan Ma, 2012). Ada beragam sitokin yang berperan dalam proses ini, seperti

Interleukin, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , dan sebagainya. TNF- $\alpha$  merupakan salah satu sitokin yang dapat menginduksi terjadinya kematian pada sel target sehingga memiliki peran dalam berbagai kondisi yang melibatkan proses inflamasi.

NAFLD (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) merupakan penyakit hati akibat adanya akumulasi lemak yang bukan karena pengaruh efek konsumsi alkohol dan ditunjukkan dari adanya *hepatic stellate cell* (HSC). Semakin lama diberikan diet aterogenik, maka kadar TNF- $\alpha$  akan semakin meningkat, karena TNF- $\alpha$  di dalam sel hepar mengalami penurunan mobilisasi HSC akibat sel hepatosit yang terus mengalami apoptosis. Apabila hal ini berlanjut bisa terjadi fibrosis jaringan dan terus berprogres terjadi gangguan fungsi hepar, gagal hati, bahkan kematian. Di dalam *Sargassum sp.* memiliki kandungan zat aktif salah satunya yaitu fucoidan yang diharapkan mampu meningkatkan mobilisasi HSC dengan memengaruhi kadar TNF- $\alpha$ . Terjadinya penurunan kadar TNF- $\alpha$  akan menurunkan lesi akibat NAFLD yang menyebabkan gangguan fungsi hati.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada hepar tikus wistar dengan diet aterogenik.
2. Dosis ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) berkorelasi negatif terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada hepar tikus wistar dengan diet aterogenik.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan rancangan *Randomized Post Test*

*Only Controlled Group Design* dengan subjek penelitian menggunakan tikus Wistar. Organ hepar diambil untuk dilakukan pemeriksaan imunohistokimia.

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan berusia 8 Minggu.

##### 4.2.2 Sampel

Untuk sampel hewan coba adalah tikus jenis Wistar dengan mengacu pada kriteria inklusi dan kriteria eksklusi.

##### 4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- Tikus wistar jenis kelamin jantan.
- Umur sekitar 8-12 minggu (dewasa).
- Berat badan sekitar 150-200 gram.
- Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak.
- Sehat ditandai dengan bergerak aktif dan tingkah laku normal serta belum pernah digunakan untuk penelitian.

#### 4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- Sakit (gerakan tidak aktif) selama masa adaptasi 10 hari.
- Terlihat adanya tanda-tanda infeksi disekitar luka, misalnya bekas gigitan.

Adapun perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Andayani, 2013):

$$p.(n-1) > 15$$

p : jumlah perlakuan, n : jumlah ulangan

Pada penelitian ini p = 6 sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$6(n-1) > 15$$

$$n-1 > 15:6$$

$$n > 3,5$$

jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan adalah 4.

Penelitian ini total menggunakan 30 ekor tikus Wistar sebagai sampel. Terdapat enam perlakuan kelompok sampel yang tiap kelompok berisi lima ekor tikus, jumlah ini sudah termasuk penambahan satu ekor dari jumlah minimal pengulangan sebagai cadangan apabila terjadi hal yang tidak diinginkan selama penelitian berlangsung

#### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB, Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, dan Laboratorium Biomedik FKUB. Waktu penelitian dilakukan sekitar empat bulan yaitu dilaksanakan mulai sekitar bulan November 2017 hingga Februari 2018.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak alga coklat yang diberikan pada kelompok tikus di tiap perlakuan, yaitu:

- a. Perlakuan 1: kelompok kontrol negatif, yaitu tikus yang tidak diberi diet tinggi lemak.
- b. Perlakuan 2: kelompok kontrol positif, yaitu tikus yang diberi diet tinggi lemak.
- c. Perlakuan 3: tikus yang diberi diet tinggi lemak dengan diberikan *Sargassum sp* 150mg/KgBB pada minggu ke 2 hingga minggu ke-12.
- d. Perlakuan 4: tikus yang diberi diet tinggi lemak dengan diberikan *Sargassum sp* 300mg/KgBB pada minggu ke 2 hingga minggu ke-12.
- e. Perlakuan 5: tikus yang diberi diet tinggi lemak dengan diberikan *Sargassum sp* 600mg/KgBB pada minggu ke 2 hingga minggu ke-12.
- f. Perlakuan 6: tikus yang diberi diet tinggi lemak dengan diberikan simvastatin 4 mg/KgBB pada minggu ke 2 hingga minggu ke-12.

##### 4.4.2. Variabel Terikat

Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu ekspresi TNF- $\alpha$  pada organ hepar tikus.

#### 4.5 Definisi Operasional

- a. Tikus putih (*Rattus novergicus strain Wistar*) berjenis kelamin jantan, spesies berumur kurang lebih 8-12 minggu dengan berat badan kurang lebih 150-200 gram.

- b. Pemberian pakan diet aterogenik sesuai dengan komposisi racikan pakan tiap hari selama waktu penelitian selama 12 minggu. Adapun komposisi yang digunakan untuk menginduksi kondisi hiperkolesterolemia terdiri atas pakan normal PAR-S dan tepung terigu yang kemudian ditambahkan kolesterol, asam kolat, minyak babi, dan air (Murwani *et al.*, 2006). Penggunaan kolesterol, minyak babi, dan asam kolat ditujukan untuk meningkatkan kadar LDL darah.
- c. Alga coklat (*Sargassum sp.*) dari perairan di Bangkalan, Kabupaten Madura, Jawa Timur. Adapun proses pembuatan ekstrak *Sargassum sp.* dilakukan dengan menggunakan metode maserasi.
- d. Pemberian ekstrak *Sargassum sp.* kepada hewan coba dilakukan melalui sonde dengan menggunakan pipa orogastrik yang dihubungkan dengan spuit.
- e. Ekspresi TNF- $\alpha$  yang diteliti adalah ekspresi TNF- $\alpha$  pada hepar tikus putih strain wistar yang diberi perlakuan diet aterogenik. Ekspresi TNF- $\alpha$  diukur dengan metode imunohistokimia.

#### 4.6 Alat dan Bahan Penelitian

##### 1. Perawatan Tikus

Alat dan bahan: Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, 25 buah, tutup kandang terbuat dari kawat 25 buah, botol air 25 buah, sekam 6 karung, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius, dan makanan dengan pelet, serta air untuk kebutuhan minum tikus.

2. Pembuatan pakan hewan coba

Alat dan bahan: baskom, plastik, penggiling pakan, pengaduk, neraca

Sartorius, dan nampan. PAR-5, tepung, minyak babi, minyak kambing, asam kolat, telur bebek 2 butir.

3. Pemberian Induksi *Hypercholesterolemia* Hewan Coba

Alat dan bahan: untuk 1 kali sonde pertikus dibutuhkan minyak babi 2 ml, asam kolat 0.02 gram, dan kuning telur puyuh rebus 1 gram, pipa orogastric, dan spuit.

4. Pembuatan dan pemberian ekstrak *Sargassum sp.*

Alat dan bahan: Pembuatan ekstrak *Sargassum sp.* memerlukan timbangan 1, 3 buah mortar dan penggiling, gelas ukur, cawan bening, kertas, sendok spatula, botol toples bening 3 buah, air dan bubuk ekstrak *Sargassum sp.* Untuk pemberian: alat sonde, spuit 3 cc, kapas alkohol.

5. Pembedahan Tikus

Alat dan bahan: gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set, sterofoam 2, kapas, kloroform 20 ml, alkohol, wadah plastik dan tutup 25 buah, spuit insulin 1 ml.

6. Pengecekan Ekspresi TNF  $\alpha$  dengan Imunohistokimia

Alat dan bahan: buffer formalin 10% untuk fiksasi, *paraffin block* dan microtome, kit imunohistokimia TNF- $\alpha$ .

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Pembuatan Diet Aterogenik

Pembuatan diet aterogenik dilakukan setiap hari. Kebutuhan makanan tikus umur 8 minggu per-ekor setiap hari adalah 30g/100gBB sehingga

komposisi total untuk semua tikus PAR-S 600 gram, tepung terigu 240 gram, minyak babi 100 ml, minyak kambing 100 cc, asam kolat 1,14 gram, 2 butir telur bebek, dan air secukupnya. Diet atherogenik diberikan selama 12 minggu pada kelompok kontrol positif dan perlakuan 3,4,5 dan 6.

#### 4.7.2. Pembuatan Ekstrak *Sargassum sp.*

##### 1. Proses pengeringan

*Sargassum sp.* dicuci bersih dan dipotong ukuran kecil. Kemudian potongan tersebut dikeringkan di bawah panas matahari sampai terbebas dari kandungan air yang ditandai dengan sudah kering.

##### 2. Proses pembuatan ekstrak *Sargassum sp.*

Ekstrak *Sargassum sp.* dibuat melalui metode maserasi, meliputi:

###### a. Proses Pengeringan

Bahan alam (sampel basah) dicuci bersih kemudian dipotong kecil dan dimasukkan oven suhu  $40^{\circ}$  -  $60^{\circ}$  atau dikeringkan dengan panas matahari.

###### b. Proses ekstraksi

Bahan kering dihaluskan dengan blender, sehingga didapatkan bubuk *Sargassum sp.* yang konsistensi halus, lalu ditimbang sebanyak 100 gram dan direndam pelarut 900 ml (1 Liter). Setelah itu, dikocok (30 menit) dan direndam satu malam sampai mengendap. Diambil lapisan atas yang merupakan campuran pelarut

dan zat aktif. Proses pengocokan dan pengambilan ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

### c. Proses evaporasi

Setelah selesai pengulangan, kemudian dimasukkan ke labu evaporasi. Labu evaporasi dimasukkan dipasang pada evaporator.

*Water bath* diisi air sampai penuh. Suhu *water bath* diatur sampai 90°

atau sesuai dengan titik didih pelarut. Semua rangkaian alat dipasang

dan disambungkan dengan aliran listrik. Pelarut dibiarkan terpisah

dengan zat aktif. Aliran pelarut dibiarkan terpisah dengan zat aktif.

Aliran pelarut dibiarkan sampai berhenti menetes pada labu

penampung ( $\pm 1,5$  jam - 2 jam)  $\pm 900$  ml. Oven hasil ekstrak sampai

berat tetap dengan cara oven selama satu jam, lalu ditimbang. Oven

kembali selama 30 menit, lalu ditimbang dengan pelarut sudah

teruap, proses oven selama 30 menit ini dilakukan sebanyak dua kali.

Setelah selesai, akan didapatkan hasil ekstraksi kira-kira 1/5 dari

bahan alam kering. Hasil ekstraksi dimasukkan ke botol plastik atau

kaca, lalu disimpan di *freezer*.

### 3. Proses pembuatan larutan ekstrak *Sargassum sp.* untuk sonde

Hasil ekstraksi yang sudah berupa bubuk kemudian ditimbang

dengan berat dosis 150mg, 300mg, 600mg yang sebelumnya telah

diberi asam kolat. Dosis ekstrak yang dibuat dalam penelitian ini

untuk diberikan per 10 hari, oleh karena itu dalam pembuatan ekstrak

memerlukan dosis sebesar 1500mg, 3000 mg, dan 6000mg. Masing-

masing dosis dimasukkan ke dalam mortar lalu ditambah dengan

aquades 50 cc. Kemudian tiap dosis diaduk dengan penggiling mortar hingga ekstrak benar-benar tercampur. Setelah itu, masing-masing dosis disimpan dalam botol toples bening dan didiamkan sampai ekstrak tersebut akan diinduksikan pada hewan coba.

#### 4.7.3 Pemberian Ekstrak *Sargassum sp.*

Pemberian ekstrak *Sargassum sp.* dilakukan menggunakan metode sonde dengan menggunakan pipa orogastrik yang dihubungkan dengan spuit. Diberikan pada kelompok hewan coba perlakuan 3, 4, 5, dan 6 mulai minggu ke-5 setelah induksi diet aterogenik.

#### 4.7.4 Pembedahan Tikus dan Pengambilan Organ Hepar

Persiapkan peralatan pembedahan yang telah dipersiapkan sebelumnya dan pergunakan alat perlindungan diri dengan baik dengan menggunakan jas laboratorium dan *handscoon*. Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Tikus yang sudah dianestesi di atas steroform kemudian difiksasi kemudian dibedah. Tikus diletakkan pada penjepit (*block holder*), organ hepar diambil untuk kemudian dilakukan pemeriksaan ekspresi TNF- $\alpha$ . Organ hepar yang diambil dipilih yang memiliki bentuk dan konsistensi jaringan yang masih baik untuk dilakukan pada proses selanjutnya.

Setelah pembedahan, organ tikus dikembalikan dan tikus dijahit seperti semula. Sisa organ tikus yang tidak terpakai dimasukkan ke dalam kantong plastik untuk dimusnahkan. Kemudian, untuk sampah non-organ

seperti plastik, kertas, *handscoon*, dan sebagainya, dibuang dalam kantong plastik tersendiri. Peralatan pembedahan dibersihkan dengan sabun hingga bersih. Untuk tikus yang sudah dibedah akan dikubur di tanah dengan ukuran 20 cm x 20 cm kedalaman 30 cm.

#### 4.7.5 Pengecatan Ekspresi TNF- $\alpha$ dengan Imunohistokimia

Awalnya dilakukan proses fiksasi hepar dengan perendaman formalin selama minimal 24 jam. Kemudian dibuat *paraffin block* dan dipotong dengan mikrotom (Laboratorium Patologi Anatomi). Organ dilekatkan ke *object glass*, dan dilakukan prosedur deparaffinisasi sebelum pengecatan imunohistokimia sesuai petunjuk kitnya.

Adapun langkah-langkah dalam proses pengecatan imunohistokimia yaitu

1. Dilakukan *Blocking endogen peroksidase* dengan ditetaskan 3%  $H_2O_2$  (dalam methanol) inkubasi 20 menit pada suhu ruang.
2. Lalu, dicuci *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 3x5 menit.
3. *Blocking unspesifik protein* dengan ditetaskan *blocking buffer* (*background sniper*), inkubasi 60 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci PBS 3x5 menit.
4. Inkubasi antibodi primer dengan ditetaskan antibodi primer yang dilarutkan dalam *blocking buffer*. Inkubasi *overnight* pada 4°C. Esok harinya dikeluarkan dari 4°C, ditunggu sampai suhu ruang, kemudian dicuci PBS.

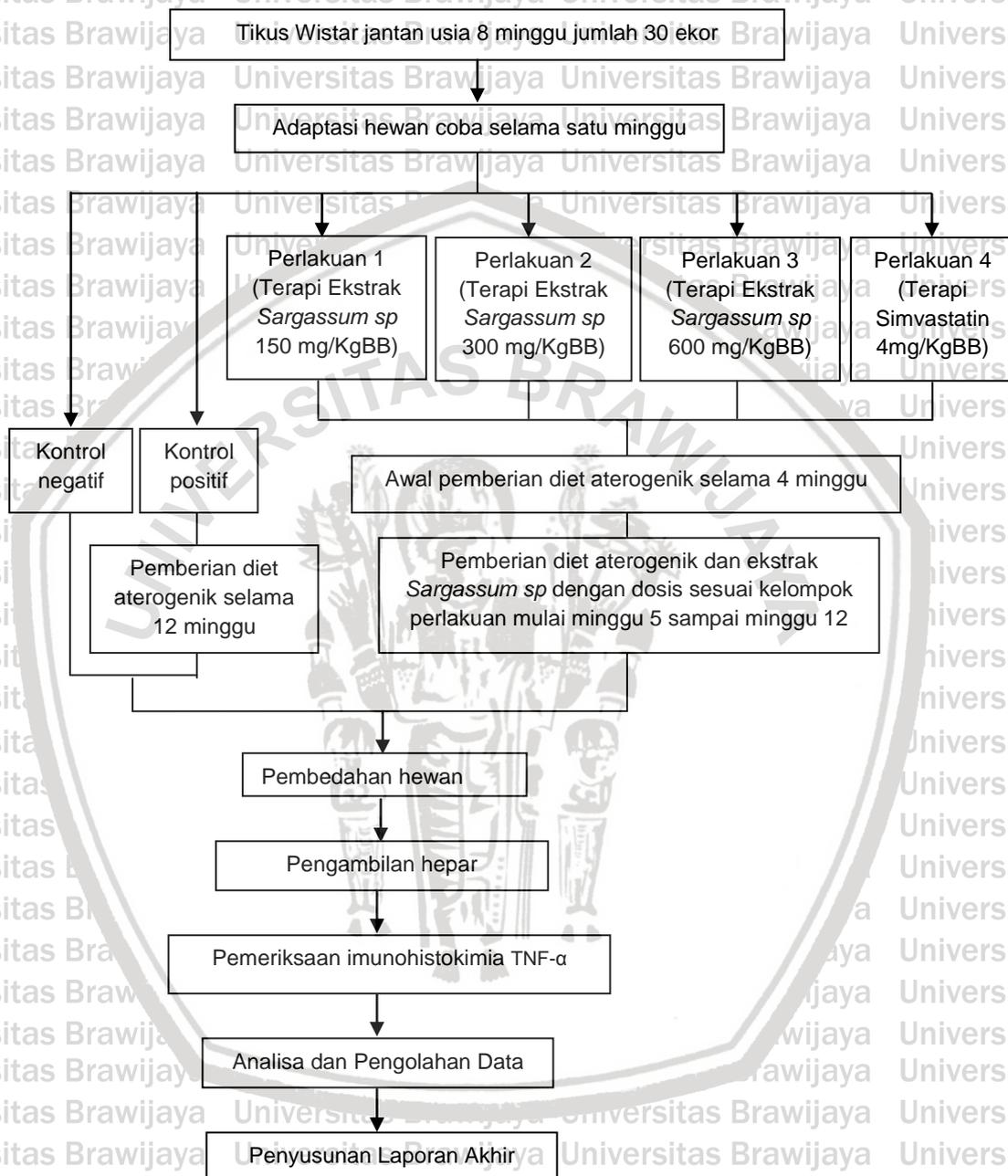
5. Selanjutnya inkubasi antibodi sekunder dengan ditetaskan antibodi sekunder (*blotin conjugate*), inkubasi 60 menit pada suhu ruang. Dicuci PBS 3x5 menit.
6. Dilakukan inkubasi SA-HRP (*Streptavidin Horseradish Peroxidase*) dengan ditetaskan SA-HRP, diinkubasi 40 menit pada suhu ruang.
7. Dicuci PBS 3x5 menit dan bilas dengan aquades.
8. Aplikasi chromagen DAB (*Diarninobenzidine*) dengan ditetaskan DAB (DAB Chromogen : DAB buffer = 1 : 40), inkubasi 1-10 menit pada suhu ruang. Dicuci aquades 3x5 menit.
9. Counterstain dengan Mayer's Hematoxilen dengan ditetaskan Mayer's Hematoxilen (Mayer's Hematoxilen : aquades = 1 : 3), inkubasi 1-10 menit dan dibilas dengan aquades.
10. Mounting dengan entellan lalu dikeringanginkan. Hasil pengecatan imunohistokimia diperiksa dibawah mikroskop cahaya dan dilakukan pemotretan.

#### 4.7.6 Penghitungan Ekspresi TNF- $\alpha$

Gambaran hepar diamati secara kualitatif. Slide preparat yang sudah dilakukan pengecatan imunohistokimia selanjutnya dilihat dan dipotret dengan menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran total 400x. Setelah pemotretan selesai, dilakukan pengamatan yang dipilih pada bagian parenkim hepar menggunakan aplikasi software imageJ. Ekspresi TNF- $\alpha$  dipresentasikan dengan satuan jumlah sel hepatosit yang berwarna kecokelatan pada dua lapang pandang.



#### 4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

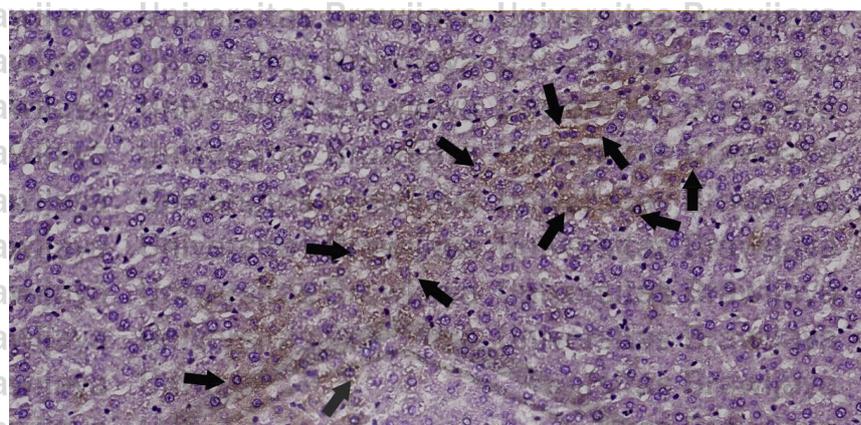
Pada penelitian ini, untuk mengetahui pengaruh ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  hepar, dilakukan percobaan terhadap tikus wistar jantan model diet aterogenik yang dibagi enam kelompok perlakuan dengan menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Didapatkan data hasil masing-masing kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok kontrol negatif yaitu kelompok tikus yang diberi diet normal, kelompok kontrol positif yaitu tikus yang diberi diet aterogenik saja, kelompok perlakuan satu sampai dengan kelompok perlakuan empat yang masing-masing diberi diet aterogenik dan ekstrak *Sargassum sp.* dosis 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, 600 mg/kgBB, serta simvastatin.

Perlakuan kepada hewan coba dilaksanakan selama 12 minggu dengan diberi diet aterogenik setiap hari. Pemberian simvastatin dan ekstrak *Sargassum sp.* pada awal minggu ke-5 hingga minggu ke-12. Hepar hewan coba diambil setelah delapan minggu pemberian ekstrak alga cokelat dan simvastatin.

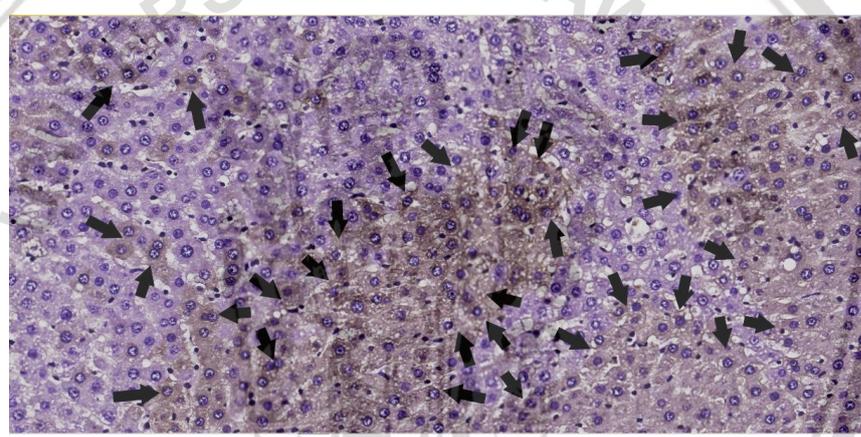
Kemudian dilakukan pengecatan imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi TNF- $\alpha$  pada hepar tikus wistar jantan kelompok perlakuan negatif, positif, dan masing-masing perlakuan dosis.

#### 5.1 Hasil Penelitian

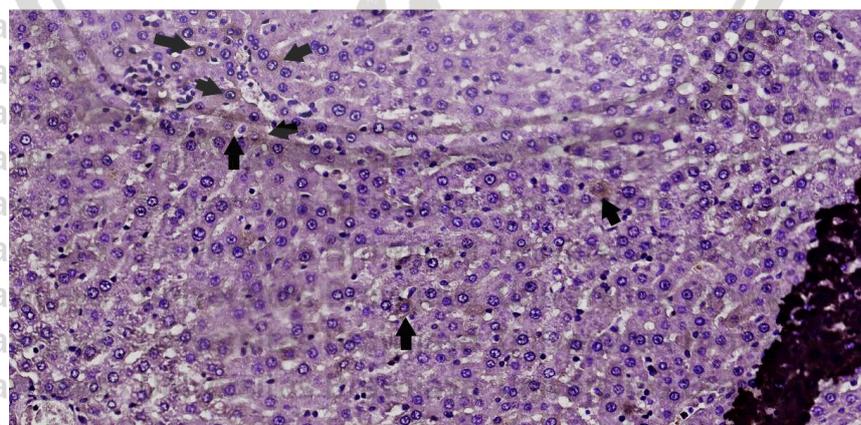
Penghitungan ekspresi TNF- $\alpha$  hepar melalui pengamatan slide preparat mikroskop dengan total perbesaran 400x. Gambar hasil ekspresi TNF- $\alpha$  pada slide imunohistokimia dapat dilihat pada semua kelompok perlakuan berikut.



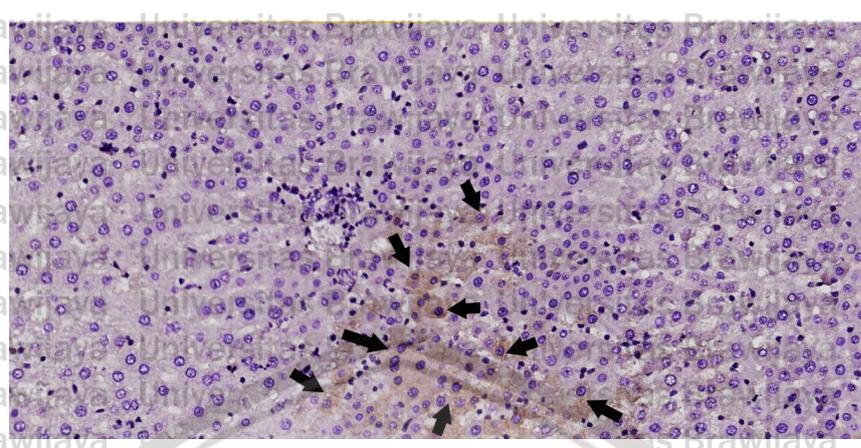
**Gambar 5.1** Gambaran Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$  pada Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik, Kontrol Negatif (Perbesaran 400x). Tanda panah menunjukkan warna kecokelatan pada sitoplasma sel hepatosit.



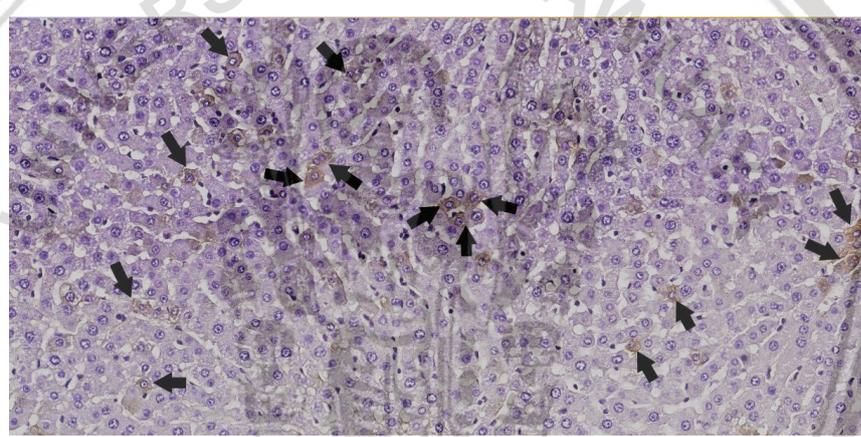
**Gambar 5.2** Gambaran Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$  pada Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik, Kontrol Positif (Perbesaran 400x). Tanda panah menunjukkan warna kecokelatan pada sitoplasma sel hepatosit.



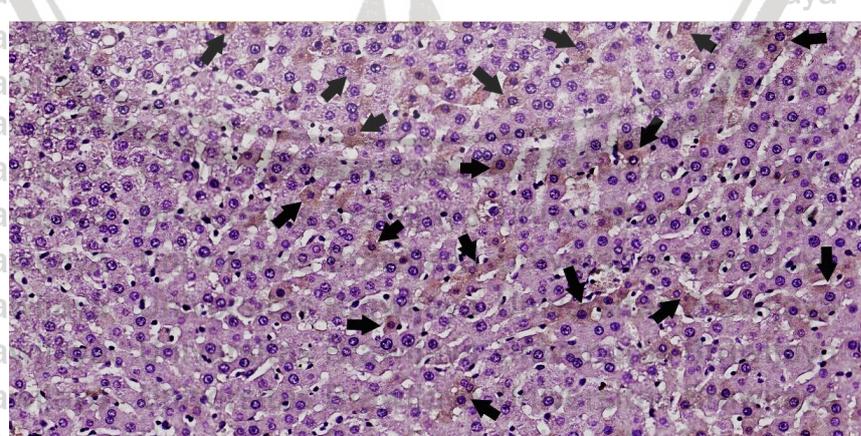
**Gambar 5.3** Gambaran Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$  pada Hepar Tikus Wistar Diberi Diet Aterogenik, Dosis 150mg/KgBB (Perbesaran 400x). Tanda panah menunjukkan warna kecokelatan pada sitoplasma sel hepatosit.



**Gambar 5.4** Gambaran Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$  pada Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik, Pemberian Dosis 300mg/KgBB (Perbesaran 400x). Tanda panah menunjukkan warna kecokelatan pada sitoplasma sel hepatosit.



**Gambar 5.5** Gambaran Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$  pada Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik, Pemberian Dosis 600mg/KgBB (Perbesaran 400x). Tanda panah menunjukkan warna kecokelatan pada sitoplasma sel hepatosit.



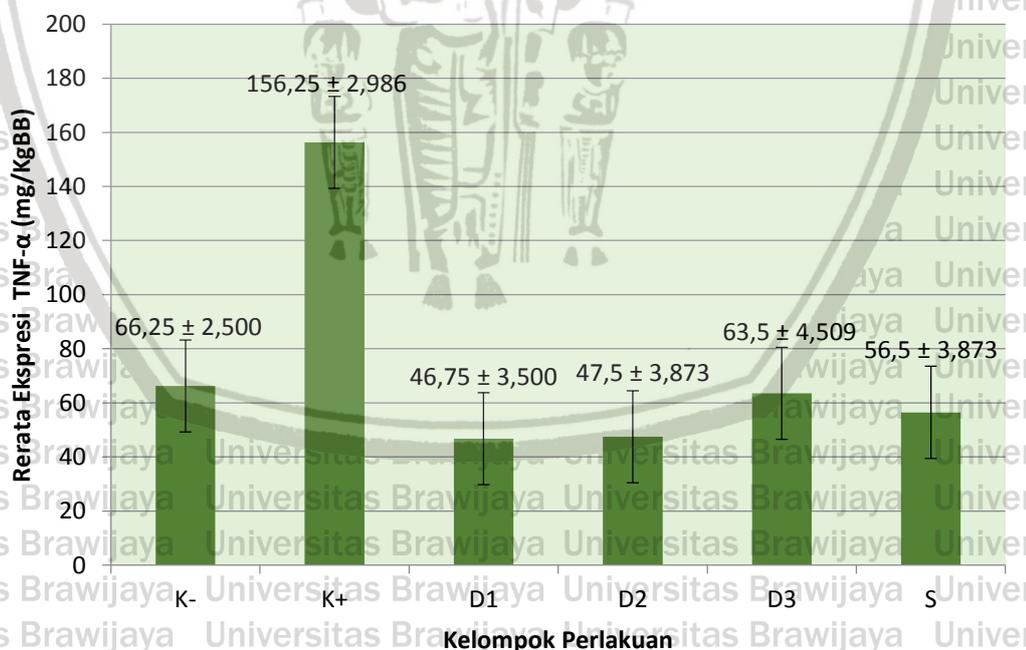
**Gambar 5.6** Gambaran Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$  pada Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik, Pemberian Simvastatin 4mg/KgBB (Perbesaran 400x). Tanda panah menunjukkan warna kecokelatan pada sitoplasma sel hepatosit.

Adapun pengukuran rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  hepar dilakukan pada tiap kelompok perlakuan dan disajikan dengan menggunakan tabel dan grafik perbandingan berikut ini.

**Tabel 5.1 Rerata Ekspresi TNF- $\alpha$  Hepar Tikus Wistar Diet Aterogenik dengan Terapi Ekstrak *Sargassum* sp. Tiap Kelompok Perlakuan**

Perlakuan	Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$ $\pm$ Standart Deviasi
Kontrol negatif	66,25 $\pm$ 2,500
Kontrol positif	156,25 $\pm$ 2,986
Dosis I	46,75 $\pm$ 3,500
Dosis II	47,50 $\pm$ 3,873
Dosis III	54,50 $\pm$ 4,509
Simvastatin	56,50 $\pm$ 3,873

Keterangan : **Kontrol Negatif** ( diet normal tanpa induksi diet aterogenik); **Kontrol Positif** (Induksi diet aterogenik ); **Dosis 1**( Induksi diet aterogenik + *Sargassum* sp 150 mg/KgBB); **Dosis 2** (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 300 mg/KgBB); **Dosis 3** (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 600mg/KgBB); **Simvastatin** (Induksi diet aterogenik + simvastatin 4mg/KgBB).



**Gambar 5.7 Grafik Perbandingan Rerata Ekspresi TNF- $\alpha$  Hepar Tikus**

Dari Tabel 5.1 dan Gambar 5.7 terlihat bahwa terjadi peningkatan rerata ekspresi TNF- $\alpha$  pada hepar tikus pada kelompok kontrol positif ( $156,25 \pm 2,986$ ) dibandingkan dengan kontrol negatif ( $66,25 \pm 2,500$ ). Sedangkan pada semua kelompok perlakuan pemberian ekstrak *Sargassum sp.* dosis 150mg/KgBB, 300mg/KgBB, dan 600mg/KgBB, serta simvastatin, terjadi penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  hepar tikus di mana penurunan yang paling tinggi pada pemberian dosis *Sargassum sp.* 150mg/KgBB ( $46,75 \pm 3,500$ ) diikuti dengan dosis *Sargassum sp.* 300mg/KgBB ( $47,50 \pm 3,873$ ) ditempat kedua, ditempat ketiga dosis *Sargassum sp.* 600mg/KgBB ( $54,50 \pm 4,509$ ), dan terakhir diisi oleh dosis simvastatin ( $56,50 \pm 3,873$ ).

## 5.2 Analisis data

Analisis data dilakukan secara statistika menggunakan software SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) versi 20. Bila data sebaran normal diberlakukan uji *One-Way Anova* dan apabila sebaran data tidak normal diberlakukan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*. Analisis data dimulai dengan uji normalitas untuk mengetahui distribusi data (normal apabila nilai *Sig* < 0,05) dan uji homogenitas untuk menentukan varian data sama atau tidak. Lalu, untuk melihat perbedaan dari setiap kelompok digunakan uji *Post Hoc* sebagai lanjutan uji *One-Way Anova* dan *Mann Whitney* sebagai lanjutan uji *Kruskal-Wallis*.

### 5.2.1 Uji Normalitas Data dan Uji Homogenitas

Uji komparansi yang akan digunakan yaitu uji parametrik *One-Way Anova*, hal ini disebabkan data diperoleh dari enam kelompok yang tidak berpasangan. Namun, sebelum mengerjakan uji *One-Way Anova* perlu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas yang merupakan syarat uji parametrik yaitu harus memenuhi kriteria data homogen dan terdistribusi normal.

**Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas TNF- $\alpha$  Hepar Tiap Kelompok Tikus Wistar Diet Aterogenik dengan Pemberian Ekstrak *Sargassum sp.***

Kelompok	Df	Sig.
Kontrol negatif	4	0,911
Kontrol positif	4	0,952
Dosis I	4	0,894
Dosis II	4	0,414
Dosis III	4	0,230
Simvastatin	4	0,972

Keterangan : **Kontrol Negatif** ( diet normal tanpa induksi diet aterogenik); **Kontrol Positif** (Induksi diet aterogenik ); **Dosis 1**( Induksi diet aterogenik + *Sargassum sp* 150 mg/KgBB); **Dosis 2** (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 300 mg/KgBB); **Dosis 3** (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 600mg/KgBB); **Simvastatin** (Induksi diet aterogenik + simvastatin 4mg/KgBB).

Uji normalitas data penelitian ini menggunakan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah sample kurang dari 50. Berdasarkan hasil uji normalitas *Saphiro-Wilk*, diperoleh nilai signifikasi sebesar 0,911 untuk kelompok kontrol negatif, 0,952 untuk kelompok kontrol positif, 0,894 untuk perlakuan I dosis 150mg/KgBB, 0,414 untuk perlakuan II dosis 300mg/KgBB, 0,230 untuk kelompok perlakuan III 600mg/KgBB, serta 0,972 untuk perlakuan IV yang diberi simvastatin. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data ekspresi TNF- $\alpha$  tersebar normal karena seluruh signifikasi > 0,05. Kemudian, berdasarkan hasil uji homogenitas varian, diperoleh nilai signifikasi sebesar 0,881. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semua variasi sampel populasi homogen atau sama, sebab data dikatakan homogen diperoleh nilai signifikasi sebesar < 0,05. Dari kedua hasil uji diatas, maka syarat untuk melakukan uji *One-Way Anova* terpenuhi.

### 5.2.2 Uji *One-way Anova*

Berdasarkan hasil uji statistik *One-Way Anova*, diperoleh nilai signifikasi sebesar 0,000. Hal tersebut memiliki nilai *Sig* < 0,05 yang berarti terdapat perbedaan bermakna pada jumlah ekspresi TNF- $\alpha$  pada tiap kelompok perlakuan. Dengan demikian, hipotesis dari penelitian ini (H1) diterima dan (H0)

ditolak yaitu ekstrak *Sargassum sp.* secara signifikan menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada hepar tikus wistar yang diinduksi diet aterogenik. Secara deskriptif ekspresi TNF- $\alpha$  hepar paling sedikit yaitu pada kelompok perlakuan 1 dengan pemberian ekstrak *Sargassum sp.* 150 mg/kgBB dan ekspresi TNF- $\alpha$  paling banyak terdapat pada kelompok kontrol positif dengan diet aterogenik.

### 5.2.3 Uji *Post-Hoc Tukey*

Guna membuktikan hasil dari *One-Way Anova* sebelumnya, langkah selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc* untuk melihat perbedaan rerata tiap kelompok perlakuan. Pada data ekspresi TNF- $\alpha$  dilakukan uji *Post Hoc Tukey* yang sebelumnya telah diuji dengan menunjukkan hasil data terdistribusi normal dan homogen. Adapun hasil uji *Post Hoc* dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 5.3 Hasil Uji *Post-Hoc* Ekspresi TNF- $\alpha$  Hepar Tiap Kelompok Tikus Diet Aterogenik dengan Pemberian Ekstrak *Sargassum sp.*

	KN	KP	DP 1	DP 2	DP3	DS
KN		0,000	0,000	0,000	0,003	0,013
KP	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000
DP 1	0,000	0,000		1,000	0,065	0,013
DP 2	0,000	0,000	1,000		0,113	0,024
DP 3	0,003	0,000	0,065	0,113		0,966
DS	0,013	0,000	0,013	0,024	0,966	

Keterangan : **KN** ( Kontrol negatif: diet normal tanpa induksi diet aterogenik); **KP** ( Kontrol positif: Induksi diet aterogenik ); **DP1**( Dosis Perlakuan 1: Induksi diet aterogenik + *Sargassum sp* 150 mg/KgBB); **DP2** (Dosis Perlakuan 2: Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 300 mg/KgBB); **DP3** (Dosis Perlakuan 3: Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 600mg/KgBB); **DS4** (Dosis Simvastatin: Induksi diet aterogenik + ssimvastatin 4mg/KgBB).\*=signifikansi  $p < 0,05$

Tabel 5.3 Menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  pada hepar kelompok diet aterogenik (KP) berbeda signifikan kelompok diet normal (KN) dan kelompok dengan pemberian ekstrak *Sargassum sp.* sebanyak 150 mg/KgBB (DP 1). Kelompok normal (KN) dan Kelompok diet aterogenik (KP) tidak memiliki perbedaan signifikan terhadap kelompok diet aterogenik dengan pemberian

ekstrak *Sargassum sp.* sebanyak 300 mg/KgBB (DP2); kelompok diet aterogenik dengan pemberian ekstrak *Sargassum sp.* sebanyak 600 mg/KgBB (DP3); kelompok diet aterogenik dengan pemberian simvastatin sebanyak 4 mg/KgBB (DS).

#### 5.2.4 Hasil Uji Korelasi

Uji korelasi dilakukan untuk menilai hubungan pemberian beberapa tingkatan dosis ekstrak *Sargassum sp.* dengan ekspresi TNF- $\alpha$  hepar. Uji Korelasi dilakukan dengan metode *Pearson* untuk mengukur kekuatan dan arah hubungan linier dari dua variabel yang dinyatakan dalam koefisien korelasi.

Tabel 5.4 Hasil Uji Korelasi *Pearson* Ekspresi TNF- $\alpha$  Hepar Tiap Kelompok Tikus Diet Aterogenik dengan Pemberian Ekstrak *Sargassum sp.*

		Ekspresi TNF- $\alpha$
Kelompok Perlakuan	Korelasi <i>Pearson</i>	-0,734**
	Sig.	0,001
	N	16

Dari hasil uji korelasi *Pearson*, didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,001.

Hal ini bermakna bahwa ada perbedaan yang signifikan antara perbedaan dosis ekstrak *Sargassum sp.* dengan ekspresi TNF- $\alpha$ , sebab nilai tersebut memiliki  $p < 0,05$ .

Selain itu, diperoleh nilai korelasi sebesar  $-0,734$ . Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara penambahan jumlah dosis *Sargassum sp.*

yang berbanding terbalik dengan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$ . Semakin tinggi penambahan jumlah dosis *Sargassum sp.* maka semakin menurun ekspresi

TNF- $\alpha$ .

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  hepar pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar dengan model diet aterogenik. Hewan coba yang digunakan merupakan tikus wistar jantan yang berusia delapan minggu dengan berat badan 150-200 gram dan dalam kondisi sehat. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jaringan histopatologi organ hepar tikus dengan dilakukan pewarnaan imunohistokimia. Sebanyak 30 ekor tikus dilibatkan sebagai subjek penelitian dan terbagi dalam enam kelompok perlakuan di mana tiap kelompok berisi lima ekor tikus yang sudah termasuk jumlah penambahan satu ekor dari jumlah minimal yaitu empat ekor tikus.

Penelitian yang dilakukan melalui pemberian diet tinggi lemak kepada hewan coba terdiri dari PARS 20 gram, tepung terigu 10 gram, kuning telur bebek 2 gram, asam kolat 0,05 gram, minyak babi 3,55 gram, minyak kelapa 0,4 gram, dan lemak kambing 4 gram yang dilakukan selama 8 minggu menyebabkan peningkatan kadar kolesterol total (Wahyuni *et al.*, 2013). Kondisi hiperkolesteremia akan menyebabkan peningkatan akumulasi lemak pada hepar. Akumulasi lemak pada sel-sel hepatosit menghambat kapasitas oksidatif dari mitokondria khususnya kompleks rantai transpor elektron sehingga terstimulasi jalur peroksisomal dan mikrosomal dalam oksidasi lemak dan terjadi peningkatan spesies oksigen reaktif sebagai pencetus adanya stress oksidatif (Rolo *et al.*, 2013). Stress oksidatif merefleksikan ketidakseimbangan antara agen prooksidan dan antioksidan yang nantinya bisa menyebabkan teraktivasinya kaskade

inflamasi dengan melibatkan berbagai macam sitokin, salah satunya TNF- $\alpha$  yang merupakan salah satu sitokin yang dapat menginduksi terjadinya kematian pada sel target sehingga memiliki peran dalam berbagai kondisi yang melibatkan proses inflamasi.

Disisi lain, ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) memiliki banyak manfaat diantaranya adalah sebagai antiinflamasi, antioksidan, antitumor, imunomodulator, dan banyak pula digunakan sebagai suplemen makanan (Teng *et al.*, 2015). *Sargassum sp.* terbukti memiliki efek proteksi melalui peningkatan interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10). Oleh karena itu, melalui penelitian ini ingin membuktikan bahwa ekstrak *Sargassum sp.* memiliki pengaruh juga pada organ hepar tikus yang diinduksi diet aterogenik. Adapun pengaruh tersebut dinilai dari ekspresi TNF- $\alpha$  yang terekspresi dari pemeriksaan imunohistokimia dilihat pada warna kecokelatan pada sitoplasma sel.

Deskripsi hasil penelitian pengaruh ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  hepar pada tikus dapat dilihat melalui pembahasan berikut ini.

### 6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Dari hasil penelitian didapatkan rerata ekspresi TNF- $\alpha$  masing-masing kelompok ditunjukkan pada Tabel 5.1. Dalam hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  hepar pada kelompok diet aterogenik (KP) memiliki perbedaan signifikan terhadap kelompok diet normal (KN) dan terjadi peningkatan jumlah ekspresi rata-rata pada kelompok diet aterogenik (KP) dibandingkan dengan kelompok diet normal (KN). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian lain yang telah dibuktikan sebelumnya. Pada penelitian yang

menggunakan hewan coba berupa kelinci putih *New Zealand* jantan yang diinduksi diet tinggi kolesterol selama 10 minggu menunjukkan perbedaan kadar TNF- $\alpha$  yang signifikan antara kelompok kontrol (diet normal) dengan kelompok yang diinduksi diet tinggi kolesterol. Kadar TNF- $\alpha$  pada kelompok diet normal dan kelompok diet tinggi kolesterol diukur dengan menggunakan ELISA dengan sampel yang diambil dari serum menunjukkan hasil secara berurutan  $59,18 \pm 11,23$  dan  $143,93 \pm 45,64$  (Kong *et al.*, 2013).

Dari hasil statistik penelitian ini juga menunjukkan bahwa ekstrak *Sargassum sp.* pada tiap dosis perlakuan (DP), yaitu DP 1, DP 2, dan DP 3 memiliki korelasi berbeda secara signifikan sehingga mampu menurunkan jumlah ekspresi TNF- $\alpha$  hepar jika dilihat pada perlakuan diet aterogenik (KP) dan pada ketiga dosis ini sama-sama memiliki penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  yang mendekati pada kelompok perlakuan diet normal (KN) tetapi nilainya tidak lebih tinggi dari kelompok perlakuan diet normal (KN). Penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  hepar pada penelitian ini sesuai dengan penelitian menggunakan metode sonde dengan sulfat polisakarida dari ekstrak etanol *Sargassum hemiphyllum* yang diberikan kepada tikus BABL/c jantan berusia 12 minggu selama 5 hari berturut turut terbagi dalam 3 kelompok dosis yaitu 20 mg/KgBB, 40mg/KgBB, dan 80 mg/kgBB dilanjutkan induksi inflamasi asam arakhidonat pada telinga kanan tikus di hari ke 5 menunjukkan efek penghambatan pada produksi sitokin pro inflamasi seperti IL-1, IL6 dan TNF- $\alpha$  pada metode penghitungan kadar menggunakan ELISA (Hwang *et al.*, 2015).

Adapun penentuan dosis ekstrak etanol *Sargassum sp.* yang digunakan pada penelitian ini diharapkan tidak menimbulkan efek toksik pada tikus.

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa pemberian fucoidan dari ekstrak *Undaria pinnatifida* dengan dosis 150 mg/kgBB, 450 mg/KgBB, dan 1350 mg/KgBB yang diberikan secara oral pada tikus setiap hari selama 4 minggu tidak memberikan gejala toksik hingga kematian pada hewan coba (Kim *et al.*, 2010).

Pada kelompok perlakuan 1 (DP 1), yaitu pemberian ekstrak *Sargassum sp.* dosis 150mg/KgBB pada tikus yang diinduksi diet aterogenik menunjukkan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  hepar yang signifikan dibandingkan dengan kelompok diet aterogenik (KP) serta memiliki ekspresi TNF- $\alpha$  yang lebih rendah dibandingkan dengan dosis simvastatin dan dosis lainnya, yaitu DP 2 dan DP 3. Hal ini sesuai dengan hipotesis penelitian. Pada kelompok perlakuan 2 (DP 2), yaitu pemberian ekstrak *Sargassum sp.* dosis 300mg/KgBB memiliki ekspresi TNF- $\alpha$  lebih besar dibandingkan kelompok DP 1, namun masih lebih rendah bila dibandingkan seluruh kelompok perlakuan. Meskipun demikian, hasil ini juga masih sesuai dengan hipotesis penelitian. Pada kelompok perlakuan 3 (DP 3), yaitu pemberian ekstrak *Sargassum sp.* dosis 600mg/KgBB memiliki ekspresi TNF- $\alpha$  lebih besar dibandingkan kelompok DP 1, DP 2, dan simvastatin, tetapi masih lebih rendah bila dibandingkan kelompok diet aterogenik (KP). Pada penelitian lain yang sudah ada, pemberian fucoidan dengan dosis 75-300 mg/KgBB per hari dari ekstrak *L.japonica* akan memberikan efek *renoprotective* serta tidak memberikan efek toksik (Li *et al.*, 2015). Bila melihat ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok D3 tersebut, pemakaian dosis diduga kurang maksimal jika digunakan pada penelitian ini, sebab kadar dosis yang digunakan masih kurang kecil sehingga hasilnya dapat berbeda bila dibandingkan dengan dosis perlakuan DP 1 dan DP 2.

Pada kelompok simvastatin, yaitu pemberian diet aterogenik dengan simvastatin 4mg/KgBB memiliki penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  yang lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan DP 1 dan DP 2, tetapi masih lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan DP 3 dan KP. Menurut penelitian sebelumnya, pada penelitian kombinasi ekstrak kulit manggis dan simvastatin (P3) mempunyai rerata 24,09 mg/dl yang lebih rendah dari P2 dan P1. Hal ini mungkin dapat diakibatkan karena simvastatin memiliki efek meningkatkan kadar enzim hati dalam 5 bulan pertama terapi yang menjadi tanda adanya kerusakan hepar.

Pada penelitian didapatkan kelompok perlakuan P2 memiliki rerata 30,51 mg/dl, sedikit lebih tinggi sedikit dibandingkan kelompok lain. Simvastatin merupakan obat standar untuk memperbaiki fraksi lipid dengan menghambat enzim *HMG-coA-reduktase*. Statin yang diberikan pada hepar dapat meningkatkan mRNA apoA1 dan sintesis ApoA1, lalu menghasilkan ApoA1 dan HDL ekstraseluler (Inge, 2014).

Secara kualitatif, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  hepar pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar dengan model diet aterogenik.

Terjadi penurunan TNF- $\alpha$  yang signifikan pada organ hepar adanya dugaan bahwa TNF- $\alpha$  memainkan peranan penting untuk agen proinflamatori. Terjadinya penurunan TNF- $\alpha$  disebabkan oleh kerusakan sel endotel dan ekspresi TNF- $\alpha$  yang tidak mencapai sitoplasma yang sudah terjadi sebelum dilakukan penelitian, kerusakan ini mungkin disebabkan mekanisme umpan balik oleh IGF-1. GH bekerja secara tidak langsung melalui IGF-1 dalam memengaruhi TNF- $\alpha$ . IGF-1 meningkatkan aktivasi NF-kB, di mana NF-kB akan mengaktivasi gen pembuat TNF- $\alpha$ . Penurunan jumlah sel yang rusak akan menyebabkan tidak teraktivasinya

makrofag sehingga sekresi sitokin kemokin dan sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) mengalami penurunan. Ekspresi TNF- $\alpha$  yang menurun menandakan inflamasi pada sitoplasma di hepar juga menurun.

## 6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran

Penelitian ini diharapkan dapat menambah ilmu pengetahuan dan wawasan tentang pemberian ekstrak alga coklat (*Sargassum sp.*) terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus dengan diet aterogenik. Sehingga dapat menjadi pengobatan alternatif untuk menurunkan inflamasi yang lama dan mencegah terjadinya fibrosis sel hepar yang berujung pada nekrosis. Ekstrak *Sargassum sp.* mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  sehingga dapat digunakan sebagai terapi NAFLD.

## 6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dari penelitian ini adalah belum membuktikan tentang terjadi penurunan TNF- $\alpha$  secara sistemik, sebab perhitungan ekspresi TNF- $\alpha$  hanya diuji pada organ hepar saja. Penelitian ini belum membuktikan zat aktif tertentu dalam *Sargassum sp.* yang berpotensi menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  dikarenakan penggunaan ekstrak kasar *Sargassum sp.* Penghitungan ekspresi TNF- $\alpha$  masih dilakukan secara kualitatif, belum dilakukan secara kuantitatif. Selain itu, efek samping, rentang uji efektivitas dan uji toksisitas dosis obat juga belum diteliti.

## BAB 7

## PENUTUP

### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak *Sargassum sp.* pada pemberian dosis 150 mg/KgBB dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dengan diet aterogenik.
2. Dosis ekstrak *Sargassum sp.* memiliki korelasi negatif terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dengan diet aterogenik.

### 7.2 Saran

Adapun saran yang dapat peneliti berikan dari penelitian ini adalah:

- a. Diperlukan untuk pengujian lebih dalam mengenai *Sargassum sp.* sebagai pengobatan penyakit NAFLD.
- b. Diperlukan adanya pengujian ekspresi kadar TNF- $\alpha$  melalui metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) untuk hepar hewan coba.
- c. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai uji efektivitas dan uji toksisitas dari dosis *Sargassum sp.* terhadap ekspresi TNF- $\alpha$ .
- d. Dalam penelitian ini masih menggunakan ekstrak kasar *Sargassum sp.*, sehingga perlu penelitian fraksi atau isolasi tertentu zat aktif yang bisa berpotensi menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  hepar tikus dengan diet aterogenik.

## DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A., Lichtman, A. and Pillai, S. 2012. Cellular and Molecular Immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders.

Aditya, P., Lesmana, R.A. 2013. Pharmacological and Non-Pharmacological Treatment in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. The Indonesian Journal of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy, 14 (3): 174-180.

Ahmed, A., Wong, R.J., Harrison, S.A. 2015. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 13 (12): 2062-2070.

Ajmal, M., Yaccha, M., Malik, M., Rabbani, M., Ahmad, I., Isalm, N. and Abdali, N. 2014. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in patients of cardiovascular diseases and its association with hs-CRP and TNF- $\alpha$ . Indian Heart Journal, 66(6): pp.574-579.

Amarapurkar, D., Hashimoto, E., Lesmana, L., Sollano, J., Chen, P. and Goh, K. 2007. How common is non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region and are there local differences?. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(6): pp.788-793.

Andayani, T. M. 2013. Famakoekonomi Prinsip dan Metodologi. Jogjakarta: Bursa Ilmu.

Asthari, S., Pourhoseingholi, M.A., Zali, M.R. 2015. Non-alcoholic fatty liver disease in Asia: Prevention and planning. *World Journal of Hepatology*, 7(13): 1788-1796.

Bechmann, L., Hannivoort, R., Gerken, G., Hotamisligil, G., Trauner, M. and Canbay, A. 2012. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 56(4): pp.952-964.

Bian, Z. and Ma, X. 2012. Liver Fibrogenesis in Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Frontiers in Physiology*, 3.

Carmiel-Haggai, M., Cederbaum, A.I., Nieto, N.A. 2005. High-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB Journal*, 19(1): 136-138.

Chalasan, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cus K. Chariton, M. et al. 2012. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*, 55(6): 2005-2023.

- Chater, P., Wilcox, M., Houghton, D. and Pearson, J. 2015. The role of seaweeds bioactives in the control of digestion: implications for obesity treatments. *Food & Function*, 6(11): pp.3420 - 3427.
- Chatrath, H., Vuppalanchi, R. and Chalasani, N. 2012. Dyslipidemia in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Seminars in Liver Disease*, 32(01): pp.022-029.
- Coelho, D.F., Pereira-Lancha, LO., Chaves, D.S., Diwan, D., Ferraz, R., Campos-Ferraz, P.L. et al. 2011. Effect of high-fat diets on body composition, lipid metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameters. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 4(10): 966-972.
- Crespo, J., Cayon, A., Fernández-Gil, P. and Hernández-Guerra, M. 2001. Gene expression of tumor necrosis factor [alpha ] and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*, 34(6): pp.1158-1163.
- Croke, B., Sampson, D. 2012. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Clinical Practice and Health Promotion. *Journal for Nurse Practitioners*, 8(1): 45-50.
- Cuong, H., Thuy, T., Huong, T., Ly, B. and Van, T. 2014. Structure and hypolipidaemic activity of fucoidan extracted from brown seaweed *Sargassum henslowianum*. *Natural Product Research*, 29(5): pp.411-415.
- Das, S. and Balakrishnan, V. 2011. Role of Cytokines in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26(2): pp.202-209.
- Dowman, J.K., Tomlinson, J.W., Newsome, P.N. 2010. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM: An International Journal of Medicine*, 103(2): 71-83.
- Dyson, J., Jaques, B., Chattopadyhay, D., Lochan, R., Graham, J., Das, D., Aslam, T., Patanwala, I., Gaggar, S., Cole, M., Sumpter, K., Stewart, S., Rose, J., Hudson, M., Manas, D. and Reeves, H. 2014. Hepatocellular cancer: The impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *Journal of Hepatology*, 60(1): pp.110-117.
- Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. 2010. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic and Clinical Implications. *Hepatology*. 2010 February ; 51(2): 679–689. doi:10.1002/hep.23280.
- Farinde, Abimbola. 2016. Lipid-Lowering Agents, (Online), (<http://emedicine.mescap.com//article/2172172-overview>, diakses 17 Juli 2018).

Guiry, Michael D. 2014. *Sargassum* (*Sargassum*) polycystum C. Agardh, 1824. Algae Base. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from Algae Base with permission of M.D. Guiry). Accessed through: World Register of Marine Species at <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetail&id=145561> on 2014-11-30.

Hasan I, Gani RA, Machmud R et al. 2002. Prevalence and Risk Factor and Non Alcoholic Fatty Liver in Indonesia. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17 (Suppl.): S154.

Hwang P.A., Hung Y.L., Chien S.Y. 2015. Inhibitory activity of *Sargassum hemiphylum* sulfated polysaccharide in arachidonic acid-induced animal models of inflammation. *J Food Drug Anal.*(1):49-56.

Inge Kurniawati Adipratama, Kusmiyati Tjahjono, Amalia Nugetsiana Setyawati. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana*) Dan Simvastatin Terhadap Kadar Kolesterol Hdl Tikus Sprague - Dawley Dengan Pakan Tinggi Lemak. Journal article: Jurnal Kedokteran Diponegoro.

Jarrar, M., Baranova, A., Collantes, R., Ranard, B., Stepanova, M., Bennet, C., Fang, Y., Elariny, H., Goodman, Z., Chandhoke, V. and Younossi, Z. 2007. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(5): pp.412-421.

Jensen GS, Hart AN, Zaske LA, Drapeau C, Gupta N, Schaeffer DJ, Cruickshank JA. 2007. Mobilization of human CD34+ CD133+ and CD34+ CD133(-) stem cells in vivo by consumption of an extract from *Aphanizomenon flos-aquae*-related to modulation of CXCR4 expression by an L-selectin ligand? *Cardiovasc Revasc Med.* 8(3):189-202.

Karadeniz G, Serefden A, Tekin AI, Tascýlar O, Gun BD, Cömertl M. 2008. *Oxidized Low-Density-Lipoprotein Accumulation is Associated with Liver Fibrosis in Experimental Cholestasis.* Sao Paulo: *Clinics.* 2008 Aug; 63(4): 531–540.

Kim K.J., Lee O.H., Lee H.H., Lee B.Y. 2010. A 4-week repeated oral dose toxicity study of fucoidan from the Sporophyll of *Undaria pinnatifida* in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* ;267(1-3):154-8.

Kim, M., Chang, U. and Lee, J. 2008. Inhibitory Effects of Fucoidan in 3T3-L1 Adipocyte Differentiation. *Marine Biotechnology*, 11(5): pp.557-562.

Kodama, Y., Taura, K., Miura, K., Schnabl, B., Osawa, Y. and Brenner, D. 2009. Antiapoptotic Effect of c-Jun N-terminal Kinase-1 through Mcl-1 Stabilization in TNF-Induced Hepatocyte Apoptosis. *Gastroenterology*, 136(4): pp.1423-1434.

- Koek, G., Liedorp, P. and Bast, A. 2011. The Role of Oxidative Stress in Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Clinica Chimica Acta*, 412(15-16): pp.1297-1305.
- Kong L, Luo C, Li X, Zhou Y, He H. 2013. The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits. *Lipids Health Dis* :115.
- Lee SH, Chang-Ik Ko, Youngheun Jee, Yoonhwa Jeong, Misook Kim, Jin-Soo Kim, You-Jin Jeon. 2013. Ant-inflammatory effect of fucoidan extracted from *Ecklonia cava* in zebrafish model. *Carbohydrate Polymers* 92: 84-89.
- Li, S., Tan, H., Wang, N., Zhang, Z., Lao, L., Wong, C. and Feng, Y. 2015. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11): hal.26087-26124.
- Longo, D. 2012. Harrison's Principles of Internal Medicine. 20th ed. Maidenhead: McGraw-Hill, pp.2050-2056.
- Manco, M., Marcellini, M., Giannone, G. and Nobili, V. 2007. Correlation of Serum TNF- $\alpha$  Levels and Histologic Liver Injury Scores in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *American Journal of Clinical Pathology*, 127(6): pp.954-960.
- Marra, F. and Bertolani, C. 2009. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*, 50(3), halaman 957-969.
- Maulina, N. 2015. Penilaian TNF-Alfa pada Hati Mencit Jantan Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Manggis *Garcinia Mangostana* L dengan Metode Imunohistokimia. *Jurnal Title*, 7(01).
- Montecucco, F. and Mach, F. 2008. Does Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Increase Cardiovascular Risk ?. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 8(4): hal.301307.
- Murwani, S., Ali, M. and Muliarta, K. 2006. Diet Aterogenik pada Tikus Putih (*Rattus novergicus* strain Wistar) sebagai Model Hewan Aterosklerosis. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 22(1): halaman 6-9.
- Ng, M. et al. 2014. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 384(9945): pp. 766-781.
- Palanisamy, S., Vinosha, M., Marudhupandi, T., Rajasekar, P. and Prabhu, N. 2017. Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: Structural characterization, in vitro antioxidant and anticancer activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, pp.405-412.

- Parizadeh, S.M.R., Azarpazhooh, M.R., Moohebbati, M., Nematy, M., Ghayour-Mobarhan, M., Tavallaie, S. et al. 2011. Simvastatin Therapy Reduces Prooxidant-Antioxidant Balance: Results of a Placebo-Controlled Cross-Over Trial. *Lipids*, 46(4): 333-340.
- Park HY, Min Ho Han, Cheol Park, Cheng-Yun Jin, Gi-Young Kim, Whan Choi, Nam Deuk Kim, Taek-Jeong Nam, Taeg Kyu Kwon, Yung Hyun Choi. 2011. Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF- $\kappa$ B, MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells. *Food and Chemical Toxicology* 49: 1745-1752.
- Park, M., Jung, U. and Roh, C. 2011. Fucoidan from Marine Brown Algae Inhibits Lipid Accumulation. *Marine Drugs*, 9(12), pp.1359-1367.
- Plomgaard, P., K. Bouzakri, R. Krogh-Madsen, B. Mittendorfer, J. Zierath and B. Pedersen. 2005. Tumor Necrosis Factor- Induces Skeletal Muscle Insulin Resistance in Healthy Human Subjects via Inhibition of Akt Substrate 160 Phosphorylation. *Diabetes*. 54(10): 2939-2945.
- Putri. K. H. 2011. *Pemanfaatan Rumput Laut Coklat (Sargassum sp.) Sebagai Serbuk Minuman Pelangsing Tubuh*. Departemen Teknologi Hasil Perairan. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Rolo, A., Teodoro, J. and Palmeira, C. 2012. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), halaman 59-69.
- Schwabe, R. 2006. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- $\alpha$ -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(4): pp.G583-G589.
- Shevchenko, N.M., T.A. Kuznetsova., N.N. Besednova., A.N. Mamaev., A.P.Momot., T.N.Zvyagintseva. 2003. Anticoagulant activity of fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* of the Okhotsk sea. *Bull. Exp. Biol. Med.* 136, 471-473.
- Sugiono, Simon Bambang Widjanarko, Loekito Adi Soehono. 2014. Extraction Optimization by Response Surface Methodology and Characterization of Fucoidan from Brown Seaweed *Sargassum polycystum*. Food Science and Technology Department, Brawijaya University, Malang.
- Sulisetijono. 2009. Bahan Serahan Alga. Malang: UIN Malang.
- Sumida, Y., Niki, E., Naito, Y. and Yoshikawa, T. 2013. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radical Research*, 47(11): pp.869-880.

Srivastava, R., Srivastava, N. and Aversa, M. 2000. Dietary cholic acid lowers plasma levels of mouse and human apolipoprotein A-I primarily via a transcriptional mechanism. *European Journal of Biochemistry*, 267(13): pp.4272-4280.

Takahashi Y., Soejima, Y., Fukusato, T. 2012. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 18(19): 2300-2308.

Tan, Y., Jin, X., Lao, W., Kim, J., Xiao, L. and Qu, X. 2015. Antiresistin RNA Oligonucleotide Ameliorates Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice through Attenuating Proinflammatory Cytokines. *BioMed Research International*, halaman.1-13.

Taylor, C. and Rudbeck, L. 2013. Education guide - Immunohistochemical Staining Methods. 6th ed. [Glostrup]: Dako Denmark A/S, halaman 10-18.

Teng, H., Yazong Y., Hengyun W., Liu Zundong., Liu Zhichao., Yanhong M., et al. 2015. Fucoidan Suppresses Hypoxia-Induced Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis in Mouse Hepatocarcinoma. *Mar. Drugs* 13(6): 3514-3530.

Wahyuni E.S., Kusumastuty I., Budiarti M.E. 2013. Pengaruh pemberian tepung sorgum (*Sorghum Bicolor* L) terhadap jumlah foam cell aorta torasika pada tikus putih (*Rattus norvegicus* strain wistar) yang diberi diet aterogenik. *Jurnal Jurnal Kedokteran Brawijaya*.

Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. 2003. Tumor Necrosis Factor Signaling. *Cell Death and Differentiation*, 10(1), halaman 45-65.