

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL ALGA COKLAT

(*Sargassum* sp.) TERHADAP EKSPRESI TNF- α AORTA TIKUS

(*Rattus norvegicus*) STRAIN WISTAR DIET ATEROGENIK

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum



Oleh:

Hafidh Alyza Rachman

155070101111080

PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL ALGA COKLAT
(*Sargassum sp.*) TERHADAP EKSPRESI TNF- α AORTA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) STRAIN WISTAR DIET ATEROGENIK**

Oleh:

Hafidh Alyza Rachman

NIM 155070101111080

Telah diuji pada

Hari:

Tanggal:

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

dr. Nurul Hidayati, M.Sc.

NIP.197707062005012001

Pembimbing-I/Penguji-II

Pembimbing-II/Penguji-III

dr. Bayu Lestari, M.Biomed

NIP.198602012010121004

Aswaty Nur, S.Si., M.Kes

NIK.20130682091920001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran,

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

NIP. 196310221996012001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Hafidh Alyza Rachman

NIM : 155070101111080

Program Studi : Program Studi Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar benar hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila dikemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 10 November 2018

Yang membuat pernyataan,

Hafidh Alyza Rachman,

NIM. 155070101111080

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi bimbingan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Pengaruh Ekstrak Etanol Alga Coklat (*Sargassum* sp.) Terhadap Ekspresi TNF Aorta Tikus (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar Diet Aterogenik”.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. dr. Bayu Lestari, M.Biomed sebagai pembimbing pertama yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membimbing saya dengan sabar dan senantiasa memberi semangat sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
2. Aswaty Nur, S.si, M.Kes, sebagai pembimbing kedua yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membimbing saya dengan sabar dan senantiasa memberi semangat sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
3. Dr. Nurul Hidayati, M.Sc yang telah meluangkan waktu dan bersedia menjadi dosen penguji dalam sidang Tugas Akhir serta memberikan saran sehingga saya dapat menyempurnakan Tugas Akhir ini.
4. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan saya kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. dr. Triwahju Astuti, M.Kes, SpP(K), selaku Ketua Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
6. Keluarga orang tua tercinta, Slamet dan Siti Khanifah beserta adik, Nadif dan Liza yang telah memberikan dukungan, do'a, serta motivasi yang tiada henti.

7. Bu Fer dan Mas Memet sebagai staff Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

8. Mbak Ami staff biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

9. Mas Mizan staff Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini

10. Teman satu penelitian Nabilah, Lisa, Faizna, Ocha, Prima yang telah bersama-sama membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

11. Teman-temanku BPI HMPD Abhipraya yang selalu menyemangati Acha, Caca, Hani, Sita dan teman-teman PBL 13 yang selalu membawa keceriaan selama dihiruk pikuk masa perkuliahan.

12. Sahabat-sahabatku tercinta yang selalu mengerti dan menemani jika sedang membutuhkan refreshing Jaya, Dila, Hidayana, Sony, Novan, Vitara, Birrul, Khansa, Nurul Huda, serta seluruh anggota Himambis dan Khuul.

13. Teman-temanku dari SD, SMP, dan SMA yang telah menemani penulis dari awal perjuangan

14. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhirnya, semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 10 November 2018

Penulis

ABSTRAK

Rachman¹, Hafidh Alyza Rachman. 2018. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Alga Coklat (*Sargassum* sp.) terhadap Ekspresi TNF- α Aorta Tikus (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar Diet Aterogenik.** Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing (1) dr.Bayu Lestari, M.Biomed. (2) Aswaty Nur, S.Si, M.Kes.

Diet aterogenik memicu peningkatan kadar kolesterol plasma yang berakibat pada penimbunan LDL (*Low Density Lipoprotein*) pada lapisan tunica intima dan tunica media aorta sehingga memicu proses aterosklerosis. Penimbunan LDL pada lapisan arteri akan memicu peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang berakibat pada timbulnya respon inflamasi vaskuler. Respon inflamasi vaskuler diperankan oleh sitokin inflamasi TNF- α yang dihasilkan oleh makrofag pada saat proses oksidasi LDL. Pencegahan aterosklerosis dapat dilakukan dengan agen antiinflamasi, salah satu agen inflamasi adalah fucoidan yang terdapat pada ekstrak etanol *Sargassum* sp. Penelitian eksperimantal laboratorik ini bertujuan mengetahui pengaruh ekstrak etanol *Sargassum* sp terhadap ekspresi TNF- α aorta pada tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar yang diinduksi diet aterogenik. Metode penelitian adalah *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* dengan menggunakan 30 ekor tikus. Tikus dibagi menjadi 6 kelompok yakni kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan dosis 1 (150 mg/kgBB), dosis 2 (300 mg/kgBB), dosis 3 (600 mg/kgBB), dan simvastain (4 mg/kgBB). Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan perbedaan nilai yang signifikan ($p < 0,05$) pada pemberian ekstrak etanol *Sargassum* sp pada tikus yang diinduksi diet aterogenik. Pemberian dosis *Sargassum* sp 150 mg/KgBB mampu menurunkan ekspresi TNF- α aorta yang signifikan ($p < 0,05$) dibanding kelompok dosis lain. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol *Sargassum* sp pada tikus yang diinduksi diet aterogenik dapat menurunkan ekspresi TNF- α .

Kata kunci: Diet aterogenik, *Rattus norvegicus* strain Wistar, ekstrak etanol *Sargassum* sp, LDL (*Low Density Lipoprotein*), aterosklerosis, Tumor Necrosis Factor - α (TNF- α), antiinflamasi

ABSTRACT

Rachman¹, Hafidh Alyza Rachman. 2018. **Effect of Ethanolic Extract of Brown Algae (*Sargassum* sp.) Against TNF- α Aortic Expression on *Rattus norvegicus* Wistar Strain with Atherogenic Diet.** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya Supervisors: (1) dr.Bayu Lestari, M.Biomed. (2) Aswaty Nur, S.Si, M.Kes.

Atherogenic diet triggers an increase in plasma cholesterol levels which results in the accumulation of LDL in tunica intima and tunica media layers which stimulates the atherosclerosis process. The mass of LDL in the arterial layers will cause ROS increase which results in the emergence of a vascular inflammatory response. The trigger of vascular inflammatory response is inflammatory cytokines TNF- α produced by macrophages during the LDL oxidation process. However, it is possible to prevent the atherosclerosis process by utilizing antiinflammation agents such as fucoidan found in the ethanolic extract of *Sargassum* sp. This experimental laboratory study aims to determine the effect of ethanolic extract of *Sargassum* sp on TNF- α aorta expression in *Rattus norvegicus* induced by atherogenic diets. The research method used is Randomized Post Test Only Controlled Group Design using 30 rats which consisted of 6 groups: negative control, positive control, dose 1 (150 mg / kg body weight), dose 2 (300 mg / kg body weight), dose 3 (600 mg / kg body weight), and simvastatin (4 mg / kg body weight). The One-Way ANOVA test showed that the administration of ethanolic extract of *Sargassum* sp in atherogenic diet-induced rats could reduce aortic TNF- α expression significantly ($p < 0.05$). Furthermore, the dosage of this extract which had the best effect was 150 mg / Kg body weight ($p < 0.05$).

Keyword: Atherogenic diet, *Rattus norvegicus*, Ethanolic extract of *Sargassum* sp, LDL (Low-Density Lipoprotein), Atherosclerosis, (TNF- α), antiinflammation

DAFTAR ISI

Judul.....	i
Lembar Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Gambar.....	x
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Lampiran.....	xii
Daftar Singkatan.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Luaran yang Diharapkan.....	4
1.5 Kegunaan.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Diet Aterogenik.....	6
2.1.1 Kolesterol.....	6
2.2 Aterosklerosis.....	7
2.2.1 Patogenesis Ateroskleosis.....	7
2.3 Profil TNF- α (<i>Tumor Necrosis Factor -α</i>).....	9
2.3.1 <i>Signaling</i> TNF- α	9
2.4 <i>Sargassum</i> sp.....	11
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	13
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	13
3.2 Uraian Kerangka Konsep.....	14
3.3 Hipotesis.....	15
3.3.1 Hipotesis Umum.....	15
3.3.2 Hipotesis Khusus.....	15

BAB 4 METODE PENELITIAN.....	16
4.1 Desain Penelitian.....	16
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	17
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian.....	17
4.4 Variabel Penelitian.....	18
4.5 Definisi Oprasional.....	18
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	19
4.7 Metode Pengumpulan dan Pengolahan Data.....	20
4.8 Jadwal Kegiatan.....	20
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA.....	22
5.1 Ekspresi TNF- α	22
5.1.1 Hasil Uji Normalitas Data dan Uji Homogenitas.....	24
5.1.2 Hasil Uji <i>One-Way ANOVA</i>	25
5.1.3 Hasil Uji <i>Post-Hoc Tuckey</i>	26
5.1.4 Korelasi Dosis <i>Sargassum sp</i> denga Ekspresi TNF- α	27
BAB 6 PEMBAHASAN.....	29
6.1 Keterbatasan Penelitian.....	33
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
7.1 Kesimpulan.....	34
7.2 Saran.....	34
Daftar Pustaka.....	35
Lampiran.....	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar 5.1 Grafik Rata-Rata Jumlah Ekspresi TNF- α aorta.....23

Gambar 5.2 Ekspresi TNF- α aorta.....24

Gambar 5.3 Grafik scatter uji korelasi *Pearson*.....28



DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Rata Rata Ekspresi TNF- α Aorta.....23

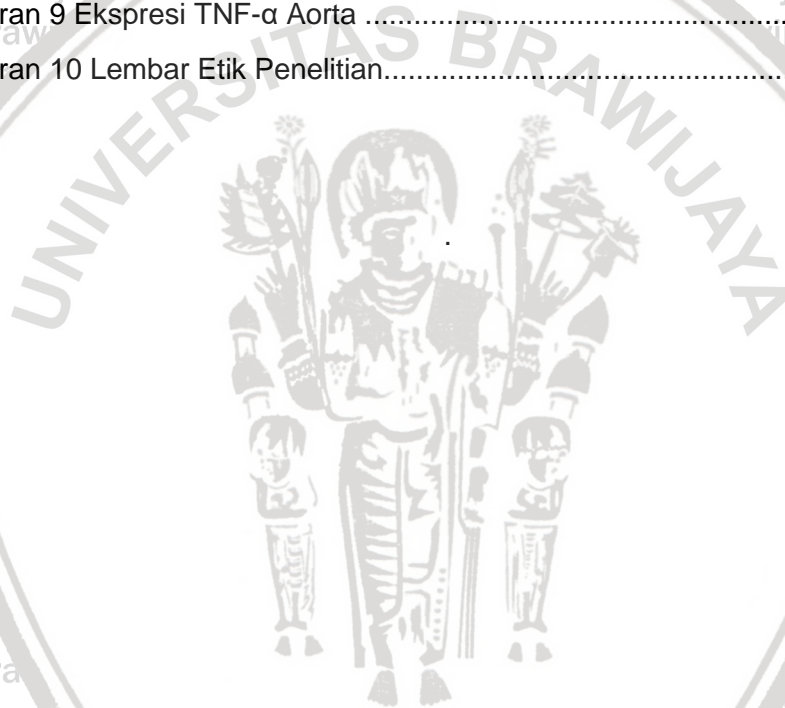
Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas TNF- α Aorta.....25

Tabel 5.3 Hasil Uji *Post-Hoc* Rata-Rata Ekspresi TNF- α Aorta.....26



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Alat dan Bahan.....	40
Lampiran 2 Pembedahan Hewan Coba.....	43
Lampiran 3 Pembuatan Slide dan Pengecatan Imunohistokimia.....	44
Lampiran 4 Hasil Uji Normalitas.....	46
Lampiran 5 Hasil Uji Homogenitas.....	46
Lampiran 6 Hasil Uji One Way ANOVA.....	47
Lampiran 7 Hasil Uji Post Hoc Tuckey.....	47
Lampiran 8 Hasil Uji Korelasi Pearson.....	48
Lampiran 9 Ekspresi TNF- α Aorta	48
Lampiran 10 Lembar Etik Penelitian.....	51



DAFTAR SINGKATAN

LDL	: <i>Low Density Lipoprotein</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor –α</i>
NO	: <i>Nitrik Oksida</i>
VCAM -1	: <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
TNFR1	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>
TNFR2	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 2</i>
TRADD	: <i>TNF receptor-associated death domain</i>
FADD	: <i>Fass-associated death dommain</i>
TRAF2	: <i>TNF receptor-associated factor 2</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide adenine dinucleotide fosfat</i>
IKK	: <i>Ikappa B (IκB) kinase</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
NF-K β	: <i>Nuclear factor kappa B</i>
RIP-1	: <i>Reseptor –interacting protein 1</i>
TG	: <i>Trigliserida</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Spesies</i>
MCP-1	: <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
SIRT1	: <i>Silent information regulator type-1</i>

ABSTRAK

Rachman, Hafidh Alyza Rachman. 2018. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Alga Coklat (*Sargassum* sp.) terhadap Ekspresi TNF- α Aorta Tikus (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar Diet Aterogenik**. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing (1) dr.Bayu Lestari, M.Biomed. (2) Aswaty Nur, S.Si, M.Kes.

Diet aterogenik memicu peningkatan kadar kolesterol plasma yang berakibat pada penimbunan LDL (*Low Density Lipoprotein*) pada lapisan tunica intima dan tunica media aorta sehingga memicu proses aterosklerosis. Penimbunan LDL pada lapisan arteri akan memicu peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang berakibat pada timbulnya respon inflamasi vaskuler. Respon inflamasi vaskuler diperankan oleh sitokin inflamasi TNF- α yang dihasilkan oleh makrofag pada saat proses oksidasi LDL. Pencegahan aterosklerosis dapat dilakukan dengan agen antiinflamasi, salah satu agen inflamasi adalah fucoidan yang terdapat pada ekstrak etanol *Sargassum* sp. Penelitian eksperimantal laboratorik ini bertujuan mengetahui pengaruh ekstrak etanol *Sargassum* sp terhadap ekspresi TNF- α aorta pada tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar yang diinduksi diet aterogenik. Metode penelitian adalah *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* dengan menggunakan 30 ekor tikus. Tikus dibagi menjadi 6 kelompok yakni kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan dosis 1 (150 mg/kgBB), dosis 2 (300 mg/kgBB), dosis 3 (600 mg/kgBB), dan simvastatin (4 mg/kgBB). Uji *One-Way ANOVA* menunjukkan perbedaan nilai yang signifikan ($p < 0,05$) pada pemberian ekstrak etanol *Sargassum* sp pada tikus yang diinduksi diet aterogenik. Pemberian dosis *Sargassum* sp 150 mg/KgBB mampu menurunkan ekspresi TNF- α aorta yang signifikan ($p < 0,05$) dibanding kelompok dosis lain. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol *Sargassum* sp pada tikus yang diinduksi diet aterogenik dapat menurunkan ekspresi TNF- α .

Kata kunci: Diet aterogenik, *Rattus norvegicus* strain Wistar, ekstrak etanol *Sargassum* sp, LDL (*Low Density Lipoprotein*), aterosklerosis, Tumor Necrosis Factor - α (TNF- α), antiinflamasi

ABSTRACT

Rachman¹, Hafidh Alyza Rachman. 2018. **Effect of Ethanolic Extract of Brown Algae (*Sargassum* sp.) Against TNF- α Aortic Expression on *Rattus norvegicus* Wistar Strain with Atherogenic Diet.** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya Supervisors: (1) dr.Bayu Lestari, M.Biomed. (2) Aswaty Nur, S.Si, M.Kes.

Atherogenic diet triggers an increase in plasma cholesterol levels which results in the accumulation of LDL in tunica intima and tunica media layers which stimulates the atherosclerosis process. The mass of LDL in the arterial layers will cause ROS increase which results in the emergence of a vascular inflammatory response. The trigger of vascular inflammatory response is inflammatory cytokines TNF- α produced by macrophages during the LDL oxidation process. However, it is possible to prevent the atherosclerosis process by utilizing antiinflammation agents such as fucoidan found in the ethanolic extract of *Sargassum* sp. This experimental laboratory study aims to determine the effect of ethanolic extract of *Sargassum* sp on TNF- α aorta expression in *Rattus norvegicus* induced by atherogenic diets. The research method used is Randomized Post Test Only Controlled Group Design using 30 rats which consisted of 6 groups: negative control, positive control, dose 1 (150 mg / kg body weight), dose 2 (300 mg / kg body weight), dose 3 (600 mg / kg body weight), and simvastatin (4 mg / kg body weight). The One-Way ANOVA test showed that the administration of ethanolic extract of *Sargassum* sp in atherogenic diet-induced rats could reduce aortic TNF- α expression significantly ($p < 0.05$). Furthermore, the dosage of this extract which had the best effect was 150 mg / Kg body weight ($p < 0.05$).

Keyword: Atherogenic diet, *Rattus norvegicus*, Ethanolic extract of *Sargassum* sp, LDL (Low-Density Lipoprotein), Atherosclerosis, (TNF- α), antiinflammation

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sekarang ini penyakit kardiovaskuler sudah menjadi penyebab terbesar kasus kematian di Dunia. Menurut data WHO pada tahun 2008 sebanyak 57 juta kematian di dunia, 36 juta diantaranya disebabkan oleh penyakit tidak menular yang salah satunya secara jumlah terbanyak disebabkan oleh kasus penyakit kardiovaskuler. Di kawasan Asia Tenggara sendiri 25% dari total kematian disebabkan oleh penyakit kardiovaskuler (WHO, 2011). Salah satu mekanisme timbulnya penyakit kardiovaskuler adalah proses aterosklerosis. Aterosklerosis disebabkan oleh adanya timbunan endapan lemak di seluruh kedalaman tunika intima (lapisan sel endotel) dan akhirnya ke tunika media (lapisan otot polos) yang makin lama semakin menebalkan dinding arteri (Corwin, 2009). Proses aterosklerosis terjadi sejak anak-anak dan semakin berkembang di usia dewasa, pada umur 8-18 tahun lesi ateroma mulai terbentuk dan berkembang, pada usia 25 tahun lesi berubah menjadi bentuk lanjut lalu pada umur 50-60 tahun manifestasi klinis penyakit sering muncul yang disebabkan oleh disrupsi plak (Orford dan Selwyn, 2005). Pola makan tinggi lemak diyakini merupakan penyebab utama timbulnya aterosklerosis melalui proses peningkatan LDL (*Low Density Lipoprotein*) (Arkhaesi, 2008). Dislipidemia didefinisikan sebagai kondisi abnormalitas pada metabolisme lemak yaitu hiperkolesteremia dan hipertrigliserida. Kondisi ini dapat muncul sebagai akibat dari pola makan yang tidak seimbang, kurangnya aktivitas, serta dapat juga dipengaruhi oleh faktor genetik (Mahamuni *et al*, 2012). Berdasarkan data WHO tahun 2008 dislipidemia didefinisikan suatu kondisi dimana total kolesterol plasma lebih dari 5mmol/L (190

mg/dl) prevalensi kawasan asia tenggara sendiri memiliki nilai 30,3% dan di kawasan pasifik barat sebesar 36,7% keduanya lebih rendah daripada di kawasan eropa dan amerika masing masing sebesar 53,7% dan 47,7%. Di Indonesia sendiri prevalensi dislipidemia dalam rentang umur ≥ 25 secara keseluruhan yaitu sebesar 36% , pada laki laki yaitu sebesar 33,1% dan pada perempuan sebesar 38,2% dari total populasi (Martin *et al*, 2013). Salah satu terapi untuk dislipidemia adalah menggunakan statin. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa penggunaan statin sebagai terapi dapat menurunkan insiden penyakit jantung koroner serta penurunan LDL-C secara signifikan (Baigent *et al*, 2005). Namun perlu disadari bahwa penggunaan statin dalam dosis yang tinggi mampu meningkatkan resiko efek samping seperti myopati (Rallidis *et al*, 2012). Penggunaan statin dalam jangka waktu beberapa tahun berakibat pada kerusakan fungsi kognitif otak seperti berkurangnya konsentrasi (FDA, 2012).

Hiperkolesteremia sendiri merupakan suatu kondisi dimana kadar kolesterol dalam darah melebihi batas normal. Hiperkolesteremia akan menyebabkan peningkatan radikal bebas yang secara langsung akan merusak endotel ,meningkatkan permeabilitas, serta memicu adhesi leukosit pada dinding endotel. Pada pembuluh darah terutama arteri kondisi hiperkolesteremia kronik akan menyebabkan penimbunan LDL dalam lapisan *tunica intima* di daerah dengan permeabilitas endotel yang meningkat. Kondisi ini akan menyebabkan terjadinya cedera endotel. Pelepasan radikal bebas akan memicu proses oksidasi LDL serta kan memicu aktivitas makrofag untuk menghasilkan sel busa yang merupakan pencetus terbentuknya plak ateroma. Mekanisme inflamasi juga memberikan peran penting pada proses aterogenesis terutama dalam hal progresivitas lesi aterosklerosis. Proses inflamasi ini dihasilkan oleh makrofag saat proses oksidasi LDL dimana akan dihasilkan interleukin -1 (IL-1) dan $\text{TNF-}\alpha$ yang akan memicu peningkatan adhesi leukosit ke sel endotel terutama monosit yang akan masuk ke

dalam tunika intima dan berubah menjadi makrofag yang akan memicu reaksi berantai dari proses inflamasi (Kumar *et al*, 2007; Schoen, 2005).

Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui dari banyaknya jenis *Sargassum* sp yang ada di Indonesia, *Sargassum polycystum* merupakan alga coklat yang meliki kandungan fucoidan paling banyak (Sugiono *et al*, 2014).

Fucoidan telah menjadi subyek yang menarik untuk diteliti karena memiliki berbagai sifat farmakologis seperti antiobesitas, antivirus, antikanker, antitumor anti inflamasi anti oksidan dan masih banyak yang lain. Banyaknya manfaat yang diperoleh dari fucoidan membuat zat ini sangat potensial digunakan untuk terapi, kosmetik dan industri makanan (Wijesinghe *et al*, 2012). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa fucoidan memiliki potensi untuk digunakan sebagai agen anti inflamasi. Fucoidan mampu mengurangi keluhan yang berat pada tahap awal infeksi *Staphylococcus aureus* pada tikus dengan model arthritis, serta menunda proses signaling sel leukosit yang berperan dalam proses fagosit (Verdrengh *et al*, 2000). Penelitian menggunakan fucoidan dari ekstrak alga coklat spesies *E.cava* menunjukkan bahwa fucoidan memiliki kemampuan untuk mengurangi produksi nitrit oksida (NO) dari makrofag Raw 264,7. Sehingga fucoidan dari ekstrak *E.cava* merupakan agen antiinflamasi yang kuat (Lee *et al*, 2012).

Dengan demikian penelitian ini ditujukan untuk melihat ekspresi TNF melalui pemberian ekstrak etanol *Sargassum* sp. Diharapkan ekstrak etanol *Sargassum* sp dapat mengurangi proses inflamasi melalui hambatan produksi sitokin TNF- α pada lapisan *tunica intima* dan *tunica media* aorta tikus wistar jantan sehingga dapat mengurangi proses aterosklerosis pada kasus penyakit kardiovaskuler.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian ekstrak etanol dari *Sargassum* sp mampu mempengaruhi ekspresi TNF- α aorta pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak?
2. Apakah ada korelasi antara dosis ekstrak etanol *Sargassum* sp dengan ekspresi TNF- α aorta tikus yang diinduksi diet tinggi lemak?

1.3 Tujuan

Tujuan Umum

Membuktikan potensi ekstrak etanol *Sargassum* sp yang dapat mempengaruhi ekspresi TNF- α aorta pada penyakit aterosklerosis.

Tujuan Khusus

Mengetahui potensi ekstrak etanol *Sargassum* sp dalam mempengaruhi ekspresi TNF- α aorta pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak

1.4 Luaran yang Diharapkan

1. Pengembangan penelitian molekuler lebih lanjut baik secara *in vitro* maupun *in vivo* serta hewan model lainnya terhadap potensi ekstrak etanol *Sargassum* sp sehingga dapat digunakan sebagai herbal yang bermanfaat.
2. Peluang publikasi dalam jurnal-jurnal ilmiah dan mendapatkan paten tentang produksi anti inflamasi pada proses aterosklerosis.

1.5 Kegunaan

Manfaat Keilmuan:

Dapat dijadikan sebagai dasar teori dalam pengembangan penelitian kesehatan terkait dengan aterosklerosis dan ekstrak etanol *Sargassum* sp

dengan melakukan penelitian lanjutan terhadap berbagai parameter molekular lainnya yang terkait.

Manfaat Aplikatif:

Dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan bagi pengembangan herbal tersandar untuk *Sargassum* sp melalui berbagai uji yakni uji toksisitas, uji *in vivo*, uji *in vitro*, hingga uji klinis terkait dengan pencegahan aterosklerosis.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diet Aterogenik

Hiperkolesterolemia merupakan suatu kondisi dimana kadar kolesterol dalam darah melebihi batas normal. Kondisi ini timbul akibat produksi dan atau penggunaan LDL (*Low Density Lipoprotein*) yang meningkat. Hiperkolesteremia dapat disebabkan oleh pola hidup dengan kebiasaan diet tinggi lemak (Sherer, 2001; Murray, 2003). 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). Pemberian diet aterogenik selama 8 minggu yang terdiri dari 4 gr kolesterol, 0,4 gr asam kolat, dan 8 ml minyak babi dapat meningkatkan kadar kolesterol darah (Murwani *et al*, 2006)

2.1.1 Kolesterol

Kolesterol adalah salah satu lemak tubuh yang berada dalam bentuk bebas dan ester dengan asam lemak, serta merupakan komponen utama selaput sel otak dan saraf (Murray *et al*, 2003). Sel-sel jaringan tubuh memerlukan kolesterol untuk tumbuh dan berkembang secara semestinya. Sel-sel ini menerima kolesterol dari LDL (*Low Density Lipoprotein*). Meskipun demikian jumlah kolesterol yang dapat diterima atau diserap oleh sel ada batasnya. Bila kita makan banyak lemak jenuh atau bahan makanan yang kaya akan kolesterol, maka kadar LDL dalam darah kita tinggi. Kolesterol

sangat diperlukan dalam berbagai proses metabolisme tubuh, misalnya

(Murray *et al*, 2003) :

1. Sebagai bahan pembentuk dinding sel.
2. Membuat asam empedu untuk mengemulsikan lemak.
3. Untuk membuat vitamin D.
4. Berperan sebagai bahan pembuat hormon-hormon seks dan kortikosteroid atau hormon yang dapat mempengaruhi volume dan tekanan darah, kadar gula darah, otot, serta kekebalan tubuh.

2.2 Aterosklerosis

Aterosklerosis merupakan pencetus utama berbagai kondisi penyakit seperti infark miokard maupun penyakit yang ada kaitanya dengan kelainan cerebrovaskuler. Aterosklerosis sering dijumpai pada pembuluh darah terutama pada arteri sedang dan besar yang merupakan sebuah proses inflamasi.

Aterosklerosis erat kaitanya dengan berbagai faktor resiko seperti kondisi kolesterol plasma yang tinggi serta hipertensi. Aterosklerosis berkembang melalui beberapa tahapan dimulai dari adanya cedera serta *disfungsi endotel* ,diikuti proses ekspresi molekul adhesi leukosit serta proses sekresi sitokin inflamasi,dilanjutkan dengan pembentukan sel busa (*foam cell*), pembentukan plak ateroma, hingga menimbulkan komplikasi saat adanya ruptur dari plak tersebut (McLaren *et al*, 2011).

2.2.1 Patogenesis Aterosklerosis

Mekanisme terjadinya aterosklerosis didasari oleh konsep hipotesis respons terhadap cedera yang merupakan gabungan teori lama dan. Proses aterosklerosis diawali proses cedera endotel yang disebabkan oleh banyak faktor seperti hiperkolesteremia dan gangguan hemodinamik. Kondisi hiperkolesteremia kronik

menyebabkan gangguan relaksasi vaskuler yang diperankan oleh endotel yang akan mengakibatkan terjadinya *shear stress* lokal yang akan mengganggu hemodinamika vaskuler sehingga memicu ekspresi molekul adhesi leukosit maupun trombosit pada endotel, kedua kondisi ini mengakibatkan penurunan produksi *nitrik oksida* (NO) sehingga permeabilitas pembuluh darah dan adhesi leukosit maupun trombosit ke endotel akan meningkat sebagai respon kompensasi tubuh.

Ekspresi VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) yang muncul setelah adanya cedera endotel akan menyebabkan adhesi leukosit. Molekul VCAM-1 akan mengikat monosit dan limfosit T, setelah monosit menempel di endotel monosit akan masuk ke dalam *tunica intima* melalui celah dari sel endotel. Selanjutnya monosit akan berubah menjadi makrofag.

Pada lesi cedera endotel terjadi akumulasi LDL pada dinding pembuluh darah serta proses modifikasi LDL melalui proses oksidasi akibat adanya oksigen toksik yang dihasilkan oleh makrofag. LDL tersebut akan teroksidasi dan masuk ke dalam makrofag melalui reseptor scavenger sehingga terbentuk sel busa. Selain itu makrofag juga menghasilkan sitokin inflamasi seperti *interleukin-1* (IL-1) dan *tumor necrosis factor* (TNF) yang akan memicu semakin banyaknya adhesi monosit pada endotel. Proses ini terjadi terus menerus hingga terbentuk *fatty streak* yang terdiri dari monosit, lipid dan makrofag yang mencerna LDL yang teroksidasi bersama-sama dengan limfosit T.

Cedera endotel juga menyebabkan terlepasnya zat-zat vasoaktif seperti sitokin dan faktor pertumbuhan. Proses radang yang terjadi menyebabkan migrasi dan proliferasi sel-sel otot polos membentuk sebuah lesi yang dinamakan ateroma. Proliferasi sel-sel otot pada *tunica intima* dan matriks ekstrasel

mengakibatkan akumulasi kolagen dan proteoglikan, mengubah *fatty streak* menjadi suatu atheroma *fibrofatty* yang matang dan menyokong pertumbuhan lesi aterosklerotik yang progresif. *Fatty streaks* yang progresif berkembang menjadi lesi sedang dan lanjut, kemudian akan membentuk *fibrous cap* yang berbatasan dengan lumen pembuluh darah. *Fibrous cap* menutupi campuran dari lekosit, lemak dan debris seluler yang membentuk suatu pusat nekrotik (Kumar et al, 2007 ; Schoen, 2005).

2.3 Profil TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)

Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) merupakan agen pro inflamasi yang utama yang dihasilkan setelah terjadi proses trauma, infeksi maupun paparan bakteri turunan LPS. TNF- α berperan penting dalam reaksi berantai dari sitokin sehingga sering disebut sebagai “master regulator” dari proses pro inflamasi (Maini *et al*, 1995). TNF- α merupakan sitokin yang diproduksi oleh makrofag, monosit, a diposit, sel otot polos serta fibroblast. Pada seluruh sel kecuali eritrosit terdapat reseptor dari sitokin TNF- α yaitu reseptor TNFR1 dan reseptor TNFR2. Kedua reseptor ini memiliki peran dan afinitas ikatan yang berbeda. TNFR1 dapat berikatan dengan protein TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) yang mengaktifasi apoptosis sel melalui protein FADD (*Fass-associated death domain*) atau melalui proses inflamasi melalui *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2). Sedangkan reseptor TNFR2 tidak dapat mengaktifasi proses apoptosis melalui jalur TRADD/FADD namun dapat melalui jalur TRAF 2 (Aggarwal, 2003).

2.3.1 Signaling TNF- α

Inflamasi merupakan salah satu respon biologis tubuh yang meningkat sebagai respon atas berbagai rangsangan dan kondisi yang berpotensi merusak tubuh seperti radiasi sinar ultraviolet, bahan-bahan iritan, infeksi atau kerusakan

sel. Inflamasi dicirikan dengan kondisi seperti kemerahan, peningkatan suhu, nyeri serta mengubah fungsi fisiologis normal dari suatu organ (Wynn, 2008). Beberapa bukti penelitian telah mengatakan bahwa TNF- α merupakan sitokin inflamasi pleiotropic dalam rangkaian proses inflamasi yang memegang peranan penting dalam proses inflamasi vaskuler. TNF- α meningkatkan aktivitas ROS dengan mengaktifasi jalur NADPH oksidase di endotelium (Kleinbongard *et al*, 2010).

Proses regulasi TNF secara biologis erat kaitannya dengan 2 tipe reseptor dari TNF yaitu TNFR1 dan TNFR2 (Liu, 2005). Ikatan antara TNF dengan reseptor memicu terjadinya reaksi yang kompleks dari aktivasi reseptor TNF serta memberikan efek yang beragam pada sel (Baud *et al*, 2001). Interaksi antara TNF dengan reseptor TNFR1 akan memicu ekspresi TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*), selanjutnya TRADD akan memicu 3 mediator lain yaitu RIP 1 (*Reseptor-interacting protein 1*), FADD (*Fas-associated death domain protein*) FADD serta TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor 2*) (Hsu *et al*, 1996). Interaksi antara TNF dengan reseptor TNFR2 akan secara langsung mengaktifasi protein TRAF2 (Rothe *et al*, 1994). TRAF2 memerankan peranan penting dalam proses awal pada aktivasi reseptor TNFR1 dan TNFR2 dimana TRAF2 akan mengaktifasi jalur IKK (*I κ B kinase*) dan MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*). RIP-1 protein memiliki beberapa domain fungsional yaitu C terminal death domain (DD) (Stanger *et al*, 1995). RIP-1 dapat meaktifasi NF- κ B. Penelitian menyebutkan bahwa RIP-1 berperan penting dalam mengaktifasi NF- κ B tanpa mengaktifasi MAPK (Kelliher *et al*, 1998). TRADD juga berinteraksi terhadap aktivitas FADD yang merupakan protein yang akan berinteraksi dengan FAS yang merupakan salah satu reseptor TNF lainnya (Nagata, 1999). TNFR1 dapat menginduksi apoptosis melalui aktivasi protein FADD (Hsu *et al*, 1996).

2.4 *Sargassum* sp

Secara taksonomi *Sargassum* sp termasuk dalam kelompok berikut (ITIS,2004) :

Kingdom : *Chromista*

Subkingdom : *Chromista*

Divisi : *Phaeophyta*

Class : *Phaeophyceae*

Ordo : *Fucales*

Family : *Sargassaceae*

Keluarga Sargassaceae (Alga coklat) telah digunakan sebagai bahan baku makanan serta obat tradisional di negara Korea dan China. Beberapa zat bioaktif yang dapat diperoleh dari Sargassaceae adalah meroterpenoid, phlorotannins, fucoxantin dan fucosterol (Liu *et al*, 2012).

Kemampuan *Sargassum* sp. sebagai obat berhubungan dengan bidang farmakologi disebabkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder.

Metabolit sekunder merupakan substansi bioaktif yang dikembangkan melalui berbagai penelitian untuk dijadikan obat alternatif. Salah satu metabolit adalah

fucoidan yaitu suatu komponen biologi aktif yang menarik untuk dikaji (Shevchenko *et al*, 2007). Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui dari

banyaknya jenis *Sargassum* sp yang ada di Indonesia, *Sargassum polycystum* merupakan alga coklat yang meliki kandungan fucoidan paling banyak (Sugiono

et al, 2014). Fucoidan dapat diekstraksi dari *Sargassum* sp. Dengan menggunakan metode ultrasona, kombinasi metode ekstraksi menggunakan degradasi

melalui gelombang ultrasonic diikuti pemanasan menggunakan waterbath (Sugiono *et al*, 2014).

Fucoidan merupakan polisakarida yang tersusun dari L-fucose dan sulfat yang banyak terkandung dalam alga coklat (Nagumo *et al*, 1996). Fucoidan merupakan sulfat polisakarida yang paling banyak ditemukan dalam berbagai spesies alga coklat dan rumput laut coklat (Jiao *et al*, 2011). Selain sulfat polisakarida fucoidan juga mengandung galaktosa, mannan, xyloza, glukosa serta asam glukuronat dalam jumlah yang sedikit. Meskipun komposisi utama dari fucoidan adalah L-fucose dan sulfat, namun komposisi fucoidan ini sangatlah bervariasi di berbagai jenis alga coklat. Fucoidan yang diperoleh dari ekstrak *F. vesiculosus* memiliki komposisi 44,1% fucose, 26,3% sulfat, dan 31,1% ash serta tipikal L-fucose 20-45% (Black *et al*, 1953; Takashi *et al*, 1994). Penelitian lain menyebutkan bahwa ekstrak kasar dari alga coklat *E. cava* terdiri dari karbohidrat sebanyak 51%, asam uronik 11,3%, sulfat 20,1% dan protein sebanyak 8,7% lalu komposisi monosakarida yaitu fucose sebanyak 61,1%, galactosa 27,2%, xylose 7,0%, rhamnose 3,9% dan glukosa 0,8%. Fucoidan dari spesies lain yaitu *Sargassum stenophyllum* dan *L. japonica* masing-masing memiliki kandungan fucose 67,8% dan 62,1% (Durate *et al*, 2001).

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). Di Negara Korea, Jepang, Australia, dan Amerika fucoidan telah digunakan sebagai suplemen kesehatan yang sering dijadikan bahan tambahan pada industri minuman dan obat (Shen *et al*, 2018).

3.2 Uraian Kerangka Konsep

Aterosklerosis merupakan proses penebalan dinding pembuluh darah akibat penumpukan endapan lipid di lapisan tunika intima hingga lapisan tunika media. Proses ini umumnya terjadi di pembuluh darah yang bersifat elastis seperti arteri karotis maupun aorta serta pada arteri muskularis sedang dan besar (Corwin, 2009; Baroncini, 2008). Diet tinggi kolesterol erat kaitannya dengan terjadinya aterosklerosis. Diet tinggi kolesterol akan meningkatkan konsentrasi kolesterol terutama LDL dalam plasma darah. Radikal Bebas maupun ROS dapat menyebabkan oksidasi lipid serta oksidasi protein (Lee *et al*, 2004). Peningkatan radikal bebas ini akan menyebabkan kerusakan di berbagai sel maupun jaringan salah satunya endotel. Cedera pada endotel merupakan awal dari proses aterosklerosis dimana endotel akan mengirimkan sinyal kimiawi sehingga sel sel inflamasi seperti makrofag akan berkumpul pada lesi. Makrofag akan melepaskan sitokin inflamasi salah satunya TNF- α yang akan mengontrol reaksi berantai dari proses inflamasi. Proses ini diikuti dengan proses oksidasi LDL sehingga terbentuk oxLDL, oxLDL akan membentuk sel busa yang nantinya jika terakumulasi menjadi fatty streak, hal inilah yang dinamakan lesi aterosklerosis. Proses inflamasi akan mengirimkan sinyal agar sel sel fibroblast maupun sel sel otot polos untuk datang sehingga plak aterosklerosis akan ditutupi oleh lapisan yang dinamakan fibroateroma (Kumar *et al*, 2007). Fucoidan merupakan salah satu polisakarida yang tersusun dari L-fucose dan sulfat yang banyak terkandung dalam alga coklat (Nagumo *et al*, 1996). Ekstrak etanol *Sargassum hemiphyllum* memiliki kandungan sulfat polisakarida. Kandungan sulfat polisakarida mampu mengurangi produksi pro inflamasi seperti IL-1, IL6 dan TNF- α (Hwang *et al*, 2015).

3.3 Hipotesis

3.3.1. Hipotesis Umum

Tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dan diberi ekstrak etanol *Sargassum* sp. memiliki kadar TNF- α aorta yang lebih rendah dari pada kontrol, sehingga aterosklerosis dapat dicegah.

3.3.2 Hipotesis Khusus

1. Ekstrak etanol *Sargassum* sp menurunkan ekspresi TNF- α aorta pada tikus

(*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang diinduksi diet aterogenik

2. Dosis ekstrak etanol *Sargassum* sp berkorelasi negatif dengan ekspresi

TNF- α aorta pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet aterogenik

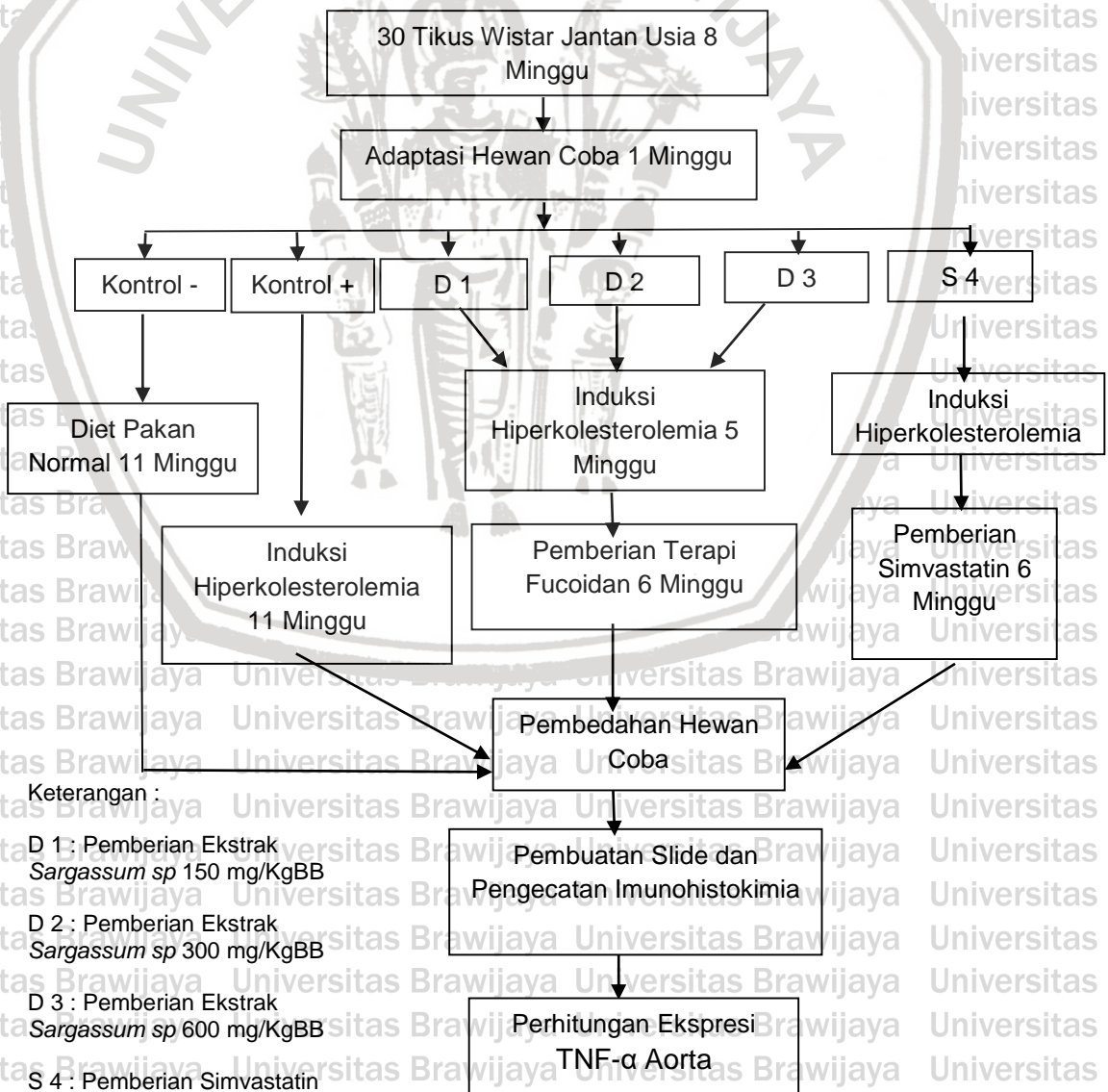


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni (*True Experiment Design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Subjek yang dipilih pada rancangan penelitian ini dibagi menjadi VI kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan D1, kelompok perlakuan D2, kelompok perlakuan D3, kelompok perlakuan S4.



4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus galur Wistar jantan berusia 8 Minggu.

4.2.2 Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus wistar yang diinduksi diet tinggi lemak dan kemudian diberikan perlakuan. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Supranto, 2007):

$$(p-1)(n-1) \geq 15 \quad p : \text{jumlah perlakuan, } n : \text{jumlah ulangan}$$

Pada penelitian ini $p = 6$ sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$5(n-1) \geq 15$$

$n-1 \geq 15:5$, $n \geq 4$ jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan adalah 4 ekor tikus wistar jantan. Total sampel yang digunakan adalah 24 sampel tikus wistar jantan.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Pemeliharaan hewan coba, induksi diet tinggi lemak, dan perlakuan pada hewan coba dilakukan di Unit Pemeliharaan hewan Lab. Farmakologi Universitas Brawijaya, Malang. Jaringan diproses dan diwarnai di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2017 - Februari 2018.

4.4 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah diet tinggi lemak, pemberian ekstrak etanol *Sargassum sp.*

b. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α pada aorta tikus *Rattus norvegicus* strain wistar

4.5 Definisi Operasional

a. Tikus

Tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar berkelamin jantan dengan usia 8 minggu yang diinduksi diet aterogenik.

b. Diet Aterogenik

Diet aterogenik adalah diet yang menginduksi aterogenik pada tikus selama 11 minggu dengan memberikan asupan pakan 30g/100gBB dengan komposisi PAR-S 405 gram, tepung terigu 202,5 gram, minyak babi 2 ml, asam kolat 0.02 gram, 1 gram kuning telur puyuh, dan air sebanyak 351 ml.

c. Ekstrak etanol *Sargassum sp*

Ekstrak etanol *Sargassum sp* diperoleh dari hasil ekstraksi dengan metode maserasi etanol 70%. *Sargassum sp* adalah salah satu jenis ganggang laut yang diambil dari pesisir Bangkalan Madura, Jawa Timur.

d. Ekspresi TNF- α

Ekspresi TNF diamati dengan metode kualitatif melalui penghitungan jumlah sel di lapisan tunica intima dan tunica media yang berwarna kuning

hingga kecoklatan pada perbesaran mikroskop 200x sebanyak 6 lapang pandang setelah sebelumnya jaringan ini dilakukan pengecatan secara imunohistokimia.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

1. Perawatan Tikus

Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm 30 buah, tutup kandang terbuat dari kawat 30 buah, botol air 30 buah, sekam 6 karung, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius, dan makanan dengan pelet.

2. Pemberian Diet Aterogenik Hewan Coba

Pemberian pakan tinggi lemak dengan komposisi total untuk semua tikus PAR-S 405 gram, tepung terigu 202,5 gram, minyak babi 2 ml, asam kolat 0.02 gram, dan 1 gram kuning telur puyuh.

3. Pemberian Paparan Ekstrak Etanol *Sargassum sp*

Pemberian dilakukan dengan cara menggunakan pipa orogastrik yang dihubungkan dengan spuit 3cc, kapas alkohol,

4. Pembedahan Tikus

Alat dan bahan : Gunting bedah, Pinset 2, Jarum pentul 2 set, Steroform 2, Kapas, Kloroform 20 ml, Alkohol, wadah plastik, tutup 25 buah, buffer formalin.

5. Pengecekan Ekspresi TNF- α

Fiksasi sel: organ aorta direndam dengan formalin dan dibiarkan selama minimal 24 jam. Organ ini kemudian dibuat paraffin blocknya kemudian dipotong dengan mikrotom (Laboratorium Patologi Anatomi). Setelah organ dipotong dengan mikrotom dan dilekatkan ke objek glass, dilakukan prosedur deparaffinisasi sebelum dilakukan pengecatan dengan Imunohistokimia. Pengecatan imunohistokimia dilakukan dengan

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni (*True Experiment Design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan rancangan *Randomized Post Test*

Only Controlled Group Design yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol *Sargassum* sp terhadap ekspresi TNF- α pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain

wistar yang diinduksi diet aterogenik. Pengaruh pemberian ekstrak etanol

Sargassum sp terhadap ekspresi TNF- α dinalisis dengan software SPSS v24

dengan metode *One-way Anova* jika sebaran data normal dan uji nonparametrik

(uji *Kruskal-Wallis*) jika sebaran data tidak normal. Sebelum melakukan uji *One-*

way Anova diperlukan syarat uji parametrik yaitu uji normalitas dan uji

homogenitas. Jika nilai analisa *One-way Anova* $< 0,05$ dapat dilakukan analisa

Post-hoc untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok

perlakuan.

5.1 Ekspresi TNF- α

Setelah tikus diinduksi dengan diet aterogenik selama 11 minggu dan diberikan paparan ekstrak etanol *Sargassum* sp dilakukan

pembedahan, penghitungan ekspresi TNF- α dilakukan dengan mengambil organ

aorta lalu dilakukan pemotongan jaringan serta pengecatan dengan metode

immunohistokimia. Ekspresi TNF- α dihitung dari jumlah sel di lapisan tunica intima

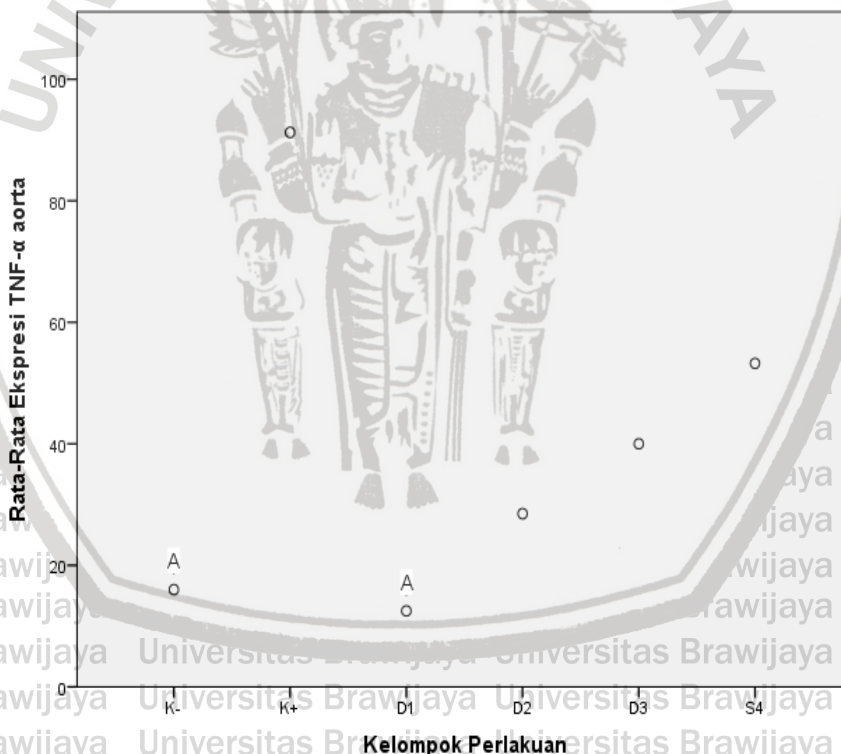
dan media yang mengekspresikan warna coklat. Jumlah rata-rata ekspresi TNF- α

pada semua kelompok disajikan dalam tabel dan gambar grafik berikut :

Tabel 5.1 Rata Rata Ekspresi TNF- α Aorta Tiap Kelompok Tikus DietAterogenik dengan Pemberian Ekstrak Etanol *Sargassum*

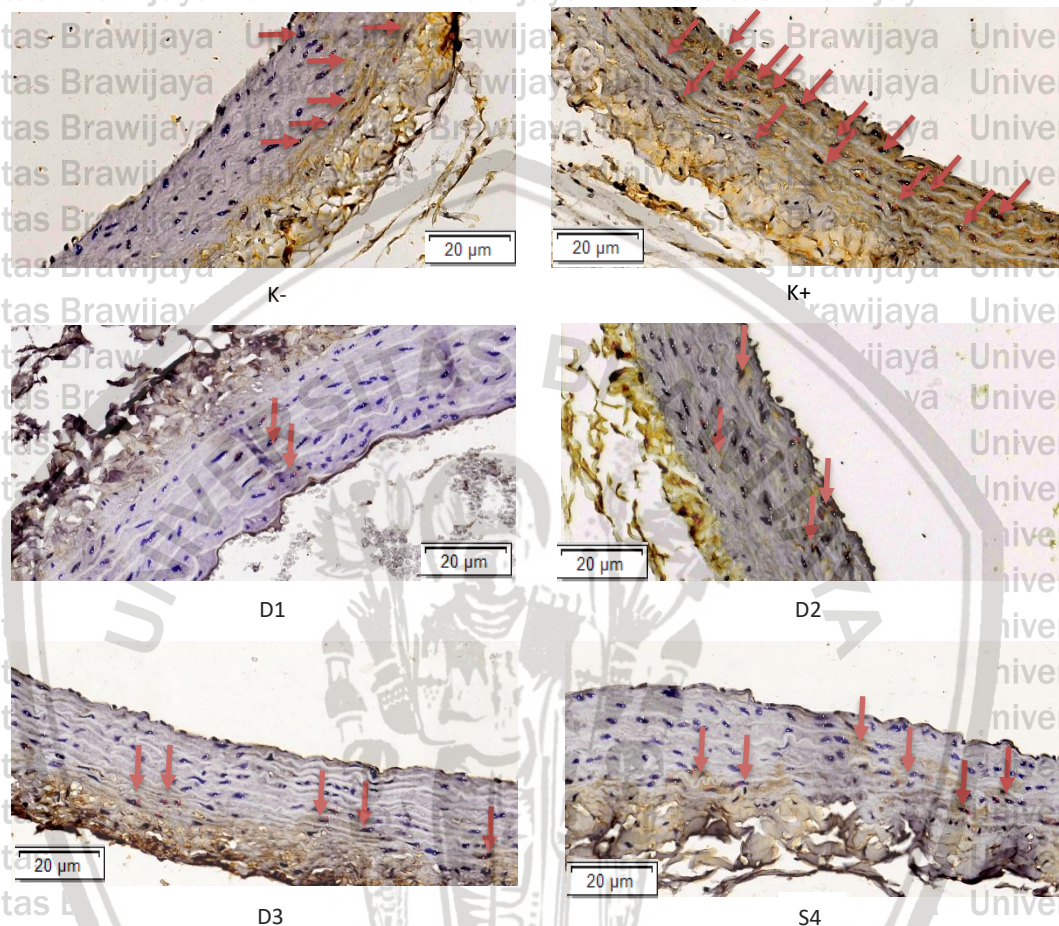
Perlakuan	Rata-Rata Ekspresi TNF \pm Standart Deviasi
K(-)	16,00 \pm 20,913
K(+)	91,25 \pm 42,664
D1	12,50 \pm 11,269
D2	28,50 \pm 24,947
D3	40,00 \pm 34,108
S4	53,25 \pm 28,500

Keterangan : K- (diet normal tanpa induksi diet aterogenik); K+ (Induksi diet aterogenik); D1 (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* sp 150 mg/KgBB); D2 (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 300 mg/KgBB); D3 (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 600mg/KgBB); S4 (Induksi diet aterogenik + simvastatin 4mg/KgBB).

Gambar 5.1 Grafik rata-rata jumlah ekspresi TNF- α aorta untuk semua kelompok percobaan

Keterangan : K- (diet normal tanpa induksi diet aterogenik); K+ (Induksi diet aterogenik); D1 (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* sp 150 mg/KgBB); D2 (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 300 mg/KgBB); D3 (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 600mg/KgBB); S4 (Induksi diet aterogenik + simvastatin 4mg/KgBB). ^A p<0,05 dibandingkan dengan K(+)

Adapun ekspresi dari TNF- α aorta dari 6 kelompok percobaan dilihat dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 200x, hasilnya dapat disajikan pada gambar berikut :



Gambar 5.2 Ekspresi TNF- α aorta dilihat dengan menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran total 200x. Tanda panah menunjukkan ekspresi TNF- α

Keterangan : K- (diet normal tanpa induksi diet aterogenik); K+ (Induksi diet aterogenik); D1(Induksil diet aterogenik + *Sargasssum* sp 150 mg/KgBB); D2 (Induksi diet aterogenik + *Sargasssum* 300 mg/KgBB); D3 (Induksi diet aterogenik + *Sargasssum* 600mg/KgBB); S4 (Induksi diet aterogenik + simvastatin 4mg/KgBB). Dari hasil pemaparan ekstrak etanol *Sargasssum* sp tampak ekspresi TNF- α pada kelompok D1 memiliki jumlah ekspresi paling rendah (12,50) dan berbeda signifikan dengan kelompok K+ ($p < 0,05$).

5.1.1 Hasil Uji Normalitas Data dan Uji Homogenitas

Langkah pertama sebelum melakukan uji parametrik adalah dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas dilakukan dengan metode *Shapiro Wilk Test* untuk mengetahui normalitas distribusi rerata TNF- α aorta. Hasil dari uji

normalitas untuk ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kelompok perlakuan 1 (dosis 150 mg/KgBB *Sargassum* sp), kelompok perlakuan 2 (dosis 300 mg/KgBB *Sargassum* sp), kelompok perlakuan 3 (dosis 600 mg/KgBB *Sargassum* sp), serta kelompok perlakuan 4 (dosis 4 mg/KgBB Simvastatin) disajikan pada tabel 5.1 berikut :

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas TNF- α Aorta Tiap Kelompok Tikus Diet Aterogenik dengan Pemberian Ekstrak Etanol *Sargassum* sp

	P-value
K-	0,256
K+	0,471
D1	0,620
D2	0,077
D3	0,624
S4	0,980

Keterangan : K- (diet normal tanpa induksi diet aterogenik); K+ (Induksi diet aterogenik); D1(Induksil diet aterogenik + *Sargassum* sp 150 mg/KgBB); D2 (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 300 mg/KgBB); D3 (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 600mg/KgBB); S4 (Induksi diet aterogenik + ssimvastatin 4mg/KgBB).

Tabel 5.2 didapatkan nilai signifikansi $p > 0,05$ untuk semua kelompok. Maka dapat disimpulkan persebaran data normal. Setelah melakukan uji normalitas *Shapiro Wilk Test* maka dilakukan uji homogenitas varian data untuk mengetahui homogenitas sampel dalam penelitian. Hasil dari uji homogenitas varian didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,478 ($p > 0,05$) yang menunjukkan bahwa data bersifat homogen. Dari kedua hasil uji diatas maka syarat untuk melakukan uji *One-way Anova* dapat terpenuhi.

5.1.2 Hasil Uji *One-way Anova*

Data hasil penelitian yang memenuhi uji normalitas dan uji homogenitas selanjutnya dilakukan uji parametrik *One-way Anova* untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan pada rata rata ekspresi TNF- α disetiap sampel.

Hasil analisa *One-way Anova* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,012

($p < 0,05$) artinya terdapat perbedaan yang bermakna pada jumlah ekspresi TNF- α pada masing-masing kelompok perlakuan. Dengan demikian, hipotesis dari penelitian ini (H1) diterima dan (H0) ditolak yaitu ekstrak etanol *Sargassum* sp secara signifikan menurunkan ekspresi TNF- α pada aorta tikus wistar yang diinduksi diet aterogenik. Secara deskriptif ekspresi TNF- α aorta paling sedikit yaitu pada kelompok perlakuan 1 dengan pemberian ekstrak etanol *Sargassum* sp 150 mg/kgBB dan ekspresi TNF- α aorta paling banyak terdapat pada kelompok kontrol positif dengan diet aterogenik.

5.1.3 Hasil Uji *Post-Hoc* Tuckey

Setelah dilakukan uji One-way ANOVA, analisis dilanjutkan dengan menggunakan *Post-Hoc* Tuckey. Hasil uji *Post-Hoc* rata-rata ekspresi TNF- α aorta tikus pada masing-masing kelompok perlakuan diperlihatkan pada tabel

Tabel 5.3 Hasil Uji *Post-Hoc* Ekspresi TNF- Aorta Tiap Kelompok Tikus Diet Aterogenik dengan Pemberian Ekstrak Etanol *Sargassum* sp

Perlakuan	K-	K+	D1	D2	D3	S4
K -		0,018*	1,000	0,989	0,841	0,474
K+	0,018*		0,012*	0,061	0,171	0,453
D1	1,000	0,012*		0,967	0,755	0,380
D2	0,989	0,061	0,967		0,992	0,824
D3	0,841	0,171	0,755	0,992		0,985
S4	0,474	0,453	0,380	0,824	0,985	

Keterangan : K- (diet normal tanpa induksi diet aterogenik); K+ (Induksi diet aterogenik); D1(Induksil diet aterogenik + *Sargassum* sp 150 mg/KgBB); D2 (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 300 mg/KgBB); D3 (Induksi diet aterogenik + *Sargassum* 600mg/KgBB); S4 (Induksi diet aterogenik + *ssimvastatin* 4mg/KgBB).*=signifikansi $p < 0,05$

Tabel 5.3 Menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi TNF- α aorta kelompok diet aterogenik (K+) berbeda signifikan kelompok diet normal (K-) dan kelompok dengan pemberian ekstrak etanol *Sargassum* sp sebanyak 150 mg/KgBB (D1).

Kelompok normal (K-) dan Kelompok diet aterogenik (K+) tidak memiliki perbedaan signifikan terhadap kelompok diet aterogenik dengan pemberian ekstrak etanol

Sargassum sp sebanyak 300 mg/KgBB (D2); kelompok diet aterogenik dengan pemberian ekstrak etanol *Sargassum* sp sebanyak 600 mg/KgBB (D3); kelompok diet aterogenik dengan pemberian simvastatin sebanyak 4 mg/KgBB (S4).

5.1.4 Korelasi Dosis *Sargassum* sp dengan Ekspresi TNF- α

Uji Korelasi dilakukan dengan metode *Pearson* untuk mengukur kekuatan dan arah hubungan linier dari dua variabel yang dinyatakan dalam koefisien korelasi. Uji korelasi dilakukan untuk menilai hubungan pemberian beberapa tingkatan dosis ekstrak etanol *Sargassum* sp dengan ekspresi TNF- α aorta. Adapun pengelompokan nilai korelasi *pearson* adalah sebagai berikut (Sugiyono, 2007):

Nilai Korelasi 0 - 0,199 = sangat lemah

Nilai Korelasi 0,150 - 0,399 = lemah

Nilai Korelasi 0,300 - 0,599 = sedang

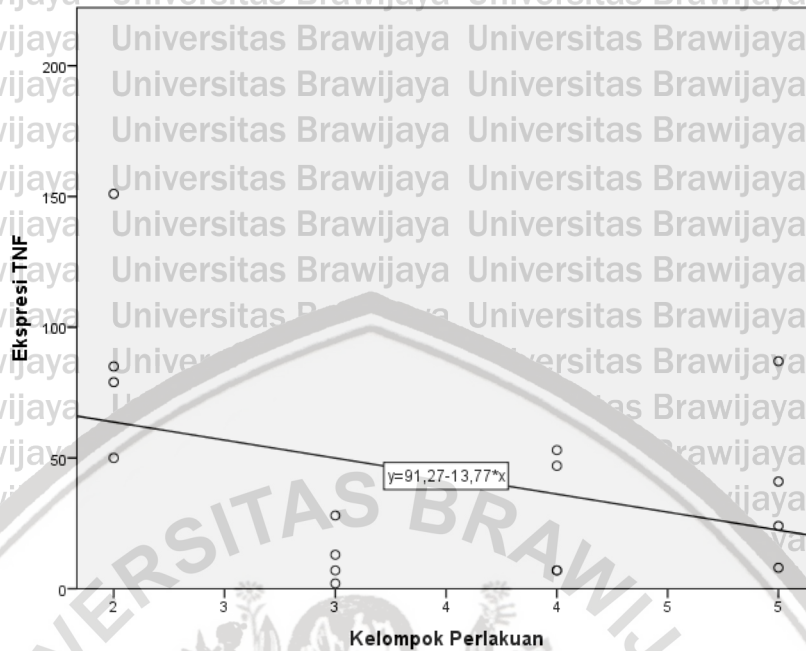
Nilai Korelasi 0,600 - 0,799 = kuat

Nilai Korelasi 0,600 - 1,00 = sangat kuat

Korelasi dapat bernilai positif maupun negatif. Korelasi bernilai positif menunjukkan arah yang searah dengan variabel, sedangkan korelasi bernilai negatif menunjukkan arah yang berlawanan dengan variabel. Adapun hasil dari uji korelasi *Pearson* adalah sebagai berikut :

1. Nilai $p = 0,137$, yang menandakan terdapat korelasi yang tidak signifikan antara dosis ekstrak etanol *Sargassum* sp dengan rerata ekspresi TNF- α aorta.
2. Nilai korelasi (r) = 0,389 yang berarti korelasi antara dosis ekstrak etanol *Sargassum* sp. Dengan ekspresi TNF- α aorta lemah.
3. Arah korelasi negatif, sehingga disimpulkan semakin tinggi dosis ekstrak etanol *Sargassum* sp., semakin menurun rerata ekspresi TNF- α aorta.

Hasil dari uji korelasi *Pearson* jika disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.3 berikut :



Gambar 5.3 Grafik scatter uji korelasi *Pearson* pada kelompok K+,D1,D2,dan D3

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni (*True Experiment Design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Sargassum* sp terhadap ekspresi TNF- α pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diinduksi diet aterogenik. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar berkelamin jantan yang digunakan dalam penelitian ini berusia 8 minggu yang diinduksi diet aterogenik dan dipapar dengan ekstrak etanol *Sargassum* sp.

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 proses oksidasi LDL pada endotel yang menyebabkan peningkatan sitokin TNF- α akibat produk *scavenger* yang dihasilkan oleh makrofag dari proses oksidasi LDL (Kumar *et al*, 2007). TNF- α merupakan sitokin proinflamasi yang berperan sebagai "*master regulator*" dari proses inflamasi, produksi TNF- α oleh makrofag akan menyebabkan reaksi berantai dari proses inflamasi (Maini *et al*, 1995). Hal memicu semakin banyak monosit yang akan menempel pada dinding endotel lalu masuk dan berubah menjadi makrofag, yang nantinya akan berpengaruh pada proses aterogenesis di lapisan tunica intima dan tunica media dari arteri (Kumar *et al*, 2007).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata kadar TNF- α aorta pada kelompok diet aterogenik (K+) memiliki perbedaan signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok diet normal (K-). Terdapat peningkatan jumlah ekspresi rata rata pada kelompok diet aterogenik (K+) yaitu sebesar $91,25 \pm 42,664$ dibandingkan dengan kelompok diet normal (K-) yaitu sejumlah $16,00 \pm 20,913$. Pada penelitian yang menggunakan hewan coba berupa kelinci putih *New Zealand* jantan yang diinduksi diet tinggi kolesterol selama 10 minggu menunjukkan perbedaan kadar TNF- α yang signifikan antara kelompok kontrol (diet normal) dengan kelompok yang diinduksi diet tinggi kolesterol. Kadar TNF- α 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). Penelitian lain dengan pemberian diet aterogenik pada tikus (*Rattus Norvegicus*) selama 8 minggu akan menyebabkan peningkatan produksi sel busa pada lapisan tunica intima dan tunica media di arcus aorta (Murwani *et al*, 2013). Sel busa merupakan hasil dari proses oksidasi dari LDL oleh makrofag yang ada pada endotel pada proses pembentukan aterosklerosis. Proses oksidasi oleh makrofag akan meningkatkan produksi sitokin TNF- α (Kumar *et al*, 2007).

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). Penelitian lain menyebutkan bahwa 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*, 2005).

Pemberian ekstrak *Sargassum* sp dengan dosis 150 mg/KgBB pada tikus yang diinduksi diet aterogenik (D1) menunjukkan penurunan ekspresi TNF- α aorta yang signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok diet aterogenik (K+).

Penentuan dosis *Sargassum* sp pada didasarkan penelitian sebelumnya tentang studi potensi *endothelial protection* dan aktivitas enzim antioksidan dari Pemberian ekstrak *Sargassum echinocarpum* pada hewan coba model diabetes yang diinduksi sterptozocin. Pemberian *Sargassum echinocarpum* dengan dosis 150 mg/KgBB, 300 mg/KgBB, dan 450 mg/KgBB secara signifikan menunjukkan efek proteksi pada endotel dengan meningkatkan kadar enzim antioksidan untuk melawan ROS agar disfungsi endotel dapat dicegah (Firdaus *et al*, 2010).

Penurunan ekspresi TNF- α aorta pada penelitian ini sesuai dengan penelitian menggunakan metode sonde dengan sulfat polisakarida dari ekstrak etanol *Sargassum hemiphyllum* yang diberikan kepada tikus BABLb/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- α pada metode penghitungan kadar menggunakan ELISA (Hwang *et al*, 2015).

Pemberian ekstrak etanol *Sargassum* sp pada dosis yang lebih tinggi menunjukkan ekspresi TNF- α aorta yang lebih banyak. Belum banyak studi yang menjelaskan mengenai dosis efektif dari ekstrak etanol *Sargassum* sp dalam menurunkan ekspresi TNF- α , khususnya ekspresi TNF- α pada aorta pada tikus yang diinduksi diet aterogenik. Penelitian sebelumnya pada kultur sel neutrofil

manusia yang diberi paparan fucoidan 10 µg/ml dari ekstrak *Undaria pinnatifida* selama 24 jam dimana kadar TNF-α yang diukur melalui metode ELISA mengalami peningkatan jumlah (Jin dan Yu, 2015). Pemberian ekstrak etanol *Sargassum sp* juga memiliki efek protektif terhadap pembentukan ROS. Pembentukan ROS merupakan proses awal terjadinya inflamasi yang dicetuskan oleh TNF-α dapat dicegah dengan pemberain antioksidan. Pemberian antioksidan dengan konsentrasi rendah dapat secara signifikan menunda atau menghambat proses oksidasi (Halliwell dan Gutteridge, 2015).

Penurunan ekspresi TNF-α aorta pada kelompok perlakuan *Sargassum sp* dosis 150 mg/KgBB lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan Simvastatin 4mg/KgBB. Belum banyak studi yang menunjukkan adanya pengaruh langsung dari simvastatin terhadap hambatan proses inflamasi yang dicetuskan oleh TNF-α, khususnya TNF-α aorta pada tikus yang diinduksi diet aterogenik. Menurut penelitian sebelumnya simvastatin dapat mencegah apoptosis sel progenitor endotel yang diinduksi TNF-α melalui peningkatan ekspresi SIRT1 (*silent information regulator type-1*) (Du et al, 2014). Simvastatin pada studi *in vivo* mikroskopik konfokal dapat melakukan blokade *rolling* dan adhesi pada leukosit yang diinduksi TNF-α melalui penghambatan interaksi ICAM-1 oleh karena sifat lipofilik dari simvastatin bukan karena mekanisme kerja statin sebagai inhibitor enzim HMG-CoA reduktase (Dick et al., 2015). Pemberian atrovastatin dapat mencegah infiltrasi makrofag, mengurangi ekspresi MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) serta aktivitas NF-κB (*nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*) yang diinduksi oleh TNF-α pada hewan coba kelinci model aterosklerosis (Niwa et al, 1996).

6.1 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dari penelitian ini adalah tidak dilakukan pengukuran secara kuantitatif terhadap kadar TNF dari aorta yakni dengan metode ELISA karena keterbatasan dana. Dalam penelitian ini juga belum mengisolasi komponen bioaktif

Sargassum sp yakni fucoidan secara khusus serta kurangnya referensi *range* dosis efektif dari ekstrak etanol *Sargassum* sp.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak etanol *Sargassum* sp menurunkan ekspresi TNF- α aorta tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar dengan diet aterogenik pada pemberian dosis 150 mg/KgBB.

2. Peningkatan dosis ekstrak etanol *Sargassum* sp memiliki korelasi yang tidak signifikan terhadap ekspresi TNF- α aorta tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar dengan diet aterogenik.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan peneliti menyarankan hal-hal sebagai berikut :

1. Penelitian lebih lanjut terhadap berbagai zat aktif pada *Sargassum* sp yang mempengaruhi kadar TNF- α aorta tikus dengan diet aterogenik.

2. Penelitian lebih lanjut mengenai dosis efektif *Sargassum* sp. sebagai penghambat ekspresi TNF- α aorta tikus dengan diet aterogenik dan uji toksisitas LD50 pada ekstrak tersebut.

3. Penelitian ini harus dilengkapi dengan pengujian kadar TNF- α aorta tikus melalui metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal B.B., Kumar A., Bharti A.C. 2003. *Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies*. *Anticancer Research* 23 : 363-398
- Arkhaesi, Nahwa. 2008. *Kadar Malondialdehyde (MDA) Serum Sebagai Indikator Prognosis Keluaran pada Sepsis Neonatorum*. Tesis. Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis-1 Ilmu Kesehatan Anak Universitas Diponegoro, Semarang.
- Baigent C., Keech A., Kearney P.M., Blackwell L., Buck G., Pollicino C, et al. 2005. *Efficacy and safety of cholesterol lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins*. *Lancet*; 366:1267e78.
- Baud V., Karin M. 2001. *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. *Trends Cell Biol.*372–377
- Baroncini L.A., de Oliveira A., Vidal E.A., França, G.J., Stahlke P.S., Alessi, A., Prêcoma D.B. 2008. *Appropriateness of carotid plaque and intima-media thickness assessment in routine clinical practice*. *Cardiovascular ultrasound*, 6, 52.
- Black, W.A.P., Cornhill, W.J., Dewar, E.T., Woodward, F.N. 1953. *Manufacture of algal chemicals. VI.-Laboratory-scale isolation of l-fucose from brown marine algae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81–91
- Corwin E.J. 2009. *Buku Saku Patofisiologi*, edisi 3 revisi. Jakarta. EGC
- Dick, M., MacDonald, K., Tardif, J. C., & Leask, R. L. 2015. *The effect of simvastatin treatment on endothelial cell response to shear stress and tumor necrosis factor alpha stimulation*. *Biomedical engineering online*, 14, 58. doi:10.1186/s12938-015-0057-x
- Du G., Song, Y., Zhang, T., Ma L., Bian N., Chen X., Li Z. 2014. *Simvastatin attenuates TNF- α -induced apoptosis in endothelial progenitor cells via the upregulation of SIRT1*. *International Journal of Molecular Medicine*.34. 177-182.
- Durate M. E. R., Cardoso M. A., Nosedá M. D., Cerezo A. S. 2001. *Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum**. *Carbohydrate Research*, 333, 281–293.

Firdaus M., Astawan M., Muchtadi D., Wresdiyati T., Waspadji S., Karyono S.S. 2010. *Prevention of endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by Sargassum echinocarpum extract*. Med J Indones 2010; 19:32-5

Food and Drug Administration (FDA). 2012. *FDA Expands Advice on Statin Risks*. Available from : www.fda.gov/diakses 10 November 2018 jam 16.00

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th Edition, Oxford University Press, New York

Hsu H., Shu H.B., Pan M.G., Goeddel D.V. 1996. *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell.;84(2):299-308. PubMed PMID: 8565075

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

ITIS. 2004. *Taxonomy of Sargassum sp.* www.itis.gov. Diakses 10 November 2018 jam 15.00

Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H.S. 2011. *Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae*. Mar Drugs.9(2):196-223

Jin Jun-O., Yu Qing. 2015. *Fucoidan delays apoptosis and induces pro-inflammatory cytokine production in human neutrophils*. International Journal of Biological Macromolecules. 73:65-71

Kelliher M.A., Grimm S., Ishida Y., Kuo F., Stanger B.Z., Leder P. 1998. *The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal*. Immunity.8(3):297-303

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

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.

Kleinbongard P., Heusch G., Schulz R. 2010. *TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure*. Pharmacology & Therapeutics, 127(3),295–314

Kumar, Abbas, Fausto, Mitchel. 2007. Robbins Basic Pathology. 8th edition. Elsevier: p343-353

Lee J., Koo N., Min D.B. 2004. *Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals*. Compre Rev. in Food Sci. and Food Safety. 3:21-33

Lee S.H., Ko C.I., Ahn G., You S., Kim J.S., Heu M.S., et al. 2012. *Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from Ecklonia cava*. Carbohydr Polym.;89(2):599-606.

Liu L., Heinrich M., Myers S., Dworjany S.A. 2012. *Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed Sargassum in Traditional Chinese Medicine: A phytochemical and pharmacological review*. Journal of Ethnopharmacology, 142(3), 591–619

Liu Z.G. 2005 . *Molecular mechanism of TNF signaling and beyond*. Cell Res. 15 (1) 24–27

Li N., Zhang Q., Song J. 2005. *Toxicological evaluation of fucoidan extracted from Laminaria japonica in Wistar rats*. Food Chem Toxicol ;43(3):421-6.

Mahamuni S.P., Khose R.D., Menea F., Badole S.L. 2012. *Therapeutic approaches to drug targets in hyperlipidemia*. BioMedicine;2:137e46

Maini R.N., Elliott M.J., Brennan F.M., Feldmann M. 1995. *Beneficial effects of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) blockade in rheumatoid arthritis (RA)*. Clin Exp Immunol.101(2):207–212. [PubMed: 7648705]

Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, et al. 2013. Friedewald-estimated versus directly measured low-density lipoprotein cholesterol and treatment implications. J Am Coll Cardiol. 2013;62:732e739

McLaren J.E., Michael D.R., Ashlin T.G., Ramji D.P. 2011. *Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy*. Prog Lipid Res .2011;50:331–47

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., dan Rodwell, V.W. 2003. *Biokimia Harper*. Edisi 25. Jakarta . Penerbit Buku Kedokteran EGC. Halaman 270

Murwani S., Ali M., Muliarta K.. 2006. *Diet atherogenik pada tikus putih (Rattus novvergicus strain Wistar) sebagai model hewan aterosklerosis*. Jurnal Kedokteran Brawijaya.; 22: 6-12

Nagata S. 1999. *Fas ligand-induced apoptosis*. Annu. Rev Genet. 33, 29–55

Nagumo T., Nishino T., in Dumitriu S (Ed.). 1996. *Polysaccharides in Medicinal Applications*. Marcel Dekker. New York. pp. 545–574

Niwa S., Totsuka T., Hayashi S. 1996. *Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion. molecules on human monocyte cell line*. Int J Immunopharmacol ;18:669–675

Orford J.L and Selwyn A.P. 2005. *Atherosclerosis. Instant Access to the Mind of Medicine, Medicine*. Department of Internal Medicine, Brigham and Women's Hospital. Harvard Medical School

Rallidis L.S., Fountoulaki K., Anastasiou-Nana M. 2012. *Managing the underestimated risk of statin-associated myopathy*. International Journal of Cardiology. 159(3):169-76

Rothe M., Wong S.C., Henzel W.J., Goeddel DV. 1994. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. Cell.78(4):681-92

Schoen J.F., 2005. Blood Vessels. In: Kumar, Abbas, Fausto. Robbins and Cotran Pathologic Basis of disease. 7th ed. Elsevier Saunders: p.516-524.

Shen P., Yin Z., Qu G., Wang C. 2018. Fucoidan and Its Health Benefits. Bioactive Seaweeds for Food Applications, Academic Press. Pages 223-238

Sherer Y and Schoenfeld Y. 2001. Report on the European Atherosclerosis Society Workshop on the Immune System in Atherosclerosis.

Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. 2007. *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nat Protoc 1: 2856-2860

Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. 1995. *RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death*. Cell. May 19;81(4):513-23.

Sugiono, Widjanarko S.B., Soehono L.A. 2014. *Extraction Optimization by Response Surface Methodology and Characterization of Fucoidan from Brown Seaweed Sargassum polycystum*. Malang. Food Science and Technology Department, Brawijaya University

Sugiyono. 2007. *Metode Penelitian Pendidikan, Pendekatan Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung. Alfabeta

Supranto J. 2007. *Teknik Sampling untuk Survey dan Eksperimen*. Jakarta: Rineka Cipta

Takashi N., Nishioka C., Ura H., Nagumo T., 1994. *Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial Fucus vesiculosus fucoidan*. Carbohydrate Research 255, 213–224

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

Verdrengh M.H. 2000. Erlandsson-Harris, A. Tarkowski, European Journal of Immunology 30 1606–1613

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 novergicus strain wistar) yang diberi diet aterogenik*. Jurnal Jurnal Kedokteran Brawijaya

Wijesinghe W. A. J. P., and Jeon Y. J. 2012. *Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review*. Carbohydrate Polymers, 88, 13–20

World Health Organization. 2011. *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. ISBN: 978 92 4 156437 3.3-13

Wynn T. A. 2008. *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. The Journal of Pathology. 214, 199–210