

**POTENSI BIOAKTIF KARANG LUNAK *Sarcophyton* sp. SEBAGAI  
ANTI-INFLAMASI AKIBAT INDUKSI LIPOPOLYSACCHARIDE –  
INHIBITOR JALUR *MyD88* DEPENDENT**

**DISERTASI  
UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN  
MEMPEROLEH GELAR DOKTOR**



Oleh

**WENDY ALEXANDER TANOD  
NIM. 147080100111003**

**PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN  
MINAT TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN DAN KELAUTAN**

**PROGRAM PASCASARJANA  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG**

**2019**



**POTENSI BIOAKTIF KARANG LUNAK *Sarcophyton* sp. SEBAGAI  
ANTI-INFLAMASI AKIBAT INDUKSI LIPOPOLYSACCHARIDE –  
INHIBITOR JALUR *MyD88* DEPENDENT**

Oleh  
**WENDY ALEXANDER TANOD**  
**NIM. 147080100111003**

**Menyetujui,  
Komisi Pembimbing**

**Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA., Ph.D.**  
**Promotor**

**Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si.**  
**Ko-Promotor 1**

**Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si.**  
**Ko-Promotor 2**

**Mengetahui,  
Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**

**Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS.**  
**NIP. 196003221986011001**



## IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : Potensi Bioaktif Karang Lunak *Sarcophyton* sp. Sebagai Anti-inflamasi Akibat Induksi Lipopolysaccharide – Inhibitor Jalur MyD88 Dependent

Nama Mahasiswa : Wendy Alexander Tanod

NIM : 147080100111003

Program Studi : Ilmu Perikanan dan Kelautan

Minat : Teknologi Hasil Perikanan dan Kelautan

### KOMISI PEMBIMBING

Promotor : Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D.

Ko-promotor I : Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si.

Ko-promotor II : Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si.

### KOMISI PENGUJI

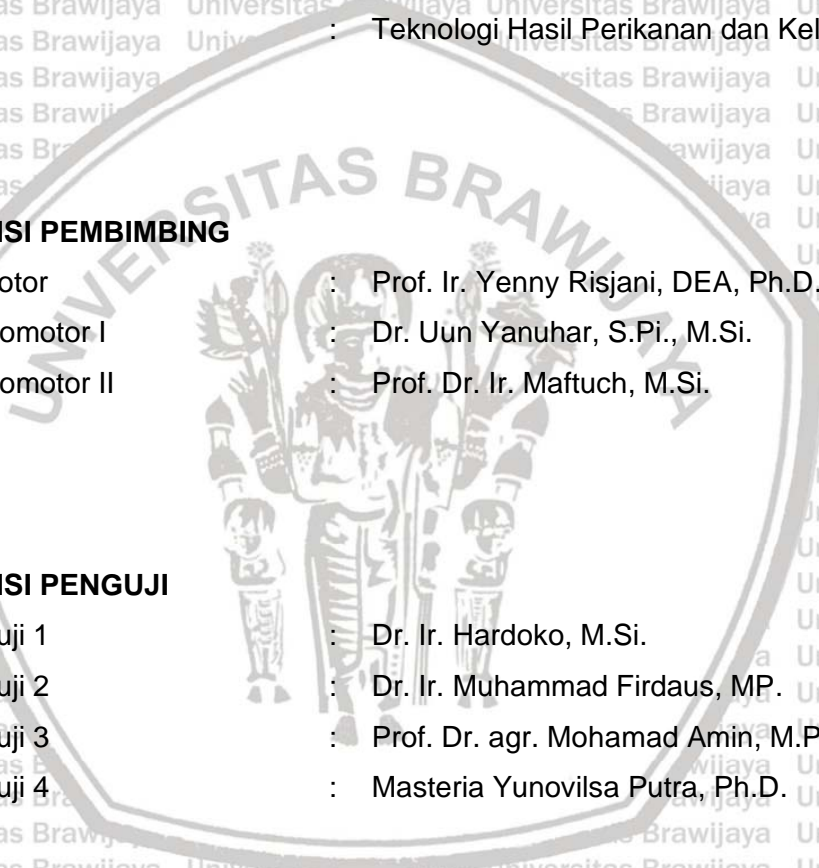
Penguji 1 : Dr. Ir. Hardoko, M.Si.

Penguji 2 : Dr. Ir. Muhammad Firdaus, MP.

Penguji 3 : Prof. Dr. agr. Mohamad Amin, M.Pd.

Penguji 4 : Masteria Yunovilsa Putra, Ph.D.

Tanggal Ujian : 16 September 2019



## PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah Disertasi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia Disertasi (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, September 2019  
Penulis



Wendy Alexander Tanod  
NIM. 147080100111003



# SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI

plagiarism-detector

Cutting-edge class tool for plagiarism detection and prevention

19 0110 D



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
PASCASARJANA



---

**SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI**  
Nomor: 1763/UN10.F40/PN/2019

Sertifikat ini diberikan kepada:

Nama	: Wendy Alexander Tanod
NIM	: 147080100111003
Program Studi	: Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan
Fakultas	: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas	: Universitas Brawijaya

Dengan Judul **Disertasi**  
**Potensi Bioaktif Karang Lunak *Sarcophyton sp.* Sebagai Anti-inflamasi Akibat Induksi *Lipopolysaccharide* - Inhibitor Jalur MyD88 Dependent**

Telah dideteksi tingkat plagiasinya secara online pada tanggal **19 Juli 2019**  
dan dinyatakan **bebas plagiasi** dengan kriteria toleransi  $\leq 5\%$ .



Direktur  
Prof. Dr. Muzono, M.Phil  
NIP. 196211161988031004

Malang, 23 Juli 2019  
Ketua Badan Penerbitan Jurnal



Indah Yanti, S.Si., M.Si.  
NIP. 19791129 200501 2 002





## RIWAYAT HIDUP



Wendy Alexander Tanod, lahir di Palu (Sulawesi Tengah) 25 Agustus 1986, anak kedua dari tiga bersaudara, dari pasangan suami-istri Johanes Bosco Tanod (alm) dengan Winda Agatha Tjora. Menamatkan Sekolah Dasar pada tahun 1997 di SD Katolik Santo Antonius Kota Palu Sulawesi Tengah, pada tahun 2000 tamat dari SMP Katolik Santo Paulus Kota Palu Sulawesi Tengah, dan pada tahun 2003 tamat dari SMA Negeri 1 Kota Palu Sulawesi Tengah. Kemudian pada tahun 2003, melanjutkan pendidikan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan

Universitas Sam Ratulangi Manado pada Program Studi Ilmu Kelautan dengan minat Kimia bahan Hayati Laut, dan tamat pada tahun 2008. Pada tahun 2008 melanjutkan pendidikan magister di Program Studi Ilmu Perairan dengan minat Biologi Sumberdaya Perairan Universitas Sam Ratulangi Manado, dan tamat pada tahun 2011. Pada tahun 2014 diterima sebagai mahasiswa program doktor (S3) di program pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada Program Studi Ilmu Perikanan dan Kelautan dengan minat Teknologi Hasil Perikanan dan Kelautan.

Sejak tahun 2009 sampai sekarang, bekerja sebagai staf pengajar di Sekolah Tinggi Perikanan dan Kelautan (STPL) Palu, Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Penulis pernah menjabat sebagai Kepala Laboratorium tahun 2012-2013 dan Sekretaris Program Studi Teknologi Hasil Perikanan tahun 2013-2014.

Malang, September 2019  
Penulis,

Wendy Alexander Tanod  
NIM.147080100111003



## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur dipanjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan kasih-Nya sehingga disertasi dengan judul: **“Potensi Bioaktif Karang Lunak *Sarcophyton* sp. Sebagai Anti-inflamasi Akibat Induksi *Lipopolysaccharide* – Inhibitor Jalur MyD88 Dependent ”** ini dapat terselesaikan dengan baik.

Penelitian dan penulisan disertasi ini bertujuan untuk memenuhi sebagian dari persyaratan guna memperoleh gelar Doktor, pada Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan dan merupakan kesempatan berharga sekali untuk mengeksplorasi potensi sumberdaya hayati laut dan menganalisisnya untuk kebutuhan farmasetika kelautan. Tanpa kesempatan, bimbingan, masukan, serta dukungan semangat dari berbagai pihak, tentunya disertasi ini tidak akan terwujud sebagaimana bentuknya saat ini.

Sehubungan dengan selesainya penulisan disertasi ini, penulis menyampaikan banyak terima kasih kepada pihak-pihak yang telah memberikan bantuan, baik moril maupun materil, yaitu :

- 1) Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR., MS., selaku Rektor Universitas Brawijaya;
- 2) Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS., selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya;
- 3) Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc., selaku Ketua Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya;
- 4) Kepala Dinas Kelautan dan Perikanan Propinsi Sulawesi Tengah dan Ketua Yayasan Pengembangan Sumberdaya Madani Sulawesi Tengah, yang telah memberikan restu kepada penulis untuk melanjutkan studi;
- 5) Dr. Ir. Minarny Gobel, M.Si., selaku Ketua Sekolah Tinggi Perikanan dan Kelautan (STPL) Palu yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melanjutkan studi;
- 6) Prof. Dr. Jasruddin, M.Si., selaku Kepala Lembaga Layanan Pendidikan Tinggi Wilayah IX Sulawesi yang telah memberikan izin dan rekomendasi kepada penulis untuk melanjutkan studi;
- 7) Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D., selaku Promotor yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk perbaikan disertasi ini;
- 8) Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si. dan Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si., selaku Ko-Promotor yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk perbaikan disertasi ini;
- 9) Para Tim Penguji Disertasi : Dr. Ir. Hardoko, M.Si., Dr. Ir. Muhammad Firdaus, MP., Prof. Dr. agr. Mohamad Amin, S.Pd., M.Si., dan Masteria Yunovilsa Putra, Ph.D. yang telah memberikan saran dan masukan untuk perbaikan disertasi ini;
- 10) Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan bantuan Beasiswa Program Pendidikan Dalam Negeri (BPPDN) dan hibah penelitian disertasi doktor;
- 11) Bpk. Johannes Bosco Tanod (Almarhum) dan Ibu Winda Agatha Tjora selaku orang tua kami; Bpk. Yasin Tampanawas (Almarhum) dan Ibu Sherly selaku mertua kami; Ferdy Marcel Tanod, A.Md.T dan Ardy Willyanto, ST



- selaku saudara kandung; Pikat Gakarya Lantang, SH, Avelino Jesse Tanod dan Klaris Avariela Jenaya Tanod selaku ipar dan keponakan;
- 12) Steffany Tampanawas, SE selaku Istri yang telah memberikan semangat, kesabaran, dan doa tak henti-hentinya;
  - 13) Dr. Ir. Samliok Ndobe, M.Si. dan Dr. Ir. Novalina Serdiati, M.Si. yang telah memberikan motivasi dan dukungan baik moril dan materil;
  - 14) Prof. Muhaimin Rifa'i, Ph.D. Med.Sc., Mochammad Fitri Atho'llah, S.Si., M.Si., Yuyun Ika Christina, S.Si., M.Si., Didik Wahyudi, S.Si, M.Si., Bunga Prihardina, S.Si., Siska Nanda Widhaningrum, S.Si, dan M. Chalid Al-ayyubi, S.Si. yang telah memberikan arahan dan bantuan selama penelitian;
  - 15) Kakak-Kakak Angkatan 2014 – *Winning Eleven Team* (Pak Albert, Dr. Wahyu, Dr. Rudi, Kak Olga, Kak Siti Aisiah, Dr. Apri, Dr. Salnida, Dr. Thomas, Mas Haryo, Kak Yori) yang selalu mendukung dan membantu selama studi;
  - 16) Segenap staf pengajar, pegawai dan staf administrasi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya;
  - 17) Segenap pegawai dan staf administrasi Lembaga Layanan Pendidikan Tinggi Wilayah IX Sulawesi;
  - 18) Segenap staf pengajar dan administrasi Sekolah Tinggi Perikanan dan Kelautan (STPL) Palu;
  - 19) Rekan-rekan mahasiswa Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya, khususnya Mas Putut Har Riyadi, Kak Linda Haryadi dan Kak James Walalangi;
  - 20) Saudara, sahabat, handai taulan dan segenap pihak yang telah memberikan dorongan, motivasi dan bantuan berupa materil maupun non-materil sehingga penulis dapat menyelesaikan studi.

Kepada pihak-pihak lainnya yang tidak mungkin disebutkan satu per-satu, juga penulis sampaikan penghargaan dan rasa terima kasih yang tidak terhingga; karena dengan bantuan Bapak dan Ibu semuanya maka disertasi ini dapat diselesaikan penulisannya dengan baik.

Penulis menyadari bahwa hasil disertasi ini memiliki kekurangan dan keterbatasan, namun penulis berharap semoga bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Semoga Tuhan Yang Maha Esa senantiasa melimpahkan Rahmat dan Karunia-Nya kepada kita semua dalam melaksanakan pengabdian bagi kejayaan Negara Kesatuan Republik Indonesia yang kita cintai. Amin.

Malang, September 2019

Penulis

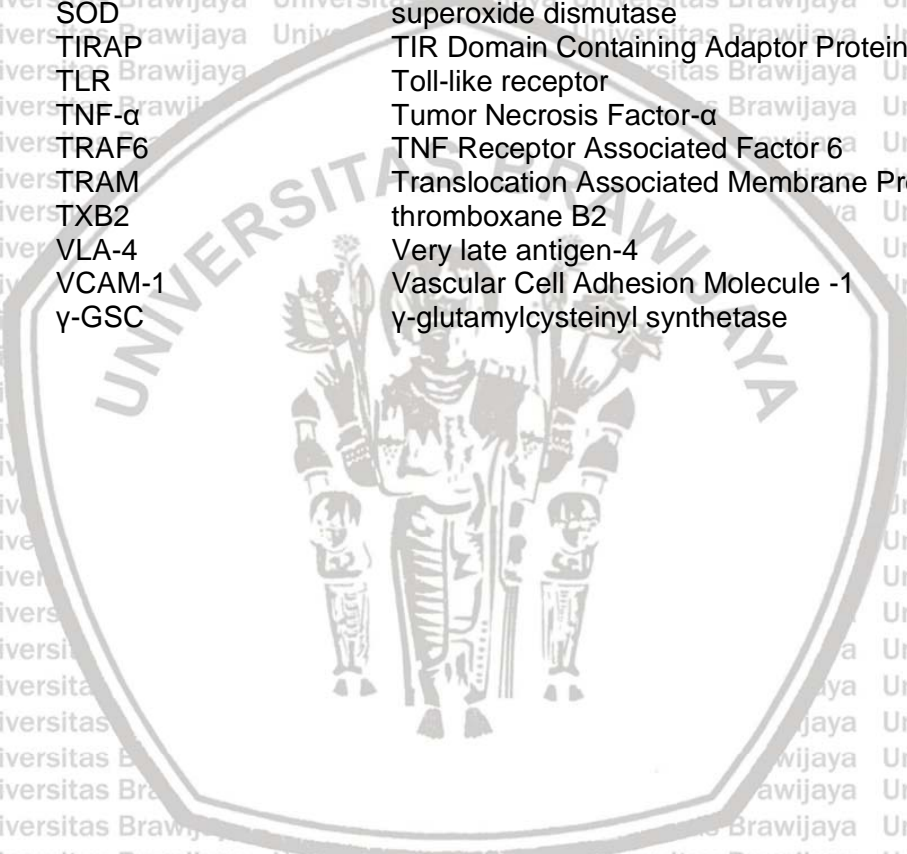
Wendy Alexander Tanod  
NIM. 147080100111003



## GLOSARIUM

AP-1	aktivator protein 1
BuOH	n-Butanol
CAMs	cell adhesion molecules
Cat	catalase
CD	cluster of differentiation
CD4	Sel T
CD11b	Sel makrofag
CD62L	L-selektin
CD4CD62L	Sel T Naive
CD4CD25CD62L	Sel T Regulator
COX-2	Siklooksigenase-2
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern
DCM	Diklorometana
DNA	Deoxyribonucleic acid
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GST	Glutathione S Transferase
ECAMs	endothelial cell adhesion molecules
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
EtOAc	Etil Asetat
HO-1	Heme oxygenase 1
HSP70	heat shock protein 70
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IRAK1	Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1
IRAK2	Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 2
IRAK4	Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 4
Keap1	Kelch Like ECH Associated Protein 1
LBP	LPS Binding Protein
LPS	Lipopolisakarida
LFA-1	Leukocyte Function-associated Antigen-1
LCMS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LTB4	leukotriene B4
LTC4	cysteinyl leukotriene C4
LOX	Lipoxygenase
Mac-1	Macrophage-1
MAP	Mitogen activated protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MPO	Myeloperoxidase
MDA	malondialdehida
MD2	Myeloid differentiation factor 2
MyD88	MYD88 Innate Immune Signal Transduction Adaptor
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NFκB	Nuclear Factor-Kappa B
NK	Natural Killer
NO	Nitric Oxide
Nrf-2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PECAM-1	plateletendothelial cell adhesion molecule-1
PMn	Polymorphonuclear
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand
PAF	platelet-activating factor
PGE2	Prostaglandin E2
PLA2	phospholipase A2
PRR	Pattern recognition receptors
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	superoxide dismutase
TIRAP	TIR Domain Containing Adaptor Protein
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor 6
TRAM	Translocation Associated Membrane Protein
TXB2	thromboxane B2
VLA-4	Very late antigen-4
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule -1
γ-GSC	γ-glutamylcysteinyl synthetase





## RINGKASAN

Nama Mahasiswa: Wendy Alexander Tanod, NIM : 147080100111003 Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan, Program Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, September 2019, "**Potensi Bioaktif Karang Lunak *Sarcophyton* sp. Sebagai Anti-inflamasi Akibat Induksi *Lipopolysaccharide* – Inhibitor Jalur *MyD88* Dependent**", Komisi Pembimbing/Promotor : Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D., Ko-Promotor I : Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si., Ko-Promotor II : Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si.

Karang lunak termasuk dalam filum cnidaria, kelas anthozoa, subclass octocorallia dilaporkan menghasilkan senyawa yang berpotensi sebagai senyawa obat. Dilaporkan 11-17 % semua obat yang ditemukan dari laut berasal dari karang lunak. Karang lunak diketahui umumnya memproduksi senyawa turunan terpenoid dan steroid, yang mempunyai efek anti-inflamasi. Proses inflamasi merupakan suatu mekanisme protektif dalam merespons infeksi mikroba atau iritasi atau cedera pada jaringan/organ. Respon inflamasi merupakan respon imunologis kompleks dan diatur ketat terhadap invasi patogen dan cedera jaringan yang sebagian besar dikendalikan oleh sistem imun bawaan (*innate*) dan adaptif. Sel imun bawaan (*innate*) seperti makrofag merupakan mediator sentral dari respon inflamasi melalui pengenalan mikroba patogen oleh PRR yang dikenal TLR.

Pada penelitian ini, menggunakan *Lipopolysaccharide* (LPS) dari bakteri *Escherichia coli* sebagai stimulan respon inflamasi. Reseptor pengenalan LPS, yaitu TLR4. LPS diangkut dalam darah oleh LPS *Binding Protein* (LBP), ke protein terkait CD14. Interaksi antara CD14 dan LBP, memberikan respons TLR4 terhadap LPS. Interaksi ini menghasilkan stabilisasi, dimerisasi, aktivasi kompleks reseptor dan selanjutnya *downstream* TLR4 *signaling*. *Signaling* TLR4 melalui jalur *MyD88-dependent* bertanggungjawab terhadap ekspresi sitokin pro-inflamasi. Jalur ini menstimuli aktivasi faktor transkripsi NFκB. Aktivasi NFκB menstimuli produksi sitokin pro-inflamasi (TNF-α, dan IL-6), *cell adhesion molecules* (ICAM-1 dan VCAM-1) dan iNOS. Untuk mengimbangi produksi sitokin pro-inflamasi, sel T regulator memproduksi sitokin anti-inflamasi IL-10 untuk meredam produksi sitokin pro-inflamasi. Selain memproduksi substansi anti-inflamasi, karang lunak juga dilaporkan memproduksi substansi antioksidan. Respon inflamasi dapat dihambat dengan mencegah stres oksidatif dalam sel. Selain itu, LPS dapat meningkatkan produksi ROS. Produksi ROS memicu pelepasan ikatan Nrf-2/Keap-1, sehingga Nrf-2 dapat teraktivasi dan meregulasi produksi antioksidan endogen (SOD dan HO-1).

Tujuan penelitian ini, yaitu 1). Mendapatkan fraksi karang lunak yang menunjukkan aktivitas inhibitori pelepasan NO; 2). Mendapatkan data probabilitas senyawa dan karakter spektrometri fraksi karang lunak yang berpotensi sebagai anti-inflamasi; 3). Mendapatkan fraksi karang lunak yang dapat meningkatkan jumlah relatif sel T naïve, sel T regulator, dan produksi sitokin anti-inflamasi IL-10 setelah induksi LPS secara *in vitro* dan *in vivo*; 4). Mendapatkan fraksi karang lunak yang dapat menghambat aktivasi TLR4, ekspresi NFκB, iNOS dan produksi TNF-α dan IL-6 serta menekan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1 setelah diinduksi LPS secara *in vitro* dan *in vivo*; dan 5). Mendapatkan fraksi karang lunak yang dapat meningkatkan aktivasi SOD dan HO-1 yang diregulasi oleh Nrf-2, serta dapat menurunkan level MDA pada mencit yang diinduksi LPS. Manfaat penelitian ini, yaitu dapat mengungkap potensi substansi bioaktif karang lunak sebagai anti-inflamasi, dalam menekan respon inflamasi. Hasil penelitian ini juga diharapkan dapat menjadi alternatif bagi dunia farmasi sebagai bahan sediaan agen anti-inflamasi.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini eksperimen dan metode deskriptif. Penelitian ini dibagi dalam 3 tahap, yaitu 1). Sampling, ekstraksi karang lunak, dan purifikasi; 2). Karakterisasi fraksi karang lunak potensial dan pengujian *in silico*; 3). Pengujian *in vivo* dan *in vitro*. Ekstrak karang lunak potensial (ekstrak kasar dan fraksi) dilakukan pengamatan aktivitas inhibitori pelepasan *Nitric Oxide* dan penghambatan radikal DPPH. Fraksi karang lunak potensial dianalisis LC-MS serta dikarakterisasi dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Selanjutnya, dipurifikasi dengan kromatografi kolom. Fraksi karang lunak potensial diamati aktivitasnya terhadap parameter inflamasi jalur *MyD88 dependent*, yaitu TLR 4, NFκB, TNF-α, IL-6, iNOS. Selain itu diamati sel T naïve,



sel T regulator, IL10, VCAM-1 dan ICAM-1 akibat induksi LPS. Diamati juga potensi substansi antioksidan dari fraksi karang lunak, yaitu SOD, HO-1 dan Nrf-2 dalam mengimbangi stres oksidatif MDA. Pengujian *in vivo* terdiri dari 6 perlakuan yaitu kontrol normal (tanpa induksi LPS), kontrol negatif (Induksi LPS 4 mg/mL), kontrol positif (LPS + Dexametason 6 mg/kg), konsentrasi ekstrak 1 (LPS + 50 mg/kg BB), konsentrasi ekstrak 2 (LPS + 125 mg/kg BB), dan konsentrasi ekstrak 3 (LPS + 250 mg/kg BB), dimana masing-masing perlakuan terdiri dari 6 ulangan. Pengujian *in vitro* memiliki 6 perlakuan yaitu kontrol negatif (tanpa induksi LPS), kontrol negatif (Induksi LPS 0.04 mg/mL), kontrol positif (LPS + Dexametason 5 mg/mL), konsentrasi ekstrak 1 (LPS + 0.50 mg/mL), konsentrasi ekstrak 2 (LPS + 1.25 mg/mL), dan konsentrasi ekstrak 3 (LPS + 2.50 mg/mL), dimana masing-masing perlakuan terdiri dari 3 ulangan. Pengujian *in silico* dianalisis dengan Lipinski, SwissADME, PASSonline, pyrex, dan Discovery Studi Visualizer.

Sampel karang lunak yang digunakan pada penelitian ini teridentifikasi sebagai *Sarcophyton* sp. (SCC), dikoleksi dari Teluk Palu, Sulawesi Tengah. Analisis kandungan komponen bioaktif dari ekstrak kasar *Sarcophyton* sp. (SCC) mengindikasikan kehadiran alkaloid, polifenol dan steroid. Analisis probabilitas senyawa dengan LCMS mendeteksi kehadiran senyawa yang berpotensi kuat sebagai anti-inflamasi, yaitu Coralloidin E; Lobophytol; Sinularolide B; (5Z,9E,11E, 14E) Ethyl 8 hydroxy 13 oxoicosa-5,9,11,14 tetraenoate; Sinulaflexiolide B; Sinulaflexiolide C; Sinulaflexiolide D; Australin A; Australin B; Australin C; dan Australin D. Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) menunjukkan aktivitas inhibitori pelepasan NO yang paling baik sebesar  $4.85 \pm 0.17 \mu\text{M}$  pada 5 mg/mL sedangkan kontrol LPS  $6.00 \pm 0.92 \mu\text{M}$  dan menunjukkan kemampuan dalam menghambat radikal DPPH ( $\text{IC}_{50} = 79.36 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$ ). Data hasil pengujian menunjukkan bahwa konsentrasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) 125 mg/kg (*in vivo*) dan 1.25 mg/mL (*in vitro*) mampu meningkatkan jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> sebesar  $69.97 \pm 1.44\%$  (*in vivo*) sedangkan pada kontrol LPS  $50.96 \pm 1.17\%$  (*in vivo*); jumlah relatif sel T regulator sebesar  $81.83 \pm 1.05\%$  (*in vivo*) dan  $44.13 \pm 0.81\%$  (*in vitro*) sedangkan kontrol LPS sebesar  $72.97 \pm 1.13\%$  (*in vivo*) dan  $25.64 \pm 0.93\%$  (*in vitro*); dan jumlah relatif IL-10 sebesar  $8.27 \pm 1.08\%$  (*in vivo*) dan  $58.24 \pm 0.76\%$  (*in vitro*) sedangkan jumlah relatif kontrol LPS  $7.58 \pm 1.01\%$  (*in vivo*) dan  $11.68 \pm 0.83\%$  (*in vitro*).

Konsentrasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) 125 mg/kg (*in vivo*) dan 1.25 mg/mL (*in vitro*) dapat menurunkan jumlah relatif TLR4 sebesar  $15.97 \pm 1.37\%$  (*in vivo*) dan  $42.06 \pm 0.81\%$  (*in vitro*) sedangkan pada kontrol LPS sebesar  $22.37 \pm 1.48\%$  (*in vivo*) dan  $49.19 \pm 0.71\%$  (*in vitro*); jumlah relatif NF $\kappa$ B sebesar  $13.96 \pm 0.84\%$  (*in vivo*) dan  $21.99 \pm 0.39\%$  (*in vitro*) sedangkan kontrol LPS  $18.38 \pm 1.24\%$  (*in vivo*) dan  $22.45 \pm 0.19\%$  (*in vitro*); jumlah relatif TNF- $\alpha$  sebesar  $13.95 \pm 1.76\%$  (*in vivo*) dan  $31.99 \pm 0.70\%$  (*in vitro*) sedangkan pada kontrol LPS sebesar  $17.85 \pm 1.32\%$  (*in vivo*) dan  $34.19 \pm 0.44\%$  (*in vitro*); jumlah relatif IL-6 sebesar  $21.27 \pm 1.10\%$  (*in vivo*) dan  $38.40 \pm 0.33\%$  (*in vitro*) sedangkan jumlah relatif kontrol LPS  $25.21 \pm 1.29\%$  (*in vivo*) dan  $38.90 \pm 0.45\%$  (*in vitro*); serta menekan ekspresi iNOS pada kategori kuat sebesar 11.11% sedangkan pada kontrol LPS 61.11%.

Konsentrasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) 125 mg/kg juga menurunkan level MDA  $144.72 \pm 18.31 \text{ ng/mL}$  sedangkan level MDA pada kontrol LPS  $188.06 \pm 15.15 \text{ ng/mL}$ . Konsentrasi ekstrak DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) 125 mg/kg mampu meningkatkan jumlah relatif SOD ( $28.58 \pm 0.79\%$ ); yang menurun akibat induksi LPS ( $17.04 \pm 1.07\%$ ); jumlah relatif HO-1 ( $38.96 \pm 1.14\%$ ) yang menurun akibat induksi LPS ( $28.69 \pm 1.05\%$ ); dan jumlah relatif Nrf-2 ( $37.34 \pm 1.14\%$ ) yang menurun karena induksi LPS ( $27.80 \pm 1.15\%$ ). Konsentrasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) 125 mg/kg juga mampu menekan ekspresi VCAM-1 pada kategori sedang sebesar 66.65% sedangkan ekspresi VCAM-1 pada kontrol LPS sebesar 83.33%; serta mampu menekan ekspresi ICAM-1 pada kategori sedang sebesar 16.67% sedangkan pada kontrol LPS ekspresi ICAM-1 sebesar 50%.

Mekanisme kerja anti-inflamasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC), yaitu sebagai inhibitor jalur MyD88 dependent melalui rangkaian MyD88 dependent-IRAK-TRAF-TAK, sehingga menekan fosforilasi dan degradasi I $\kappa$ B. Penghambatan fosforilasi dan degradasi I $\kappa$ B mengakibatkan gangguan translokasi dari faktor transkripsi NF $\kappa$ B. Penghambatan aktivasi NF $\kappa$ B ini menyebabkan gangguan produksi sitokin pro-inflamasi TNF- $\alpha$  dan IL-6 serta penekanan ekspresi iNOS. Selain itu, fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) meningkatkan aktivitas sel T regulator sebagai regulator negatif inflamasi dan mensekresikan sitokin anti-inflamasi IL-10. Produksi IL-10 mengganggu jalur persinyalan



TLR4. Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) juga mampu menghambat pengenalan LPS dan TLR4 dengan berperan sebagai kompetitif binding dalam pengikatan dengan MD2, sehingga mengganggu interaksi LPS-MD2-TLR4. Substansi antioksidan dalam fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) mampu menurunkan *oxidative stress response element* MDA dan meningkatkan jumlah relatif *antioxidant response element* SOD dan HO-1 yang diregulasi Nrf-2. Hal ini dapat memberikan efek anti-inflamasi dengan memodulasi sinyal inflamasi dan melemahkan respons inflamasi yang diinduksi LPS melalui pengurangan NFκB. Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dapat menghambat ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1, diduga sebagai akibat dari deaktivasi faktor transkripsi NFκB. Penghambatan aktivasi NFκB dapat mempengaruhi angiogenesis dan respon inflamasi akibat induksi LPS dan hiperpermeabilitas vaskular. Deaktivasi NFκB, menyebabkan pengurangan ekstravasasi leukosit pada sel endotel mencit yang terinduksi LPS. Penghambatan pelepasan NO meregulasi molekul adhesi sel termasuk ICAM-1 dan VCAM-1. Efek penghambatan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1, sehingga menyebabkan penurunan stres fibrosa, tegangan sentripetal dan retraksi sel. Penurunan ini mengganggu regulasi interaksi *leucocyte-endothelial cell adhesion*, sehingga mencegah migrasi leukosit keluar dari pembuluh darah antara sel-sel endotel dan ke dalam jaringan secara berlebihan.





## SUMMARY

Name of Student : Wendy Alexander Tanod, NIM : 147080100111003 Doctoral Program of Fisheries and Marine Sciences, Postgraduate Program Faculty of Fisheries and Marine Sciences University of Brawijaya Malang, September 2019, **“The Bioactive Potential of Soft Coral *Sarcophyton* sp. as Anti-inflammatory on Lipopolysaccharide-induced - Inhibitory of MyD88 Dependent Pathway”**, Advisory Committee / Promoter : Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D., Co-Promoter I : Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si., Co-Promoter II : Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si.

Soft corals include in cnidarians phylum, class Anthozoa, subclass Octocorallia are reported to produce compounds that have the potential as drug compounds. Reportedly 11-17% of all drugs found on the sea derived from soft corals. Soft corals are known generally produce terpenoids and steroid derivatives, which have anti-inflammatory effects. The inflammatory process is a protective mechanism in response to microbial infections or irritation or injury to tissues/organs. The inflammatory response is a complex immunological response and strictly regulated against pathogenic invasion and tissue injury that is controlled by innate and adaptive immune systems. Innate immune cells such as macrophage is a central mediator of the inflammatory response through the recognition of microbial pathogens by PRR, which is known TLR.

In this research, used Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* as a stimulant for the inflammatory response. LPS recognition receptor, namely TLR4. LPS is transported in the blood by LPS Binding Protein (LBP), to CD14-related proteins. The interaction between CD14 and LBP, responding TLR4 to LPS. These interactions result in stabilization, dimerization, activation of the receptor complex, and subsequent downstream TLR4 signaling. TLR4 signaling via the MyD88-dependent pathway is responsible for the expression of pro-inflammatory cytokines. This pathway stimulates the activation of the transcription factor NF $\kappa$ B. Activation of NF $\kappa$ B stimulates the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , and IL-6), cell adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) and iNOS. Regulatory T cells produce anti-inflammatory cytokines IL-10 to reduce the production of pro-inflammatory cytokines to compensate for the production of pro-inflammatory cytokines. Besides producing anti-inflammatory substances, soft corals are also reported to produce antioxidant substances. The inflammatory response can inhibit by preventing oxidative stress in cells. Furthermore, LPS can increase ROS production. ROS triggers the release of Nrf-2/Keap1 bonds so that Nrf-2 can be activated and regulate the production of endogenous antioxidants (SOD and HO-1).

The aimed of this study, namely 1). to obtained soft coral species that show NO release-inhibitory activity; 2). to obtained compound probability data and spectrometry characteristics of soft coral fraction that have the potential to be anti-inflammatory; 3). to obtained soft coral fraction which can increase the relative number of naïve T cells, regulatory T cells, and the production of anti-inflammatory cytokines IL-10 after LPS induction in vitro and in vivo; 4). to obtained soft coral fraction that can inhibit the activation of TLR4, NF $\kappa$ B expression and production of TNF- $\alpha$ , IL-6, and suppresses VCAM-1 and ICAM-1 expressions after LPS induction in vitro and in vivo; 5). to got the soft coral fraction that can increase the activation of antioxidant response element SOD and HO-1 which is regulated by Nrf-2 and can reduce MDA levels in LPS-induced mice. The benefits of this research are that it can reveal the potential of soft coral bioactive substances as an anti-inflammatory, in suppressing the inflammatory response. The results of this study are also expected to be an alternative to the pharmaceutical world as an anti-inflammatory agent.

The methods used in this study experiments and descriptive. This study divided into two stages: 1). Sampling, soft coral extraction, and purification; 2). Characterization fraction of potential soft corals and in silico assays. 3). in vivo and in vitro assays. The soft coral extracts (crudes and fractions) observed the inhibitory of Nitric Oxide release activity and inhibition of DPPH radical. The potential soft coral fraction analyzed by LC-MS and characterized by UV-Vis and FTIR spectrophotometers. Furthermore, it purified by column chromatography. The Potential soft coral fraction observed for its activity against the inflammatory parameters MyD88 dependent pathway, namely TLR 4, NF $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS. Additionally observed naïve T cells, regulatory T cells, IL-10, VCAM-1, and ICAM-1



expression induced by LPS. The study also observed at the potential antioxidant substances from soft coral fraction, i.e., SOD, HO-1, and Nrf-2 in balancing oxidative stress MDA. In vivo assaying consisted of 6 treatments are normal control (without LPS induction), negative control (LPS induction 4 mg/mL), positive control (Dexamethasone LPS + 6 mg/kg), extract concentration 1 (LPS + 50 mg/kg BW), extract concentration 2 (LPS + 125 mg/kg BB), and extract concentration 3 (LPS + 250 mg/kg BB), where each treatment consisted of 6 replications. In vitro assaying consisted of 6 treatments are normal control (without LPS induction), negative control (LPS induction 0.04 mg/mL), positive control (Dexamethasone LPS + 5 mg/mL), extract concentration 1 (LPS + 0.50 mg/mL), extract concentration 2 (LPS+1.25 mg/mL), and extract concentration 3 (LPS+2.50 mg/mL), where each treatment consisted of 6 replications. The assayed of in silico with Lipinski, SwissADME, PASSonline, pyrex, and Discovery Studio Visualizer.

The Soft coral samples used in this study identified as *Sarcophyton* sp. (SCC) collected from Palu Bay, Central Sulawesi. Analysis of the bioactive component of *Sarcophyton* sp. (SCC) crude extracts indicates the presence of alkaloids, polyphenols and steroids. The probability analysis of compounds with LC-MS detected the presence of potentially anti-inflammatory compounds, namely Coralloidin E; Lobophytol; Sinularolide B; (5Z,9E,11E, 14E) Ethyl 8 hydroxy 13 oxoicosa-5,9,11,14 tetraenoate; Sinulaflexiolide B; Sinulaflexiolide C; Sinulaflexiolide D; Australin A; Australin B; Australin C; dan Australin D. The DCM fraction of *Sarcophyton* sp. (SCC) showed the best NO inhibitory release activity of  $4.85 \pm 0.17 \mu\text{M}$  at 5 mg/mL while LPS control was  $6.00 \pm 0.92 \mu\text{M}$ , and showed the ability to inhibition of DPPH radical ( $\text{IC}_{50} = 79.36 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$ ). The data showed that the concentration 125 mg/kg (in vivo) and 1.25 mg/mL (in vitro) of *Sarcophyton* sp. (SCC) DCM fraction were able to increase the relative number of CD4+ T cells by  $69.97 \pm 1.44\%$  (in vivo) while in the LPS control  $50.96 \pm 1.17\%$  (in vivo); relative number of regulatory T cells was  $81.83 \pm 1.05\%$  (in vivo) and  $44.13 \pm 0.81\%$  (in vitro) while the LPS control was  $72.97 \pm 1.13\%$  (in vivo) and  $25.64 \pm 0.93\%$  (in vitro); and relative number of IL-10 was  $8.27 \pm 1.08\%$  (in vivo) and  $58.24 \pm 0.76\%$  (in vitro) while the relative number of LPS controls was  $7.58 \pm 1.01\%$  (in vivo) and  $11.68 \pm 0.83\%$  (in vitro).

The concentration 125 mg/kg (in vivo) and 1.25 mg/mL (in vitro) of DCM fraction *Sarcophyton* sp. (SCC) can reduce the relative number of TLR4 by  $15.97 \pm 1.37\%$  (in vivo) and  $42.06 \pm 0.81\%$  (in vitro) while at LPS control it is  $22.37 \pm 1.48\%$  (in vivo) and  $49.19 \pm 0.71\%$  (in vitro); relative number of NF $\kappa$ B was  $13.96 \pm 0.84\%$  (in vivo) and  $21.99 \pm 0.39\%$  (in vitro) while the LPS control is  $18.38 \pm 1.24\%$  (in vivo) and  $22.45 \pm 0.19\%$  (in vitro); relative number of TNF- $\alpha$  was  $13.95 \pm 1.76\%$  (in vivo) and  $31.99 \pm 0.70\%$  (in vitro) while the LPS control was  $17.85 \pm 1.32\%$  (in vivo) and  $34.19 \pm 0.44\%$  (in vitro); relative number of IL-6 was  $21.27 \pm 1.10\%$  (in vivo) and  $38.40 \pm 0.33\%$  (in vitro) while the relative number of LPS controls was  $25.21 \pm 1.29\%$  (in vivo) and  $38.90 \pm 0.45\%$  (in vitro); and suppressing iNOS expression in the strong category of 11.11% while in the LPS control it was 61.11%.

The concentration 125 mg/kg of DCM fraction *Sarcophyton* sp. (SCC) also decreases MDA level  $144.72 \pm 18.31 \text{ ng/mL}$  while the MDA level in LPS control was  $188.06 \pm 15.15 \text{ ng/mL}$ . The concentration 125 mg/kg of DCM fraction *Sarcophyton* sp. (SCC) can increase the relative number of SOD ( $28.58 \pm 0.79\%$ ); which decreased to LPS-induced ( $17.04 \pm 1.07\%$ ); the relative number of HO-1 ( $38.96 \pm 1.14\%$ ) decreased to LPS-induced ( $28.69 \pm 1.05\%$ ); and the relative number of Nrf-2 ( $37.34 \pm 1.14\%$ ) decreased to LPS-induced ( $27.80 \pm 1.15\%$ ). The concentration 125 mg/kg of DCM fraction *Sarcophyton* sp. (SCC) was also able to suppress VCAM-1 expression in the moderate category by 66.65% while VCAM-1 expression in LPS control was 83.33%; and able to suppress ICAM-1 expression in the moderate category by 16.67% while in the LPS control ICAM-1 expression was 50%.

It can be concluding from the anti-inflammatory pathway of DCM fractions *Sarcophyton* sp. (SCC), namely as an inhibitor of the MyD88 dependent pathway through the MyD88 dependent-IRAK-TRAF-TAK interaction, thereby suppressing phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B. Inhibition of phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B resulted in impaired translocation of NF $\kappa$ B transcription factors. This inhibition of NF $\kappa$ B activation disrupts the production of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 and suppression of iNOS expression. Also, DCM fraction of *Sarcophyton* sp. (SCC) increases the activity of regulatory T cells as a negative inflammatory regulator and secures anti-inflammatory



cytokines IL-10. IL-10 production interferes with TLR4 signaling pathway. The DCM fraction *Sarcophyton* sp. (SCC) was also able to inhibit the recognition of LPS and TLR4 by acting as a competitive binding in binding with MD2, thus disrupting the interaction of LPS-MD2-TLR4. The antioxidant substance in DCM fraction of *Sarcophyton* sp. (SCC) was able to reduce the MDA oxidative stress response element and increase the relative number of antioxidant response elements SOD and HO-1 regulated by Nrf-2. It can provide an anti-inflammatory effect by modulating the inflammatory signal and attenuate the inflammatory response induced by LPS through reducing NFκB. The DCM fraction of *Sarcophyton* sp. (SCC) can inhibit VCAM-1 and ICAM-1 expression, presumably as a result of deactivation of NFκB transcription factors. Inhibition of NFκB activation can affect angiogenesis and inflammatory response to LPS-induced and vascular hyperpermeability. Deactivation of NFκB causes a reduction in leukocyte extravasation in endothelial cells induced by LPS. Inhibition of NO release regulates cell adhesion molecules including ICAM-1 and VCAM-1. The inhibiting effect of VCAM-1 and ICAM-1 expression causes a decrease in fibrous stress, centripetal stress, and cell retraction. This decrease disrupts the regulation of leukocyte-endothelial cell adhesion interactions, thereby preventing excessive leukocyte migration from the blood vessels between endothelial cells and into the tissues.





## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena atas rahmat kasih-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan disertasi ini, dengan judul **“Potensi Bioaktif Karang Lunak *Sarcophyton* sp. Sebagai Anti-inflamasi Akibat Induksi Lipopolisakarida – Inhibitor Jalur *MyD88* Dependent”**.

Disertasi ini disusun sebagai bahan untuk penyelesaian studi pada program doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Disertasi ini mengkaji potensi karang lunak yang dikoleksi dari perairan Sulawesi Tengah dalam menghasilkan substansi anti-inflamasi. Karang lunak menjadi sumber molekul biologi aktif dan senyawa model sebagai bahan obat. Karang lunak menghasilkan senyawa-senyawa yang memiliki potensi sebagai anti-inflamasi. Penelitian yang mengungkap potensi anti-inflamasi dari ekstrak karang lunak masih sedikit, padahal inflamasi berkaitan erat dengan penyakit kronis, seperti kanker, arthritis, diabetes, alzheimer dan arterosklerosis. Perairan Sulawesi Tengah menyimpan potensi biodiversitas karang lunak yang besar dan belum banyak dieksplorasi.

Penulis berharap semoga hasil penelitian ini dapat menjadi alternatif bagi dunia farmasi sebagai bahan sediaan agen anti-inflamasi. Penulis menyadari hasil penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan oleh karenanya kritik dan saran yang sifatnya membangun sangat diharapkan.

Malang, September 2019  
Penulis

Wendy Alexander Tanod  
NIM. 147080100111003

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
IDENTITAS TIM PENGUJI.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN DISERTASI.....	iv
SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI.....	v
RIWAYAT HIDUP.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
GLOSARIUM.....	ix
RINGKASAN.....	xi
SUMMARY.....	xiv
KATA PENGANTAR.....	xvii
DAFTAR ISI.....	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xxi
DAFTAR TABEL.....	xxiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxv
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Biologi dan Klasifikasi Karang Lunak.....	7
2.2 Substansi Bioaktif Anti-inflamasi dari Karang Lunak <i>Sarcophyton</i> sp.....	10
2.3 Potensi Bioaktif Karang Lunak dari Perairan Indonesia.....	11
2.4 Mekanisme Bioaktif Anti-inflamasi dari Produk Alami.....	14
2.5 Inflamasi.....	16
2.6 Toll-Like Receptors.....	17
2.6.1 <i>Lipopolysaccharide</i> dan Persinyalan TLR4.....	19
2.6.2 Transduksi Persinyalan TLR4.....	19
2.7 Faktor Transkripsi NFκB.....	30
2.8 Sitokin.....	32
2.8.1 Tumor Necrosis Faktor Alpha (TNF-α).....	33
2.8.2 Interleukin 6 (IL-6).....	35
2.8.3 Interleukin 10 (IL-10).....	36
2.9 <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS).....	38
2.10 <i>Cell Adhesion Molecules</i> (CAMs).....	39
2.10.1 Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1).....	42
2.10.2 Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1).....	44
2.11 Enzim Antioxidant Response Element (ARE).....	45
2.11.1 Enzim ARE-Responsive yang Berasosiasi dengan Glutathione.....	47
2.11.2 Enzim ARE-Responsive Lainnya.....	48



**BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

3.1 Kerangka Konseptual..... 51

3.2 Kerangka Operasional Penelitian..... 54

    3.2.1 Tahap 1. Sampling, Seleksi Ekstrak Karang Lunak dan Purifikasi..... 55

    3.2.2 Tahap 2. Karakterisasi Ekstrak dan Fraksi Karang Lunak Potensial dan Pengujian *in silico*..... 57

    3.2.3 Tahap 3. Pengujian *in vivo* dan *in vitro*..... 58

3.3 Hipotesis Penelitian..... 59

**BAB IV. METODE PENELITIAN**

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian..... 61

4.2 Bahan dan Alat..... 62

4.3 Prosedur Penelitian..... 62

    4.3.1 Sampling dan Ekstraksi Karang Lunak..... 64

    4.3.2 Identifikasi Karang Lunak..... 64

    4.3.3 Pengujian Kandungan Komponen Bioaktif..... 65

    4.3.4 Prosedur Analisis Senyawa dan Karakterisasi Fraksi Karang Lunak..... 66

    4.3.5 Prosedur Kerja *In Silico*..... 68

    4.3.6 Pengujian Aktivitas Inhibitori Pelepasan NO..... 69

    4.3.7 Pengujian Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH..... 70

    4.3.8 Prosedur Kerja *In Vivo*..... 71

    4.3.9 Prosedur Kerja *In Vitro*..... 76

4.4 Analisa Data..... 79

**BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN**

5.1 Identifikasi Morfologi Karang Lunak..... 81

5.2 Berak Ekstrak Karang Lunak..... 81

5.3 Kandungan Komponen Bioaktif dalam Ekstrak Kasar..... 83

5.4 Aktivitas Inhibitori Pelepasan *Nitric Oxide*..... 85

5.5 Aktivitas Penghambatan Radikal DPPH..... 89

5.6 Analisis Senyawa dan Karakterisasi Fraksi Karang Lunak..... 93

    5.6.1 Analisis Probabilitas Senyawa dengan LCMS..... 93

    5.6.2 Karakterisasi Fraksi Dengan Spektrofotometer UV-Vis..... 97

    5.6.3 Karakterisasi Fraksi Dengan FTIR..... 98

5.7 Analisis *In Silico* dengan Senyawa yang dideteksi dengan LCMS..... 100

    5.7.1 Aktivitas senyawa aktif fraksi 3 sebagai Anti-inflamasi Melalui Jalur TLR4..... 104

    5.7.2 Aktivitas senyawa aktif fraksi 3 sebagai Anti-inflamasi Melalui Jalur NFkB..... 109

    5.7.3 Aktivitas Senyawa Aktif Fraksi 3 Sebagai Anti-inflamasi Melalui Jalur IL-10..... 114

5.8 Hasil Pengujian *In Vivo* dan *In Vitro* Ekstrak DCM *Sarcophyton* sp. (SCC)..... 119

    5.8.1 Pengaruh Perlakuan Terhadap Berat Badan Mencit..... 123

    5.8.2 Pengaruh Ekstrak DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) Terhadap Jumlah Relatif Sel T Naïve Secara *In Vivo*..... 124





5.8.3	Pengaruh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Terhadap Jumlah Relatif Sel T Regulator Secara <i>In Vivo</i> dan <i>In Vitro</i> .....	126
5.8.4	Pengaruh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Terhadap Jumlah Relatif Sitokin Anti-inflamasi IL-10 Secara <i>In Vivo</i> dan <i>In Vitro</i> .....	131
5.8.5	Pengaruh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Terhadap <i>Downregulation</i> TLR4 Secara <i>In Vivo</i> dan <i>In Vitro</i> .....	135
5.8.6	Pengaruh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Terhadap Jumlah Relatif NFκB Secara <i>In Vivo</i> dan <i>In Vitro</i> .....	139
5.8.7	Pengaruh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Terhadap Jumlah Relatif Sitokin Pro-Inflamasi TNF-α dan IL-6 Secara <i>In Vivo</i> dan <i>In Vitro</i> .....	143
5.8.8	Pengaruh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Terhadap Jumlah MDA, SOD, HO-1 dan Nrf-2 Secara <i>In Vivo</i> .....	150
5.8.9	Pengaruh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Terhadap Ekpresi <i>Cell Adhesion Molecules</i> (VCAM-1 dan ICAM-1) Pada Mencit yang Diinduksi LPS.....	160
5.8.10	Pengaruh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Terhadap Ekpresi iNOS Pada Mencit yang Diinduksi LPS.....	168
5.9	Pembahasan Umum.....	171
5.10	Kebaruan Penelitian/Novelty.....	178
<b>BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN</b>		
6.1	Kesimpulan.....	180
6.2	Saran.....	181
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....		182
<b>LAMPIRAN</b> .....		212



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Tubuh Karang Lunak (Ordo Alcyonacea).....	7
Gambar 2.2 Bentuk-Bentuk Sklerit Karang Lunak.....	8
Gambar 2.3 Struktur Senyawa Anti-inflamasi dari Genus <i>Sarcophyton sp.</i> .....	11
Gambar 2.4 Mekanisme Bioaktif Anti-inflamasi.....	15
Gambar 2.5 Persinyalan LPS/TLR4 dalam mengenali LPS yang difasilitasi LBP dan CD14, serta dimediasi oleh kompleks reseptor TLR4/MD-2.....	20
Gambar 2.6 Jalur pensinyalan TLR.....	22
Gambar 2.7 Regulator Negatif dari Persinyalan TLR.....	25
Gambar 2.8 Jalur Nuclear factor kappa B (NFkB).....	32
Gambar 2.9 Mekanisme Migrasi Leukosit Melalui Sel Endotel.....	42
Gambar 2.10 Efek Substansi Fitokimia pada sensor redoks Keap1.....	46
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	55
Gambar 3.2 Kerangka Operasional Penelitian Tahap 1.....	57
Gambar 3.3 Kerangka Operasional Penelitian Tahap 2.....	58
Gambar 3.4 Kerangka Operasional Penelitian Tahap 3.....	60
Gambar 4.1 Lokasi Pengambilan Sampel Karang Lunak.....	61
Gambar 4.2 Bagan Alir Pengujian <i>In vivo</i> dan <i>In vitro</i> .....	63
Gambar 4.3 Pemberian Ekstrak dan LPS pada Mencit.....	72
Gambar 4.4 Pengambilan Darah dari Jantung Mencit.....	75
Gambar 5.1 Persentase Inhibisi Radikal DPPH dari Ekstrak Kasar <i>Sarcophyton sp.</i> dan Vitamin E pada Konsentrasi 200 µg/mL.....	90
Gambar 5.2 Persentase Inhibisi Radikal Bebas DPPH dari Fraksi Karang Lunak Hasil Partisi pada Pelarut Berbeda dan Vitamin E.....	92
Gambar 5.3 Spektrum UV-Vis Fraksi 3 Hasil Kromatografi Kolom.....	97
Gambar 5.4 Spektrum IR Fraksi 1 dan 3 Hasil Kromatografi Kolom.....	99
Gambar 5.5 Ikatan Afinitas Senyawa Aktif Fraksi 3 dengan Protein TLR4.....	105
Gambar 5.6 Ikatan senyawa Australin C dan TLR4.....	106
Gambar 5.7 Ikatan senyawa Sinularolide B dan TLR4.....	107
Gambar 5.8 Ikatan senyawa Australin B dan TLR4.....	108
Gambar 5.9 Ikatan Afinitas Senyawa Aktif Fraksi 3 dengan Protein NFkB.....	110
Gambar 5.10 Ikatan senyawa Sinularolide B dan NFkB.....	111



Gambar 5.11	Ikatan senyawa Sinulaflexiolide B dan NFkB.....	112
Gambar 5.12	Ikatan senyawa Sinulaflexiolide C dan NFkB.....	113
Gambar 5.13	Ikatan Afinitas Senyawa Aktif Fraksi 3 dengan Protein IL-10.....	115
Gambar 5.14	Ikatan senyawa Sinulaflexiolide B dan IL-10.....	116
Gambar 5.15	Ikatan senyawa Sinulaflexiolide D dan IL-10.....	117
Gambar 5.16	Ikatan senyawa Sinularolide B dan IL-10.....	118
Gambar 5.17	Efek Perlakuan Terhadap Berat Badan Mencit.....	124
Gambar 5.18	Peningkatan sel T Naïve CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vivo</i> .....	125
Gambar 5.19	Peningkatan sel T Regulator CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vivo</i> ...	127
Gambar 5.20	Peningkatan sel T Regulator CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vitro</i> ...	129
Gambar 5.21	Peningkatan Sitokin Anti-inflamasi IL-10 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vivo</i> .....	132
Gambar 5.22	Peningkatan Sitokin Anti-inflamasi IL-10 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vitro</i> .....	134
Gambar 5.23	<i>Downregulation</i> TLR4 oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vivo</i> .....	136
Gambar 5.24	<i>Downregulation</i> TLR4 oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vitro</i> .....	138
Gambar 5.25	Penurunan Faktor Transkripsi NFkB CD11b <sup>+</sup> NFkB <sup>+</sup> oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vivo</i> .....	140
Gambar 5.26	Penurunan Faktor Transkripsi NFkB CD11b <sup>+</sup> NFkB <sup>+</sup> oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vitro</i> .....	142
Gambar 5.27	Penurunan Sitokin Pro-inflamasi TNF- $\alpha$ CD11b <sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vivo</i> .....	144
Gambar 5.28	Penurunan Sitokin Pro-inflamasi IL-6 CD11b <sup>+</sup> IL-6 <sup>+</sup> oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vivo</i> .....	145
Gambar 5.29	Penurunan Sitokin Pro-inflamasi TNF- $\alpha$ CD11b <sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vitro</i> .....	147
Gambar 5.30	Penurunan Sitokin Pro-inflamasi IL-6 CD11b <sup>+</sup> IL-6 <sup>+</sup> oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vitro</i> .....	149
Gambar 5.31	Penurunan <i>Oxidative Stress Response Element</i> MDA oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC)	



	Secara <i>In Vivo</i> .....	152
Gambar 5.32	Peningkatan <i>Antioxidant Response Element</i> SOD oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vivo</i> .....	153
Gambar 5.33	Peningkatan <i>Antioxidant Response Element</i> HO-1 oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>in Vivo</i> .....	155
Gambar 5.34	Peningkatan <i>Antioxidant Response Element</i> Nrf-2 oleh Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) secara <i>In Vivo</i> .....	156
Gambar 5.35	Efek Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) terhadap Ekspresi VCAM-1 dengan analisis ImmunoMembrane.....	161
Gambar 5.36	Ekspresi VCAM-1 pada Otak Mencit yang Terinduksi LPS.....	162
Gambar 5.37	Efek Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) terhadap Ekspresi ICAM-1 dengan analisis ImmunoMembrane.....	163
Gambar 5.38	Ekspresi ICAM-1 pada Otak Mencit yang Terinduksi LPS.....	164
Gambar 5.39	Efek Ekstrak DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) terhadap Ekspresi iNOS dengan analisis ImmunoMembrane.....	169
Gambar 5.40	Ekspresi iNOS pada Otak Mencit yang Terinduksi LPS.....	170
Gambar 5.41	Mekanisme fraksi DCM <i>Sarcophyton</i> sp. dalam meregulasi Nrf-2, SOD, HO-1 dan MDA.....	176
Gambar 5.42	Mekanisme fraksi DCM <i>Sarcophyton</i> sp. dalam meregulasi VCAM-1 dan ICAM-1.....	178
Gambar 5.43	Mekanisme Kerja Anti-inflamasi dari Fraksi DCM <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) sebagai inhibitor <i>MyD88 dependent pathway</i> dalam Merespon Inflamasi Akibat Induksi LPS.....	179



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1	10
Laporan Bioaktif Anti-inflamasi Karang Lunak Genus <i>Sarcophyton</i> .....	
Tabel 2.2	12
Potensi Bioaktif Karang Lunak yang Dikoleksi dari Perairan Indonesia.....	
Tabel 2.3	18
<i>Pathogen Recognition Receptors</i> (PRR) dan Ligan.....	
Tabel 2.4	24
Regulator Negatif dari Persinyalan TLR.....	
Tabel 2.5	40
<i>Leukocyte – Endothelial Cell Adhesion Receptors</i> .....	
Tabel 4.1	73
Kombinasi Antibodi ekstraseluler dan intraseluler untuk <i>immunostaining pada pengujian in vivo</i> .....	
Tabel 4.2	78
Kombinasi Antibodi ekstraseluler dan intraseluler untuk <i>immunostaining pada pengujian in vitro</i> .....	
Tabel 5.1	81
Karakteristik karang lunak <i>Sarcophyton</i> sp. dari pesisir Teluk Palu.....	
Tabel 5.2	82
Berat Ekstrak dan Fraksi Sampel Karang Lunak.....	
Tabel 5.3	83
Analisis Komponen Bioaktif dari Ekstrak Kasar <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC).....	
Tabel 5.4	86
Efek Inhibitori Ekstrak Kasar <i>Sarcophyton</i> sp. Terhadap Konsentrasi NO Yang Diinduksi LPS Pada Sel Makrofag Peritoneal Mencit.....	
Tabel 5.5	86
Efek Inhibitori Fraksi Hasil Partisi Ekstrak <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Terhadap Konsentrasi NO Yang Diinduksi LPS Pada Sel Makrofag Peritoneal Mencit.....	
Tabel 5.6	87
Efek Inhibitori Fraksi DCM <i>Sarcophyton</i> sp. Hasil Kromatografi Kolom Terhadap Konsentrasi NO Yang Diinduksi LPS Pada Sel Makrofag Peritoneal Mencit.....	
Tabel 5.7	85
Analisis Probabilitas Senyawa dalam Fraksi 3 hasil kromatografi kolom menggunakan LC-MS.....	
Tabel 5.8	91
Identifikasi Gugus Fungsional Melalui Analisis FTIR.....	
Tabel 5.9	92
Analisis Senyawa Aktif dengan Lipinski.....	
Tabel 5.10	94
Prediksi Aktivitas (Pa) Senyawa Aktif Fraksi 3 Sebagai Anti-inflamasi.....	
Tabel 5.11	95
Analisis Prediksi LD <sub>50</sub> dari 18 Senyawa Aktif Sebagai Anti-inflamasi.....	
Tabel 5.12	120
Matriks Hubungan Antara Parameter Inflamasi.....	



DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Sertifikat Kelaikan Etik.....	212
Lampiran 2	Prosedur Pengujian Aktivitas Inhibitori Pelepasan NO.....	213
Lampiran 3	Spot Noda Kromatografi Lapis Tipis.....	214
Lampiran 4	Analisis Statistik Efek Inhibitori Ekstrak Kasar Karang Lunak <i>Sarcophyton</i> sp. Terhadap Konsentrasi NO Yang Diinduksi LPS.....	215
Lampiran 5	Analisis Statistik Efek Inhibitori Ekstrak Hasil Partisi <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Terhadap Konsentrasi NO Yang Diinduksi LPS.....	217
Lampiran 6	Analisis Statistik Efek Inhibitori Fraksi Hasil Kromatografi Kolom <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Terhadap Konsentrasi NO Yang Diinduksi LPS.....	221
Lampiran 7a	Hasil LC-MS Fraksi 3 Hasil Kromatografi Kolom <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC).....	226
Lampiran 7b	Analisis Probabilitas Senyawa dalam Fraksi 3 Hasil Kromatografi Kolom <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Dengan LC-MS Beserta Spektra UV dan FTIR.....	236
Lampiran 8	Analisis SwissADME Senyawa Aktif Pada Fraksi 3.....	238
Lampiran 9	Analisis Protox II Senyawa Aktif Pada Fraksi 3.....	245
Lampiran 10	Jalur TLR4, NFkB, dan IL-10 dalam Respon Inflamasi.....	252
Lampiran 11	Hasil Analisis Statistik Pengujian <i>In Vivo</i> Dengan Parameter Sel T Naïve, Sel T Regulator, IL-10, TLR4, NFkB, TNF- $\alpha$ , IL-6, MDA, SOD, HO-1 dan Nrf-2.....	254
Lampiran 12	Hasil Analisis Statistik Pengujian <i>In Vitro</i> Dengan Parameter Sel T Regulator, IL-10, TLR4, NFkB, TNF- $\alpha$ , IL-6.....	274
Lampiran 13	Publikasi Hasil Penelitian.....	290





# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Daerah laut tropis termasuk Indonesia memiliki spesies-spesies organisme laut yang beraneka ragam dan berpotensi sebagai sumber senyawa bioaktif yang baru. Organisme laut seperti karang lunak diketahui merupakan sumber dari berbagai variasi substansi bioaktif, terutama golongan senyawa terpenoid dengan fungsi yang luar biasa. (Putra, 2012) melakukan penelusuran senyawa bioaktif dari 13 famili karang lunak. Dari hasil penelusuran, karang lunak dari famili Alcyonidae, menjadi penghasil terbesar senyawa bioaktif.

Karang lunak termasuk dalam filum cnidaria, kelas anthozoa, subkelas octocorallia dilaporkan menghasilkan senyawa racun dan sekitar 60% substansi bioaktif dari karang lunak berpotensi menghasilkan senyawa obat (Sheu *et al.* 2002; Higa *et al.* 2001 dan Coll *et al.* 1982). Karang lunak merupakan invertebrata sesil bertubuh lunak, tidak memiliki sistem pertahanan fisik sehingga mengandalkan sistem pertahanan kimia untuk bertahan hidup (Coll, 1992). Senyawa kimia yang diproduksi oleh karang lunak dapat dieksplorasi untuk menghasilkan substansi bioaktif.

Dalam Lewis & Janse (2008) menyatakan bahwa 11-17 % semua obat yang ditemukan dari laut berasal dari karang lunak. Karang lunak menjadi sumber molekul biologi aktif dan senyawa model sebagai bahan obat (Carté 1996; Coll *et al.* 1985). Karang lunak diketahui umumnya memproduksi senyawa turunan terpenoid dan steroid. Karang lunak memproduksi senyawa cembranoid (L. C. Hu *et al.*, 2013; Ahmed, Wen, *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2008 dan Ahmed, Tai, *et al.*, 2008)



diterpenoid (Lee, Tai, Hwang, & Sheu, 2014; Yin *et al.*, 2013 dan S. Y. Cheng *et al.*, 2010), steroid (Chao *et al.*, 2012), yang mempunyai efek anti-inflamasi.

Senyawa terpenoid yang diproduksi oleh karang lunak merupakan suatu senyawa pertahanan kimia terhadap tekanan lingkungan, predasi dan menyediakan mekanisme perbaikan luka. Senyawa terpenoid dapat menekan sinyal nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), regulator utama dalam patogenesis penyakit inflamasi (Salminen, *et al.*, 2008). Thao *et al.*, (2014) melaporkan bahwa ekstrak metanolik dari *Sarcophyton pauciplicatum* dapat memodulasi aktivasi NF $\kappa$ B yang diinduksi TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  pada sel HaCat. Transkripsi NF $\kappa$ B merupakan regulator kunci dari jalur pro-inflamasi. Oleh karena itu, dengan mengidentifikasi isyarat penghambatan NF $\kappa$ B dapat memberikan hasil efek anti-inflamasi dalam penemuan obat terapi inflamasi (Perkins, 2007).

Respon inflamasi adalah suatu respons awal dari sistem imun manusia atau mamalia pada umumnya, dan hal ini normal dalam sistem imun. Inflamasi merupakan suatu mekanisme protektif dalam merespons infeksi mikroba atau iritasi atau cedera pada sel/jaringan (Wei *et al.*, 2013). Proses inflamasi melibatkan aktivasi sel makrofag dan neutrofil, sel NK (*natural killer*), sistem komplemen dan sekresi sitokin yang diaktivasi oleh sel yang esensial bagi sistem imun (Checker *et al.*, 2012).

Thao, Luyen, Sun, *et al.* (2014) menyatakan *Nitric Oxide* yang diproduksi oleh iNOS merupakan salah satu gen respon awal proses inflamasi dan umumnya digunakan sebagai penanda respon inflamasi. Perkembangan respon inflamasi berkaitan erat dengan perkembangan penyakit manusia, antara lain aterosklerosis, arthritis (Blunt *et al.*, 2013), diabetes (Kaplanski *et al.*, 2003), penyakit radang usus (G.-P. Hu *et al.*, 2011), kanker (Marris, 2006) dan alzheimer (Blunt *et al.*, 2012).



Bellik *et al.*, (2013) memetakan substansi bioaktif anti-inflamasi bekerja dengan mekanisme, yaitu : 1). Sebagai antioksidan dan *scavenging* radikal, 2).

Sebagai modulator aktivitas seluler inflamasi, 3). Sebagai modulator enzim pro-inflamatori 4). Sebagai modulatori produksi molekul pro-inflamatori, dan 5). Sebagai modulator ekspresi gen pro-inflamatori.

Sel makrofag merupakan sel imun bawaan dan memiliki peranan penting sebagai mediator sentral dalam respon inflamasi. Sel makrofag mengenali kehadiran mikroba patogen dan cedera jaringan dengan reseptor pengenalan patogen yang berbeda (Takeuchi & Akira, 2011). Toll-like receptor (TLR) merupakan famili dari reseptor pengenalan pathogen (*pathogen recognition receptor*). Dalam pengenalan komponen mikroba telah dikenal seperti TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 dan TLR6 yang terletak pada membran plasma pada sel endothelium.

Pada penelitian ini, menggunakan *Lipopolysaccharide* (LPS) dari bakteri *Escherichia coli* sebagai stimulant respon inflamasi. Reseptor pengenalan LPS, yaitu TLR4. Pengenalan TLR4 terhadap LPS membutuhkan sejumlah faktor-faktor lain untuk memfasilitasi pengenalan dan aktivasi yang efektif. LPS diangkut dalam darah oleh *LPS Binding Protein* (LBP), ke protein terkait CD14. Interaksi antara CD14 dan LBP, memberikan respons TLR4 terhadap LPS (Frey *et al.*, 1992). Interaksi ini menghasilkan stabilisasi, dimerisasi, aktivasi kompleks reseptor dan selanjutnya *downstream TLR4 signaling* (Park *et al.*, 2009).

*Signaling TLR4* melalui jalur *MyD88-dependent* dan *MyD88-independent*.

Jalur *MyD88-dependent* bertanggungjawab terhadap ekspresi sitokin pro-inflamasi, sedangkan jalur *MyD88-independent* memediasi induksi interferon tipe 1 dan gen yang diinduksi interferon (Y. C. Lu, Yeh, & Ohashi, 2008). Kedua jalur ini menstimuli faktor transkripsi NFκB.



Aktivasi faktor transkripsi NF $\kappa$ B akan menstimuli produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-6 (Bremner & Heinrich, 2002). NF $\kappa$ B mengontrol berbagai gen inflamasi, dan memainkan peran sentral dalam respon inflamasi terhadap infeksi. Pengikatan LPS ke TLR memicu persinyalan, yang memuncak pada aktivasi NF $\kappa$ B, yang menstimuli produksi sitokin pro-inflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), kemokin dan molekul adhesi (ICAM-1, E-selectin, P-selectin, VCAM-1 dan HMGB-1) (Tucsek, 2011). Untuk mengimbangi produksi sitokin pro-inflamasi, sel T regulator juga memproduksi sitokin anti-inflamasi IL-10 untuk meredam produksi sitokin pro-inflamasi.

Selain memproduksi substansi anti-inflamasi, karang lunak juga dilaporkan memproduksi substansi antioksidan. Respon inflamasi dapat dihambat dengan mencegah stres oksidatif dalam sel. Selain itu, LPS dapat meningkatkan produksi ROS. Produksi ROS memicu pelepasan ikatan Nrf-2/Keap-1, sehingga Nrf-2 dapat teraktivasi dan meregulasi produksi antioksidan endogen (SOD dan HO-1).

Perairan Indonesia khususnya Indonesia bagian timur memiliki biodiversitas organisme laut yang besar dan belum banyak diungkap potensi substansi bioaktif dan aktivitas biologinya (Tapilatu, 2015). Perairan Sulawesi Tengah juga dilaporkan menyimpan potensi biodiversitas karang lunak yang besar.

Ellis (1999) melaporkan potensi budidaya karang lunak di akuarium. Selain itu, di Indonesia juga telah dilaporkan budidaya karang lunak di alam, yaitu di Teluk Awur Jepara. Akan tetapi di Indonesia, potensi budidaya karang lunak hanya dieksplorasi nilai estetikanya saja, dan belum mengeksplorasi potensi bioaktif dan aktivitas biologisnya. Oleh karena itu, berdasarkan potensi biodiversitas dan bioaktif karang lunak serta potensinya dalam menghambat respon inflamasi, maka penelitian ini penting untuk dilakukan. Penelitian ini mengkaji potensi bioaktif dari karang lunak *Sarcophyton* sp. yang dikoleksi dari perairan Sulawesi Tengah dalam



menghasilkan substansi anti-inflamasi sebagai modulator faktor transkripsi, sitokin, dan enzim yang bertanggung jawab dalam respon inflamasi.

## 1.2 Perumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dijawab dalam penelitian ini, yaitu :

1. Bagaimana analisis probabilitas senyawa dan karakter substansi bioaktif karang lunak *Sarcophyton* sp. dengan analisis spektrometri?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak karang lunak *Sarcophyton* sp. terhadap sel T naive; sel T regulator; sitokin anti-inflamasi IL-10; reseptor pengenalan TLR; faktor transkripsi NFκB; iNOS; sitokin pro-inflamasi TNF-α dan IL-6; elemen stres oksidatif MDA; elemen anti-oksidan SOD, HO-1, Nrf-2, dan ekspresi *cell adhesion molecules* (VCAM-1, ICAM-1), pada mencit balb/c yang diinduksi LPS?
3. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak karang lunak *Sarcophyton* sp. terhadap sel T regulator; sitokin anti-inflamasi IL-10; reseptor pengenalan TLR-4; faktor transkripsi NFκB; sitokin pro-inflamasi TNF-α, dan IL-6 pada kultur sel limfosit yang diinduksi LPS?

## 1.3 Tujuan Penelitian

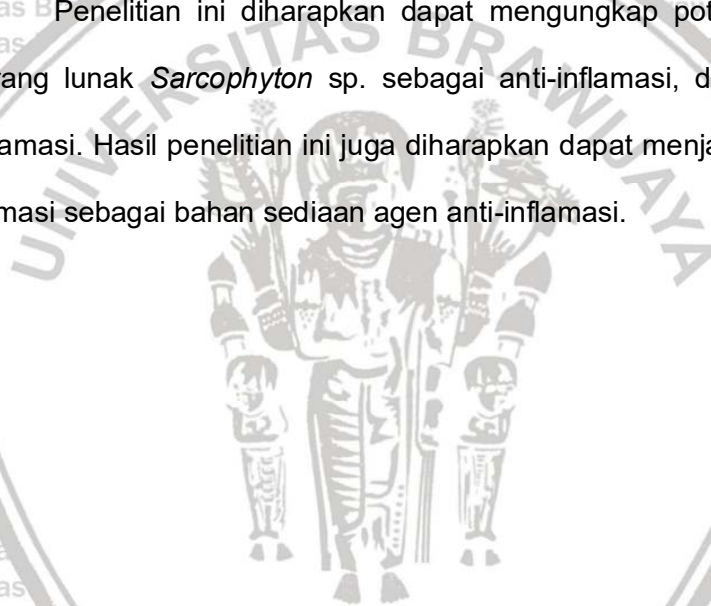
1. Mendapatkan fraksi karang lunak *Sarcophyton* sp. yang menunjukkan aktivitas inhibitori pelepasan NO.
2. Mendapatkan data probabilitas senyawa dan karakter spektrometri fraksi karang lunak *Sarcophyton* sp. yang berpotensi sebagai anti-inflamasi.
3. Mendapatkan fraksi karang lunak *Sarcophyton* sp. yang dapat meningkatkan jumlah relatif sel T naive (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>); sel T regulator (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>); dan produksi IL-10 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>), setelah induksi LPS secara *in vitro* dan *in vivo*.



4. Mendapatkan fraksi karang lunak *Sarcophyton* sp. yang dapat menghambat aktivasi TLR4 (CD11b<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup>); NFκB (CD11b<sup>+</sup>NFκB<sup>+</sup>), iNOS dan produksi TNF-α dan IL-6 (CD11b<sup>+</sup>TNFα<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>) serta menekan ekspresi VCAM-1, dan ICAM-1 setelah induksi LPS secara *in vitro* dan *in vivo*.
5. Mendapatkan fraksi karang lunak *Sarcophyton* sp. yang dapat meningkatkan aktivasi SOD dan HO-1 yang diregulasi oleh Nrf-2, serta dapat menurunkan level MDA pada mencit yang diinduksi LPS.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat mengungkap potensi substansi bioaktif karang lunak *Sarcophyton* sp. sebagai anti-inflamasi, dalam menekan respon inflamasi. Hasil penelitian ini juga diharapkan dapat menjadi alternatif bagi dunia farmasi sebagai bahan sediaan agen anti-inflamasi.



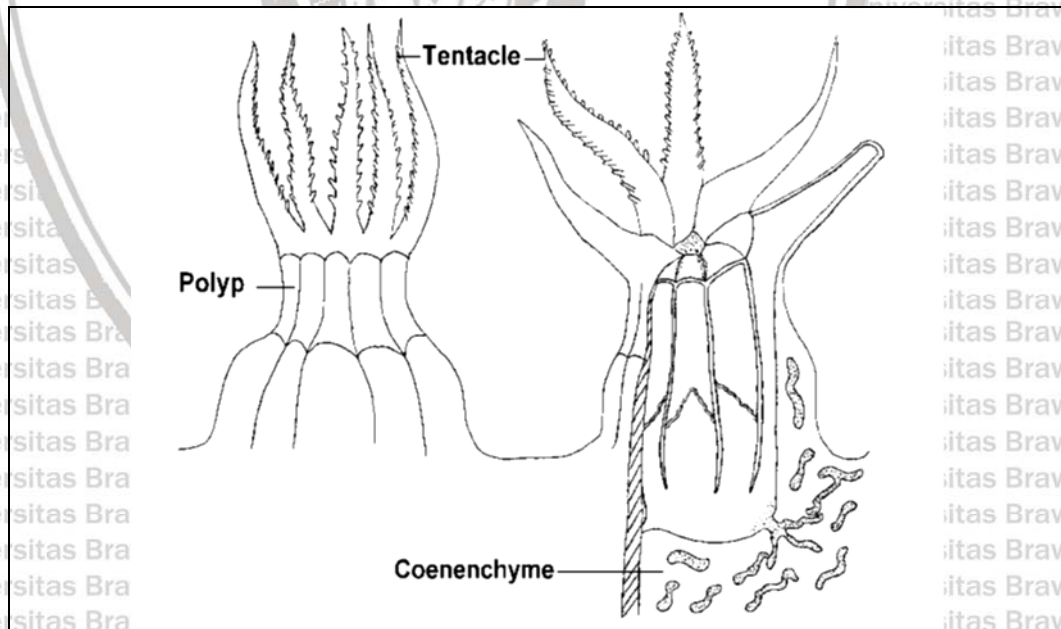


**BAB II**

**TINJAUAN PUSTAKA**

**2.1 Biologi dan Klasifikasi Karang Lunak**

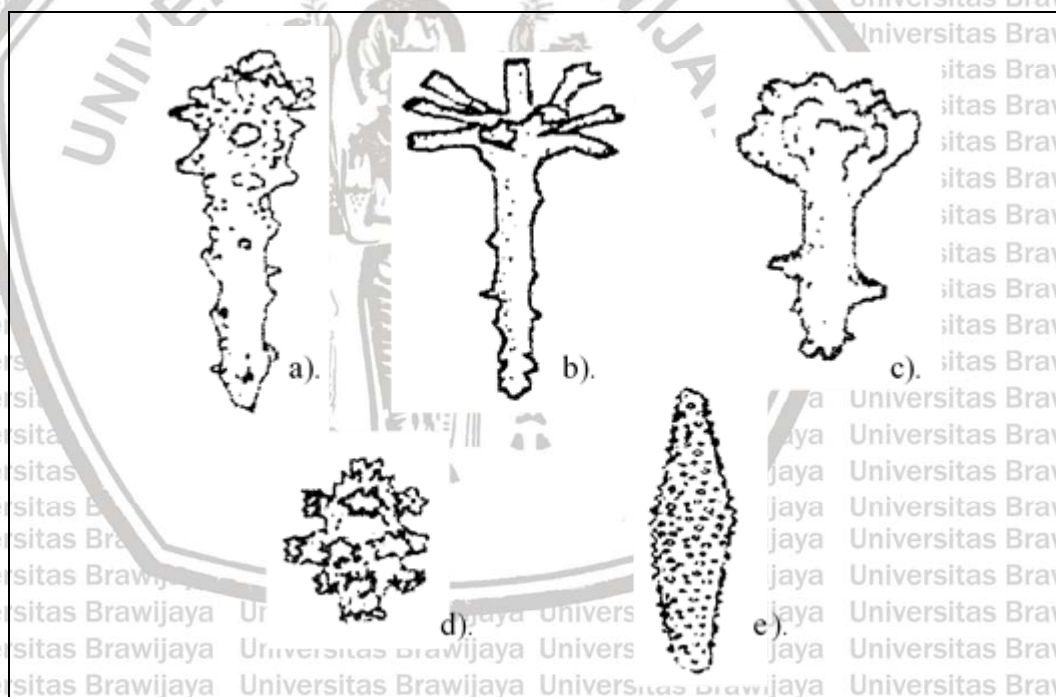
Karang lunak merupakan koloni hewan kecil yang dikenal dengan cnidaria polipoid (disingkat polip). Polip karang lunak jarang yang diameternya melebihi 5 mm dan tersusun dengan lembut, berdaging dan koloni yang bentuknya tidak beraturan dan berukuran hingga 1 m (Ellis & Sharron, 1997). Karang lunak masuk dalam ordo alcyonacea dan dikenali karena adanya partikel berkapur yang disebut sklerit (Putra, 2012). Setiap polip karang lunak memiliki 8 tentakel yang menyirip dan hal ini sehingga karang lunak diidentifikasi masuk dalam subkelas Octocorallia. Polip yang tertanam bersama dengan koloni sebagai massa dari jaringan yang disebut coenenchyme. Coenenchyme ini mendapatkan makan dan dikelola dari usus polip dan ditutupi oleh kulit pelindung (Gambar 2.1).



Gambar 2.1. Struktur Tubuh Karang Lunak (Ordo Alcyonacea)  
(Sumber : Ellis & Sharron, 1997)



Koloni pada karang lunak terbentuk melalui tunas aseksual dan pembentukan konsekuen coenenchyme disekitar polip baru. Amebocytes yang merupakan organ khusus, mengeluarkan spikula kalsium karbonat pada coenenchyme yang mengakibatkan kekakuan dan dukungan untuk terbentuknya koloni. Spikula yang sangat kecil dan disebut sklerit, yang terdapat di dalam jaringan tubuhnya. Pada tiap spesies karang lunak, bentuk dan ukuran spikula atau sklerit (Gambar 2.2) berbeda dan hal ini menjadi salah satu cara mengidentifikasi karang lunak (Ellis, 1999). Strategi reproduksi cnidaria secara umum dan karang lunak khususnya, yaitu pada perkembangan gamet dan planula, dan adanya musim kawin yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan, terutama suhu air laut dan fase bulan (Hwang & Song, 2007).



Gambar 2.2. Bentuk-Bentuk Sklerit Karang Lunak (Sumber : Verseveldt, 1980)  
Keterangan : a).Club; b).Wart pusat; c).Leptoclados; d).Barrel; e).Spindle

Karang lunak mendapatkan makanan di laut, menggunakan tentakel untuk menjebak mangsa. Pada tentakel ini terdapat sel-sel penyengat yang disebut



nematosis, yang berfungsi melumpuhkan plankton mikroskopis dan mentransfer ke dalam rongga tubuh untuk dicerna (Ellis & Sharron, 1997). Akan tetapi, karang lunak yang hidup di perairan dangkal memiliki alga simbiotik yang dikenal dengan zooxanthelle (*Symbiodinium microadriaticum*) yang hidup dalam tubuh karang lunak di bagian coenenchyme. Zooxanthelle ini berfotosintesis dan menghasilkan gula kompleks, asam lemak, asam amino, yang kemudian dilepaskan melalui dinding sel alga langsung ke tubuh karang lunak. Sebagai imbalannya, zooxanthelle menerima perlindungan dan nutrisi seperti nitrogen dan karbon dioksida dari polip karang lunak (Ellis, 1999). Struktur klasifikasi umum karang lunak yang terdapat di perairan Indo-Pasifik sebagai berikut (Ellis & Sharron, 1997):

Filum : Cnidaria

Kelas : Anthozoa

Subkelas : Octocorallia

Ordo : Alcyonacea

Subordo : Stolonifera, Alcyoniina, Scleraxonia, Holaxonia

Family : Alcyoniidae

Genera : *Sarcophyton*

Spesies : *Sarcophyton* sp.

Putra (2012) melaporkan bahwa famili karang lunak yang memproduksi bioaktif umumnya berasal dari famili clavulariidae, alcyoniidae, nephtheidae, xeniidae. Famili alcyoniidae dilaporkan memproduksi substansi bioaktif terbanyak, hal ini disebabkan karena famili alcyoniidae merupakan famili dengan jumlah spesies yang terbesar.

Karang lunak dilaporkan memproduksi beragam substansi bioaktif yang unik, termasuk senyawa sesquiterpenoid, diterpenoid, steroid dan senyawa kimia lainnya (Blunt *et al.*, 2013 dan Wei *et al.*, 2013). Pada tahun 2010-2011 diperkirakan lebih dari 22% penemuan metabolit baru dilaporkan dari karang



lunak, dengan didominasi senyawa golongan diterpenoid dan steroid (Blunt *et al.*, 2012 dan Putra, 2012). Senyawa Anti-inflamasi dari karang lunak juga telah dilaporkan (Mayer, Rodríguez, Tagliatalata-Scafati, & Fusetani, 2013).

## 2.2 Susbtansi Bioaktif Anti-inflamasi dari Karang Lunak *Sarcophyton* sp.

Karang lunak genus *Sarcophyton* termasuk dalam famili Alcyoniidae.

Genus *Sarcophyton* merupakan karang lunak yang kaya akan cembraneterpen (Blunt *et al.*, 2008 dan Kobayashi *et al.*, 1983). *Sarcophyton* merupakan genus

karang lunak dengan ciri khas keras dan banyak tersebar di daerah terumbu

karang. Karang lunak genus *Sarcophyton* memiliki bentuk yang melebar dan

berbentuk seperti jamur, sklerit ditemukan pada jaringan interior coenenchymal

(Aratake *et al.*, 2012). Tabel 2.1 menunjukkan laporan Anti-inflamasi dari karang

lunak genus *Sarcophyton*. Struktur senyawa dari karang lunak genus *Sarcophyton*,

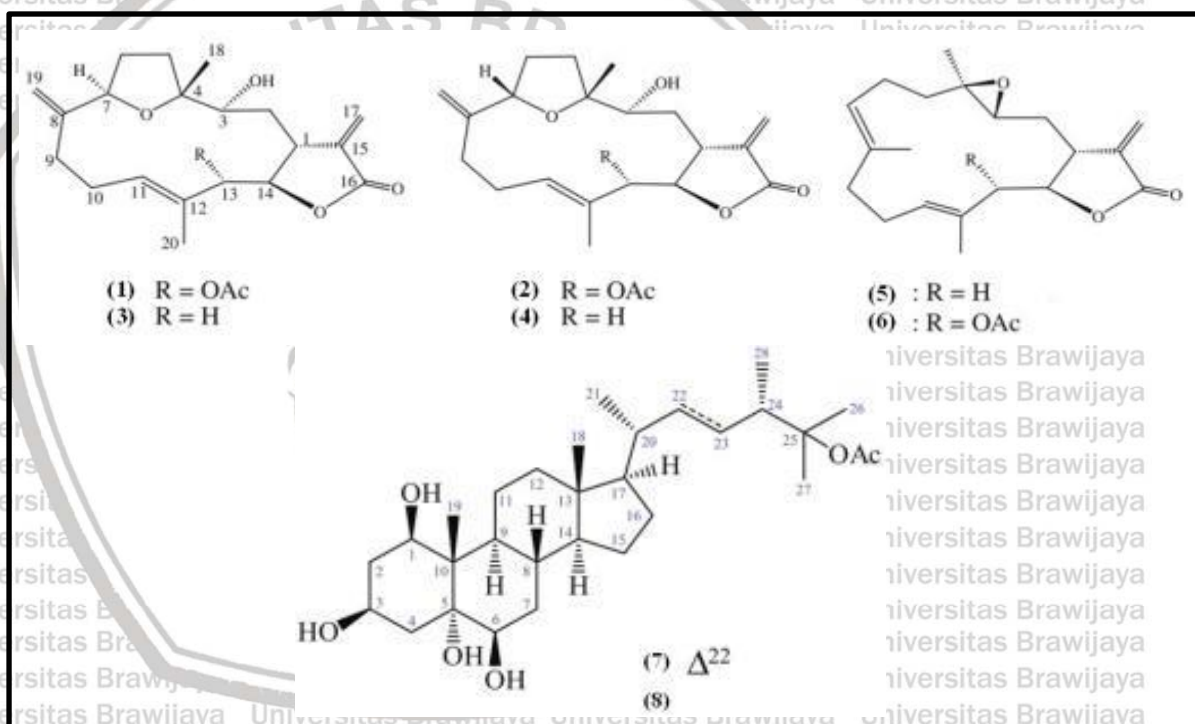
dapat dilihat pada Gambar 2.3.

Tabel 2.1. Laporan Bioaktif Karang Lunak Genus *Sarcophyton*

No	Karang Lunak	Lokasi	Senyawa	Mekanisme Kerja Anti-inflamasi	Referensi
1	<i>Sarcophyton ehrenbergi</i>	Perairan pulau Dongsha Taiwan	Ceramide (Gambar 2.4.9) Cerebroside 6 (Gambar 2.4.14) sarcoehrenosides A (Gambar 2.4.10) sarcoehrenosides B (Gambar 2.4.11) cerebroside 3 (Gambar 2.4.12) cerebroside 5 (Gambar 2.4.13)	mereduksi kadar iNOS dan COX-2 mereduksi ekspresi protein iNOS	(Cheng <i>et al.</i> , 2009)
2	<i>Sarcophyton crassocaule</i>	Perairan Dongsha Taiwan	sesarcocrassocolid es A (Gambar 2.4.1) sesarcocrassocolid es B (Gambar 2.4.2)	mereduksi kadar protein iNOS	(W. Y. Lin <i>et al.</i> , 2014 dan W.-Y. Lin <i>et al.</i> , 2010)



		sesarcocrossolid es C (Gambar 2.4.3)		
		sesarcocrossolid es D (Gambar 2.4.4)		
		13- acetoxysarcocrosso lide (Gambar 2.4.6)		
		Sarcocrossolide (Gambar 2.4.5)	mereduksi kadar protein iNOS dan COX-2	
		sarcopan ol A (Gambar 2.4.7)		
3	<i>Sarcophyton pauciplicatum</i>	Perairan Hai Phong, Vietnam	(24S)-ergost- 1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -tetraol- 25-monoacetate (Gambar 2.4.8)	menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B (Thao et al., 2014)



Gambar 2.3. Struktur Senyawa Anti-inflamasi dari Genus *Sarcophyton*,

### 2.3 Potensi Bioaktif Karang Lunak dari Perairan Indonesia

Berdasarkan studi literatur, publikasi ilmiah yang mengeksplorasi potensi bioaktif karang lunak asal perairan Indonesia masih relatif sedikit. Padahal, studi literatur juga menunjukkan bahwa karang lunak berpotensi besar memproduksi substansi bioaktif Anti-inflamasi (Wei *et al.*, 2013). Tabel 2.2 menunjukkan laporan



ilmiah yang mengeksplorasi potensi bioaktif karang lunak yang dikoleksi dari perairan Indonesia.

Tabel 2.2. Potensi Bioaktif Karang Lunak yang Dikoleksi dari Perairan Indonesia

No	Karang Lunak	Lokasi	Senyawa	Aktivitas	Referensi
1.	<i>Nephtea chabrolii</i>	perairan pulau Sinyaru, Sumatera Barat	Hydroxycolorenone, Methoxycolorenone dan (+)-cyclocolorenone	insektisida terhadap larva neonate dari hama serangga polifagus <i>Spodoptera littoralis</i>	Handayani <i>et al.</i> , 1997
	<i>Nephtea sp.</i>	Perairan kepulauan Seribu, Jakarta	3,4-epoxy-nephtenol acetate; decaryiol; 15-hydroxy-cembrenene; 2-hydroxy-nephtenol; nephtenol dan arachidonic acid	Sitotoksik yang lemah pada 3 galur sel tumor (SF-268 [CNS], MCF-7 [breast], H460 [lung])	Januar <i>et al.</i> , 2010
2.	<i>Lobophytum sp.</i>	perairan pulau Mayu Laut Maluku	secosterol	sitotoksik sel tumor ovarium manusia A2780 dan sel leukimia manusia K562	Morris, Christie, Jaspars, & Ofwegen, 1998
		perairan pulau Siladen, Taman Nasional Laut Bunaken, Manado Sulawesi Utara	O-Methyl decaryiol	Sitotoksik terhadap galur sel glioma	Fattorusso <i>et al.</i> , 2009 dan Fattorusso, Romano, Tagliatalata-Scafati, Janib Achmad, <i>et al.</i> , 2008
3.	<i>Xenia sp.</i>	perairan pulau Togean Sulawesi Tengah	xeniolide-F, 9-hydroxyxeniolide-F, isoxeniolide-A dan 7,8-oxido-isoxeniolide-A	Sitotoksik terhadap galur sel tumor tikus (P-388) dan manusia (A-549, HT-29, MEL-28)	Anta <i>et al.</i> , 2002
		perairan pulau Siladen, Taman Nasional Laut Bunaken,	blumiolide C, xeniolide F dan deoxyoxidoisoxeniolide A	sitotoksik terhadap galur sel tumor P-388 (mouse lymphocytic leukemia)	Fattorusso, Romano, Tagliatalata-Scafati, Achmad, <i>et al.</i> , 2008



		Manado Sulawesi Utara		
			25S)-3-Oxocholesta- 1,4-dien-26-oic acid; (25S)-18-acetoxy-3- oxocholesta-1,4-dien- 26-oic acid, 3-oxochol-1,4-dien-24- oic acid dan 3-oxochol-4-en-24-oic acid.	
4.	<i>Minaeba</i> sp. (cf. <i>alderladei</i> )	perairan selat Lembeh Sulawesi Utara		Tidak Ada Aktivitas W. Wang <i>et al.</i> , 2009
5.	<i>Sarcophyton</i> sp.	perairan Manado Sulawesi Utara	Lobohedleolide, (7Z)-lobohedleolide, dan denticulatolide	mereduksi produksi TNF- $\alpha$ dari sel makrofag RAW264.7 yang distimulasi LPS sitotoksik yang signifikan terhadap galur sel DLD-1 dan HL-60. Kapojos <i>et al.</i> , 2010
6.	<i>Cladiella</i> sp.	perairan Indonesia	Cladieunicellins A—E	Anti-inflamasi dengan penghambatan yang signifikan terhadap peningkatan generasi anion superoksida neutrofil manusia Y.-H. Chen <i>et al.</i> , 2011
7.	<i>Sinularia</i> sp.	perairan pulau Siladen, Taman Nasional Laut Bunaken, Manado Sulawesi Utara	scabrolide D dan sinularioside	menghambat produksi NO <sub>2</sub> (metabolit yang stabil dari NO) sebagai parameter aktivasi makrofag dan induksi iNOS Fattorusso <i>et al.</i> , 2011 dan Putra <i>et al.</i> , 2012.
		Perairan pantai Malalayang kota Manado	Belum teridentifikasi	Diduga memiliki aktivitas antimitotik dengan mempengaruhi pertumbuhan jamur uji <i>Pyricularia</i> <i>oryzae</i> menjadi keriting (Tanod, Mangindaan, & Kapojos, 2015)

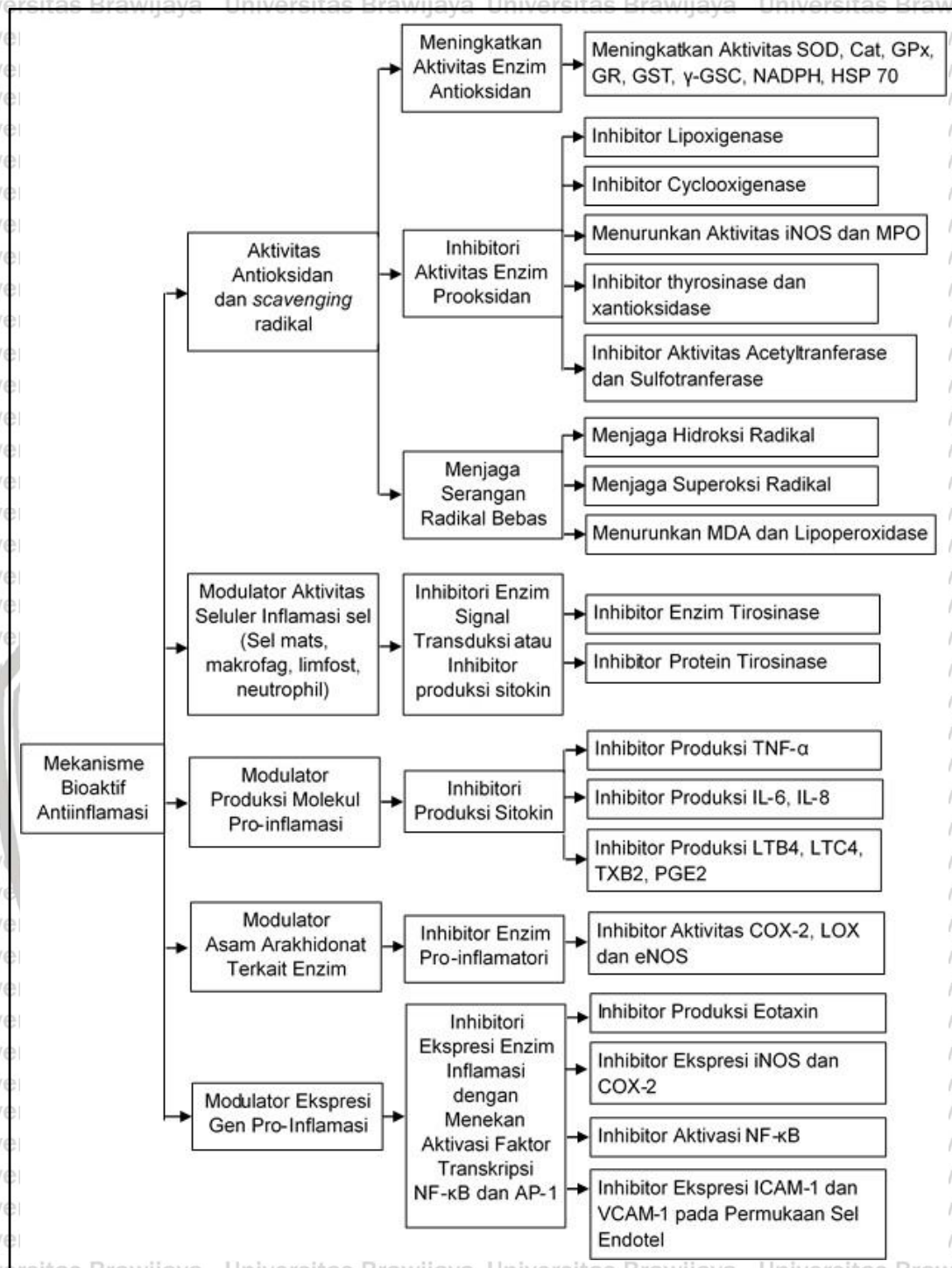


Antifeedant, Fraksi etanol menghambat aktivitas makan larva <i>P.</i> <i>xylostella</i>	Tanod, Aristawati, Nurhani, & Mappiratu, 2017
Perairan Pantai Desa Kabonga Teluk Palu Sulawesi Tengah	Belum teridentifikasi
Fraksi diklorometana dapat menghambat pertumbuhan bakteri <i>S.</i> <i>aureus</i> dan <i>E.</i> <i>coli</i>	Tanod, Aristawati, Putra, & Muliadin, 2018

## 2.4 Mekanisme Bioaktif Anti-inflamasi Dari Produk Alami

Mekanisme bioaktif Anti-inflamasi dari produk alami telah dikemukakan dan dijabarkan secara luas, yaitu: 1). Aktivitas antioksidan dan *scavenging* radikal, 2). Modulasi aktivitas seluler inflamasi yang berhubungan dengan sel (sel mast, makrofag, limfosit dan neutrofil), 3). Modulasi aktivitas enzim pro-inflamatori seperti *phospholipase* A2 (PLA2), *cyclooxygenase* (COX), *lipoxygenase* (LOX) dan enzim yang memproduksi nitric oxide (NO), nitric oxide synthase (NOS), 4). Modulasi dari produksi molekul pro-inflamatori lainnya, dan 5). Modulasi dari ekspresi gen pro-inflamatori (Bellik *et al.*, 2013). Mekanisme kerja bioaktif Anti-inflamasi dapat dilihat pada Gambar 2.4.





Gambar 2.4. Mekanisme Bioaktif Anti-inflamasi (Khansari *et al.*, 2009)

Ket : SOD, superoxide dismutase; Cat, catalase; GPx, *Glutathione peroxidase*; GR, *Glutathione reductase*; GST, *Glutathione S Transferase*; γ-GSC, (*γ*-glutamylcysteinyl synthetase; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; HSP70, heat shock protein 70; MPO, Myeloperoxidase; MDA, malondialdehida; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LTB4, leukotriene B4; LTC4, cysteinyl leukotriene C4; TXB2, thromboxane B2; PGE2, Prostaglandin E2; COX-2, Cyclooxygenase-2; LOX, Lipoxygenase; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; AP-1, activator protein 1; NF-κB, nuclear factor-kappa B; TNF-α, Tumor Necrosis Factor-α; ICAM-1, Intercellular Adhesion Molecule-1; VCAM-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1.



## 2.5 Inflamasi

Inflamasi merupakan suatu mekanisme atau respon imunitas yang normal pada tubuh manusia. Jika sel/jaringan/organ terkena suatu tekanan eksogen maupun endogen maka akan memberikan respon inflamasi (Fulda, Gorman, Hori, & Samali, 2010). Respon inflamasi merupakan respon imunologis kompleks dan diatur ketat terhadap invasi patogen dan cedera jaringan yang sebagian besar dikendalikan oleh system imun bawaan (*innate*) dan adaptif. Sel imun bawaan (*innate*) seperti makrofag merupakan mediator sentral dari respon inflamasi melalui pengenalan mikroba patogen dan cedera jaringan inang oleh *pathogen recognition receptor* (PRR) yang berbeda (Takeuchi & Akira, 2011).

Keadaan fisiologis pada manusia seperti kelelahan, demam, depresi, kebingungan, infeksi dan kehilangan memori merupakan gejala umum yang dapat berindikasi pada reaksi inflamasi. Kondisi fisiologis ini dapat disebabkan oleh stress fisik maupun psikologis (Hasegawa *et al.*, 2011). Secara visual, inflamasi ditandai dengan kemerahan, sendi yang bengkak, hangat, nyeri, kekakuan dan tidak bekerjanya fungsi suatu organ (Prasad, Ravindran, & Aggarwal, 2010). Inflamasi juga dihubungkan dengan penyakit akut dan kronis manusia seperti penyakit saraf, jantung, penyakit autoimun dan kanker (Kamp, Shacter, & Weitzman, 2011 dan Aggarwal, Vijayalekshmi, & Sung, 2009).

Setelah pengenalan patogen atau cedera, produksi mediator inflamasi termasuk sitokin, kemokin, enzim, peptida vasoaktif dan amina, komponen komplemen dan mediator lipid mengatur perekrutan leukosit dan migrasi ke jaringan yang mengalami inflamasi. Hal ini mengaktifkan sitotoksik dan remodeling jaringan bawaan dan sel imun adaptif yang dapat membersihkan infeksi, meningkatkan perbaikan jaringan dan penyembuhan peradangan (Medzhitov, 2008). Sementara respon inflamasi mikrobisidal yang kuat sangat penting untuk melawan infeksi, respon inflamasi yang berkepanjangan dapat berakibat merusak



jaringan. Inflamasi yang berlebihan atau tidak terkontrol dapat menyebabkan berbagai inflamasi kronis dan penyakit autoimun yang pleiotropik di samping kanker, penyakit jantung dan diabetes. Dengan demikian penyesuaian fisiologis dari respon inflamasi sangat penting untuk mempromosikan homeostasis jaringan dan resolusi inflamasi pasca tantangan inflamasi (Medzhitov, 2008 dan Nathan, 2002).

## 2.6 Toll-like Receptors

Toll-like receptor (TLRs) adalah keluarga PRR yang paling banyak dipelajari dan berkarakter luas. Penemuan homolog TOLL manusia telah mengarah pada penemuan 12 TLRs pada mencit dan 10 TLRs pada manusia. Secara struktural, TLRs mengandung ectodomain yang kaya akan pengulangan leusin yang mengakui berbagai PAMP dan DAMP, domain transmembran dan domain TIR sitoplasma yang memediasi pensinyalan sinyal hilir dan peristiwa transkripsi. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 dan TLR6 tertanam dalam membran plasma pada permukaan sel dan mengenali komponen mikroba yang diekspresikan pada permukaannya.

TLRs adalah PRR yang paling banyak dipelajari dalam kekebalan bawaan yang mengenali berbagai jamur (mannan), virus (*envelop proteins*, RNA dan DNA), bakteri (lipopolysaccharide (LPS), asam lipotechoic, peptidoglikan dan DNA) dan *host DAMP-Danger Associated Molecular Patterns (heat shock proteins dan fibrinogen)* (Tabel 2.3). TLR4 terutama mengenali LPS, komponen dinding sel membran luar dari bakteri gram negatif. TLR4 juga mengenali mannan, *heat shock proteins* dan fibrinogen. TLR2 penting untuk mendeteksi bakteri gram positif. TLR2 mengenali peptidoglikan (PGN) dan asam lipotechoic, lipoarabinomannan dan zymosan dari mikobakterium serta jamur selain protein hemagglutinin dari virus campak. TLR2 dapat membentuk heterodimer dengan TLR1 dan TLR6 masing-



masing untuk mendeteksi triacylated mikrobial dan lipoprotein diacylated. TLR5 secara khusus mengenali flagelin sedangkan anggota keluarga murine yang terkait erat TLR11 mengenali bakteri uropatogenik dan molekul seperti profiling.

Tabel 2.3. *Pathogen Recognition Receptors (PRR) dan Ligan*

Sumber	Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP)	TLR	PRR
Bakteri	Triacyl Lipopeptides	TLR1/TLR2	
	Diacyl Lipopeptides	TLR6/TLR2	
	LPS	TLR4	
	Lipotechoic acid	TLR2	NOD1/NOD2
	Peptidoglycan	TLR2	NOD1/NOD2
	Flagellin	TLR5	
	DNA	TLR9	AIM2
	Lipoarabinomannan	TLR2	
	Porins	TLR2	
	Uropathogenic bacteria	TLR11	
Virus	dsRNA	TLR3	RIG-I, MDA5, LGP2
	ssRNA	TLR7 & TLR8	RIG-I, MDA5, LGP2
	DNA	TLR9	AIM2
	Envelope proteins	TLR4	
	Hemagglutinin	TLR2	
Fungi	Profilin like molecules	TLR11	
	Glycoinositolphospholipids	TLR4	
	Mannan	TLR2/TLR4	
	Zyosan	TLR2/TLR6	Dectin1
	Phospholipomannan	TLR2	
	Hemozoin	TLR9	
Host	HSP	TLR4	
	Fibrinogen	TLR4	

Sumber : O'Carroll (2013)

TLR3, TLR7, TLR8 dan TLR9 secara khusus mengenali RNA dan DNA virus; oleh karena itu, terletak secara strategis di dalam kompartemen sitosolik seperti endosom dan lisosom untuk mendeteksi asam nukleat dari sel yang terinfeksi virus. TLR7 dan TLR8 berkaitan erat dan mengenali virus single stranded RNA (ssRNA) seperti Influenza A dan HIV, sementara TLR9 mengenali motif CpG DNA *unmethylated* yang ditemukan dalam virus dan bakteri tetapi tidak pada mamalia. TLR3 secara khusus mengenali virus double stranded RNA (dsRNA) dan sinyal melalui jalur persinyalan yang berbeda dari semua TLR lainnya untuk memediasi tanggapan antivirus yang kuat (Kawai & Akira, 2011; Kawai & Akira, 2010; dan Takeuchi & Akira, 2010).



### 2.6.1 Lipopolysaccharide dan Persinyalan TLR4

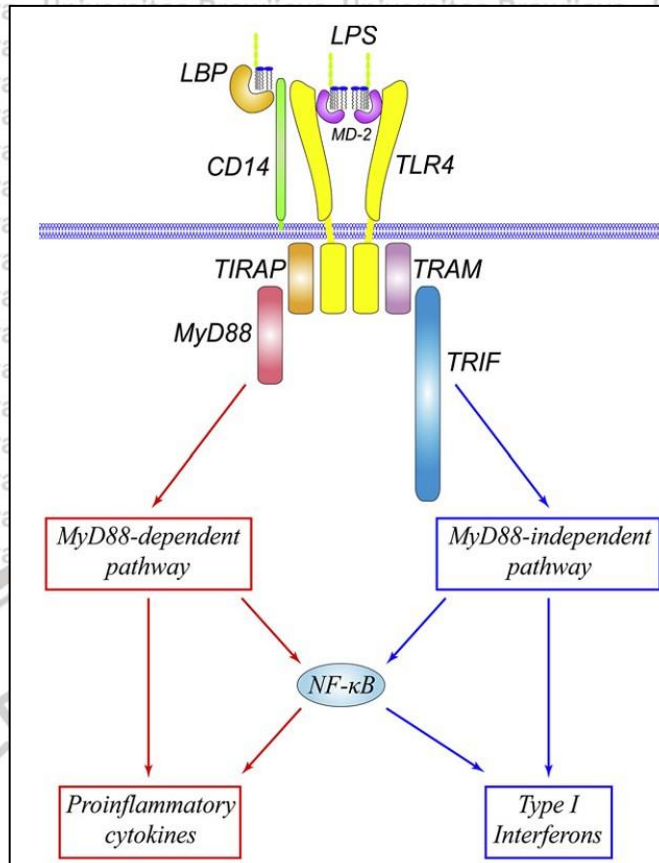
*Lipopolysaccharide* (LPS) adalah glikolipid kompleks dari bakteri gram negatif dan aktivator yang sangat kuat dari respon imun bawaan (*innate*) terhadap infeksi mikroba. LPS adalah salah satu komponen imunostimulator bakteri yang paling baik dipelajari dan dapat menginduksi peradangan sistemik dan sepsis jika sinyal yang berlebihan terjadi (Beutler & Rietschel, 2003). LPS terdiri dari tiga bagian: lipid A, oligosakarida inti, dan rantai samping O (Miller, Ernst, & Bader, 2005 dan Raetz & Whitfield, 2002). Pengenalan TLR4 terhadap LPS membutuhkan sejumlah faktor-faktor lain untuk memfasilitasi pengenalan dan aktivasi yang efektif.

LPS diangkut dalam darah oleh *LPS Binding Protein* (LBP), yang merupakan protein pembawa plasma terlarut yang mengikat glikosilfosfatidilinositol, protein terkait CD14. Interaksi antara CD14 dan LBP memfasilitasi pengenalan LPS oleh TLR4 – kompleks *myeloid differentiation factor 2* (MD2) sehingga memberikan respons TLR4 terhadap LPS (Frey *et al.*, 1992; Schumann *et al.*, 1990; Kirkland *et al.*, 1990; dan Wright, Ramos, Tobias, Ulevitch, & Mathison, 1990). Interaksi kompleks ini menghasilkan stabilisasi dari interaksi LPS-TLR4-MD2, dimerisasi, aktivasi kompleks reseptor dan selanjutnya *downstream TLR4 signaling* (Park *et al.*, 2009).

### 2.6.2 Transduksi Persinyalan TLR4

Persinyalan TLR4 telah dibagi menjadi jalur *MyD88-dependent* dan *MyD88-independent (TRIF-dependent)* (Gambar 2.5). Jalur *MyD88-dependent* bertanggungjawab terhadap ekspresi sitokin proinflamasi, sedangkan jalur *MyD88-independent* memediasi induksi interferon tipe 1 dan gen yang diinduksi interferon (Y. C. Lu, Yeh, & Ohashi, 2008).





Gambar 2.5. Persinyalan LPS/TLR4 dalam mengenali LPS yang difasilitasi LBP dan CD14, serta dimediasi oleh kompleks reseptor TLR4/MD-2 (Y. C. Lu *et al.*, 2008)

### Jalur MyD88-dependent

Respons imunologis yang diinduksi TLR dirancang sesuai dengan sinyal aktivasi TLR spesifik oleh PAMP atau DAMP. TLR3, TLR7, TLR8, dan TLR9 mengenali RNA dan DNA virus dan mendorong kekebalan anti-virus melalui induksi gen respons interferon. TLR1/TLR2, TLR6/TLR2, dan TLR5 terutama meningkatkan respon sitokin pro-inflamasi. Semua TLR kecuali TLR3 secara eksklusif memberi sinyal melalui protein adaptor MyD88, yang mengarah pada aktivasi kuat produksi sitokin pro-inflamasi melalui aktivasi NF-κB dan ekspresi gen mitogen activated protein (MAP) kinase. Selain itu TLR4 adalah satu-satunya TLR yang dapat memanfaatkan kedua jalur MyD88 yang *dependent* dan *independent*



lebih jauh menekankan potensi imunologis yang kuat dari respons pensinyalan TLR4 terhadap infeksi (Hoshino *et al.*, 1999; Kawai & Akira, 2010; dan Kawai & Akira, 2011).

Aktivasi semua pensinyalan TLR membutuhkan perekrutan kombinasi protein adaptor domain TIR. Ini termasuk MyD88, TRIF, TIRAP (MAL), TRAM dan protein adaptor SARM yang baru diidentifikasi (Carty *et al.*, 2006). Kompleks pensinyalan TLR yang diaktifkan merekrut MyD88 ke membran plasma melalui interaksi domain TIR yang difasilitasi oleh molekul adaptor penghubung TIRAP.

MyD88 berinteraksi melalui interaksi domain kematian dengan IRAK4 yang mengarah ke aktivasi. IRAK4 memfosforilasi IRAK1 dan IRAK2, keduanya terlepas dari kelompok adaptor ini dan membentuk kompleks baru dengan TRAF6, ligase ubiquitin E3 dan kompleks enzim ubiquitin E2 yang terdiri dari Ubc13 dan Uev1.

Kompleks E2 ini bertanggung jawab untuk memediasi K63 mediasi poly-ubiquitination dari TRAF6 dan menghasilkan rantai polyubiquitin bebas terkonjugasi yang mengarah pada perekrutan kompleks lain yang terdiri dari TAK1,

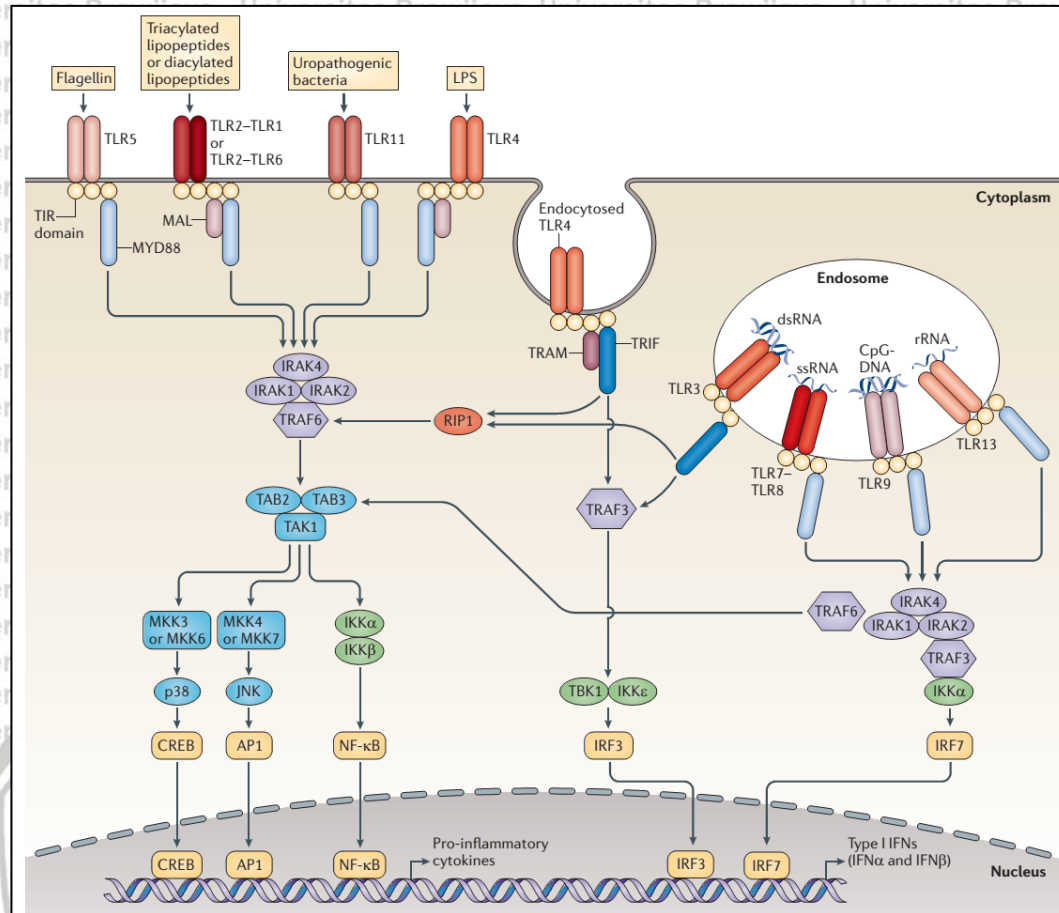
TAB1, TAB2 dan TAB3. TAK1 adalah IKK kinase yang memfosforilasi residu serin spesifik pada IKK $\beta$  di kompleks IKK yang terlibat dalam aktivasi NF- $\kappa$ B. Aktivasi phosphorylates IKK $\beta$  dan menargetkan protein I $\kappa$ B predominant I $\kappa$ B $\alpha$  untuk

degradasi proteosom dengan memicu polubiquitinasia K48. Degradasi I $\kappa$ B $\alpha$  memungkinkan pergerakan faktor transkripsi NF $\kappa$ B ke dalam nukleus untuk mempromosikan transkripsi mediator pro-inflamasi. Selain itu, TAK1

memfosforilasi MAP kinase 6 yang pada gilirannya mengarah pada aktivasi jalur respons stres JNK dan p38 dan aktivasi selanjutnya dari faktor transkripsi AP1

(Gambar 2.6) (Carmody & Chen, 2007; Kawai & Akira, 2010; dan Kawai & Akira, 2011).





Gambar 2.6. Jalur pensinyalan TLR

Jalur pensinyalan TLR *MyD88 dependent* dan *MyD88 independent* (TRIF) menggunakan TLR yang berbeda. TLR4 menggunakan kedua jalur untuk mengaktifkan sitokin pro-inflamasi melalui NF- $\kappa$ B dan jalur respons stres (p38 dan JNK). Gen yang diinduksi interferon diaktifkan oleh NF- $\kappa$ B dan IRF3 (Kawagoe *et al.*, 2007).

Defisiensi pada molekul-molekul adaptor pensinyalan ini menghasilkan respons imunologis yang berubah dan selanjutnya meningkatkan kerentanan terhadap infeksi mikroba. Mencit yang kekurangan MyD88 dan TIRAP menunjukkan pengurangan ekspresi gen pro-inflamasi NF $\kappa$ B yang diinduksi sebagai respons terhadap aktivasi LPS (Kawai, Adachi, Ogawa, Takeda, & Akira, 1999 dan Horng, Barton, Flavell, & Medzhitov, 2002). Lebih lanjut, defisiensi MyD88 membuat mencit sangat rentan terhadap perkembangan radang usus dan colitis (Araki *et al.*, 2005). Demikian pula, defisiensi IRAK4 mengarah ke



pensinyalan IL-1 dan TLR yang rusak (Suzuki *et al.*, 2002 dan Picard *et al.*, 2003).

Menariknya, kekurangan MyD88 mengidentifikasi jalur independen MyD88 dari TLR4 yang mengarah pada induksi interferon tipe 1 dan penundaan ekspresi gen NF $\kappa$ B (Suzuki *et al.*, 2002).

### **Jalur MyD88 independent**

Jalur pensinyalan TLR *MyD88 independent* menggunakan adaptor dan TIR domain protein TRIF. Pensinyalan TRIF dependent digunakan oleh TLR3 untuk mengaktifkan ekspresi gen interferon yang dirancang khusus untuk infeksi virus.

Namun pensinyalan TRIF tidak secara eksklusif digunakan oleh TLR3 karena TLR4 juga dapat memberi sinyal meskipun TRIF secara independen dari MyD88 memediasi respons pro-inflamasi dan interferon. TLR3 yang diaktifkan dapat secara langsung berinteraksi dengan TRIF melalui domain TIR-nya, namun TLR4 membutuhkan *adaptor bridging protein* tambahan, TRAM untuk memediasi interaksi TLR4 dengan TRIF. TRIF berinteraksi dengan TRAF3 dan TRAF6 di samping RIP1 melalui *RIP homotypic interaction motif* (RHIM). Kompleks yang terdiri dari TRAF6, RIP1, Pellino dan TRADD diperlukan untuk aktivasi IKK kinase TAK1, yang pada gilirannya mengarah pada aktivasi kompleks IKK dan selanjutnya aktivasi NF $\kappa$ B dan MAP kinase.

Pensinyalan TRIF juga memunculkan induksi gen respons interferon melalui faktor transkripsi IRF3. TRAF3 bertanggung jawab untuk mengaktifkan TBK1 dan IKKi yang bertanggung jawab untuk fosforilasi IRF3 dan IRF7 dan selanjutnya transkripsi interferon tipe 1 (Carmody & Chen, 2007; Kawai & Akira, 2010; Kawai & Akira, 2011; dan Takeuchi & Akira, 2011). Ilustrasi penjelasannya dapat dilihat pada Gambar 2.4. Kekurangan dalam pensinyalan TRIF dapat menyebabkan penurunan yang signifikan dalam respon anti-virus melalui represi produksi IRF3 dan IFN $\beta$  (Yamamoto *et al.*, 2003).



## Regulasi negatif dari TLR yang Menginduksi Inflamasi

Pensinyalan TLR menginduksi respon imun yang cepat namun disesuaikan dan kuat terhadap repertoar rangsangan yang luas. Namun pensinyalan TLR yang tidak terkontrol dan berlebihan dapat memiliki konsekuensi patologis yang tidak baik. Pensinyalan TLR yang berlebihan dan transkripsi selanjutnya dari sitokin dan kemokin dapat mengakibatkan induksi rekrutmen seluler sel imun bawaan seperti neutrofil, apoptosis seluler yang diinduksi TNF- $\alpha$  selain produksi oksigen reaktif dan spesies nitrogen yang berlebihan yang semuanya dapat mengakibatkan jaringan dan kerusakan organ. Hal ini mengharuskan perlunya kontrol yang ketat terhadap respons pensinyalan TLR untuk mempertahankan homeostasis imun. Untuk membatasi kerusakan jaringan, respons inflamasi TLR dikendalikan oleh sejumlah proses molekuler yang meliputi penghambatan transduksi sinyal dan represi transkripsi gen (Tabel 2.4 dan Gambar 2.7) (Liew, Xu, Brint, & O'Neill, 2005; Lang & Mansell, 2007; Kondo, Kawai, & Akira, 2012; dan Hedl & Abraham, 2013).

Tabel 2.4. Regulator Negatif dari Persinyalan TLR

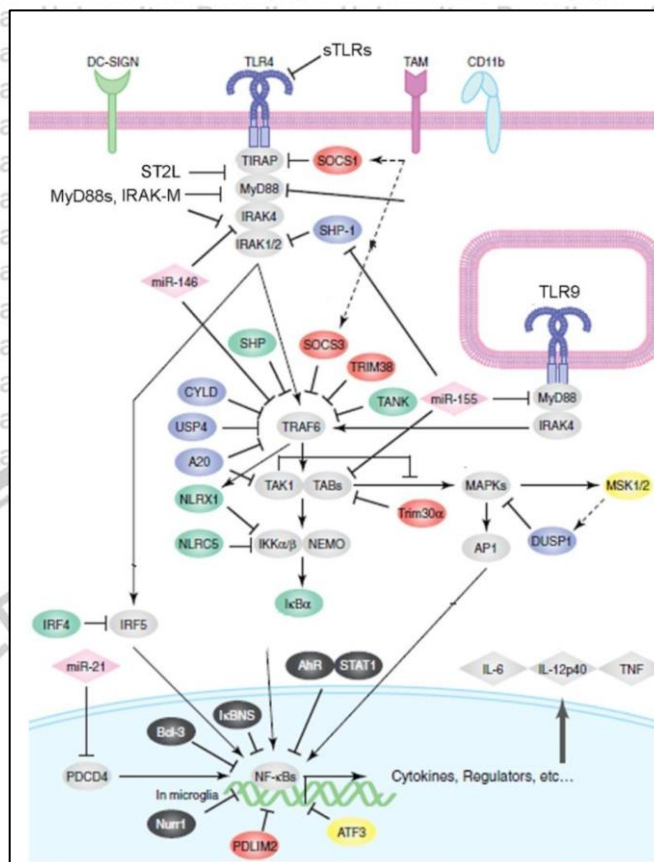
Regulator Negatif	Target
ST2	MyD88, TIRAP
SIGIRR	IRAK1, TRAF6
IRAK-M	IRAK1, IRAK4 MyD88
TOLLIP	IRAK1
MyD88s	IRAK1/IRAK4
sTLR2/sTLR4	TLR Kompleks Reseptor
SARM	TRIF
A20	TRAF6
USP4	TRAF6
CYLD	TRAF6/TRAF7
SHP2	TRIF/TBK1
SOCS1	TIRAP, MAPK, p38, JNK
PDLIM2	p65
TRIM30 $\alpha$ /TRIM38	TAB2/TAB3/TRAF6
IL10, TGF $\beta$	IRAK1, IRAK4, $\uparrow$ negative regulators
IL1RA	IL1R signalling
TGF- $\beta$	$\uparrow$ SHIP1
PI3K	TLR9 signalling
ATG16L	ROS, IL1 signalling
IRF4/IRF5	MyD88



## TIPE2

## Activating protein 1 (NF-Kb)

Sumber : (O'Carroll, 2013)



Gambar 2.7. Regulator Negatif dari Pensinyalan TLR

Regulator negatif dari MyD88 dan TRIF dependent pada jalur TLR melalui penghambatan transduksi sinyal TLR (Diadaptasi dari Kondo *et al.*, (2012).

Reseptor pemecah umpan menargetkan tahap awal pensinyalan TLR dengan mengubah aktivasi TLR dan karenanya merupakan salah satu baris pertama regulasi negatif pensinyalan TLR (Lang & Mansell, 2007). sTLR4 telah diusulkan untuk secara langsung melemahkan aktivasi TLR dan peristiwa *downstream signalling* dengan menghalangi interaksi antara TLR4 dan protein aksesori MD2 dan CD14 (Hyakushima *et al.*, 2004 dan Iwami *et al.*, 2015). Untuk mendukung hal ini, sTLR2 dan sTLR4 telah terbukti mengurangi aktivasi NF-κB dan ekspresi gen proinflamasi (Liew *et al.*, 2005).



ST2 adalah glikoprotein terikat transmembran tipe 1 dan regulator negatif dari pensinyalan TLR4 dan IL-1R1 yang mengasingkan protein adaptor MyD88 dan TIRAP untuk mencegah perekrutan mereka ke kompleks TLR yang diaktifkan.

Selain itu, mencit yang kekurangan ST2 ditemukan sangat responsif terhadap tantangan yang berulang dengan LPS dan gagal mengembangkan toleransi LPS, sebuah respons regulasi protektif terhadap tantangan berulang dengan LPS (Brint *et al.*, 2004 dan S. K. Biswas & Lopez-collazo, 2009). Mirip dengan ST2, *orphan reseptor* SIGIRR (TIR8) telah menunjukkan mencegah perekrutan protein adaptor ke reseptor TLR dengan peningkatan aktivasi NF- $\kappa$ B *MyD88 dependent* yang diukur pada mencit kekurangan SIGIRR (Wald *et al.*, 2003). SIGIRR adalah regulator negatif dari pensinyalan TLR dan IL-1R1 tetapi hanya domain TIR dari SIGIRR yang telah terbukti spesifik untuk interaksi dengan IRAK1 dan TRAF6 dalam pensinyalan TLR (Qin, Qian, Yao, Grace, & Li, 2005).

Selain SIGIRR dan ST2 ada banyak regulator negatif yang mempengaruhi perekrutan protein adaptor ke kompleks protein adaptor TLR. IRAK-M adalah regulator negatif intraseluler yang dapat diinduksi dari pensinyalan IL-1 dan TLR yang menghambat disosiasi IRAK1 dan IRAK4 dari MyD88 dengan mencegah membentuk kompleks dengan TRAF6, yang diperlukan untuk aktivasi *downstream* pensinyalan TLR. IRAK-M mencit dan makrofag sangat responsif terhadap keduanya stimulasi TLR / IL-1 dan menampilkan cacat pada toleransi LPS mirip dengan mencit yang kekurangan ST2 (K. Kobayashi, Hernandez, Janeway, Medzhitov, & Flavell, 2002). Pengurangan ekspresi IRAK-M pada tikus bebas kuman menyoroati pentingnya IRAK-M dalam pengaturan respon imun usus terhadap komunitas mikroba usus (A. Biswas *et al.*, 2011).

Selain itu sejumlah kondisi termasuk asma dan fibrosis kistik telah dikaitkan dengan hilangnya mutasi fungsi untuk IRAK-M yang selanjutnya mendukung perannya sebagai pengatur penting regulator negatif upstream dari pensinyalan



TLR (Balaci *et al.*, 2007 dan del Fresno *et al.*, 2009). Selain itu, persinyalan regulator negatif TLR dan IL-1 (Tollip = *Toll Interacting Protein*) secara langsung mengganggu IRAK1 menghambat aktivitas fosforilasi dan kinase-nya (Burns *et al.*, 2000 dan G. Zhang & Ghosh, 2002). Demikian pula, MyD88s telah terbukti menghambat fosforilasi IRAK1 oleh IRAK4 sehingga menghambat pensinyalan downstream dan aktivasi NF- $\kappa$ B (Janssens, Burns, Tschopp, & Beyaert, 2002 dan Burns *et al.*, 2003). Protein yang mengandung Sterile-alpha and armadillo-motif (SARM) mewakili regulator negatif lain dari jalur TLR independen MyD88. SARM adalah protein adaptor domain TIR yang menghambat protein adaptor esensial TRIF dengan mekanismenya yang belum diketahui (Carty *et al.*, 2006).

Peristiwa fosforilasi memainkan peran penting dalam membentuk respons terinduksi TLR yang disesuaikan setelah pengenalan pathogen. Oleh karena itu, modifikasi pasca-translasi memainkan peran sentral dalam regulasi negatif pensinyalan TLR (Kondo *et al.*, 2012). Enzim deubiquitinating A20 adalah regulator negatif yang diinduksi TLR dari respons yang diinduksi *MyD88 dependent* dan *TLR independent* melalui penghapusan rantai polyubiquitin terkait K63 pada TRAF6 teraktivasi (Boone *et al.*, 2004).

A20 juga mengatur pensinyalan TLR3 dengan mencegah dimerisasi IRF3 (Saitoh *et al.*, 2014), selain mengatur secara negatif pensinyalan TNF (Wertz *et al.*, 2004) dan pensinyalan NOD2 (Hitotsumatsu *et al.*, 2008) melalui penghilangan rantai polyubiquitin K63 pada protein RIP. Selain itu, A20 telah dikaitkan dengan sejumlah penyakit inflamasi, dengan kekurangan A20 dalam enterosit dan sel dendritik berimplikasi dalam pengembangan inflamasi spontan termasuk colitis (Vereecke *et al.*, 2010 dan Hammer *et al.*, 2011). Selain itu hilangnya fungsi polimorfisme terkait dengan *rheumatoid arthritis* (RA) dan *systemic lupus erythematosus* (SLE) (Thompson *et al.*, 2007 dan Musone *et al.*, 2008).



Demikian pula dengan A20, ubiquitin specific peptidase 4 (USP4) secara negatif mengatur pensinyalan TLR dengan menghapus rantai ubiquitin dari TRAF6 dan kekurangan USP4 mengarah pada peningkatan sitokin pro-inflamasi pada stimulasi LPS dan IL-1 $\alpha$  (Zhou *et al.*, 2012). Lebih dari itu, sementara *deubiquitinating enzyme cylindromatosis protein* (CYLD) telah diidentifikasi sebagai regulator negatif NF- $\kappa$ B dan protein I $\kappa$ B, Bcl-3, ia juga memainkan peran dalam mengatur pensinyalan TLR2 secara negatif dengan *deubiquitinating* TRAF6 dan TRAF7 (Yoshida, Jono, Kai, & Li, 2005 dan Massoumi, Chmielarska, Hennecke, Pfeifer, & Fässler, 2006). Selain itu Src homologi 2 domain yang mengandung protein tirosin fosfatase 2 (SHP2) telah terbukti menjadi regulator negatif dari jalur TRIF dependent dengan menargetkan TBK1. Ini didukung oleh hasil penelitian SHP2 dalam makrofag yang menghasilkan peningkatan produksi IFN- $\beta$  (An *et al.*, 2006).

Penekan dari cytokine signalling 1 (SOCS1) adalah regulator negatif penting dari pensinyalan TLR karena beberapa target regulasi. SOCS1 mencit hipersensitif terhadap stimulasi LPS dan menghasilkan lebih banyak IFN- $\gamma$  (Lang & Mansell, 2007 dan Hedl & Abraham, 2013). Ini telah dikaitkan terhadap pengaruh kerentanan dari syok endotoksin (Kinjyo *et al.*, 2002 dan Nakagawa *et al.*, 2002). SOCS1 menghambat jalur JAK-STAT dan menekan aktivasi NF- $\kappa$ B dengan menargetkan protein adaptor TIRAP selain mengikat ke anggota NF- $\kappa$ B, p65 yang menargetkan mereka untuk ubiquitinasi dan degradasi selanjutnya. Selain itu, SOCS1 juga mengatur respons stres MAP kinase, jalur JNK dan p38 (Mansell *et al.*, 2006).

Selain itu, defisiensi reseptor TAM (Tyro3, Axl dan MER) telah terbukti menyebabkan penurunan ekspresi SOCS1 dan selanjutnya peningkatan sekresi sitokin (Q. Lu & Lemke, 2002). Selain itu, TRIM30 $\alpha$  diidentifikasi sebagai regulator negatif penting dari pensinyalan TLR dengan studi *in vitro* dan *in vivo* yang



menekankan pentingnya perlindungan terhadap syok endotoksin. TRIM30 secara negatif mengatur pensinyalan TLR dengan menargetkan TAB2 dan TAB3 dari kompleks TAK1-TAB2-TAB3 untuk degradasi, sehingga menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B (Shi *et al.*, 2008). Lebih lanjut anggota famili TRIM38 juga telah terbukti bertindak sebagai regulator negatif dari pensinyalan TLR dengan menargetkan TRAF6 untuk degradasi proteosom mengikuti poly-ubiquitination oleh TRIM38 (Zhao, Wang, Zhang, Yuan, & Gao, 2012).

Regulasi negatif dari pensinyalan TLR dapat ditimbulkan melalui ekspresi mediator yang larut termasuk IL-10, TGF- $\beta$  dan IL-1RA. TGF- $\beta$  dan IL-10 adalah mediator anti-inflamasi dari pensinyalan TLR dan defisiensi IL-10 atau TGF- $\beta$  yang membuat menciit lebih rentan terkena colitis (Elson *et al.*, 2005). IL-10 mengurangi ekspresi gen pro-inflamasi yang dihasilkan dari degradasi IRAK1 dan IRAK4 selain mengubah kapasitas presentasi antigen makrofag (Chang, Kunkel, & Chang, 2009). Lebih jauh ekspresi IL-10 mengarah pada peningkatan sejumlah regulator negatif dari pensinyalan TLR termasuk IL-1RA, SOCS3 dan Bcl-3 di samping peningkatan aktivitas jalur STAT3 dan PI3K (Kuwata *et al.*, 2003; Riemann, Endres, Liptay, Pfeffer, & Schmid, 2005; dan Hedl & Abraham, 2013).

TGF- $\beta$  mengubah ekspresi gen pro-inflamasi dengan mengubah aktivasi NF- $\kappa$ B dan mengarah pada peningkatan regulator negatif tambahan SHIP1, dengan SHIP1 makrofag rusak dalam toleransi endotoksin (Sly, Rauh, Kalesnikoff, Song, & Krystal, 2004). Selain itu TGF- $\beta$  telah terbukti memainkan peran penting dalam meredam jalur pensinyalan TLR *MyD88 dependent* dengan menginduksi ubiquitinasi dan degradasi selanjutnya MyD88 (Naiki *et al.*, 2005). Lebih lanjut, defisiensi IL-1RA membuat menciit sangat rentan terhadap syok endotoksin dengan perubahan sinyal IL-1R yang mengurangi produksi sitokin pro-inflamasi (Hirsch, Irikura, Paul, & Hirsh, 2002).



Selain ekspresi mediator terlarut, komponen jalur pensinyalan seluler lainnya berperan dalam mengatur respons TLR. Induksi PI3K telah terbukti memainkan peran dalam regulasi negatif untuk menanggapi pensinyalan TLR9 (Liew *et al.*, 2005). Hilangnya Atg16L1, sebuah komponen jalur autophagy dikaitkan dengan peningkatan risiko penyakit radang usus di samping peningkatan produksi spesies oksigen reaktif dan pensinyalan IL-1 menunjukkan bahwa ia memainkan peran pengaturan dalam menanggapi pensinyalan TLR (Saitoh *et al.*, 2008). Lebih lanjut persaingan antara faktor-faktor transkripsi IRF4 dan IRF5 untuk protein adaptor MyD88 merupakan tingkat kompleksitas lain terhadap regulasi negatif pensinyalan TLR dengan IRF4 yang mempengaruhi transkripsi IRF5 (Negishi *et al.*, 2005 dan Kondo *et al.*, 2012). Selain itu TIPE2 diidentifikasi sebagai regulator negatif dari pensinyalan TLR melalui aktivitas caspase-8 dengan defisiensi TIPE2 yang menghasilkan keadaan hiperresponsivitas seluler (Sun *et al.*, 2008). Sejumlah besar regulator negatif dan tingkat berbagai mode regulasi negatif menunjukkan kompleksitas jalur pensinyalan TLR dan perlunya untuk mengontrol respons TLR secara ketat untuk menghasilkan respons imun yang dirancang khusus.

## **2.7 Faktor Transkripsi NFκB (Nuclear Factor Kappa B)**

Nuclear factor kappa B (NFκB) adalah salah satu regulator terpenting ekspresi gen proinflamasi. NFκB memainkan peran penting dalam sintesis sitokin seperti TNF-α, IL-1β, IL-6, dan IL-8 yang merupakan inhibitor atau penambah proses inflamasi (Bremner & Heinrich, 2002 dan M. . Huang, Ghai, & Ho, 2004).

NFκB yang tidak aktif hadir dalam sitoplasma semua sel. Dengan rangsangan luar itu diaktifkan dan ditranslokasi ke dalam inti sel menghasilkan urutan peristiwa yang biasa.



NFkB menginduksi banyak gen yang terlibat dalam banyak inflamasi kaskade imun. Beberapa gen yang diinduksi adalah sitokin proinflamasi IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  yang dikenal kemokin bertanggung jawab untuk menarik sel-sel inflamasi ke situs target (Ueda *et al.*, 1994). NFkB berperan dalam kontrol berbagai gen inflamasi, dan memainkan peran sentral dalam respon inflamasi terhadap infeksi. Pengikatan LPS ke TLR memicu kaskade sinyal seluler, yang memuncak pada aktivasi NFkB dan faktor transkripsi AP-1. Aktivasi NFkB dan faktor transkripsi AP-1 yang mengikat urutan nukleotida diskrit di daerah hulu gen mengatur ekspresi sitokin pro-inflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), kemokin dan molekul adhesi (ICAM-1, E-selectin, P-selectin, VCAM-1 dan HMGB-1) (Lademarco, Barks, & Dean, 1995 dan Tucsek, 2011).

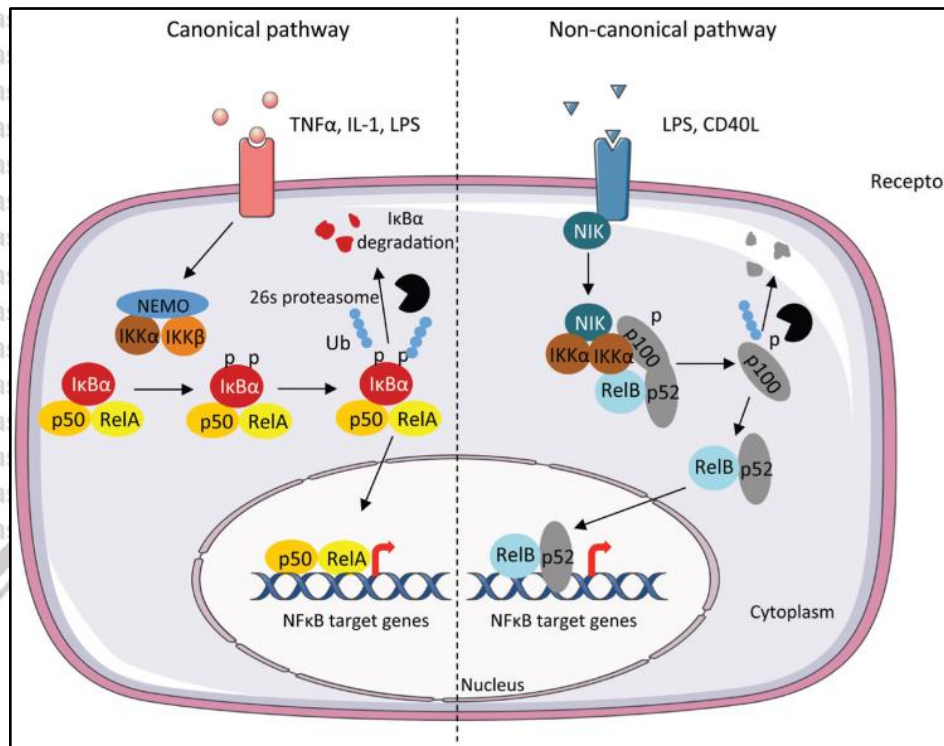
NFkB terdiri dari keluarga protein yang mengandung Rel-domain; mis., Rel A (p65), Rel B, c-Rel, p50 (NF- $\kappa$ B1), dan p52 (NF- $\kappa$ B2) (Baud & Karin, 2001). Bentuk Klasik NFkB merupakan heterodimer p50 dan p65. NFkB terletak dalam sitoplasma dalam kondisi tidak aktif bersama protein regulator I $\kappa$ B (Amiri & Richmond, 2005).

NFkB diaktivasi melalui dua jalur, yaitu *canonical pathway* dan *non-canonical pathway* (Gambar 2.8). *canonical pathway* melalui heterodimer p50 dan p65 (RelA) (Annunziata, 2011). Signal reseptor mengaktivasi multi-subunit I $\kappa$ B kinase (IKK) kompleks dan memfosforilasi I $\kappa$ B. Fosforilasi I $\kappa$ B menyebabkan degradasi I $\kappa$ B sehingga NFkB akan tertranslokasi ke dalam inti dan ativasi fraktor transkripsi NFkB terjadi.

Pada *non-canonical pathway*, dimer NFkB berada dalam tidak aktif karena pemanjangan domain C-terminal pada precursor, p50 atau p52, yang kemudian disintesis menjadi p105 dan p100 (precursor yang lebih panjang) (Amiri & Richmond, 2005). Aktivasi NFkB oleh adanya infeksi dari bakteri dan radikal



bebas, akan menyebabkan stimulasi gen yang menstimuli sitokin inflamasi (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , dan IFN- $\gamma$ ) (Heimdal, Aarstad, & Olofsson, 2000).



Gambar 2.8. Jalur Nuclear faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) (Viennois, Chen, & Merlin, 2012).

## 2.8 Sitokin

Sitokin merupakan pembawa pesan dari sistem imun. Sel darah putih dan sel-sel tertentu lainnya dari sistem imun menghasilkan sitokin ketika antigen terdeteksi. Ada banyak jenis yang mempengaruhi berbagai bagian sistem imun.

Sitokin dapat menstimulasi atau menonaktifkan aktivitas sistem imun, dan menarik sel ke jaringan yang rusak (kemokin), atau membantu mengakhiri respons imun.

Kemokin (sitokin chemotactic) diklasifikasikan menurut karakteristik struktural seperti ukuran kecil (berukuran sekitar 8-10 kDa), dan adanya empat residu sistein di lokasi yang dikonservasi yang merupakan kunci untuk membentuk bentuk 3 dimensi mereka. Beberapa kemokin dianggap pro-inflamasi dan dapat diinduksi selama respons imun untuk merekrut sel-sel sistem imun ke tempat infeksi,



sementara yang lain dianggap homeostatik dan terlibat dalam mengendalikan migrasi sel selama proses normal pemeliharaan atau pengembangan jaringan (Laing & Secombes, 2004).

Regulasi respon inflamasi diperankan antara efek pro-inflamasi) dan anti-inflamasi yang dihubungkan dengan sejumlah sitokin. Sitokin merupakan pembawa pesan kimiawi dan termasuk *Tumor Necrosis Factor*, interleukin (IL), interferon (IFN), kemokin, dan *Transforming growth Factor* (TGF). Sitokin digolongkan menjadi (Coppack, 2001 dan Kang *et al.*, 2016) :

1. Sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-12, IL-18 dan *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF).
2. Sitokin anti-inflamasi seperti IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$  dan *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ).

Interleukin adalah sekelompok sitokin yang pertama kali diekspresikan oleh sel darah putih (leukosit, disebut leukin) sebagai alat komunikasi (Inter-). Telah banyak hasil penelitian yang melaporkan berbagai macam sel yang memproduksi interleukin. Sebagian besar fungsi dari sistem imun, tergantung pada interleukin, dan kekurangan interleukin (meskipun jarang) dapat menyebabkan penyakit autoimun atau defisiensi imun. Beberapa sitokin memiliki efek pro dan anti-inflamasi. Respon inflamasi ditentukan oleh keseimbangan antara sitokin pro-inflamasi dan sitokin anti-inflamasi. Sitokin TNF- $\alpha$  memiliki sifat pro-dan anti-inflamasi. Telah ditunjukkan bahwa TNF- $\alpha$  menginduksi pelepasan tipe II IL-1, yang mewakili jalur unik regulasi negatif sistem IL-1 yang menghasilkan efek Anti-inflamasi (Orlando *et al.*, 1997).

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

TNF- $\alpha$  diekspresikan oleh system saraf pusat seperti sel neuron, glial dan



sel endotel (Allan & Rothwell, 2001). TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  bersifat sitotoksik bagi sel tumor. TNF- $\alpha$  berperan sebagai modulator respon imun dengan induksi molekul adhesi, sitokin dan aktivasi neutrophil. TNF- $\alpha$  berfungsi dalam meningkatkan ekspresi molekul adhesi, sehingga sel leukosit dapat melekat pada permukaan sel endotel, dan menstimulasi sel fagosit mononuclear dalam mensekresi kemokin serta mengaktivasi leukosit (Abbas & Lichtman, 2003).

TNF- $\alpha$  berperan penting dalam proliferasi sel, kelangsungan hidup, diferensiasi dan apoptosis. TNF- $\alpha$  juga memberikan peran pleiotropik dalam memediasi berbagai proses yang dimediasi imun termasuk mitogenesis, sitolisis dan rekrutmen neutrofil dan limfosit ke tempat terjadinya inflamasi (Woolf, Allchorne, Safieh-Garabedian, & Poole, 1997). TNF- $\alpha$  juga memediasi orkestrasi sitokin lain, khususnya IL-1 $\beta$  dan IL-6 selama pengembangan hiperalgesia inflamasi dan pada *generation of central and peripheral neuropathic pain* (Leung & Cahill, 2010). Namun, produksi TNF- $\alpha$  yang berlebih berkaitan dengan patogenesis beragam penyakit seperti rheumatoid arthritis, obesitas, psoriasis, penyakit Crohn, dan sepsis (Parameswaran & Patial, 2010).

TNF- $\alpha$  termasuk dalam super famili *Tumour Necrosis Factor/Tumour Necrosis Factor Receptor* (TNF/TNFR). mRNA dari TNF- $\alpha$  terutama diekspresikan dalam monosit dan jaringan makrofag. Berbagai faktor terlibat dalam induksi sintesis TNF- $\alpha$  termasuk virus, produk bakteri dan parasit, sel tumor, komplemen, sitokin, iskemia, trauma, dan iradiasi (Hackel, Brack, & Rittner, 2010). Ekspresi gen TNF- $\alpha$  diatur pada level transkripsional, yang melibatkan NF- $\kappa$ B dan sel nuclear factor-activated T (NFAT), diikuti oleh translasi ke dalam membran TNF- $\alpha$  (mTNF $\alpha$ ). Akhirnya, mTNF $\alpha$  mengalami pembelahan proteolitik oleh enzim TNF $\alpha$ -converting, melepaskan soluble TNF- $\alpha$  (sTNF $\alpha$ ) (Parameswaran & Patial, 2010).



### 2.8.2 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 adalah sitokin dengan beragam aktivitas biologis. IL-6 merupakan mediator untuk mensubsitusi kelas imunoglobulin dan untuk mengatur respon fase inflamasi akut. Untuk terjadinya bakteremia, IL-6 juga dapat digunakan sebagai penanda investigasi (Fuster & Walsh, 2014). IL-6 adalah biokimia endogen yang aktif selama maturasi sel B dan proses inflamasi. IL-6 berperan sebagai pirogen dan dapat menyebabkan demam selama infeksi, non-infeksi dan penyakit autoimun (Dalrymple *et al.*, 1996). Pada inflamasi akut dan kronis, IL-6 diproduksi dalam situasinya kanker, trauma, luka bakar dan infeksi (Srirangan & Choy, 2010). IL-6 juga dapat menyebabkan peningkatan kerentanan (Tanaka & Kishimoto, 2012).

IL-6 diproduksi oleh makrofag dan monosit sebagai reaksi terhadap sitokin inflamasi lainnya yang mengandung tumor necrosis factor (TNF)-beta dan interleukin-11. Pada fase istirahat reseptor IL-6 hadir pada sel B yang diaktivasi normal, sel hepatik dan jalur sel myeloid dan sel normal limfosit T (Kubistova, Horacek, & Novak, 2012). IL-6 juga hadir dalam sel-B yang dimodifikasi oleh virus Epstein-Barr. Reaksi inflamasi yang diproduksi oleh IL-6 dengan menginisiasi faktor transkripsi yang ada pada beberapa jalur inflamasi. Asalnya terjadi dengan protein kinase C, cAMP / protein kinase A dan pelepasan kalsium. IL-6 memiliki berbagai fungsi dan bentuk berdasarkan produksinya dan juga memiliki aktivitas pleiotropic (Maeda, Mehta, Drevets, & Coggeshall, 2010).

IL-6 diproduksi oleh makrofag dan monosit pada tahap awal inflamasi karena infeksi segera setelah stimulasi dari Toll-Like Reseptors (TLRs) dengan terpisah dari *pathogen related molecular patterns* (PAMPs). Ketika inflamasi non-infeksi terjadi seperti cedera traumatis atau terbakar, kemudian kerusakan yang berkaitan *molecular patterns* (DAMPs) dari situs kerusakan yang mengaktifkan TLR untuk menghasilkan IL-6 (Uchiyama, Takahashi, Endo, Sakai, & Hosono,



2012).

Dalam pertahanan inang ekspresi akut IL-6 memainkan peran utama dengan mengaktifkan populasi sel yang berbeda. IL-6 memulai berbagai protein fase akut seperti serum amiloid A (SAA), fibrinogen, haemoglobin, protein C-reaktif, hepcidin dan antichymotrypsin ketika bekerja pada hepatosit dan mengurangi sitokrom P450, transferrin, fibronectin dan albumin (Y. Wang, Boxel-dezaire, Cheon, Yang, & Stark, 2013).

IL-6 aktif dalam sejumlah besar proses fisiologis dan patofisiologis.

Berbagai macam faktor telah ditunjukkan untuk memodulasi ekspresi IL-6.

Walaupun beberapa hal yang mungkin menstimulasi ekspresi IL-6, hanya beberapa faktor yang telah terbukti menghambat ekspresi IL-6. Di antara penghambat ekspresi gen IL-6 adalah steroid, termasuk kortikosteroid, estrogen, dan androgen (Keller, Wanagat, & Ershler, 1996).

### **2.8.3 Interleukin-10 (IL-10)**

IL-10 adalah molekul anti-inflamasi kuat yang mengatur produksi sitokin inflamasi yang berlebihan selama infeksi atau kerusakan jaringan. Disregulasi IL-10 dikaitkan dengan sejumlah penyakit autoimun. Makrofag merupakan sumber utama IL-10, yang dihasilkan sebagai respons terhadap pensinyalan TLR sebagai mekanisme umpan balik untuk mengurangi respons inflamasi (Iyer, Ghaffari, & Cheng, 2010).

Sel imun bawaan merespon infeksi bakteri atau virus dengan aktivasi cepat sitokin pro-inflamasi yang berfungsi untuk memulai pertahanan inang melawan invasi mikroba. Namun, produksi sitokin pro-inflamasi yang berlebih, dapat menimbulkan gangguan metabolisme sistemik dan hemodinamik yang berbahaya bagi inang. Untuk menghindari efek buruk ini, IL-10 diproduksi oleh makrofag sebagai mekanisme umpan balik negatif untuk meredam produksi sitokin pro-



inflamasi yang tidak terkontrol dan respon inflamasi berlebihan selama infeksi. IL-10 adalah sitokin anti-inflamasi yang kuat dengan efek luas pada sistem imun bawaan dan adaptif (Meylan, Tschopp, & Karin, 2006).

Sitokin Interleukin 10 (IL-10) diperlukan untuk mengatur fungsi imunitas dengan mempromosikan supresi respons imun secara luas melalui efek pleiotropiknya. Kemampuan autokrin / parakrin IL-10 melalui pengikatan langsung pada leukosit dan penahanan respons imun yang dihasilkan mempertimbangkan fungsi utama sitokin ini. Sekresi IL-10 dari CD4 + CD25 + FoxP3 + sel T Regulator (Treg), makrofag dan leukosit lainnya diikuti oleh pengikatan selanjutnya terhadap reseptor IL-10 pada makrofag dan sel dendritik (DCs) telah dikaitkan dengan berkurangnya presentasi antigen dan peningkatan anergi sel T<sub>H</sub>1 (Shalev, Schmelzle, Robson, & Levy, 2011). Anergis sel T adalah mekanisme toleransi di mana limfosit secara intrinsik dinonaktifkan secara fungsional setelah pertemuan antigen, tetapi tetap hidup untuk periode waktu yang lama dalam keadaan hiporesponsif (Schwartz, 2003).

Sitokin juga berfungsi untuk meminimalkan perkembangan tanggapan Th1 dengan mengurangi sitokin terkait Th1 (IL-12 dan IFN- $\gamma$ ) dan mendorong respons Th2 dengan meningkatkan level sitokin terkait Th2 (IL-4, IL-5 & IL-13) (Cope, Le Friec, Cardone, & Kemper, 2011). Selain itu, peningkatan kadar IL-10 telah dikaitkan dengan peningkatan aktivitas protein *programmed cell death 1* (PD-1) dan ko-reseptor cytotoxic T-cell lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) pada sel T yang berfungsi sebagai regulator negatif sel-T, sementara juga dikaitkan dengan penurunan aktivitas ko-reseptor CD28 pada sel-T, yang semuanya terkait dengan penurunan fungsi sel-T efektor (Hatachi *et al.*, 2003 dan Hoves *et al.*, 2006).

Selain itu, IL-10 efektif dalam menurunkan kadar sitokin proinflamasi: IL-2, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12, GM-CSF, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$ , baik dalam situasi stimulasi dan naive terkait dengan ada/tidaknya antigen yang cukup (Tang-Feldman, Lochhead,



Lochhead, Yu, & Pomeroy, 2011). Pengurangan sitokin ini meminimalkan maturasi leukosit, perekrutan, dan inflamasi. Akhirnya, IL-10 secara langsung dikaitkan dengan mengurangi respons anafilaksis setelah paparan antigen dan respons inflamasi mematikan yang berpotensi lainnya, yaitu respons fase akut hepatic (Frossard & Eigenmann, 2008).

## 2.9 Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)

*Nitric oxide* (NO) adalah radikal bebas gas yang digunakan untuk memberi sinyal ke sel-sel otot polos di sekitarnya untuk merelaksasi endotelium pembuluh darah. Relaksasi ini menghasilkan vasodilatasi dan meningkatkan aliran darah. Karena *nitric oxide* sangat reaktif, ia dapat berdifusi bebas melintasi membran, yang membuat molekul pensinyalan transien nitrat oksida ideal untuk berkomunikasi antara sel yang berdekatan dan dengan sel tunggal (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002). Setelah sistem imun diaktifkan, *nitric oxide* juga dihasilkan oleh fagosit seperti monosit, makrofag, dan neutrofil. Sebagai respon imun, NO berpasangan dengan superoksida ( $O_2^-$ ) untuk membentuk peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) dengan cara yang tergantung difusi yang sangat reaktif, dibandingkan dengan NO atau  $O_2^-$  saja. NO juga dikenal sebagai molekul yang berpotensi secara kimiawi menyebabkan kerusakan DNA oleh nitrasasi dan oksidasi (Szabó & Ohshima, 1997).

NO disintesis oleh reaksi enzimatik yang mengubah L-arginin menjadi L-sitruilin oleh Nitric oxide synthase (NOS). NOS diklasifikasikan menjadi tiga isomer berdasarkan lokasi ekspresi dalam tubuh dan cara ekspresi, konstitutif atau tidak dapat diinduksi. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) dan endothelial nitric oxide synthase (eNOS) adalah NOS konstitutif yang diekspresikan dalam jaringan neuron dan sel endotel vaskular, sedangkan NOS yang dapat diinduksi (iNOS) dinyatakan dalam berbagai jenis sel sebagai respons terhadap berbagai stimuli



seperti mediator pro-inflamasi endotoksin dan endogen. Dengan stimuli infeksi dan sitokin pro-inflamasi, iNOS diinduksi untuk menghasilkan NO (Knowles Richard G. & Salvador Moncada, 1994 dan Förstermann & Sessa, 2012).

eNOS mengatur tonus pembuluh darah dan nNOS menyediakan fungsi neurotransmitter dan neuromodulator. Ekspresi konstitutif dari iNOS terdeteksi di epitel paru-paru dan usus kecil. Lebih lanjut, ekspresi iNOS yang berkelanjutan terjadi pada limfosit yang terinfeksi virus. Setelah diaktifkan, iNOS menghasilkan NO dalam jumlah besar hingga substrat rusak. Terutama, karena fungsinya yang kritis dalam penyakit yang berhubungan dengan inflamasi (Hickey, Granger, & Kubes, 2001). Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), dan interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) adalah sitokin yang paling menonjol yang menstimuli iNOS. Selain itu, lipopolysaccharide (LPS) telah banyak dipelajari sebagai endotoksin. LPS adalah salah satu aktivator yang memicu jalur sinyal intraseluler penting, NF $\kappa$ B. Ekspresi gen iNOS dan translasi mRNA selanjutnya dikendalikan oleh jalur NF $\kappa$ B (Kleinert *et al.*, 1998).

## 2.10 Cell Adhesion Molecules (CAMs)

*Adhesion molecules* merupakan kelompok dari gen immunoglobulin yang memediasi komunikasi antara sel-sel endotel yang berdekatan, serta antara endothelium dan leukosit (Armentero *et al.*, 2011). *Adhesion molecules* menyediakan landasan untuk komunikasi sel, pertukaran dan pusat pengendalian kekebalan untuk menjadi "tuan rumah" pertahanan. *Cell adhesion molecules* meliputi kelompok selektin, integrin dan anggota superfamily Immunoglobulin, yang menyediakan sistem pengenalan antar leukosit, sel endotel dan molekul matriks (Wahl, Feldman, & McCarthy, 1996). Tabel 2.5 menunjukkan kelompok *cell adhesion molecules*. *Cell adhesion molecules* merupakan reseptor membrane sel yang memediasi beberapa interaksi yang diketahui memiliki peranan utama dalam



berbagai kondisi fisiologis dan patologis yang berhubungan dengan pertukaran dan interaksi antar sel-sel, kontak matriks sel dan dalam menentukan spesifikasi dari sel-sel yang mengikat (Kriegelstein & Granger, 2001). *Cell adhesion molecules* memiliki peran sentral dalam fungsi sistem imun dengan mengawali penarikan leukosit pada sel endotel, lalu memungkinkan leukosit bermigrasi dari pembuluh darah ke bagian yang mengalami inflamasi (Bevilacqua, Nelson, Mannori, & Cecconi, 1994).

Tabel 2.5. *Leukocyte – Endothelial Cell Adhesion Receptors*

Molekul	Ekspresi Utama	Ligan	Peran Utama
<b>Selektin</b>			
L-selektin	<i>Polymorphonuclear leukocyte</i> dan Limfosit	CD34, GlyCAM-1	Rolling (Neutrofil dan monosit)
P-selektin	<i>Endothelial Cells</i> , platelet	P-selectin glycoprotein ligand (PSGL-1)	Rolling
E-selektin	<i>Endothelial Cells</i>	Sialyl Lewis <sup>x</sup>	Rolling dan adhesi
<b>Integrin</b>			
Leukocyte Function-associated Antigen-1 (LFA-1) (CD 11a/CD18)	<i>Polymorphonuclear leukocyte</i> dan Limfosit	Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) dan ICAM-2	Adhesi kuat, menangkap dan migrasi
Macrophage-1 antigen (Mac-1) (CD11b/CD18)	<i>Polymorphonuclear leukocyte</i>	ICAM-1	Adhesi kuat, menangkap dan migrasi
Very late antigen-4 (VLA-4) ( $\alpha_4\beta_1$ Integrin)	Eosinofil dan Limfosit	Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)	Adhesi
<b>Superfamily Immunoglobulin</b>			
ICAM-1	Limfosit dan <i>Endothelial Cells</i>	LFA-1, Mac-1	Adhesi kuat, menangkap dan migrasi
ICAM-2	Limfosit dan <i>Endothelial Cells</i>	LFA-1	Adhesi kuat, menangkap dan migrasi
VCAM-1	<i>Endothelial Cells</i>	VLA-4	Adhesi
(Platelet Endothelial Cell	<i>Endothelial Cells</i> , <i>Polymorphonuclear</i>	PECAM	



Adhesion Molecules-1)	leukocyte, Limfosit, Platelet
PECAM-1	

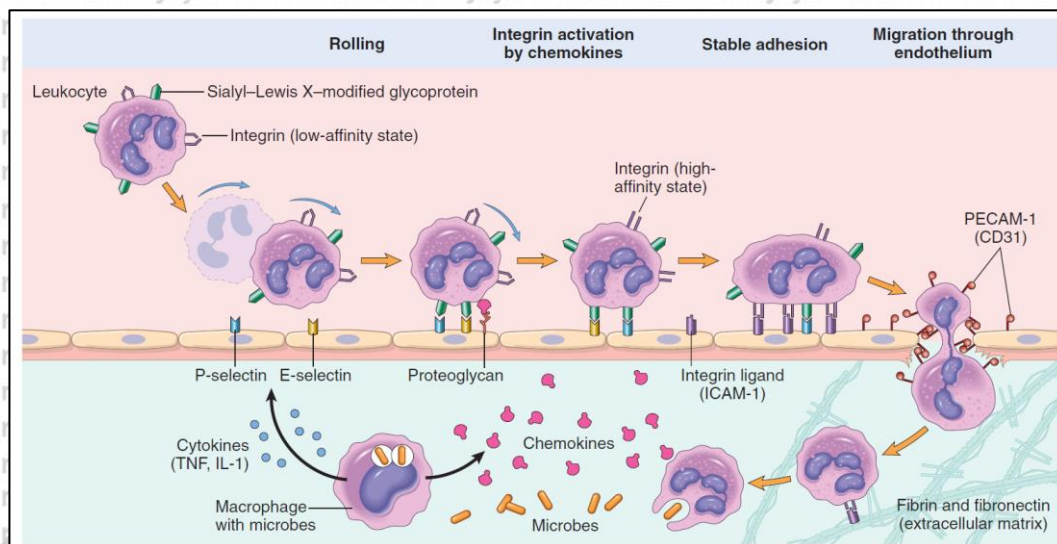
(Sumber : Albelda *et al.*, 1994 dan Kumar *et al.*, 2013)

Pada saat terjadi inflamasi, *cell adhesion molecules* mempunyai peran penting dalam menggerakkan leukosit ke bagian sel/jaringan yang mengalami inflamasi (Tsukamoto *et al.*, 1995). Pembuluh darah bereaksi sebagai respon adanya gangguan, yang diikuti dengan pembesaran ukuran pembuluh darah, penurunan laju aliran darah di pembuluh darah dan peningkatan tekanan osmotik di jaringan intravaskular. Proses ini dikenal dengan vasodilatasi. Kemudian sebagai akibat dari pembesaran pembuluh darah, maka terjadi kebocoran pembuluh darah dan cairan eksudat yang kaya akan protein dan leukosit keluar dan terakumulasi pada jaringan ekstrasvaskular. Keluarnya cairan eksudat ini akan mereduksi tekanan osmotik di jaringan intravascular dan meningkatkan tekanan osmotik pada jaringan ekstrasvaskular sehingga terjadilah endema pada bagian yang mengalami inflamasi (Beck, 1999).

Proses leukosit meninggalkan jaringan intravascular melewati beberapa tahapan, yaitu marginasi dan *rolling*, aktivasi dan *adhesion*, serta migrasi. Pada saat cairan eksudat keluar dari pembuluh darah, leukosit termarginasi disepanjang permukaan sel endotel. Kemudian, leukosit *rolling* secara perlahan disepanjang sel endotel dan melekat di *adhesion molecules surface* pada endotel dan ligan pelengkap di leukosit. Proses adhesion dimediasi oleh selektin. Selektin diregulasi di sel endotel oleh sitokin (TNF- $\alpha$ , IL-1) pada bagian yang cedera dan mengikat permukaan leukosit. Migrasi terjadi setelah melekat kuat dalam sistem vena dan kapiler melalui *platelet-endothelial cell adhesion molecules* (PECAM-1) pada sel endotel. Migrasi diregulasi oleh ligan sel endotel, yaitu integrin, untuk hasil pelekatan sel dalam mengaktivasi/melekatkan populasi leukosit yang berbeda (neutrophil, monosit/makrofag, dan limfosit). Setelah leukosit telah berada pada



jaringan ekstrasvaskular, sistem pembekuan dan fibrinolitik diaktifkan untuk membantu mengatasi penyebab inflamasi (Azimi-Nezhad *et al.*, 2013). Proses ini dapat dilihat pada Gambar 2.9.



Gambar 2.9. Mekanisme Migrasi Leukosit Melalui Pembuluh Darah (Sumber : Kumar *et al.*, 2013)

### 2.10.1 Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) adalah molekul sel adhesi mirip imunoglobulin (Ig) yang diekspresikan oleh beberapa tipe sel termasuk leukosit dan sel endotel. Secara konstitutif diekspresikan pada level rendah pada sel endotel dan leukosit dan mengalami peningkatan setelah paparan stimuli pro-inflamasi. ICAM-1 penting untuk penangkapan yang kuat dan transmigrasi leukosit keluar dari pembuluh darah dan ke dalam jaringan, serta pembentukan sinaps imunologis selama aktivasi sel T. ICAM-1 hadir dalam lesi aterosklerotik dan terlibat dalam perkembangan lesi aterosklerotik. Hasil penelitian telah menunjukkan bahwa pengikatan silang ICAM-1 pada permukaan sel mengarah pada transduksi sinyal "luar dalam" dan menghasilkan inisiasi beberapa kaskade pensinyalan pro-inflamasi dan penyusunan ulang sitoskeleton aktin, yang



mengarah pada spekulasi bahwa ICAM-1 "lebih dari sekadar lem" (Wolf & Lawson, 2012).

Molekul ICAM-1 yang larut (sICAM-1) telah diidentifikasi dalam serum, terdiri dari semua lima domain Ig ekstraseluler dari molekul ICAM-1 yang terikat membran, tetapi tidak memiliki domain transmembran dan sitoplasma. sICAM-1 hadir dalam serum manusia normal, sementara sICAM-1 tinggi telah ditemukan dalam serum dari pasien dengan penyakit kardiovaskular, kanker, penyakit autoimun dan beberapa penelitian telah mengkorelasikan kadar serum sICAM-1 dengan tingkat parahnya suatu penyakit. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa sICAM-1 mampu mengikat ligan ICAM-1 dan reseptor yang belum diketahui dan mampu memicu kaskade pensinyalan. sICAM-1 dapat bertindak sebagai agen pro-inflamasi ketika sel endotel mengalami kekuatan geser arteri yang berkepanjangan, termasuk inisiasi ekspresi sitokin dan kemokin, yang dapat menyebabkan daya tarik monosit ke daerah yang terinflamasi pada pembuluh darah.

Hasil penelitian sebelumnya menyatakan peran ICAM-1 dan kemungkinan peran interaksi leukosit-endotelium dalam regulasi permeabilitas pembuluh darah. Selama perkembangan inflamasi, leukosit akan berinteraksi dengan endotelium dalam suatu proses yang akan memungkinkan sel-sel ini untuk melewati penghalang yang dibuat oleh sel endotel. Migrasi seluler ini akan menghasilkan modifikasi permeabilitas vaskular yang akan memungkinkan transfer zat terlarut ke jaringan perifer (Sumagin, Lomakina, & Sarelius, 2008).

Peningkatan ekspresi ICAM-1 di sel tumor dapat memainkan peran penting menjadi perkembangan ke sel kanker (Fraire, Woda, Savas, & Jiang, 2003). Pada penyakit vaskular seperti aterosklerosis, ICAM-1 merupakan situs yang rentan diregulasi (Nakashima, Raines, Plump, Breslow, & Ross, 1998). Oleh karena itu,



dalam mengatur proses inflamasi, ICAM-1 dapat membuka jalan baru untuk pengobatan penyakit-penyakit ini.

### 2.10.2 Vascular Cell Adhesion Molecule -1 (VCAM-1)

Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) adalah penanda yang menarik karena secara eksklusif terekspresi pada endotelium yang teraktivasi, oleh karena itu, VCAM-1 merupakan penanda prediktif endotel pro-inflamasi (Vince *et al.*, 2009). Lebih lanjut, pemblokiran interaksi VCAM-1/VLA-4 adalah target terapi untuk pengobatan gangguan inflamasi kronis (Yusuf-Makagiansar, Anderson, Yakovleva, Murray, & Siahaan, 2002).

Pada saat limfosit bermigrasi keluar dari pembuluh darah antara sel-sel endotel dan ke dalam jaringan di mana limfosit dapat berinteraksi dengan antigen. Sel endotel mengikat limfosit melalui molekul adhesi permukaan sel. Salah satu molekul adhesi ini adalah Vascular cell adhesion molecule- (VCAM-1). Pensinyalan VCAM-1, terlibat dalam beberapa penyakit. VCAM-1 berfungsi dalam kombinasi dengan molekul adhesi lainnya selama inflamasi kronis dan metastasis tumor. Dengan memahami pensinyalan VCAM-1 memiliki potensi implikasi penting untuk intervensi penyakit (Deem & Cook-mills, 2004).

Pensinyalan VCAM-1 dalam sel endotel diperlukan untuk migrasi limfosit yang bergantung pada VCAM-1 (Matheny, Deem, & Cook-Mills, 2000). Stimulasi VCAM-1 mengaktifkan sel endotel nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oksidase, yang mengkatalisasi pelepasan Reactive Oxygen Species (ROS) level rendah. spesies (ROS) dalam sitokin dengan perlakuan *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) dan pada jalur sel endotel. ROS ini diperlukan untuk VCAM-1 yang distimulasi restrukturisasi aktin sel endotel sel dan migrasi limfosit (van Wetering *et al.*, 2013). Oleh karena itu, ROS terlibat dalam



memodulasi fungsi sel endotel untuk mempromosikan migrasi limfosit yang bergantung pada VCAM-1 (Deem & Cook-mills, 2004).

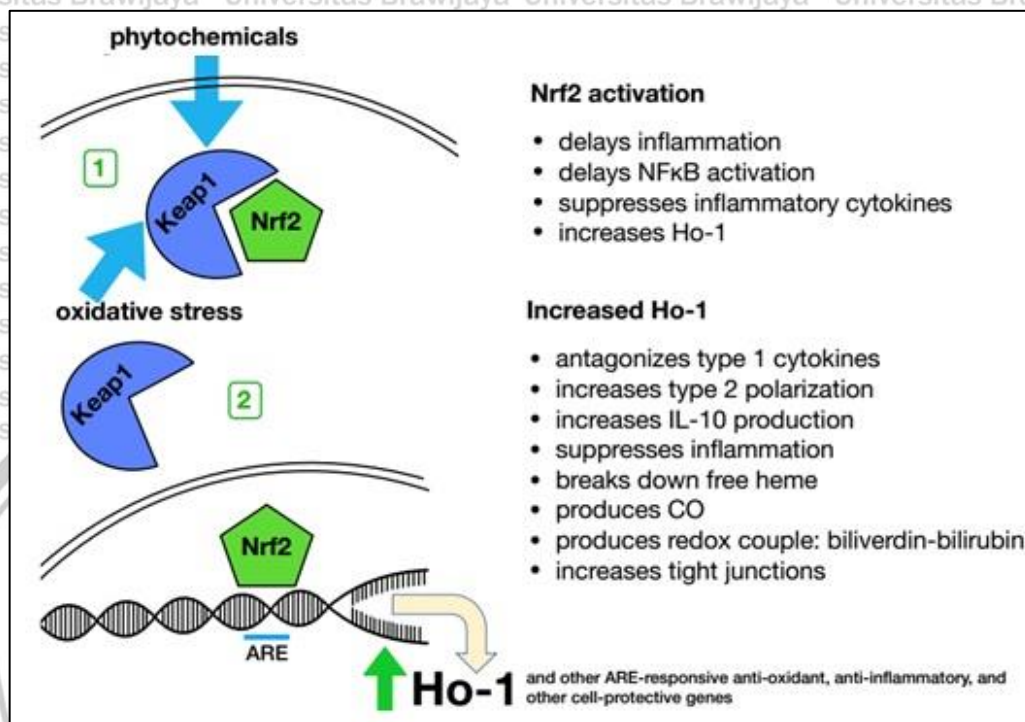
### 2.11 Enzim Antioxidant Response Element (ARE)

Inflamasi kronis dapat menstimulasi perkembangan banyak penyakit kronis termasuk kanker, penyakit kardiovaskular, dan diabetes tipe 2. *Reactive oxygen species* (ROS) dihasilkan oleh metabolisme energi normal dan berfungsi sebagai molekul pensinyalan sel yang penting. Dalam kondisi homeostatis, ROS intraseluler dipertahankan pada konsentrasi yang tepat untuk memenuhi fungsi-fungsi ini dan jika berlebihan dilindungi oleh berbagai enzim dan molekul antioksidan. Jika produksi ROS meningkat melebihi ambang batas kapasitas penyangga ini, ROS dapat memicu reaksi yang tidak terkendali dengan senyawa intraseluler non-target, pengoksidasi asam nukleat, protein, membran, dan lipid lainnya. Selanjutnya, status oksidatif intraseluler normal berkurang. Ketika jumlah senyawa teroksidasi meningkat, keadaan redoks intraseluler sel mulai bergeser dari lingkungan pereduksi normal dan terjadi tekanan oksidatif (Stefanson, 2018).

ROS mempunyai peranan penting dalam perkembangan respon inflamasi. ROS menyebabkan cedera organ penting, seperti ginjal terkait stres oksidatif, yang ditandai oleh perubahan struktural dan fungsional dalam sel glomerulus dan renal tubular. Dalam keadaan normal, sel-sel pada organ yang dipengaruhi mempertahankan diri terhadap kerusakan ROS dengan berbagai substansi antioksidan, seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, glutathione, dan peroxiredoxins (Kim *et al.*, 2016). Di antara antioksidan ini, SOD adalah enzim yang kuat, peningkatan level SOD pada mencit diabetes dapat mengurangi stres oksidatif, albuminuria, dan matriks glomerular (Zelmanovitz *et al.*, 2009). Khususnya, SOD dan katalase diketahui diregulasi oleh faktor transkripsi Nrf-2 (Barajas *et al.*, 2011). Nrf-2 memainkan peran kunci dalam menghambat stres



oksidatif. Selanjutnya, Nrf-2 berperan untuk meningkatkan enzim yang terlibat dalam pertahanan antioksidan, seperti SOD dan heme oksigenase-1 (HO-1). Efek dari substansi fitokimia pada sensor redoks Keap1 dapat dilihat pada Gambar 2.10.



Gambar 2.10. Efek Substansi Fitokimia Pada Sensor Redoks Keap1.

- 1) Redox sensing protein Keap1 diaktifkan oleh stres oksidatif intraseluler atau senyawa fitokimia lainnya, mengubah konformasi.
- 2) Keap1 melepaskan faktor transkripsi Nrf-2 untuk mentranslokasi ke inti dan meningkatkan pengaturan anti-oksidan, anti-inflamasi dan gen pelindung sel termasuk Heme Oksigenase-1 (HO-1). (Stefanson, 2018).

Stres oksidatif secara inheren merupakan disregulasi biokimiawi dari status redoks lingkungan intraseluler, yang dalam kondisi homeostatis adalah lingkungan yang berkurang, sedangkan peradangan adalah respons biologis terhadap stres oksidatif di mana sel memulai produksi protein, enzim dan senyawa lain untuk mengembalikan homeostasis. Di pusat respons biologis terhadap stres oksidatif adalah jalur Keap1/Nrf-2/ARE, yang mengatur transkripsi banyak gen antioksidan



yang melindungi homeostasis seluler dan gen detoksifikasi yang memproses dan menghilangkan karsinogen dan racun sebelum dapat menyebabkan kerusakan.

Nrf-2 (nuclear factor [erythroid-derived 2]-like 2) berperan sebagai regulator antioksidan dan chemoprotektif. Nrf-2 dikodekan oleh gen NFE2L2, yang merupakan faktor transkripsi dalam superfamili leucine zipper dasar (bZIP) dengan struktur Cap'n'Collar (CNC).

Nrf-2 heterodimerisasi dengan protein Maf kecil dalam nukleus; kompleks ini kemudian dapat mengikat elemen respons serumpunnya, yaitu *antioxidant response element* (ARE), yang mengatur transkripsi gen *ARE-responsive* (Katsuoka *et al.*, 2005 dan Hayes, McMahon, Chowdhry, & Dinkova-kostova, 2010). Nrf-2 menginduksi sintesis banyak protein dengan peran yang dikarakteristikan dengan baik dalam antioksidan seluler dan jalur detoksifikasi, melalui satu atau lebih ARE di daerah promotor gen yang sesuai.

### 2.11.1 Enzim ARE-Responsive yang Berasosiasi Dengan Glutathione

Glutathione (GSH) adalah *three amino acid peptide thiol* yang merupakan protein antioksidan intraseluler paling berlimpah, hadir dalam sitosol dengan konsentrasi sekitar 5 mM. Nrf-2 adalah kunci untuk mengatur kadar GSH dengan meningkatkan enzim GSH sintesis dan regeneratif, serta enzim yang menggunakan GSH sebagai kofaktor. Glutamate cysteine ligase (GCL) mengkatalisasi langkah tingkat pembatasan dalam sintesis GSH. Ini terdiri dari dua subunit, GCLC (*Glutamate cysteine ligase Catalytic*) dan GCLM (*Glutamate cysteine ligase modifier*). Subunit GCLC sendiri dapat mengkatalisasi reaksi yang menghasilkan  $\gamma$ -glutamyl sistein dari L-glutamat dan L-sistein, tetapi efisiensinya meningkat ketika terikat dengan subunit GCLM. Baik GCLC dan GCLM diregulasi oleh Nrf-2 (S. C. Lu, 2011).



Glutathione synthetase (GSS) mengondensasi  $\gamma$ -glutamyl sistein dan glisin, membentuk GSH. GSH adalah reduksi sitoplasma non-spesifik yang dioksidasi menjadi glutathione disulfide form (GSSG). Dalam kondisi homeostatis, rasio GSH: GSSG sekitar 100: 1. GSSG diregenerasi menjadi dua molekul GSH oleh kofaktor NADPH dari glutathione reductase (GSR), gen responsif Nrf2 lainnya. Glutathione peroxidase (GPx) mengkatalisasi reduksi hidrogen peroksida menjadi air dan peroksida lipid menjadi alkohol yang sesuai. Situs aktif GPx terdiri dari 2 GSH di mana selenium disubstitusi untuk sulfur dalam tiol satu unit GSH (Jacob, Giles, Giles, & Sies, 2003).

### 2.11.2 Enzim ARE-Responsive Lainnya

Superoxide dismutase (SOD) mengkatalisasi reaksi disproporsionasi mentransformasi superoksida sangat reaktif ( $O_2^{\cdot-}$ ) menjadi dioksigen stabil ( $O_2$ ) dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), yang selanjutnya dapat direduksi dengan GPx. SOD adalah metalloenzyme (Zn, Cu-SOD) yang distabilkan oleh seng menggunakan tembaga sebagai agen redoks di sisi aktif (mangan adalah agen redoks dalam SOD mitokondria) (Mate's, 2000). NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 (NQO-1) adalah enzim yang diinduksi, yang dikodekan oleh gen NQO1. Ini sangat penting karena dapat sepenuhnya mengurangi kuinon menjadi hidrokuinon dengan menggunakan transfer dua elektron, sehingga menghindari produksi zat intermediate oksigen radikal bebas (Dinkova-kostova & Talalay, 2010).

Heme oxygenase-1 (HO-1), yang dikodekan oleh gen HMOX1, adalah enzim yang diinduksi yang mengkatalisasi pembebasan Fe yang terikat heme untuk membentuk biliverdin. HO-1 sangat diekspresikan dalam limpa, tempat daur ulang eritrosit. Biliverdin kemudian dapat dikurangi dengan biliverdin reductase menjadi bilirubin, melepaskan karbon monoksida (CO) menjadi efek anti-inflamasi. Heme oxygenase-1 (HO-1) dan tingkat metabolitnya, stress oksidatif dan IL-10



bisa terkait dengan gangguan ini. HO-1 bertanggung jawab untuk merendahkan heme hemoglobin menjadi zat besi, karbon monoksida, dan biliverdin, yang dengan cepat diubah menjadi bilirubin (Tenhunen, Marver, & Schmid, 1968).

Hasil penelitian menunjukkan Senyawa yang berasal dari degradasi heme dan IL-10 meningkat dalam plasma dan limpa anjing yang terinfeksi. Level IL-10 dan HO-1 berkorelasi positif. Penghambatan HO-1 meningkatkan proliferasi sel-sel kelenjar getah bening dan menurunkan produksi IL-10 dan IL-2 dengan adanya antigen terlarut *Leishmania infantum*. Peningkatan metabolisme HO-1 yang diamati pada CVL (Canine visceral leishmaniasis) mungkin berhubungan dengan stress oksidatif dan peningkatan IL-10, yang bisa menjadi salah satu mekanisme yang bertanggung jawab untuk menghambat respon limfoproliferatif pada anjing yang terinfeksi (de Almeida *et al.*, 2017).

Peroksidasi lipid adalah reaksi berantai yang menyediakan pasokan radikal bebas terus menerus karena melibatkan oksidasi asam lemak tak jenuh ganda dalam membran yang menyebabkan kerusakan sel oksidatif. MDA (malondialdehyde) merupakan zat reaksi asam tiobarbiturat yang terbentuk sebagai produk akhir dari peroksidasi lipid dan bertindak sebagai indikatornya (Gavino, Miller, Ikharebha, Milo, & Cornwell, 1981 dan Devi, Prasad, Saraswathi, & Raghu, 2000). Selama inflamasi paru-paru, peningkatan jumlah Reactive Oxygen Species (ROS) dan Reactive Nitrogen Intermediate (RNI) dihasilkan sebagai hasil dari *phagocytic respiratory burst* (Kwiatkowska, Piasecka, Zieba, Piotrowski, & Nowak, 1999). Target utama ROS dianggap DNA seluler. ROS dapat bertindak sebagai agen karsinogenik dengan menginduksi perubahan struktural pada DNA dan memodulasi ekspresi gen terkait stress (Cerutti, 1994).

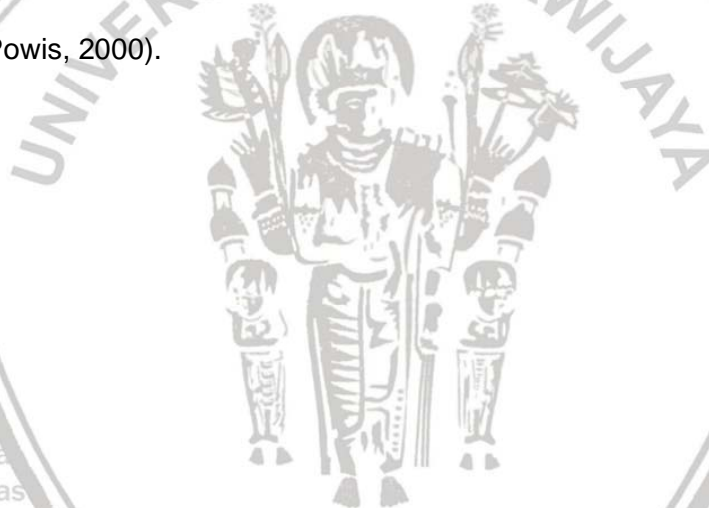
Dalam model hewan, molekul antioksidan telah terbukti menghambat karsinogenesis eksperimental. Tidak banyak yang diketahui tentang pertahanan antioksidan saluran pernapasan pasien dengan kanker paru-paru, meskipun



superoksida dismutase (SOD) telah terbukti mencegah karsinogenesis in vitro (Menkes *et al.*, 1986). Superoxide dismutase (SOD) adalah sistem pertahanan enzimatis utama, yang mengkatalisis dismutasi radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida dan melindungi tubuh terhadap potensi kerusakan dari radikal superoksida (Yamaguchi, Sakurada, & Nagumo, 1994).

Catalase adalah enzim yang sangat efisien yang mengurangi hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen menggunakan Fe di sisi katalitik (Mate's, 2000 dan D. D. Zhang & Hannink, 2003). Tioredoksin (Trx) adalah protein disulfida reduktase yang dengan sendirinya direduksi oleh tioredoksin reduktase (TrxR).

TrxR adalah selenoenzim kecil, 12 kDa, yang meregenerasi Trx teroksidasi menjadi bentuk tereduksi dengan cara yang tergantung pada NADPH (Mustacich & Powis, 2000).





**BAB III****KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN****3.1 Kerangka Konseptual**

Perairan Indonesia timur memiliki biodiversitas biota terumbu karang yang tinggi, seperti sponge, karang lunak dan ikan. Tapilatu (2015) menyatakan perairan Indonesia timur memiliki potensial yang besar dalam biodiversitas biota laut. Perairan pulau Sulawesi termasuk dalam zona transisi pengelompokan oleh Wallace (Chasanah, 2008). Termasuk di dalamnya perairan Sulawesi Tengah dengan panjang garis pantai  $\pm 4500$  km (Moore & Ndobe, 2009) dan memiliki ekosistem terumbu karang dengan biodiversitas yang cukup tinggi. Perairan Sulawesi Tengah dapat dibagi dalam dua perairan, yaitu perairan Teluk Palu yang masuk dalam perairan Selat Makassar dan perairan Teluk Tomini. Wallace *et al.*, (2000) menyatakan Teluk Tomini memiliki biodiversitas terumbu karang yang tinggi. Biodiversitas terumbu karang juga terdapat di Teluk Palu (Moore & Ndobe, 2009).

Selain itu potensi karang lunak untuk dibudidayakan juga sangat besar (Ellis & Sharron, 1997 dan Ellis, 1999). Di Indonesia, karang lunak juga telah dibudidayakan di Teluk Awur, Jepara (Wijayanti, Charismawaty, Indrayanti, & Trianto, 2017) dan telah dicobakan budidaya di kolam (Prastiwi, Soedharma, & Subhan, 2012). Akan tetapi, di Indonesia budidaya karang lunak hanya sebatas pemanfaatan nilai estetikanya. Padahal dari perspektif substansi bioaktif, karang lunak berpotensi memproduksi bioaktif dengan struktur dan fungsi biologis yang bervariasi. Substansi bioaktif invertebrata tubuh lunak (seperti sponge dan karang lunak) yang hidup di terumbu karang dapat ditemukan potensi bioaktif yang bermanfaat (Hunt & Vincent, 2006). Karang lunak merupakan organisme utama penghuni ekosistem terumbu karang, selain sponge. Karang lunak hidup berbagi



satu sama lain dengan organisme penghuni terumbu karang lainnya dalam kebutuhan akan substrat sebagai tempat hidup (Hoeksema, 2011).

Berdasarkan studi literatur, publikasi ilmiah yang mengeksplorasi potensi bioaktif karang lunak asal perairan Indonesia masih sedikit bila dibandingkan dengan potensi bioaktif sponge asal perairan Indonesia. Chasanah (2008) menyatakan ada 77 senyawa baru yang diproduksi oleh 14 jenis sponge asal perairan Indonesia dan 19 senyawa baru dari organisme non-sponge (karang lunak dan ascidian) yang memiliki potensi farmakologi. Studi literatur juga menunjukkan bahwa karang lunak memproduksi substansi bioaktif antiinflamasi (Wei *et al.*, 2013).

Eksplorasi tentang potensi bioaktif karang lunak asal perairan Sulawesi Tengah masih cukup menjanjikan. Maka dari itu, masih terbuka peluang dalam penemuan substansi bioaktif yang baru maupun eksplorasi potensi substansi biologis yang bernilai farmakologi dari karang lunak asal perairan Sulawesi Tengah. Substansi bioaktif dari karang lunak memberikan respon seluler dan jaringan, yang menunjukkan efek antiinflamasi (Fattorusso *et al.*, 2011 dan Putra *et al.*, 2012).

Reaksi inflamasi memberikan efek terhadap perkembangan dan diferensiasi fungsional sel limfosit, sehingga memberikan respon imun. Pada saat tubuh merespon kehadiran mikroba, maka sistem imunitas tubuh akan bereaksi menghilangkan infeksi. Sistem imunitas tubuh ini diinisiasi oleh sel T regulator (T reg) (Li & Zheng, 2015). Sel T reg bertindak sebagai regulator negatif penting dalam kondisi inflamasi. Sel T reg yang terpapar kondisi inflamasi akan kehilangan fungsi supresinya dalam sistem imunitas (van der Veecken *et al.*, 2016). Sel T reg merespon kondisi inflamasi dengan meningkatkan fungsi supresi, sehingga dapat mencegah aktifnya molekul pro-inflamasi (Arvey *et al.*, 2014).



Pada penelitian ini, mengkaji respon inflamasi akibat induksi Lipopolysaccharide (LPS). LPS berasal dari membrane sel bakteri gram negatif yang dapat berfungsi memicu terjadinya inflamasi selama aktivasi limfosit (McAleer & Vella, 2008). Sistem imunitas bawaan (*Innate immune system*) mengenali mikroba melalui TLR (Tool Like Receptors) yang dapat diaktifkan oleh berbagai molekul yang patogen seperti LPS (Miyake, 2004).

Dalam hal ini LPS sebagai inducer (yang memicu inflamasi), mengaktifkan TLR4 sebagai sensor khusus dan mengaktifasi faktor transkripsi NF $\kappa$ B. Aktivasi NF $\kappa$ B memediasi produksi TNF- $\alpha$ , IL-6, dapat menekan aktivitas sel T reg (CD4, CD25) pada mencit (Caramalho *et al.*, 2003). TLR4 dapat memicu jalur transduksi sinyal yang berkontribusi pada perpanjangan kelangsungan hidup sel, aktivasi cell adhesion molecules (VCAM-1 dan ICAM-1), produksi intermediet oksigen reaktif (ROI), kemokin, dan sitokin, dan peningkatan degranulasi dan fagositosis (Bellocchio *et al.*, 2004 dan Sabroe *et al.*, 2003).

Setelah TNF- $\alpha$  diproduksi, maka sitokin ini akan menstimuli iNOS. Ekspresi gen iNOS dan translasi mRNA diregulasi oleh jalur NF $\kappa$ B (Kleinert *et al.*, 1998). iNOS diinduksi untuk menghasilkan NO. NO berperan memberi sinyal ke sel-sel otot polos di sekitarnya untuk melemaskan endotelium pembuluh darah. Level NO yang tinggi dapat menyebabkan kerusakan DNA oleh nitrasi dan oksidasi. Oleh karena itu, dengan menghambat level NO, akan mencegah respon inflamasi lanjutan.

Sel T Regulator mensekresi produksi sitokin anti-inflamasi IL-10, yang diperlukan untuk mengatur fungsi imunitas dengan mempromosikan supresi respons imun secara luas melalui efek pleiotropiknya. Sitokin IL-10 dapat menurunkan kadar sitokin pro-inflamasi: IL-6 dan TNF- $\alpha$ . Oleh karena itu, IL-10 secara langsung dikaitkan dengan pengurangan respons inflamasi.



Karang lunak diketahui juga memproduksi substansi antioksidan. Bioaktif antioksidan dapat mencegah stres oksidatif melalui penangkapan radikal bebas.

Respon inflamasi dapat dihambat dengan mencegah stres oksidatif dalam sel.

Induksi LPS juga dapat meningkatkan produksi ROS. Dalam kondisi normal, sel-sel pada organ yang dipengaruhi mempertahankan diri terhadap kerusakan ROS

dengan berbagai substansi antioksidan. Produksi ROS memicu pelepasan ikatan

Nrf-2/Keap-1, sehingga Nrf-2 dapat teraktivasi dan melekat pada ARE untuk meregulasi produksi antioksidan endogen (SOD dan HO-1). Antioksidan endogen

SOD dan HO-1 berperan dalam mencegah kerusakan DNA serta memperbaiki kerusakan DNA akibat induksi LPS.

Substansi anti-inflamasi yang diproduksi oleh karang lunak, dapat menghambat sitokin pro-inflamasi seperti IL-6 dan TNF- $\alpha$ , menghambat aktivasi TLR-4 dan faktor transkripsi NF $\kappa$ B, serta menghambat produksi NO oleh iNOS.

Selain itu, dapat mengaktivasi sel T Regulator, yang dapat meningkatkan produksi sitokin IL-10 dan menghambat aktivasi *cell adhesion molecules* (ICAM-1 dan

VCAM-1). Substansi antioksidan yang diproduksi karang lunak juga dapat berperan sebagai anti-inflamasi alami, dengan meningkatkan aktivasi enzim

antioksidan, seperti SOD dan HO-1 yang diregulasi oleh Nrf-2, serta dapat menghambat malondialdehid (MDA) sebagai indikator peroksidasi lipid. Kerangka

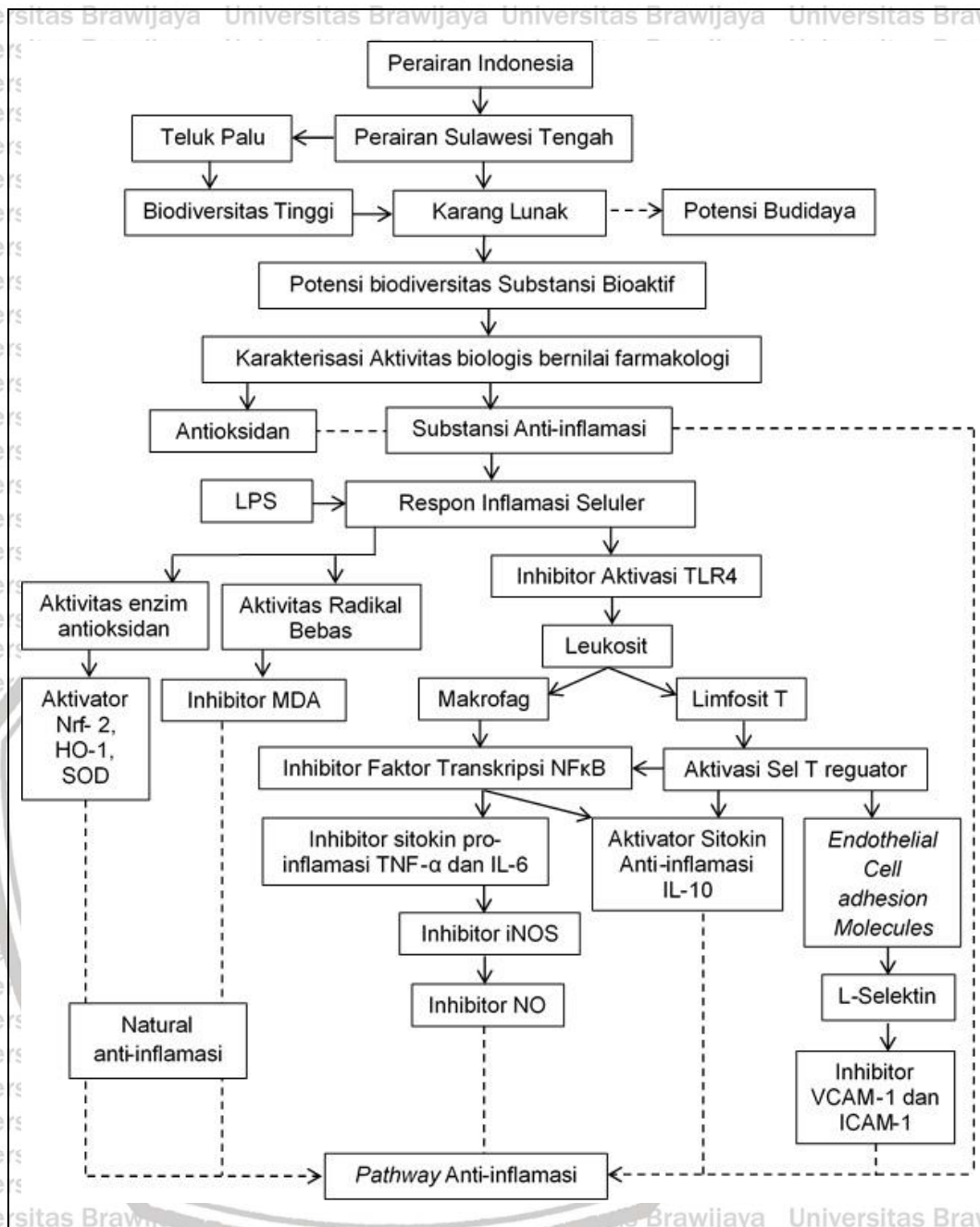
konsep dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1.

### 3.2 Kerangka Operasional Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini eksperimen dan deskriptif.

Berdasarkan tujuan yang akan dicapai, maka penelitian ini dilaksanakan dalam 3 tahapan, yaitu :





Gambar 3.1. Kerangka Konsep Penelitian

### 3.2.1 Tahap 1. Sampling, Ekstraksi Karang Lunak dan Purifikasi

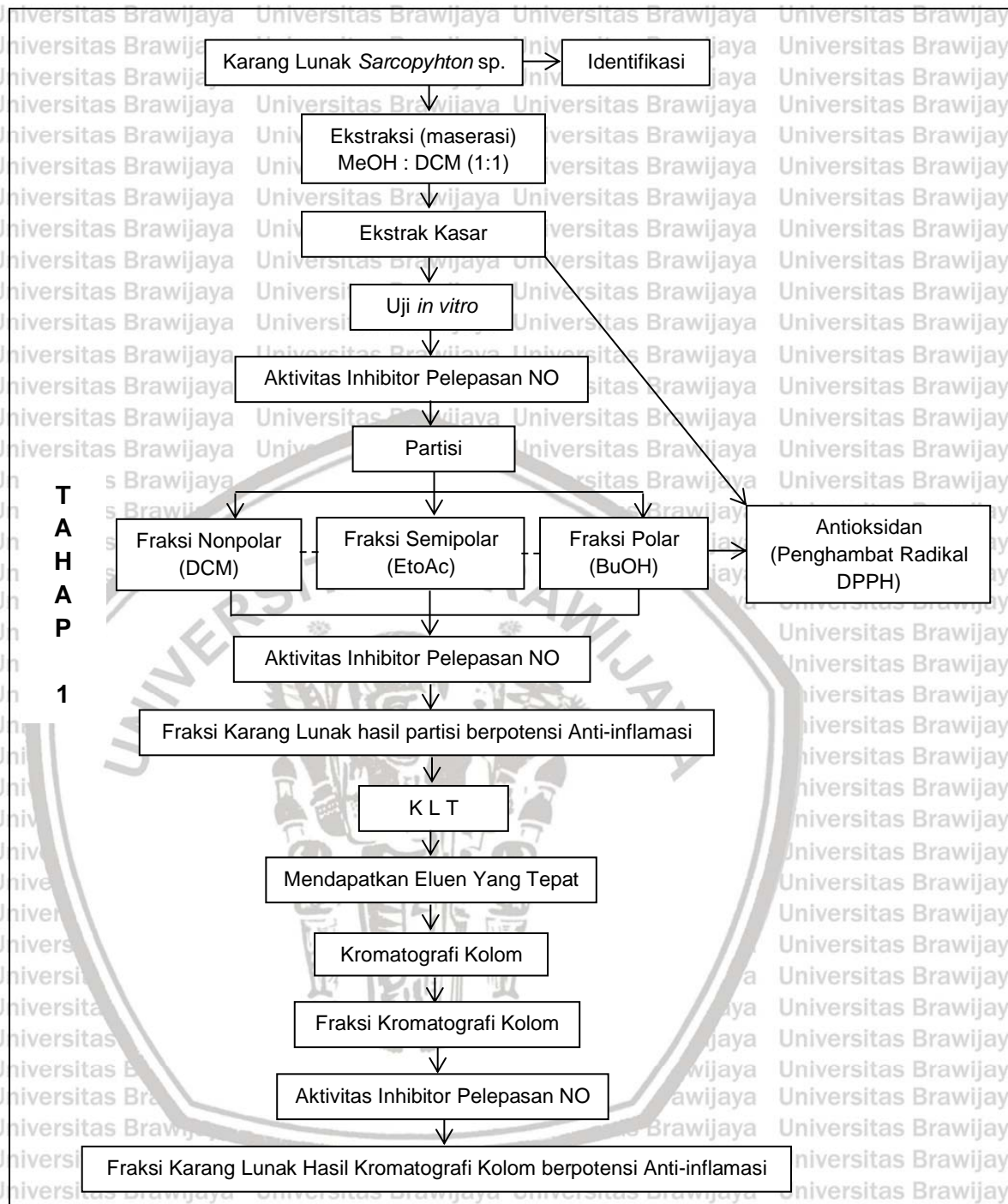
Penelitian tahap 1 dilakukan untuk menjawab tujuan 1 yang meliputi (Gambar 3.2):

- Sampling karang lunak di perairan Teluk Palu. Sampling koloni karang lunak *Sarcophyton* sp, dilakukan dengan meninggalkan bagian yang melekat di substrat untuk menjaga kelestariannya.



- b. Karang lunak *Sarcophyton* sp. diidentifikasi secara morfologi berdasarkan bentuk koloni monomorfik, sklerit interior dan permukaan.
- c. Untuk ekstraksi awal, sampel karang lunak *Sarcophyton* sp. diekstraksi sebanyak 350 g dengan metode maserasi dengan volume sampel dan larutan 1:3. Maserasi selama 24 jam, sambil sesekali diaduk. Maserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol (MeOH):diklorometana (DCM) 1 : 1, sehingga memperoleh ekstrak kasar karang lunak.
- d. Ekstrak kasar karang lunak *Sarcophyton* sp. diuji dengan mengamati aktivitas inhibitori pelepasan NO dan aktivitas antioksidan dalam menghambat radikal DPPH.
- e. Setelah itu, ekstrak kasar karang lunak *Sarcophyton* sp. dipartisi berdasarkan tingkat polaritas pelarut, yaitu DCM, Etil asetat (EtoAc) dan butanol (BuOH), masing-masing 1:3. Ketiga fraksi diuji potensinya sebagai inhibitor NO dan aktivitas antioksidan sebagai penghambat radikal DPPH.
- f. Fraksi hasil partisi karang lunak *Sarcophyton* sp. dengan aktivitas inhibitor NO dan aktivitas antioksidan sebagai penangkap radikal DPPH terbaik, ditotolkan pada plat kromatografi lapis tipis, untuk menentukan jenis dan perbandingan pelarut sebagai fase gerak dalam kromatografi kolom Si-60.
- g. Fraksi hasil partisi karang lunak *Sarcophyton* sp. yang menunjukkan potensi anti-inflamasi terbaik, selanjutnya dilarutkan melalui kolom kromatografi dengan fase diam Si-60 dan fase gerak n-heksan : EtOAc (7.5:2.5).
- h. Selanjutnya, fraksi-fraksi karang lunak hasil kromatografi kolom kembali diujikan sebagai inhibitor NO. Pengujian ini bertujuan untuk menentukan fraksi hasil kromatografi kolom yang potensial.





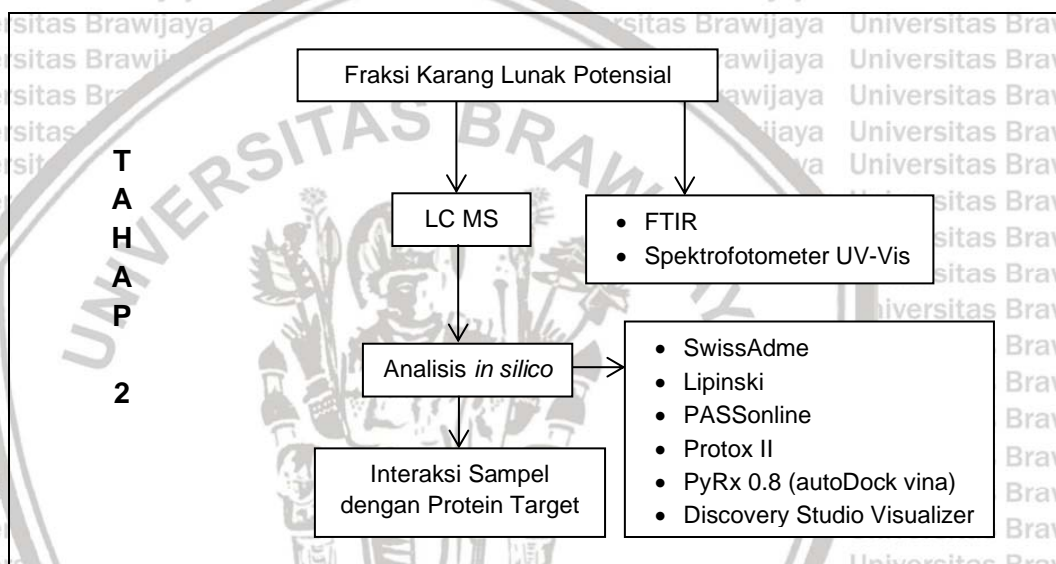
Gambar 3.2. Kerangka Operasional Penelitian Tahap 1

### 3.2.2 Tahap 2. Karakterisasi Fraksi Karang Lunak Potensial dan Pengujian *In Silico*

Penelitian tahap 2 dilakukan untuk menjawab tujuan 2 yang meliputi (Gambar 3.3):



- a. Fraksi karang lunak hasil kromatografi kolom dengan potensi terbaik sebagai inhibitor NO, dianalisis dengan LC-MS untuk memprediksi senyawa-senyawa pada fraksi.
- b. Data analisis senyawa LC-MS digunakan dalam pengujian *in silico* untuk mendapatkan interaksi sampel dengan protein target terkait inflamasi.
- c. Fraksi karang lunak hasil kromatografi kolom yang menunjukkan potensi terbaik sebagai inhibitor NO, dikarakterisasi dengan FTIR dan spektrofotometer UV-Vis.



Gambar 3.3. Kerangka Operasional Penelitian Tahap 2

### 3.2.3 Tahap 3. Pengujian *in vivo* dan *in vitro*

Penelitian tahap 2 dilakukan untuk menjawab tujuan 3, 4 dan 5 yang meliputi (Gambar 3.4) :

- a. Fraksi potensial dilakukan pengujian *in vivo* pada mencit jantan yang diinduksi LPS *E. coli* untuk mengamati :
  - 1) ekspresi iNOS dan CAMs (ICAM-1 dan VCAM-1) di otak dengan Imunohistokimia.



2) Produksi TNF- $\alpha$  dan IL-6 (CD11b<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>), NF- $\kappa$ B dan TLR4 (CD11b<sup>+</sup>NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup>).

3) Ekspresi Sel T Regulator (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), sel T naïve (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) dan Produksi IL-10 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>).

4) Produksi enzim antioksidan SOD, HO-1, Nrf-2.

5) produksi elemen stres oksidatif MDA.

b. Lalu, fraksi potensial dilakukan pegujian *in vitro* pada kultur sel limfosit mencit yang diinduksi LPS *E. coli*. Paramater yang diamati :

1) Produksi TNF- $\alpha$  dan IL-6 (CD11b<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>), NF- $\kappa$ B dan TLR4 (CD11b<sup>+</sup>NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup>).

2) Ekspresi Sel T Regulator (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) dan Produksi IL-10 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>).

c. Dari data analisis *in vivo*, *in vitro* dan *in silico* yang diperoleh dapat dijelaskan pola (*pathway*) anti-inflamasi dari fraksi karang lunak.

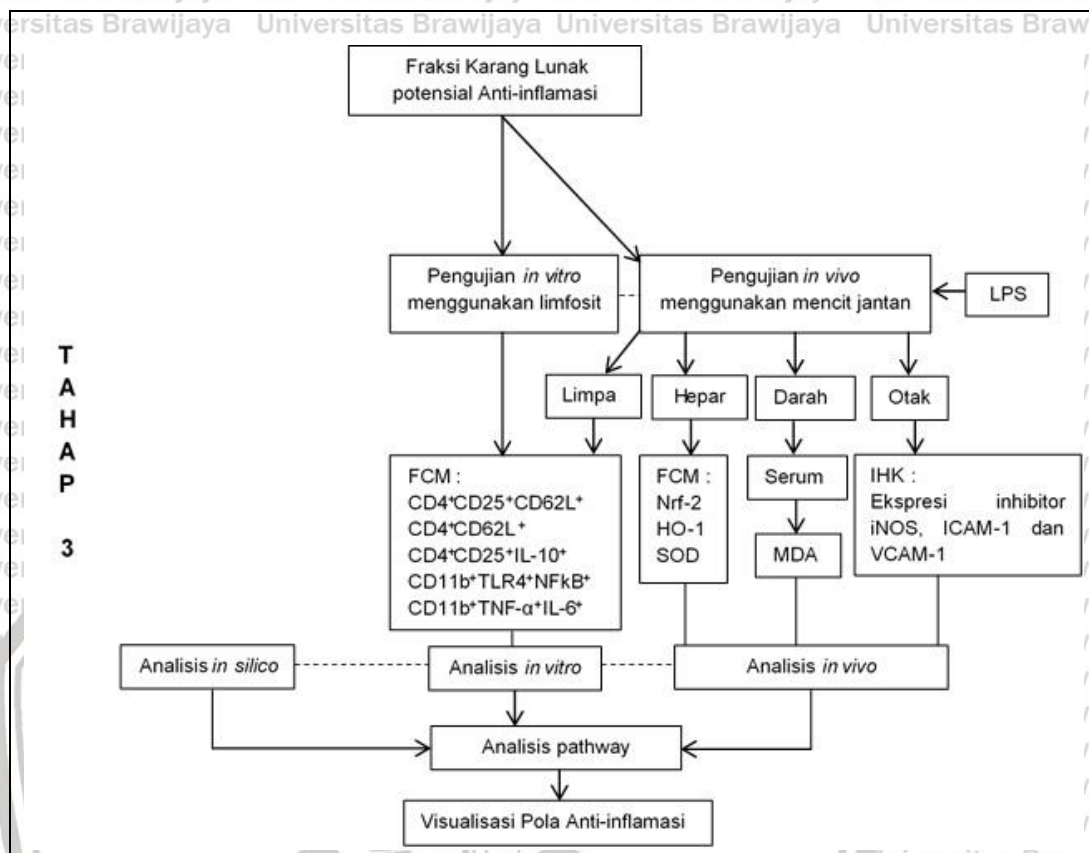
### 3.3 Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak karang lunak *Sarcophyton* sp. yang dikoleksi dari perairan Teluk Palu diduga memiliki komponen yang bernilai farmakologi sebagai anti-inflamasi berdasarkan analisis LC-MS dan karakterisasi FTIR serta Spektrofotometer UV-VIS.

2. Ekstrak karang lunak dapat meningkatkan jumlah relatif sel T regulator (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), sel T naïve (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) dan produksi IL-10 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) setelah induksi LPS secara *in vitro* dan *in vivo*.

3. Ekstrak karang lunak dapat menghambat aktivasi TLR4 (CD11b<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup>), ekspresi NF $\kappa$ B (CD11b<sup>+</sup>NF $\kappa$ B<sup>+</sup>), iNOS, VCAM-1, ICAM-1 dan produksi TNF- $\alpha$  (CD11b<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>) serta IL-6 (CD11b<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>) setelah diinduksi LPS secara *in vitro* dan *in vivo*.

4. Ekstrak karang lunak dapat meningkatkan aktivasi SOD dan HO-1 yang diregulasi oleh Nrf-2, serta dapat menurunkan MDA secara *in vivo*.



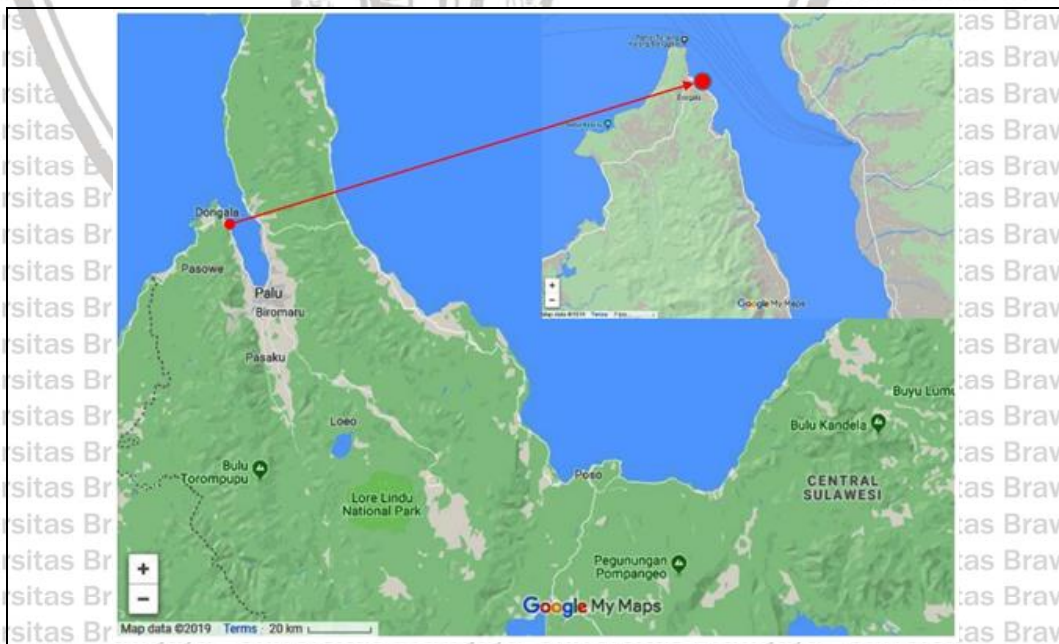
Gambar 3.4. Kerangka Operasional Penelitian Tahap 3



## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2016 – Februari 2019. Pengambilan sampel karang lunak dilakukan di perairan Teluk Palu, Pantai Desa Kabonga Besar Kabupaten Donggala Sulawesi Tengah (Gambar 4.1) pada koordinat 43.31 LS dan 119.46 BT. Ekstraksi dan pengujian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Sekolah Tinggi Perikanan dan Kelautan Palu, Laboratorium Kimia Penelitian Universitas Tadulako, Laboratorium Kimia Organik Universitas Islam Negeri Malang, Laboratorium Sentral Biomedik, Laboratorium Ilmu Faal, Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran, Laboratorium Fisiologi, Struktur, dan Perkembangan Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Brawijaya. Pemeliharaan dan perlakuan hewan uji dilakukan di *Animal Room*, FMIPA Universitas Brawijaya.



Gambar 4.1. Lokasi Pengambilan Sampel Karang Lunak



#### 4.2 Bahan dan Alat

Bahan yang diteliti ialah karang lunak *Sarcophyton* sp.. Hewan uji, yaitu mencit balb C jantan (*Mus musculus*). Bahan yang digunakan, yaitu metanol (Merck), diklorometana (Merck), etil asetat (Merck), butanol (Merck), heksan (Merck), kristal 1,1-Diphenil-2-picryl hydrazil (DPPH Merck), silica gel 60-0.015-0.040 mm (Merck), plat KLT F254 (merck), asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, LPS dari *Escherichia coli* (List Biological Laboratory, Inc.), media DMEM F-12 (Gibco Life Technologies), larutan PBS, Fetal Bovine Serum (FBS), penisilin-streptomisin, *griess kit* (Thermo Fisher Scientific), RPMI 1640 (Biowest), antibodi iNOS, VCAM-1 (Santa cruz biotechnology Inc.), ICAM-1 (Bioss), CD4, Cd11b, CD25, CD62L, TLR4, NF $\kappa$ B, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, HO-1, Nrf-2, SOD, MDA kit (trikloroasetat 100%, NA Thio 1 %, HCl 1N).

Peralatan yang digunakan, yaitu wadah kaca, tabung reaksi, erlenmeyer, mikroskop binokuler, mikrotiterplate 96 lubang, timbangan digital, kolom kromatografi (D=1,5 cm, P=30 cm), corong pemisah, rotary vaccum evaporator (Eyela N-1100), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), FTIR (Varian FTS 1000), LC-Mass Spectrometry (Shimadzu-8040), GC-Mass Spectrometry (Hewlett-Packard 6890), microplate reader (Bio-Rad 550), sentrifuge (Biosan Centrifuge LMC-3000), Flowcytometry (BD Biosciences FACS Calibur™).

#### 4.3 Prosedur Penelitian

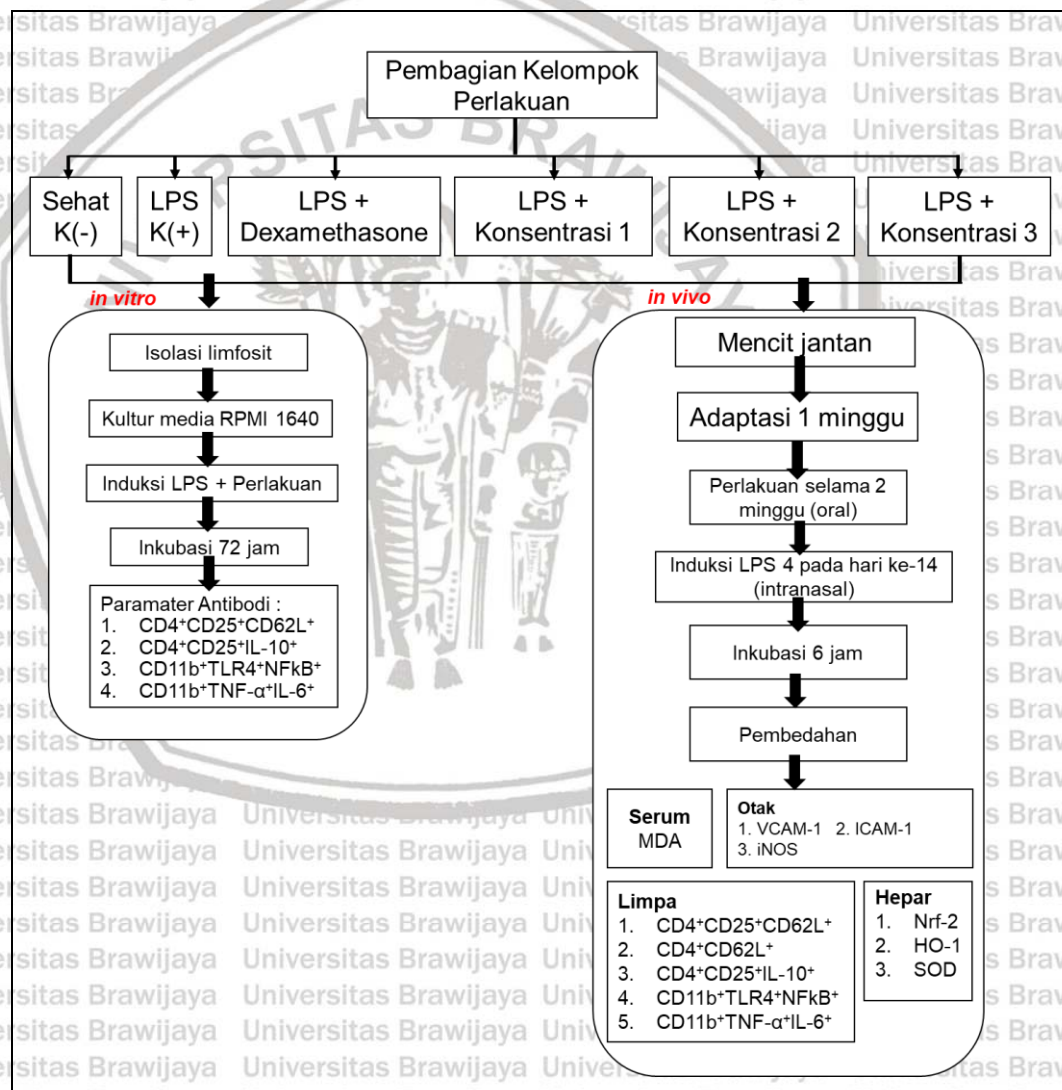
Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental yakni peneliti melakukan manipulasi perlakuan secara sengaja dan mengobservasi efek yang ditimbulkan oleh manipulasi tersebut, dengan mengontrol ketat terhadap variabel.

Pengujian secara *in vivo* terdiri dari 6 perlakuan, yaitu kontrol negatif (tanpa induksi LPS), kontrol negatif (Induksi LPS 4 mg/mL), kontrol positif (LPS + Dexametasone 6 mg/kg), konsentrasi ekstrak 1 (LPS + 50 mg/kg BB), konsentrasi ekstrak 2 (LPS



+ 125 mg/kg BB), dan konsentrasi ekstrak 3 (LPS + 250 mg/kg BB), dimana masing-masing perlakuan terdiri dari 6 ulangan.

Pengujian secara *in vitro* memiliki 6 perlakuan, yaitu kontrol negatif (tanpa induksi LPS), kontrol negatif (Induksi LPS 0.04 mg/mL), kontrol positif (LPS + Dexametasone 5 mg/mL), konsentrasi ekstrak 1 (LPS + 0,50 mg/mL), konsentrasi ekstrak 2 (LPS + 1,25 mg/mL), dan konsentrasi ekstrak 3 (LPS + 2,50 mg/mL), dimana masing-masing perlakuan terdiri dari 3 ulangan. Bagan alir pengujian *in vivo* dan *in vitro* terhadap parameter inflamasi dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Bagan Alir Pengujian *In vivo* dan *In vitro*

#### 4.3.1 Sampling dan Ekstraksi Karang Lunak

Karang lunak *Sarcophyton* sp. dikoleksi dari perairan Teluk Palu. Karang lunak *Sarcophyton* sp. dipotong-potong menjadi ukuran yang lebih kecil dan dimasukkan ke dalam wadah, kemudian dimaserasi dengan MeOH : DCM (1:1) selama 24 jam (Hsiao *et al.*, 2015). Setelah itu disaring, filtrat yang diperoleh akan diberi kode. Maserasi ini akan dilakukan sebanyak 3x. Filtrat yang diperoleh akan dievaporasi pelarut organiknya untuk mendapatkan ekstrak kasar karang lunak *Sarcophyton* sp. Ekstrak kasar ditimbang beratnya.

Ekstrak kasar karang lunak *Sarcophyton* sp. dipartisi secara bertingkat menggunakan DCM, EtoAc dan BuOH. Lewat proses ini diperoleh fraksi DCM, fraksi EtoAc dan fraksi BuOH. Fraksi karang lunak hasil partisi ditotolkan pada plat kromatografi lapis tipis (KLT) untuk menentukan komposisi perbandingan eluen yang tepat (Lampiran 3). Selanjutnya, ekstrak dipurifikasi dengan kromatografi kolom untuk pemisahan berdasarkan ukuran molekul dan daya afinitasnya.

#### 4.3.2 Identifikasi Karang Lunak

Karang lunak diidentifikasi berdasarkan petunjuk Fabricus & Alderslade (2001). Karang lunak dipisahkan berdasarkan bentuk morfologi secara visual, dengan memperhatikan bentuk tentakel, koloni, lobus dan skleritnya. Untuk pengamatan skleritnya, sekitar 0,5 cm<sup>2</sup> potongan karang lunak ditambahkan 10% natrium hipoklorit dan dibiarkan selama 5 menit. Setelah itu diaduk-aduk sampai kelihatan skleritnya yang penampakannya berupa kristal-kristal putih yang kecil.

Setelah itu kemudian ditetesi akuades secukupnya, dan diaduk-aduk kembali agar skleritnya semakin bersih dan terang. Setelah bersih, sklerit yang terdapat di cawan petri disedot dengan pipet tetes dan dipindahkan di kaca preparat, kemudian ditutup dengan kaca penutup untuk dilakukan pengamatan di bawah



mikroskop. Identifikasi sampai tahap genus menggunakan kunci identifikasi dari *Australian Institute of Marine Science*.

#### 4.3.3 Pengujian Kandungan Komponen Bioaktif

Ekstrak kasar karang lunak *Sarcophyton* sp. dianalisis kandungan komponen bioaktif mengikuti pedoman (Harborne, 1998).

##### Uji flavonoid

Sebanyak 1,0 mL larutan sampel alkoholik dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan sedikit serbuk magnesium dan beberapa tetes HCl pekat (pereaksi Shinoda), bila bereaksi positif, akan menghasilkan larutan berwarna jingga, merah muda atau merah.

##### Uji Saponin

Sebanyak 2,0 mL larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan aquades 1:1 dikocok beberapa menit, bila bereaksi positif akan terbentuk busa yang stabil selama 15 menit.

##### Uji Polifenol dan Tanin

Sebanyak 1,0 mL larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan beberapa tetes larutan feri klorida 5%, bila bereaksi positif akan menghasilkan endapan coklat.

##### Uji Alkaloid

Sebanyak 1,0 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan 2-3 tetes pereaksi Dragendorff 8 gram  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam 30% b/v  $\text{HNO}_3$  dan 27,2 g KI dilarutkan dalam 50 mL air, lalu kedua larutan tersebut dicampurkan dan dibiarkan selama 24 jam, saring lalu tambahkan air sampai volume keseluruhan campuran menjadi 100 mL, bila bereaksi positif akan menghasilkan endapan jingga.

### Uji Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrida. Selanjutnya campuran ini ditetesi dengan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Bila terbentuk warna hijau kebiruan, menunjukkan adanya sterol. Bila cincin kecokelatan atau violet menunjukkan adanya titerpenoid.

### 4.3.4 Prosedur Analisis Senyawa dan Karakterisasi Fraksi Karang Lunak

Fraksi karang lunak hasil kromatografi kolom terbaik, dikarakterisasi dengan *Spektrofotometer Fourier Transform Infra Red (FTIR)*, spektrofotometer UV-VIS untuk mengetahui gugus fungsi dan jenis ikatan. Fraksi karang lunak hasil kromatografi kolom terbaik juga dianalisis kandungan senyawanya dengan LCMS (*Liquid chromatography – mass spectrometry*).

#### Prosedur LC-MS

Analisis senyawa bioaktif dari fraksi karang lunak diprediksi menggunakan Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) dengan volume injeksi 1  $\mu$ L.

Analisis LC-MS dilakukan menggunakan model LCMS pabrikan Shimadzu-8040, Jepang dengan dilengkapi *auto sampler*, *binary pump*, *column compartment* dan *Diode Array Detector* untuk scanning spektroskopik. Pemisahan kromatografi dilakukan dengan menggunakan Column C-18, Shim Pack FC-ODS (2 mm D x 150 mm, 3  $\mu$ m). Dua pelarut disiapkan meliputi pelarut A dan pelarut B yang terdiri atas H<sub>2</sub>O:MeOH (8:2) dengan 0.1% formic acid dan 0.1% formic acid dalam asetonitril. Kedua pelarut diatur dengan perbandingan 95:5 secara berurutan dengan gradien elusi 0/0 pada 0 menit, 15/85 pada 5 menit, 20/80 pada 20 menit, 90/10 pada 24 menit. Analisis MS dilakukan dengan Electrospray Ionization (ESI) dengan ion positif sebagai sumbernya. Data MS diperoleh melalui perangkat *collision energy* mulai 5.0 V. Parameter sumber ESI diatur meliputi tegangan



kapiler 3.0 kV, sumber temperatur 100°C, *desolvation temperature* 350 °C, *sampling cone* 23 V, dan *desolvation gas flow* 6 L/jam. Data kromatogram yang diperoleh didasarkan dari sistem atau *library* (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library) yang digunakan.

### **Prosedur FTIR**

Analisis FTIR dengan menggunakan sistem Spektrofotometer Varian FTS 1000, yang digunakan untuk memperhatikan puncak khas dan kelompok fungsionalnya. FT-IR merupakan alat yang dapat mengenali jenis gugus fungsi yang ada dalam senyawa. Panjang gelombang cahaya yang diserap membedakan ikatan kimia yang dapat dilihat pada spektrum beranotasi. Inframerah penyerapan spektrum dapat disimpulkan dengan menggunakan ikatan kimia dalam suatu molekul dapat ditentukan. Fraksi karang lunak kering digunakan untuk analisis FTIR. 100 mg ekstrak kering dikondensasikan dalam pelet KBr, untuk menyiapkan cakram sampel transparan. Dalam spektroskopi FTIR, specimen sampel karang lunak yang dimuat dengan kisaran pemindaian 400 hingga 4000  $\text{cm}^{-1}$  dengan resolusi 4 $\text{cm}^{-1}$ .

### **Prosedur Spektrofotometer UV-Vis**

Fraksi karang lunak disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit dan disaring melalui kertas saring Whatmann No.1. Sampel diencerkan sampai 1:10 dengan pelarut yang sama. Ekstrak dilakukan pembacaan pada panjang gelombang mulai dari 200 hingga 800 nm menggunakan Spektrofotometer Shimadzu UV-1800 dan puncak karakteristik terdeteksi. Nilai puncak UV-VIS dicatat.

#### 4.3.5 Prosedur Kerja *In Silico*

Karakterisasi dengan spektrum UV dan IR dan analisa LCMS menunjukkan dari 42 senyawa aktif fraksi 3 hasil kromatografi kolom, hanya 25 senyawa aktif yang memiliki struktur aromatik dengan gugus –OH dan diduga sebagai anti-inflamasi. 25 senyawa aktif dianalisis dengan kemiripan sebagai obat (*druglikeness*) menurut aturan Lipinski dengan SwissADME <http://www.swissadme.ch/>.

Senyawa yang memenuhi kaidah Lipinski dianalisis potensi dengan PASS online server databe <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>. Terminologi yang dianalisis adalah anti-inflamatori. PASS server merupakan database yang berisi data mengenai aktifitas senyawa pada setiap terminologi yang dibutuhkan. Skor prediksi yang diberikan akurat dan mendekati hasil *in vitro* dan *in vivo* jika memiliki nilai *Probability to be active* ( $P_a$ ) > 0.7.

Lalu dilakukan analisis prediksi LD<sub>50</sub> dengan software Protox II [http://tox.charite.de/protox\\_II/](http://tox.charite.de/protox_II/). Daya toksisitas dinilai dalam LD<sub>50</sub> dalam satuan mg/kg berat badan. Nilai LD<sub>50</sub> diberikan dalam mg/kg, yaitu :

Kelas I: fatal jika tertelan ( $LD_{50} \leq 5$ );

Kelas II: fatal jika tertelan ( $5 < LD_{50} \leq 50$ );

Kelas III: beracun jika tertelan ( $50 < LD_{50} \leq 300$ );

Kelas IV: berbahaya jika tertelan ( $300 < LD_{50} \leq 2000$ );

Kelas V: mungkin berbahaya jika tertelan ( $2000 < LD_{50} \leq 5000$ ); dan

Kelas VI: tidak beracun ( $LD_{50} > 5000$ ).

Selanjutnya, senyawa aktif yang diduga kuat sebagai anti-inflamasi, dianalisis *molecular docking* menggunakan PyRx (autoDock Vina) dengan protein TLR4, NFkB dan IL-10. TLR 4 merupakan protein reseptor yang mengenal antigen LPS. NFkB merupakan faktor transkripsi utama dalam regulator inflamasi. IL-10 merupakan protein sebagai regulator negatif inflamasi, yang berperan sebagai



anti-inflamasi. Semakin negatif ikatan afinitasnya suatu ligand dan reseptornya, menunjukkan ikatan semakin kuat. Setelah itu, hasil *molecular docking* divisualisasikan dengan *Discovery Studio Visualizer* untuk melihat jenis interaksi ikatan.

#### 4.3.6 Pengujian Aktivitas Inhibitori Pelepasan NO

Pengujian mengikuti pedoman B.-W. Chen *et al.* (2013), Ravipati *et al.* (2012) dan Fattorusso *et al.* (2011). Isolasi makrofag dari mencit mengikuti pedoman Zhang, Goncalves, & Mosser (2008). Mencit dikorbankan dengan dislokasi leher, kemudian ditempatkan dalam posisi terlentang, kulit perut mencit dibuka dan dibersihkan selubung peritoneum dengan alkohol 70%. Kemudian, disuntikkan  $\pm$  10 mL media DMEM dingin ke dalam rongga peritoneum (tunggu  $\pm$  1 menit sambil ditekan-tekan perlahan). Setelah itu, cairan peritoneum dikeluarkan dari rongga peritoneal dengan mengetuk dengan dua jari organ internal, cairan dikeluarkan dengan injeksi jarum suntik, dipilih di yang tidak berlemak dan jauh dari bagian usus. Aspirate dikumpulkan dalam tabung centrifuge dan disentrifugasi pada 800-1000 rpm pada suhu ruangan, 8-10 menit. Kemudian, supernatan dihilangkan dan ditambahkan ke 1 mL DMEM medium lengkap (mengandung 10% FBS) dalam pelet yang diperoleh.

Sel makrofag dimasukkan dalam plat mikrotiterplate 96 sumur ( $1 \times 10^6$  sel/sumur) ditangguhkan dalam media DMEM yang mengandung 10% FBS, pada inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 2 jam. Peningkatan kadar NO pada makrofag diinduksi dengan menginkubasinya selama 24 jam dalam media yang mengandung LPS (0,01  $\mu$ g/mL) tanpa adanya ekstrak uji. Ekstrak uji (konsentrasi 5, 10, 20 mg/mL) ditambahkan ke sel 5 menit sebelum tantangan LPS, masing-masing di tiap sumur. Konsentrasi nitrit dalam media kultur diukur sebagai indikator produksi NO menurut reaksi Griess. Sekitar 100  $\mu$ l supernatan kultur sel

direaksikan dengan 100  $\mu\text{L}$  reagen Griess (1: 1 campuran 0,1% N-(1-naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride dalam air dan 1% sulfanilamide dalam 5% asam fosforik). Supernatan kultur dikumpulkan untuk dihitung konsentrasi NO dengan reaksi Griess dan dibaca menggunakan *microplate reader* pada absorbansi 570 nm (Lampiran 2).

#### 4.3.7 Pengujian Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH

Aktivitas penangkapan radikal DPPH ditentukan menggunakan pedoman Molyneux (2004). Sebanyak 25 mg ekstrak ditempatkan dalam labu 25 ml. Pelarut etanol kemudian ditambahkan, sehingga memperoleh konsentrasi larutan ekstrak 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan diencerkan untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sebuah alikuot 2 mL dari larutan ekstrak ditambahkan ke 2 mL larutan DPPH 50  $\mu\text{M}$ . Campuran dihomogenisasi dan dibiarkan selama 30 menit dalam ruangan gelap sebelum mengukur penyerapan radikal bebas dengan spektrofotometer pada absorbansi 517 nm. Nilai absorbansi larutan DPPH juga diukur sebagai absorbansi blanko.

Penentuan  $\text{IC}_{50}$  dilakukan dengan larutan ekstrak diencerkan untuk menghasilkan serangkaian konsentrasi 30, 60, 90, 120 dan 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Lalu, persentase inhibisi diplot pada sumbu y dan sumbu x sebagai konsentrasi ekstrak yang dilarutkan, untuk memperoleh persamaan regresi linier ( $y=a+bx$ ).  $\text{IC}_{50}$  ditentukan sebagai konsentrasi larutan ekstrak yang diperlukan untuk mengurangi radikal bebas DPPH sebesar 50%. Pengujian akan dilakukan dengan tiga kali pengulangan dan hasil pengukuran diekspresikan dengan standar deviasi.

Persentase inhibisi sampel dihitung menggunakan persamaan :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$



#### 4.3.8 Prosedur Kerja *in vivo*

##### Deskripsi Hewan Coba

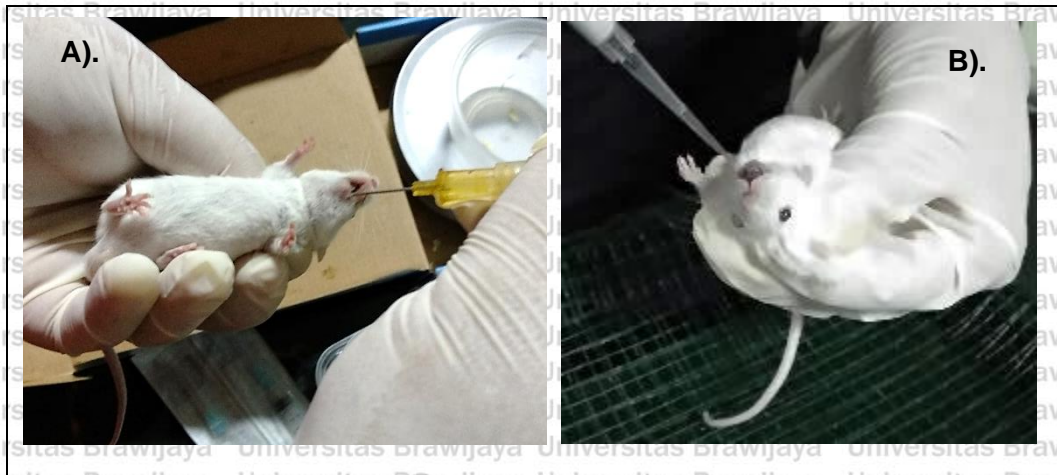
Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan dengan kriteria galur BALB/c, berumur 6-8 minggu, dengan berat sekitar 25 - 30 g, serta memiliki kondisi sehat yaitu bergerak aktif, bulu tidak rontok, dan kaki tidak bengkok atau cacat. Pengujian *in vivo* ini menggunakan 6 perlakuan dengan masing-masing perlakuan 6 kali ulangan. Jumlah mencit yang dipakai sebanyak 36 ekor. Penelitian ini telah mendapat sertifikat kelayakan etik (*Ethical Clearance*) dari Komisi Etik Penelitian (*Animal Care and Use Committee*) Universitas Brawijaya No. 680-KEP-UB (Lampiran 1).

##### Penentuan Konsentrasi Perlakuan *In vivo*

Penentuan konsentrasi perlakuan pada *in vivo* berdasarkan konsentrasi terbaik yang dapat menghambat level NO. Kemudian disesuaikan dengan berat mencit (dengan asumsi berat mencit 25 g). Konsentrasi LPS dan dexamethasone dalam pengujian *in vivo* berdasarkan Tian *et al.* (2019).

##### Pemberian Perlakuan Ekstrak dan Induksi LPS pada Mencit

Mencit dikorbankan setelah 14 hari perlakuan pemberian ekstrak. Pemberian ekstrak dilakukan secara oral dengan disonde (Gambar 4.3a). Sebelum dikorbankan pada hari ke-14, mencit diberi induksi LPS. Pemberian LPS sebanyak 10  $\mu$ L dilakukan melalui saluran pernapasan (intranasal) (Gambar 4.3b) dan pada kontrol negatif diberikan PBS dengan volume yang sama. Setelah inkubasi 6-8 jam, mencit dikorbankan dengan cara dislokasi leher.



Gambar 4.3. Pemberian Ekstrak dan LPS pada Mencit

A). Pemberian Perlakuan Ekstrak Secara Oral; B). Pemberian LPS melalui Intranasal Mencit

#### Isolasi Sel Limfosit dari Organ Limpa

Prosedur isolasi sel limfosit yaitu dengan mencuci organ limpa dengan PBS 2 kali dalam cawan petri. Setelah itu organ dipencet searah jarum jam dengan menggunakan pangkal *sputit*. Homogenat yang bercampur PBS dimasukkan dalam tabung propilen 15 mL dan ditambahkan PBS sampai volumenya mencapai 10 mL.

Kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm, 10 °C selama 5 menit.

Supernatan dibuang sedangkan pellet diambil dan diresuspensi dengan PBS 1 mL

lalu dihomogenasi dan dilakukan *immunostaining*

#### Isolasi Sel Hepatosit dari Organ Hepar

Isolasi sel hepatosit dilakukan dengan cara memotong kecil-kecil organ hepar dengan ukuran  $\pm 1$  mm. Selanjutnya organ dicuci dengan PBS hingga bersih.

Selanjutnya potongan organ dipindahkan dalam tabung erlenmeyer yang berisi 0,25% Tripsin dengan perbandingan 10 mL per 1 g jaringan organ. Selanjutnya jaringan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Lalu ditambahkan 1 mL medium DMEM hangat untuk setiap 100 mg jaringan. Dispersi sel dilakukan



dengan cara pipetting. Supernatan selanjutnya diambil dan disentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit pada suhu 10 °C. Supernatan dibuang kemudian pelet dilakukan *immunostaining* (Prajapati & Patel, 2011).

### Immunostaining dan Analisis Flowcytometry

Penelitian ini menggunakan pewarnaan ekstraseluler dan intraseluler pada organ limpa dengan kombinasi pewarnaan antibodi seperti pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kombinasi Antibodi ekstraseluler dan intraseluler untuk Analisis Flowcytometry pada pengujian *in vivo*

No.	Sel yang diamati	Kombinasi Staining	Lokasi Staining
1.	Sel Makrofag	FITC-conjugated rat anti-mouse CD11b	Membran
		PE-conjugated rat anti-mouse TLR4	Sitoplasmik
		FITC-conjugated rat anti-mouse CD11b	Membran
		PE-conjugated rat anti-mouse NFκB	Sitoplasmik
		FITC-conjugated rat anti-mouse CD11b	Membran
		PE-conjugated rat anti-mouse TNF-α	Sitoplasmik
		FITC-conjugated rat anti-mouse CD11b	Membran
2.	Sel T	PE-conjugated rat anti-mouse IL-6	Sitoplasmik
		FITC-conjugated rat anti-mouse CD4	Membran
		PE-conjugated rat anti-mouse CD25	Membran
		PE/Cy5-conjugated rat anti-mouse CD62L	Membran
		FITC-conjugated rat anti-mouse CD4	Membran
		PE/Cy5-conjugated rat anti-mouse CD62L	Membran
		FITC-conjugated rat anti-mouse CD4	Membran
3.	Sel Hepatosit	PE-conjugated rat anti-mouse CD25	Membran
		PE/Cy5-conjugated rat anti-mouse IL-10	Sitoplasmik
		FITC-conjugated rat anti-mouse Nrf2	Sitoplasmik
		FITC-conjugated rat anti-mouse HO-1	Sitoplasmik
		FITC-conjugated rat anti-mouse SOD	Sitoplasmik

Pewarnaan membran dilakukan dengan membuang supernatan. Lalu pelet yang diperoleh ditambahi PBS kemudian ditambahkan dengan antibodi (1:500) 50 µL, diresuspensi dan diinkubasi 4 °C selama 20 menit. Pewarnaan intraseluler dilakukan dengan menambahkan 100 µL larutan fiksatif *cytofix-cytoperm*, diresuspensi, dan diinkubasi 4 °C selama 20 menit. Setelah itu, sisa larutan fiksatif dibuang, lalu ditambahkan *washperm* 500 µL dan disentrifuge kecepatan 2500 rpm pada 10 °C selama 5 menit. Kemudian, supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan



pellet yang diperoleh dilakukan *immunostaining*, dan diinkubasi pada 4 °C selama 20 menit.

Sampel yang telah diinkubasi pada pewarnaan ekstraseluler dan intraseluler ditambahkan 400 µL PBS dan diresuspensi, kemudian dipindahkan ke dalam kuvet *flowcytometry*, dipipeting dan dilakukan *setting plot* pada *acquiring mode*. *Flow cytometry* dipastikan dalam keadaan *Low-Run*. Setelah *flowcytometry* siap, kuvet dipasang pada *nozzle* BD Biosciences FACS Calibur™ *flowcytometry*.

Analisis data hasil *flowcytometry* menggunakan software BD Cellquest Pro™.

#### **Pengujian MDA dari Serum**

Setelah mencit dikorbankan, darah diambil dari bagian jantung (Gambar 4.4) dan ditampung di *ependorf tube*. Kemudian darah disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Lalu, diambil serumnya dan kembali disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Setelah itu diambil bagian supernatannya sebagai sampel. Lalu disiapkan 100 µL trikloroasetat 100%, 100 µL NA Thio 1 %, 250 µL HCl 1N, 450 µL akuades dan 100 µL sampel. Bahan-bahan tersebut disediakan oleh Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Semua bahan dihomogenasi dan dipanaskan 100 °C selama 10 menit dan disentrifuge dengan kecepatan 2500 - 3000 rpm selama 5 -10 menit. Kemudian bagian supernatan diambil dan jangan sampai terambil bagian debris. Bagian supernatan ditambahkan akuades sampai dengan volumenya mencapai 3500 µL (700 µL supernatant dan 2800 µL akuades).

Kemudian dibaca dengan spektrofotometer pada absorbansi 532.8 nm.





Gambar 4.4. Pengambilan Darah dari Jantung Mencit

### Pembuatan dan Pengamatan Slide Preparat Imunohistokimia

Pembuatan preparat imunohistokimia dari organ otak dilakukan dengan melakukan *fiksasi* menggunakan larutan formalin 10%, kemudian dilakukan *embedding* menggunakan *paraffin wax*. Setelah itu dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5  $\mu\text{m}$ , lalu diletakkan pada kaca slide preparat khusus imunohistokimia. Slide preparat dilakukan deparafinisasi dengan memanaskan slide pada suhu 60-80  $^{\circ}\text{C}$ . Kemudian dicelup pada xylol selama 5-10 menit. Lalu slide dibilas dengan xylol baru selama 5-10 menit. Slide dibilas kembali dengan mencelupkan pada xylol baru selama 5-10 menit. Setelah itu, slide dibilas dengan mencelupkan pada etanol absolut selama 5-10 menit. Slide dibilas lagi dengan etanol absolut selama 5-10 menit. Lalu, slide dicelupkan pada etanol 70% selama 5-10 menit. Kemudian dibilas dengan akuades.

Tahap selanjutnya *immunostaining* menggunakan Scytek kit. Slide preparat dibilas dengan PBS sebanyak 3 kali. Lalu diinkubasi dengan *peroxidase blocking for image analysis* selama 40 menit pada suhu ruang. Kemudian, dibilas lagi dengan PBS sebanyak 3 kali. Setelah itu, diinkubasi pada *super block* selama semalam pada suhu 4  $^{\circ}\text{C}$ . Lalu, dibilas kembali dengan PBS sebanyak 3 kali. Slide



diinkubasi dengan antibodi primer (iNOS, VCAM-1 dan ICAM-1) yang telah diencerkan dalam *blocking super block* selama semalam pada suhu 4 °C. Slide dibilas dengan PBS sebanyak 3 kali. Setelah itu, slide diinkubasi dengan antibody sekunder *CRF Anti-Polivalent Biotinylated HRP* selama 1 jam pada suhu ruang. Slide dibilas dengan PBS sebanyak 3 kali. Kemudian slide diinkubasi dengan enzim *ultratek HRP* selama 40 menit pada suhu ruang. Slide dibilas dengan akuades sampai PBS hilang. Setelah itu, slide diinkubasi pada *DAB (diaminobenzidine) chromogen dalam DAB substrate (High contrast)*, lalu diamati ekspresi dari jaringan target yang diperiksa dengan mikroskop sampai respon ditandai dengan terbentuk warna coklat pada target. Kemudian reaksi substrat dihentikan dengan menggenangi slide dengan akuades selama 5 menit. Slide dibilas dengan akuades sampai substrat bersih. Setelah itu, diberikan *counterstain Mayer's Hematoxylin* (optimasi waktu dan diamati dengan mikroskop, agar kontras jaringan yang positif terwarnai coklat tidak tertumpuk warna yang terlalu ungu). Counterstain dibilas dengan akuades sampai bersih. Lalu slide dikeringanginkan dan jika telah benar-benar kering, slide ditutup dengan entelan.

Slide kemudian diamati dengan mikroskop Olympus BX-51 dengan pembesaran 400x. Gambar yang diamati dianalisis dengan menggunakan *ImmunoMembrane software* (URL: <http://153.1.200.58:8080/ImmunoMembrane/>). Hasil analisis ImmunoMembrane memiliki tiga skor : 0/1+ menunjukkan ekspresi negatif/lemah, 2+ menunjukkan ekspresi moderat atau skor ambang batas, dan 3+ menunjukkan ekspresi kuat (Rahayu *et al.*, 2019).

#### 4.3.9 Prosedur Kerja *In vitro*

##### Penentuan Konsentrasi Perlakuan *In vitro*

Penentuan konsentrasi perlakuan pada *in vitro* berdasarkan hasil yang diperoleh di pengujian *in vivo*. Konsentrasi LPS dan ekstrak disesuaikan 1/100x



dari konsentrasi pada pengujian *in vivo*. Konsentrasi dexamethasone sebesar 5 mg/mL.

### **Persiapan Media Kultur Sel Limfosit**

Sebanyak 6300  $\mu$ L ekstrak yang diambil dari larutan stok diencerkan dengan 2700  $\mu$ L RPMI 1640 yang telah ditambahkan antibiotik penisilin dan streptomisin, sehingga diperoleh media perlakuan konsentrasi 1 sebanyak 8 mL (70 % dari larutan stok). Media perlakuan konsentrasi 2 diperoleh dengan mengencerkan 160  $\mu$ L media perlakuan konsentrasi 1 dengan 15.840  $\mu$ L media RPMI+antibiotik, sehingga diperoleh 16.000  $\mu$ L media perlakuan konsentrasi 2. Media perlakuan konsentrasi 3 diperoleh dengan mengencerkan 160  $\mu$ L media perlakuan konsentrasi 2 dengan 15.840  $\mu$ L media RPMI+antibiotik, sehingga diperoleh 16.000  $\mu$ L media perlakuan konsentrasi 3. Masing-masing media kultur perlakuan konsentrasi 1, 2 dan 3 disaring dengan *cell filter* dan dipindahkan ke tabung propilen baru. Media kontrol negatif dibuat tanpa penambahan ekstrak yaitu 16.000  $\mu$ L medium RPMI+antibiotic, dimasukkan dalam tabung propilen 15 ml. Masing- masing media (kontrol negatif, kontrol negatif+LPS, kontrol positif dexamethasone+LPS, Perlakuan konsentrasi 1+LPS, Perlakuan konsentrasi 2+LPS dan Perlakuan konsentrasi 3+LPS) ditambahkan dengan 5  $\mu$ L 2-*mercaptoetanol*, 10 % *Fetal Bovine Serum* (FBS) dan 240  $\mu$ L  $\alpha$ -CD3 serta LPS.

### **Isolasi Sel Limfosit**

Isolasi sel limfosit dilakukan dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Mencit yang digunakan adalah mencit sehat (*pathogen free*). Mencit dikorbankan dengan cara dislokasi leher. Organ spleen diisolasi kemudian dicuci PBS sebanyak 2 kali dalam cawan petri steril. Organ *spleen* digerus searah jarum jam dengan menggunakan pangkal *sputit* steril. Homogenat yang bercampur PBS dimasukkan dalam tabung



propilen 15 ml dan ditambahkan PBS sampai volumenya mencapai 10 ml.

Kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm, 10 °C selama 5 menit.

Supernatan dibuang sedangkan pellet diambil dan diresuspensi dengan medium

RPMI 1640 dan dihomogenasi.

Suspensi pellet sel *spleuntuk en* diambil sebanyak 5 µL untuk menghitung

sel berinti yang hidup. Suspensi pellet ditambahkan 95 µL *Evans Blue* kemudian

dipipeting. Perhitungan sel hidup dilakukan dengan menggunakan kamar hitung

dalam *haemocytometer*. Sel yang mati akan berwarna biru sedangkan sel yang

hidup tidak berwarna atau bening. Jumlah sel hidup dihitung pada 4 kotak

berukuran sedang, kemudian dilakukan perhitungan sel dengan rumus :

$$\Sigma \text{ Sel Limfosit} = \Sigma \text{ sel hitung} \times 4 \times \text{faktor pengenceran} \times 10^4 \text{ sel/mL}$$

### **Kultur Sel Limfosit, Immunostaining dan Analisis Flowcytometry**

Sel sebanyak 1,5-2 x 10<sup>6</sup> sel/mL dikultur dalam plate 48 well dan masing-

masing well diisi sebanyak 1 mL suspensi sel. Sel dikultur selama 3 hari (72 jam)

dalam incubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37 °C. Setiap hari dilakukan pengamatan

ada atau tidaknya kontaminasi yang ditandai dengan keruhnya media. Sel dipanen

setelah 3 hari dengan cara memindahkan sel dalam plate ke dalam propilen.

Kemudian dilakukan *immunostaining* ekstraseluler dan intraseluler pada sel

limfosit dengan kombinasi pewarnaan antibodi (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Kombinasi Antibodi ekstraseluler dan intraseluler untuk Analisis Flowcytometry pada pengujian *in vitro*

No.	Sel yang diamati	Kombinasi Staining	Lokasi Staining
1.	Sel Makrofag	FITC-conjugated rat anti-mouse CD11b	Membran
		PE-conjugated rat anti-mouse TLR4	Sitoplasmik
		FITC-conjugated rat anti-mouse CD11b	Membran
		PE-conjugated rat anti-mouse NFκB	Sitoplasmik
		FITC-conjugated rat anti-mouse CD11b	Membran
		PE-conjugated rat anti-mouse TNF-α	Sitoplasmik
		FITC-conjugated rat anti-mouse CD11b	Membran
		PE-conjugated rat anti-mouse IL-6	Sitoplasmik
2.	Sel T	FITC-conjugated rat anti-mouse CD4	Membran



PE-conjugated rat anti-mouse CD25	Membran
PE/Cy5-conjugated rat anti-mouse CD62L	Membran
FITC-conjugated rat anti-mouse CD4	Membran
PE-conjugated rat anti-mouse CD25	Membran
PE/Cy5-conjugated rat anti-mouse IL-10	Sitoplasmik

Pewarnaan membran dilakukan dengan cara supernatan dibuang dan pelet yang telah ditambah PBS ditambahkan dengan antibodi (1:500) sebanyak 50  $\mu$ L, diresuspensi, kemudian diinkubasi pada suhu 4 °C selama 20 menit.

Pewarnaan intraseluler dilakukan dengan menambahkan 100  $\mu$ L larutan fiksatif *cytofix-cytoperm*, diresuspensi, kemudian diinkubasi pada suhu 4 °C selama 20 menit. Sisa larutan fiksatif dibuang, kemudian ditambahkan *washperm* 500  $\mu$ L dan disentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu 10 °C selama 5 menit.

Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan pellet dilakukan *immunostaining*, kemudian diinkubasi pada suhu 4 °C selama 20 menit.

Sampel yang telah diinkubasi pada pewarnaan ekstraseluler dan intraseluler ditambahkan 400  $\mu$ L PBS dan diresuspensi, kemudian dipindahkan ke dalam kuvet *flow cytometry*. Analisis *flow cytometry* dilakukan setelah prosedur pewarnaan antibodi pada parameter inflamasi. Lalu dilakukan *setting plot* pada *acquiring mode*. *Flow cytometry* dipastikan dalam keadaan *Low-Run*. Setelah *flow cytometry* siap, kuvet dipasang pada *nozzle* BD Biosciences FACS Calibur™ *flow cytometry*. Analisis data hasil flowcytometry menggunakan software BD Cellquest

Pro™

#### 4.4 Analisa Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk rerata  $\pm$  standar deviasi dengan bantuan Microsoft Excel 2013. Kemudian dianalisis dengan statistik menggunakan SPSS versi 20.0 for Windows. Data yang telah berdistribusi normal, diuji dengan one-way ANOVA pada taraf kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ). Apabila

diperoleh  $p > 0,05$  maka tidak terdapat perbedaan yang nyata antar masing-masing perlakuan, sebaliknya jika  $p < 0,05$  maka menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan yang dibandingkan. Kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey HSD (*High Significant Difference*).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





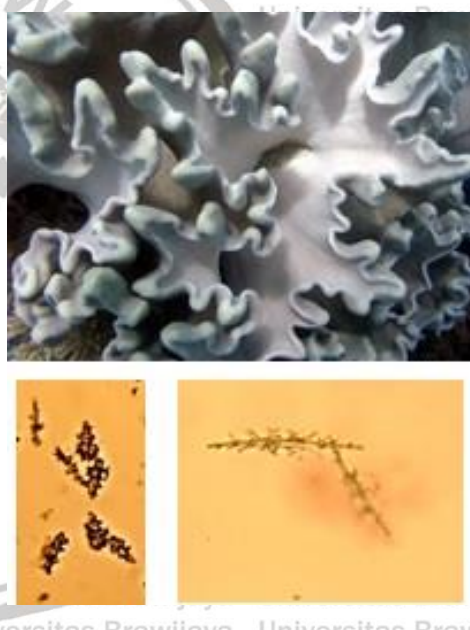
**BAB V**

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**5.1 Identifikasi Morfologi Karang Lunak**

Sampel karang lunak diidentifikasi berdasarkan bentuk koloni, sklerit interior dan permukaan dengan kunci identifikasi dari *Australian Institute of Marine Science*. Hasil identifikasi secara morfologi, sampel karang lunak teridentifikasi *Sarcophyton* sp. Karakteristik morfologi sampel karang lunak yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Karakteristik Karang Lunak *Sarcophyton* sp. dari Pesisir Teluk Palu

Karakteristik Sampel	Foto Sampel dan Sklerit
<p><b>Bentuk Koloni</b> Koloni berdaging, polip seperti piring, pinggiran bergelombang, lunak dan berdaging, dengan kekuatan kontraksi.</p> <p><b>Polip</b> Dimorfik. Berbentuk piring disk dan tentakel oral berukuran sedang. retractile, permukaan koloni tampak halus.</p> <p><b>Sklerit</b> Sklerit permukaan berbentuk club panjang. Sklerit interior berbentuk spindel. Sklerit tidak berwarna.</p>	

**5.2 Berat Ekstrak Karang Lunak**

Pada penelitian ini, proses ekstraksi dilakukan secara bertahap dan bertingkat. Tahap pertama untuk mendapatkan ekstrak kasar. Tahap kedua ekstrak kasar dipartisi dengan beberapa pelarut sesuai polaritas. Tahap ketiga fraksi hasil partisi terlih dipurifikasi melalui kromatografi kolom Si-60 untuk

pemisahan ekstrak berdasarkan ukuran partikel dan daya afinitasnya. Hasil ekstraksi sampel karang lunak dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Berat Ekstrak dan Fraksi Sampel Karang Lunak

Jenis Sampel / Fraksi	Berat Ekstrak / Fraksi (mg)
Tahap Pertama (Ekstrak Kasar)	
Berat Sampel Basah Karang Lunak 350.000 mg	
<i>Sarcophyton</i> sp. (SCC)	2.990
Tahap Kedua (Partisi)	
<i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Fraksi DCM	930
<i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Fraksi EtOAc	80
<i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Fraksi BuOH	60
Tahap Ketiga (Fraksi Kromatografi Kolom)	
Berat <i>Sarcophyton</i> sp. (SCC) Fraksi DCM 460 mg	
Fraksi 1	77
Fraksi 2	144
Fraksi 3	64
Fraksi 4	74
Fraksi 5	50
Fraksi 6	39

Tabel 5.2 menunjukkan berat ekstrak bervariasi antara fraksi karang lunak dari pelarut yang digunakan. Ekstrak yang diperoleh menunjukkan efektivitas pelarut dalam memisahkan dan menarik substansi bioaktif selama proses ekstraksi, tetapi tidak menunjukkan aktivitas biologis (Putri, Hasanah, & Kusimaningrum, 2016). Jenis pelarut yang digunakan merupakan faktor utama yang mempengaruhi berat ekstrak (Hardiningtyas, Purwaningsih, & Handharyani, 2014). Selain itu, faktor habitat juga turut mempengaruhi berat ekstrak yang diperoleh, sebagai respons terhadap lingkungan (Nopiyanti & Agustriani, 2016).

Ukuran sampel juga mempengaruhi berat ekstrak yang diperoleh. Sampel dengan ukuran yang kecil, dapat menghasilkan ekstrak yang lebih banyak. Substansi bioaktif dapat diekstraksi dengan polaritas pelarut yang mirip dengan polaritasnya (Jacob, Purwaningsih, & Rinto, 2011).



Tabel 5.2 juga menunjukkan bahwa fraksi non polar Diklorometana (DCM) memiliki massa lebih besar daripada fraksi semi polar etil asetat (EtOAc) dan fraksi polar butanol (BuOH). Hal ini menunjukkan bahwa substansi bioaktif yang diproduksi karang lunak banyak larut dalam senyawa non polar hingga semi polar. Blunt, Copp, Keyzers, Munro, & Prinsep (2013) melaporkan bahwa karang lunak memproduksi variasi substansi bioaktif yang unik, dan tergolong senyawa sesquiterpenoid, diterpenoid dan steroid. Komponen bioaktif terpenoid dan steroid termasuk dalam senyawa non hingga semi polar (Dewanto, Tanod, Finarti, & Renol, 2018).

Maka dari itu, dalam purifikasi fraksi hasil partisi eluen yang digunakan sebagai fase gerak dalam kromatografi kolom, yaitu senyawa non polar n-heksan dan semi polar etil asetat dengan perbandingan 75:25. Perbandingan eluen ini diperoleh dari proses kromatografi lapis tipis, dengan melihat komposisi pelarut yang dapat memisahkan ekstrak yang paling baik (terbentuk spot noda yang paling banyak) (Lampiran 3).

### 5.3 Kandungan Komponen Bioaktif Dalam Ekstrak Kasar

Ekstrak kasar *Sarcophyton* sp. dianalisis kandungan komponen bioaktif. Hasil analisis mengindikasikan kehadiran komponen polifenol (tannin), alkaloid dan steroid. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3. Analisis Komponen Bioaktif dari Ekstrak Kasar *Sarcophyton* sp.

Komponen Bioaktif	Standar
Flavonoid	- Membentuk warna orange, pink atau merah
Saponin	- Membentuk busa stabil selama 15 menit
Polifenol (Tanin)	+ Membentuk endapan coklat
Alkaloid	+ Membentuk endapan orange (Dragen-dorff)
Steroid	+ Membentuk warna hijau atau biru (Lieber-man-Buchard)
Triterpenoid	- Membentuk cincin kecoklatan sampai coklat kemerahan

+ : Ada; - : Tidak Ada



Analisis kandungan komponen bioaktif dari karang lunak juga telah melaporkan kehadiran alkaloid, polifenol dan triterpenoid (Apri, Zamani, & Effendi, 2013). Penelitian sebelumnya telah melaporkan senyawa bioaktif terpenoid dan steroid dari genus karang lunak *Sarcophyton* dan menunjukkan potensi aktivitas biologis anti-inflamasi (Wei *et al.*, 2013 dan Liang & Guo, 2013).

Komponen bioaktif polifenol (tanin) termasuk organik polimer glikosida dan memiliki sifat antioksidan. Komponen polifenol (tanin) memiliki gugus -OH (hidroksil) pada cincin aromatik. Komponen ini efektif dalam menangkap radikal bebas, dan mendonorkan elektron dan atom hidrogen. Harborne (1998) menyatakan fenol hidrokuinon dan senyawa derivatnya berperan sebagai inhibitor oksidatif yang berikatan dengan radikal bebas dan bereaksi dengan senyawa *Reaktif Oksigen Species* (ROS) dalam membentuk senyawa yang lebih stabil. Dengan demikian, senyawa fenol dapat membantu melindungi dari oksidasi (Agati, Stefano, Biricolti, & Tattini, 2009).

Komponen bioaktif alkaloid bersifat basa dan memiliki satu atau lebih atom nitrogen (N), biasanya dalam gabungan atau sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid umumnya tidak berwarna, berbentuk Kristal, dan hanya sedikit dalam bentuk cairan (Harborne, 1998). Atom N pada struktur alkaloid dapat berpotensi sebagai antioksidan, karena dapat mengikat molekul radikal bebas (Neganova, Afanas'Eva, Klochkov, & Shevtsova, 2012). Ekstrak karang lunak juga memproduksi senyawa alkaloid dan turunannya (Fattorusso *et al.*, 2008). Lendir pada karang lunak mengandung komponen alkaloid yang bermanfaat dalam pertahanan diri, pencegahan infeksi dan persaingan ruang.

Komponen bioaktif steroid merupakan senyawa non polar dan diketahui terdapat dalam hewan dalam jumlah yang terbatas (Harborne, 1998). Komponen steroid berperan sebagai antibakteri. Laporan penelitian menunjukkan komponen steroid tidak larut dalam senyawa non polar saja, tetapi juga dalam pelarut polar.



Hal ini diperkirakan karena momen dipol senyawa polar yang menginduksi molekul non-polar yang tidak memiliki dipol melalui gaya elektrostatik. Gaya ini dapat membuat senyawa non-polar setidaknya larut sebagian dalam pelarut polar (Firdayani *et al.*, 2015).

Komponen triterpenoid memiliki struktur siklik yang relatif kompleks, terdiri atas alkohol, aldehid atau asam karboksilat. Senyawa ini umumnya berbentuk kristalin dan mempunyai titik lebur tinggi. Karang lunak diketahui memproduksi konstituen terpenoid seperti sesquiterpen dan diterpen (Chen, Li, & Guo, 2012).

Struktur terpenoid pada karang lunak memiliki gugus hidroksil dan karbonil yang dapat berikatan dengan atom radikal bebas, sehingga membentuk senyawa yang stabil (Kamel & Slattery, 2005).

#### 5.4 Aktivitas Inhibitori Pelepasan *Nitric Oxide* (NO)

*Nitric oxide* (NO) merupakan mediator dari proses fisiologis respon inflamasi. Fungsi NO terkait dengan persinyalan sel dan vasodilatasi, melindungi organ dari kerusakan iskemik (Balboa, Conde, Moure, Falqué, & Dominguez, 2013). NO disintesis oleh enzim NO-synthase (NOS) (Moncada, Palmer, & Higgs, 1991), yang dibagi menjadi dua bentuk, yaitu isoform konstitutif (NOS endothelial dan NOS neuronal) dan isoform yang dapat diinduksi (iNOS). iNOS distimulasi oleh LPS dan sitokin. Peningkatan konsentrasi NO oleh iNOS terlibat langsung dalam pathogenesis respon inflamasi (Iannaro, O'Donnell, Di Rosa, & Liew, 1994).

Ekstrak kasar karang lunak *Sarcophyton* sp. dilakukan skrining sebagai agen anti-inflamasi, dengan melihat aktivitas inhibitori pelepasan NO. Aktivitas inhibitori pelepasan NO, dievaluasi menggunakan sel makrofag peritoneal mencit yang diinduksi LPS. Hasil pengujian aktivitas inhibitor pelepasan NO dengan ekstrak kasar *Sarcophyton* sp. dapat dilihat pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Efek Inhibitori Ekstrak Kasar *Sarcophyton* sp. Terhadap Konsentrasi NO Yang Diinduksi LPS Pada Sel Makrofag Peritoneal Mencit.

Karang Lunak	Konsentrasi NO ( $\mu\text{M}$ )		
	5 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL
Kontrol tanpa LPS		0.67 $\pm$ 0.18	
Kontrol dengan LPS		9.12 $\pm$ 0.07	
<i>Sarcophyton</i> sp.	0.57 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.25 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.21 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>

Tabel 5.4 menunjukkan ekstrak kasar karang lunak *Sarcophyton* sp. memiliki kemampuan sebagai inhibitor pelepasan NO. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi mempengaruhi konsentrasi NO. Data dan hasil analisis statistik ekstrak kasar disajikan pada Lampiran 4.

Selanjutnya, ekstrak kasar *Sarcophyton* sp. (SCC), dipartisi dengan tiga pelarut sesuai polaritas. Skrining dilakukan dengan melihat aktivitas inhibitor pelepasan NO, untuk memilih fraksi terbaik dari *Sarcophyton* sp. Hasil pengujian aktivitas inhibitor NO dengan fraksi hasil partisi dapat dilihat pada Tabel 5.5.

Tabel 5.5. Efek Inhibitori Fraksi Hasil Partisi Ekstrak *Sarcophyton* sp. (SCC) Terhadap Konsentrasi NO Yang Diinduksi LPS Pada Sel Makrofag Peritoneal Mencit.

Fraksi Hasil Partisi	Konsentrasi NO ( $\mu\text{M}$ )		
	5 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL
Kontrol tanpa LPS		6.00 $\pm$ 0.92	
Kontrol dengan LPS		163.38 $\pm$ 3.79	
Fraksi DCM	4.85 $\pm$ 0.17 <sup>a,b</sup>	6.31 $\pm$ 0.21 <sup>a,a</sup>	6.08 $\pm$ 0.01 <sup>a,a</sup>
Fraksi EtOAc	6.48 $\pm$ 0.25 <sup>c,b</sup>	6.46 $\pm$ 0.38 <sup>c,a</sup>	6.62 $\pm$ 0.34 <sup>c,a</sup>
Fraksi BuOH	8.46 $\pm$ 0.17 <sup>b,b</sup>	5.15 $\pm$ 0.21 <sup>b,a</sup>	4.77 $\pm$ 0.21 <sup>b,a</sup>

Tabel 5.5 menunjukkan *Sarcophyton* sp. (SCC) fraksi DCM menunjukkan aktivitas inhibitor pelepasan NO terbaik. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pelarut dan konsentrasi yang berbeda mempengaruhi konsentrasi NO.

Selain itu, hasil analisis juga menunjukkan adanya interaksi antara pelarut dan



konsentrasi fraksi hasil partisi terhadap konsentrasi NO. Data dan hasil analisis statistik fraksi hasil partisi disajikan pada Lampiran 5.

Dari hasil pengujian pada Tabel 5.5 dipilih Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. sebagai fraksi terbaik. Lalu, Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. dipurifikasi lanjut dengan kromatografi kolom Si-60 dengan fase gerak n-heksan:EtOAc untuk memisahkan fraksi berdasarkan ukuran berat molekul dan daya afinitasnya. Hasil purifikasi ini diperoleh 6 fraksi dan dilakukan pengujian sebagai inhibitori pelepasan NO, untuk memilih fraksi terbaik. Hasil pengujian aktivitas inhibitor NO dengan fraksi hasil kromatografi kolom dapat dilihat pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6. Efek Inhibitori Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. Hasil Kromatografi Kolom Terhadap Konsentrasi NO Yang Diinduksi LPS Pada Sel Makroflag Peritoneal Mencit.

Fraksi Hasil Kromatografi Kolom	Konsentrasi NO ( $\mu\text{M}$ )		
	5 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL
Kontrol tanpa LPS		4.87 $\pm$ 0.58	
Kontrol dengan LPS		84.53 $\pm$ 1.15	
Fraksi 1	79.87 $\pm$ 3.06 <sup>d,b</sup>	67.20 $\pm$ 3.46 <sup>d,a</sup>	119.87 $\pm$ 1.15 <sup>d,c</sup>
Fraksi 2	80.53 $\pm$ 7.02 <sup>b,b</sup>	77.87 $\pm$ 2.31 <sup>b,a</sup>	75.87 $\pm$ 1.15 <sup>b,c</sup>
Fraksi 3	75.20 $\pm$ 3.46 <sup>cd,b</sup>	51.87 $\pm$ 2.31 <sup>cd,a</sup>	128.53 $\pm$ 1.15 <sup>cd,c</sup>
Fraksi 4	53.20 $\pm$ 2.00 <sup>a,b</sup>	72.53 $\pm$ 1.15 <sup>a,a</sup>	74.53 $\pm$ 4.62 <sup>a,c</sup>
Fraksi 5	102.53 $\pm$ 2.31 <sup>e,b</sup>	56.53 $\pm$ 6.11 <sup>e,a</sup>	149.20 $\pm$ 6.00 <sup>e,c</sup>
Fraksi 6	75.20 $\pm$ 3.46 <sup>c,b</sup>	83.87 $\pm$ 5.03 <sup>c,a</sup>	91.20 $\pm$ 3.46 <sup>c,c</sup>

Tabel 5.6 menunjukkan fraksi 3 dapat menghambat aktivitas pelepasan NO terbaik, dengan konsentrasi NO 51.87  $\pm$  2.31  $\mu\text{M}$  pada 10 mg/mL. Sedangkan pada 10 mg/mL, fraksi 4 dan 6 meningkatkan konsentrasi NO. Di sisi lain, konsentrasi NO pada kontrol negatif dengan LPS adalah 84.53  $\pm$  1.15  $\mu\text{M}$ . Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa fraksi dan konsentrasi yang berbeda mempengaruhi konsentrasi NO. Selain itu, hasil analisis juga menunjukkan adanya interaksi antara fraksi dan konsentrasi fraksi hasil kromatografi kolom terhadap



konsentrasi NO. Data dan hasil analisis statistik fraksi hasil kromatografi kolom disajikan pada Lampiran 6.

Dari hasil pengujian inhibitori NO menunjukkan adanya fraksi karang lunak pada konsentrasi tertentu, dapat meningkatkan konsentrasi NO. Hal ini mengindikasikan kehadiran substansi yang memiliki sifat sitotoksik dan dapat berperan sebagai aktivator NO. Senyawa dengan sifat sitotoksik dapat merusak sel dan dapat meningkatkan konsentrasi NO sebagai respon imun dalam perannya untuk membunuh sel tumor atau kanker. Pada respon inflamasi dengan menghambat level NO, juga dapat menghambat ekspresi iNOS (Wanzola *et al.*, 2010).

Produksi NO yang berlebih oleh iNOS terdeteksi pada beberapa penyakit inflamasi (Hämäläinen, 2008). NO dianggap sebagai mediator pro-inflamasi yang menginduksi inflamasi karena produksi berlebihan pada kondisi abnormal (Sharma, Al-Omran, & Parvathy, 2007). Derivat NO-endotelial menginduksi relaksasi vaskular (vasodilatasi) dan agregasi platelet dan inhibitor *cell molecules adhesion* (Bhardwaj, Huang, Kaur, & Knaus, 2012).

Beberapa hasil penelitian melaporkan pentingnya agen anti-inflamasi yang dapat meregulasi NO, sebagai agen kardioprotektif dan hipotensi (Bhardwaj, Batchu, *et al.*, 2012 dan El-Gamal *et al.*, 2016). Pada patogenitas inflamasi, iNOS menghasilkan NO sebagai mediator inflamasi, menyebabkan vasodilatasi dan endema di lokasi inflamasi (Yun, Dawson, & Dawson, 1996). Dengan demikian, dengan menghambat produksi NO, juga menghambat ekspresi enzim iNOS dan *cell molecules adhesion*. Oleh karena itu, salah satu *pathway* penemuan agen anti-inflamasi dengan meregulasi penghambatan level NO yang diproduksi oleh iNOS (Wallace, 2005; Hämäläinen, Liija, Kankaanranta, & Moilanen, 2008; dan Momi *et al.*, 2012).



Dari Tabel 5.5 dan 5.6 menunjukkan bahwa dengan dipurifikasi, efektivitas fraksi karang lunak sebagai inhibitori pelepasan NO semakin melemah. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa bioaktif pada ekstrak/fraksi karang lunak yang digunakan pada penelitian ini, bersifat sinergistik dan saling berinteraksi. Merzenich, Panek, Zeitler, Vetter, & Wagner (2010) menyatakan bahwa senyawa-senyawa dalam suatu produk alami dapat bekerja dalam sinergistik dan saling berinteraksi untuk memberikan suatu efek biologis. Senyawa bioaktif dalam suatu produk alami bekerja melalui mode sinergis multi-senyawa dan multi-target (Long, Yang, Xu, Hao, & Li, 2015).

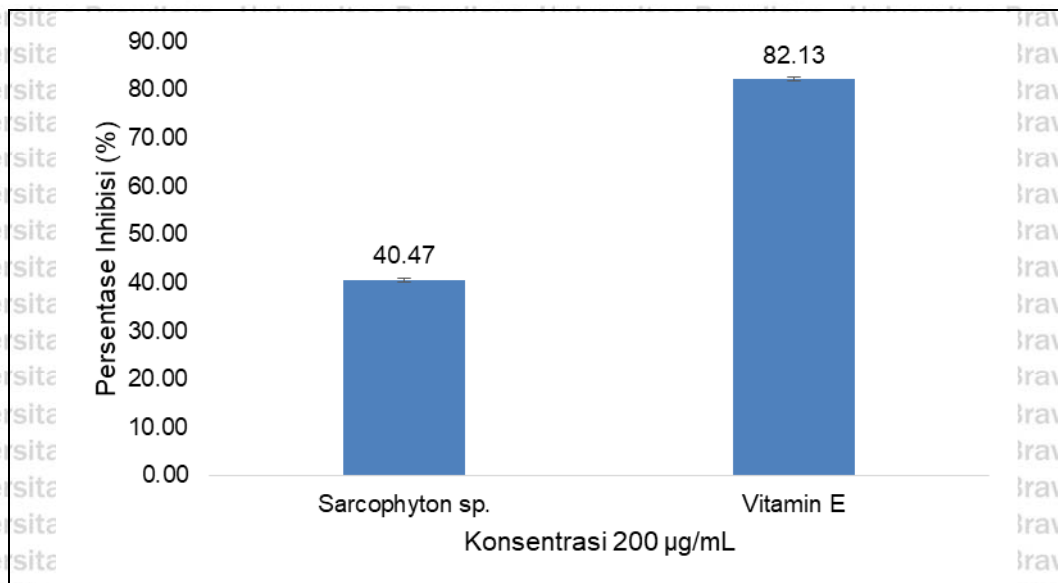
### 5.5 Aktivitas Penghambatan Radikal DPPH

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil dan dapat menerima elektron atau radikal hidrogen untuk membentuk molekul diamagnetik yang stabil. Pada penelitian ini juga mengevaluasi aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH yang dapat berfungsi sebagai antioksidan dari ekstrak kasar *Sarcophyton* sp.

Pengujian dilakukan dengan mengukur tingkat intensitas cahaya ungu DPPH, yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi DPPH. Pengurangan ini disebabkan oleh reaksi molekul *Diphenyl-2-picryl hydro* dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh komponen molekul ekstrak/fraksi karang lunak. Reaksi ini membentuk senyawa *diphenyl picryl hydrazine* dan menyebabkan DPPH berubah warna dari ungu menjadi kuning (Huliselan, Runtuwene, & Wewengkang, 2015).

Aktivitas antioksidan menunjukkan kemampuan bioaktif untuk menghambat reaksi oksidasi, yang dinyatakan sebagai persentase penghambatan. Hasil dari aktivitas inhibisi radikal bebas DPPH dari ekstrak kasar *Sarcophyton* sp. disajikan pada

Gambar 5.1.



Gambar 5.1. Persentase Inhibisi Radikal DPPH dari Ekstrak Kasar *Sarcophyton* sp. dan Vitamin E pada Konsentrasi 200 µg/mL.

Gambar 5.1 menunjukkan bahwa ekstrak kasar *Sarcophyton* sp. dapat menyumbangkan atom hidrogen/elektron untuk bereaksi dengan radikal DPPH. Ekstrak kasar *Sarcophyton* sp. dapat menghambat radikal DPPH  $40.47 \pm 0.39$  µg/mL, sedangkan Vitamin E dapat menghambat radikal DPPH  $82.13 \pm 0.39$  µg/mL. Hasil penelitian ini memberikan informasi tentang reaktivitas ekstrak kasar *Sarcophyton* sp. dalam menangkap radikal bebas yang stabil.

Ekstrak kasar *Sarcophyton* sp. menunjukkan aktivitas inhibisi radikal DPPH yang lemah. Hal ini diduga bahwa senyawa bioaktif yang terkandung pada sampel belum tertarik semuanya selama proses ekstraksi menggunakan pelarut diklorometana:metanol. Sampel karang lunak yang digunakan dalam proses ekstraksi berupa sampel basah yang masih mengandung kadar air dan garam.

Air merupakan pelarut yang lebih polar dibandingkan dengan metanol.

Senyawa antioksidan paling banyak aktif dan bereaksi pada pelarut yang lebih polar (Dewanto *et al.*, 2018). Konstituen kimia yang berperan dalam aktivitas antioksidan, umumnya senyawa yang mempunyai gugus hidroksil yang tersubstitusi pada posisi orto dan para terhadap gugus  $-CO$  dan  $-OR$  (Riza Marjoni,



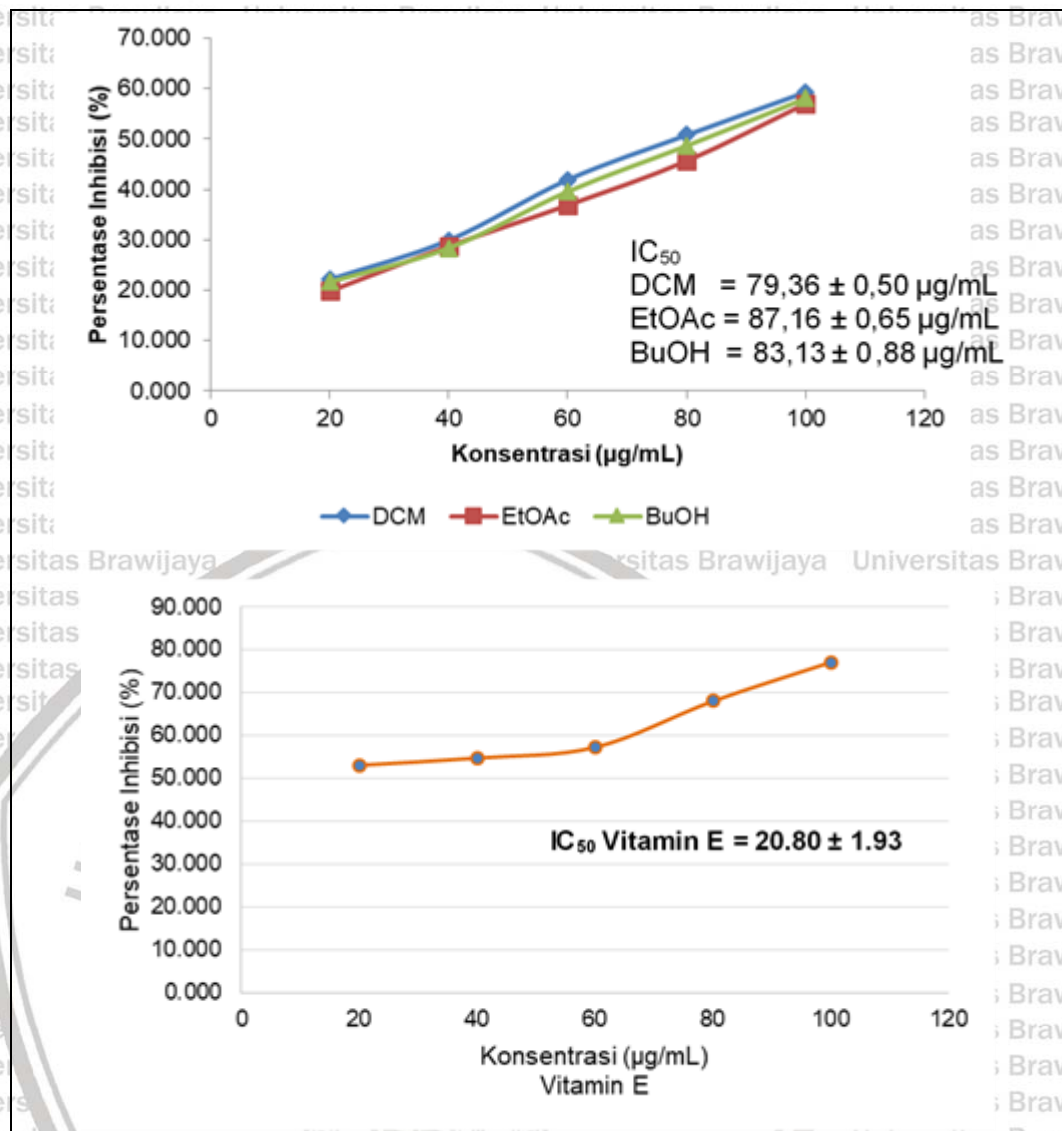
Afrinaldi, & Devi Novita, 2015). Ekstrak karang lunak yang digunakan pada penelitian ini, memiliki kandungan komponen bioaktif polifenol dan triterpenoid yang memiliki gugus hidroksil yang mudah berikatan dengan air. Oleh karena itu, diduga senyawa bioaktif antioksidan masih berikatan dalam fraksi air. Selain itu diduga kandungan garam (NaCl) pada sampel yang larut dalam air, turut mempengaruhi pelekatan gugus -OH dengan membentuk senyawa basa NaOH.

Secara umum, dalam konduktivitas ionik, garam (NaCl) akan hilang dan membentuk senyawa asam dan basa (Artemov, Volkov, Sysoev, & Volkov, 2015).

Selanjutnya, ekstrak kasar *Sarcophyton* sp., dipartisi dengan pelarut berbeda sesuai polaritas. Hasil pengujian aktivitas inhibisi radikal DPPH dengan fraksi karang lunak hasil partisi dapat dilihat pada Gambar 5.2. Fraksi karang lunak hasil partisi juga dilakukan penentuan  $IC_{50}$ , untuk melihat kekuatan antioksidannya berdasarkan kategori Blois. Menurut kategori Blois (1958), ada empat kategori aktivitas antioksidan, yaitu sangat kuat ( $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ), kuat ( $IC_{50}$  antara 50-100  $\mu\text{g/mL}$ ), sedang ( $IC_{50}$  dari 100-150  $\mu\text{g/mL}$ ) dan lemah ( $IC_{50} > 150 \mu\text{g/mL}$ ).

Hasil pengujian menunjukkan kekuatan antioksidan dari fraksi karang lunak hasil partisi termasuk dalam kategori kuat. Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. dengan  $IC_{50} = 79,36 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$ ; Fraksi EtOAc *Sarcophyton* sp.  $87,16 \pm 0,65 \mu\text{g/mL}$ ; dan Fraksi BuOH *Sarcophyton* sp.  $83,13 \pm 0,88 \mu\text{g/mL}$ .

Vitamin E sebagai kontrol komparatif termasuk dalam kelompok hidroksil. Vitamin E merupakan senyawa antioksidan alami yang sering digunakan sebagai senyawa komparatif dalam aktivitas antioksidan uji. Pengujian menunjukkan bahwa vitamin E adalah senyawa antioksidan yang sangat kuat. Dari studi literatur, nilai  $IC_{50}$  vitamin E berkisar antara 8-23  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (Rohman, Riyanto, & Hidayat, 2007; Yassa, Masoomi, Rankouhi, & Hadjiakhoondi, 2009; Da'i & Triharman, 2010; Melannisa, Da'i, & Rahmi, 2011; dan Cheng, Wu, Lin, & Liu, 2013).



Gambar 5.2. Persentase Inhibisi Radikal Bebas DPPH dari Fraksi Karang Lunak Hasil Partisi pada Pelarut Berbeda dan Vitamin E.

Hasil penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa ekstrak karang lunak *Sarcophyton* menunjukkan potensi sebagai antioksidan. Ekstrak etanolik dari *Sarcophyton flexuosum* Tixier-Durivault dari Pulau Kayarathi, Lakshadweep menunjukkan peningkatan penangkapan radikal bebas saat konsentrasi ekstrak meningkat secara bertahap (Byju *et al.*, 2015).

Karang lunak merupakan organisme invertebrata yang hidup di ekosistem terumbu karang, yang memanfaatkan senyawa kimia dalam kehidupannya (Coll,



La Barre, Sammarco, Williams, & Bakus, 1982). Karang lunak merupakan hewan bertubuh lunak dan hidup dengan tekanan lingkungan, seperti persaingan ruang, cahaya, dan sumber lain. Hal ini yang menyebabkan karang lunak memproduksi berbagai senyawa kimia yang memiliki fungsi biologis sebagai mekanisme pertahanan (Fajarningsih, Nursid, Januar, & Wikanta, 2013).

## 5.6 Analisis Senyawa dan Karakterisasi Fraksi Karang Lunak

### 5.6.1 Analisis Probabilitas Senyawa dengan LC-MS

Fraksi 3 karang lunak hasil kromatografi kolom dianalisis dengan LC-MS untuk menganalisis probabilitas senyawa yang terdapat dalam fraksi terbaik berdasarkan NIST/EPA/NIH *Mass Spectral Library*. Fraksi 3 terpilih karena menunjukkan kemampuan penghambatan pelepasan NO (Nitric oxide) terbaik. Hasil analisis probabilitas senyawa fraksi 3 (42 senyawa) disajikan dalam Tabel 5.7 dan Lampiran 7a.

Tabel 5.7. Analisis Probabilitas Senyawa dalam Fraksi 3 hasil kromatografi kolom menggunakan LC-MS.

Peak	Nama Senyawa	Rumus Molekul	RT (min)	Komposisi (%)	Organisme	Referensi	Komponen Bioaktif
1	Clavukerin A	$C_{12}H_{18}$	1,676	0,99	<i>Clavularia koellikeri</i>	(S. K. Kim & Pak, 1991)	Sesquiterpen
2	Clavulazine	$C_8H_{10}N_2O_2$	2,802	1,59	<i>Clavularia viridis</i>	(Watanabe, Iguchi, & Fujimori, 1998)	Steroid
3	Clavukerin C	$C_{12}H_{18}O_2$	5,031	1,74	<i>Clavularia koellikeri</i>	(Motomasa Kobayashi, Son, Kyogoku, & Kitagawa, 1984)	Sesquiterpen
4	Sinularene	$C_{15}H_{24}$	5,482	3,13	<i>Sinularia mayi</i>	(P. Collins & Wege, 1979)	Sesquiterpen
5	(E,E) 2 (2,6 Dimethyl 1,5,7 octatrienyl) 4 methylfuran	$C_{15}H_{20}O$	6,617	1,14	<i>Sinularia capillosa</i>	(Bowden et al., 1983)	Sesquiterpen



6	Coralloidin E	$C_{15}H_{24}O$	6,868	3,63	<i>Alcyonium coralloides</i>	(Ambrosio, Guerriero, & Pietra, 1989)	Sesquiterpen
7	(E,E) 5 (2,6 Dimethyl 1,5,7 octatrienyl) 3 furancarboxylic acid	$C_{15}H_{18}O_3$	7,331	1,38	<i>Sinularia capillosa</i>	(Bowden et al., 1983)	Sesquiterpen
8	Coralloidin B	$C_{17}H_{26}O_2$	8,857	3,26	<i>Alcyonium coralloides</i>	(Guerriero, Dematté, D'Ambrosio, & Pietra, 1986)	Sesquiterpen
9	Coralloidin A	$C_{17}H_{26}O_2$	8,859	4,61	<i>Alcyonium coralloides</i>	(Guerriero et al., 1986)	Sesquiterpen
10	Coralloidin C	$C_{17}H_{26}O_2$	8,861	2,64	<i>Alcyonium coralloides</i>	(Ambrosio, Guerriero, & Pietra, 1987)	Sesquiterpen
11	3,7,11,15 Cembratetraen 13 one	$C_{20}H_{30}O$	10,261	4,78	Unidentified soft coral		Diterpen
12	1,3,7,12(20) Cembratetraen 11 ol	$C_{20}H_{32}O$	10,354	5,02	<i>Alcyonium utinomii.</i>	(Kinamoni, Groweiss, Carmely, Kashman, & Loya, 1983)	Diterpen
13	1,4,8,13 Cembratetraen 12 ol	$C_{20}H_{32}O$	10,358	3,44	-	(Blunt & Munro, 2008b)	Diterpen
14	1(15),3,7,11 Cembratetraen 16,2 olide	$C_{20}H_{28}O_2$	11,026	3,09	-	(Blunt & Munro, 2008b)	Diterpen
15	3,7,11,15(17) Cembratetraen 16,14 olide	$C_{20}H_{28}O_2$	11,034	5,19	<i>Sinularia gibberosa</i>	(Li et al., 2005)	Diterpen
16	3,4 Epoxy 7,11,15 cembratrien 14 one	$C_{20}H_{30}O_2$	11,402	4,76	Unidentified soft coral	(Ravi & Faulkner, 1978)	Diterpen
17	Microclavatin	$C_{20}H_{28}O_3$	11,527	2,56	<i>Sinularia microclavata</i>	(C. X. Zhang et al., 2005)	Diterpen
18	Coralloidin D	$C_{19}H_{28}O_4$	11,535	4,07	<i>Alcyonium coralloides</i>	(Ambrosio et al., 1987)	Sesquiterpen
19	Cembranolide B	$C_{20}H_{26}O_4$	12,040	2,66	<i>Lobophytum</i> sp. dan <i>Sinularia mayi</i>	(Blunt & Munro, 2008a)	Diterpen
20	Lobophytol	$C_{20}H_{28}O_4$	12,071	0,73	<i>Lobophytum pauciflorum</i>	(Iguchi et al., 1991)	Steroid
21	Mayolide A	$C_{20}H_{30}O_4$	12,091	1,14	<i>Sinularia mayi</i>	(Masaru Kobayashi &)	Terpenoid



						Hamaguchi, 1988)	
22	Sinularolide B	$C_{20}H_{28}O_5$	12,337	1,59	<i>Sinularia gibberosa</i> dan <i>Lobophytum crassum</i>	(Li <i>et al.</i> , 2005) dan (W. Zhang <i>et al.</i> , 2008)	Diterpen
23	(5Z,9E,11E,14E) Ethyl 8 hydroxy 13 oxoicosa-5,9,11,14 tetraenoate	$C_{22}H_{34}O_4$	12,675	1,26	<i>Lithothamnion corallioides</i> dan <i>Lithothamnion calcareum</i>	(Guerriero, Amhrosio, Pietra, Chimica, & Trento, 1990)	Steroid
24	Sinulaflexiolide B	$C_{20}H_{32}O_6$	12,718	1,59	<i>Sinularia flexibilis</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2008)	Diterpen
25	Sinulaflexiolide D	$C_{20}H_{32}O_6$	12,721	1,05	<i>Sinularia flexibilis</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2008)	Diterpen
26	Cembranolide A	$C_{22}H_{30}O_5$	12,893	2,21	<i>Lobophytum pauciflorum</i> , <i>Sinularia mayi</i> dan <i>Lobophytum chavalieri</i>	(Blunt & Munro, 2008a)	Diterpen
27	Chlorovulone II	$C_{21}H_{29}ClO_4$	12,972	0,81	<i>Clavularia viridis</i>	(S.-K. Kim, 2015) (Wen <i>et al.</i> , 2008)	Diterpen
28	5,8 Epoxy 9 acetoxysinulariolide	$C_{22}H_{32}O_6$	13,068	0,99	<i>Sinularia flexibilis</i>	(Mori, Suzuki, Iguchi, & Yamada, 1983)	Steroid
29	24 Methylene cholesterol	$C_{28}H_{46}O$	13,226	1,16	<i>Sinularia dura</i> dan <i>Apis mellifica</i>	(Chill <i>et al.</i> , 2005) (Barbier, Reichstein, Schindler, & Lederer, 1959)	Steroid
30	Australin A	$C_{22}H_{36}O_6$	13,232	1,59	<i>Caldiella australis</i>	(Ahmed, Wu, Wang, Wu, & Sheu, 2005)	Steroid
31	Sinulodurin A	$C_{24}H_{34}O_5$	14,414	1,15	<i>Sinularia dura</i>	(Radwan <i>et al.</i> , 2008)	Steroid
32	Australin D	$C_{24}H_{38}O_6$	17,496	3,09	<i>Caldiella australis</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 2005)	Steroid
33	Bromovulone II	$C_{21}H_{29}BrO_4$	17,581	1,06	<i>Clavularia viridis</i>	(Shen <i>et al.</i> , 2004)	Diterpen
34	Sinulaflexiolide C	$C_{22}H_{34}O_8$	17,902	0,73	<i>Sinularia flexibilis</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2008)	Diterpen
35	Clavulone I	$C_{25}H_{34}O_7$	22,170	3,85	<i>Clavularia viridis</i>	(Albizati <i>et al.</i> , 1992) dan (Shen <i>et al.</i> , 2004)	Diterpen



36	Epoxycladine A	$C_{24}H_{38}O_8$	23,300	2,74	<i>Cladiella kashmani</i>	(Chill <i>et al.</i> , 2005)	Diterpen
37	Ergostane 3,5,6,22,24 pentol	$C_{28}H_{50}O_5$	24,128	2,73	-	-	Steroid
38	Australin B	$C_{26}H_{42}O_7$	24,130	2,21	<i>Caldiella australis</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 2005)	Steroid
39	Australin C	$C_{26}H_{42}O_7$	24,135	1,97	<i>Caldiella australis</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 2005)	Steroid
40	Pachyclavulide A	$C_{26}H_{38}O_{10}$	28,196	1,06	<i>Pachyclavularia violacea</i>	(Iwasaki, Ito, Aoyagi, Sato, & Iguchi, 2006)	Diterpen
41	Sinulaflexiolide A	$C_{40}H_{62}O_9$	46,208	2,39	<i>Sinularia flexibilis</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2008)	Diterpen
42	Firmacoside B	$C_{39}H_{72}O_{14}$	46,906	3,05	<i>Sinularia firma</i>	(R. Kumar & Lakshmi, 2006)	Steroid

Dari Tabel 5.7 menunjukkan variasi senyawa yang terdapat dalam fraksi 3, berdasarkan retention time yang diolah dengan software NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Dari fraksi 3 terdapat 10 senyawa sesquiterpenoid (26.59%), 19 senyawa diterpen (50.58%), 1 senyawa terpenoid (1.14%) dan 12 senyawa steroid (21.52%). Studi literatur menunjukkan senyawa-senyawa yang terdeteksi dari hasil analisis LC-MS sebelumnya telah dilaporkan juga telah diisolasi dari karang lunak.

Dari Tabel 5.4 juga menunjukkan bahwa dari karang lunak jenis yang berbeda juga dapat memproduksi senyawa yang sama.

Dari studi literatur dilaporkan beberapa senyawa memiliki aktivitas biologis.

Senyawa Sinulaflexiolide B dan Chlorovulone II sebagai antikanker. Senyawa 3,7,11,15(17)-Cembratetraen-16,14-olide; Microclavatin; dan Sinularolide B memiliki aktivitas sebagai anti-tumor dan sitotoksik. Senyawa Sinulodurin A dilaporkan memiliki aktivitas anti-proliferative and anti-invasive yang diujikan dengan berbagai galur sel kanker dan tumor.

Senyawa yang bervariasi dari analisis probabilitas senyawa dengan LC-MS membuktikan bahwa karang lunak merupakan sumber dari senyawa dengan struktur yang unik khususnya senyawa diterpen, sesquiterpen dan steroid (Blunt

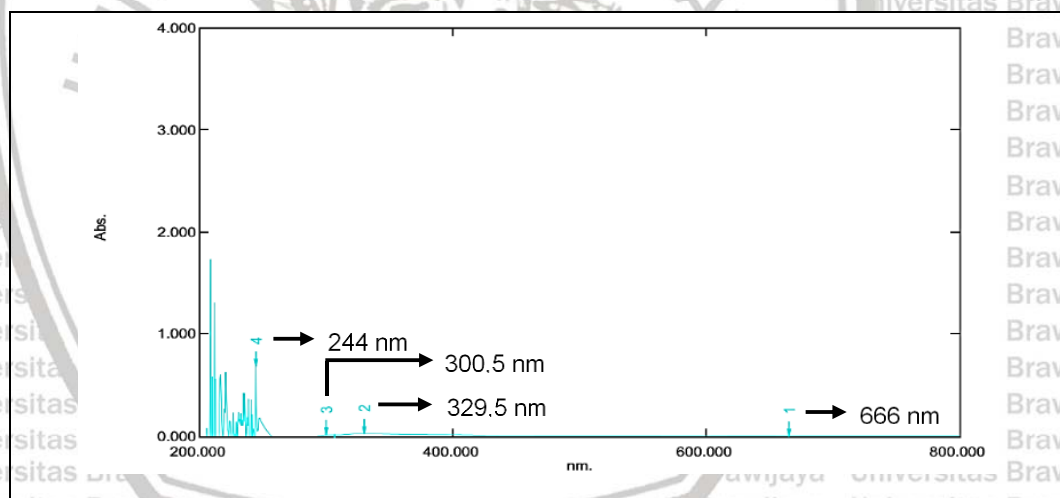


*et al.*, 2013 dan L. C. Hu *et al.*, 2013). Senyawa unik yang diproduksi karang lunak memiliki variasi potensi aktivitas biologis (Nagappan & Palaniveloo, 2018).

### 5.6.2 Karakterisasi Fraksi dengan Spektrofotometer UV-Visible

Spektroskopi UV-VIS menawarkan teknik sederhana untuk mengidentifikasi fitokimia utama, membedakan antara molekul lipofilik dan hidrofilik sehubungan dengan polaritasnya (Ibrahim, Hameed, & Jalbout, 2008).

Spektra UV-Visible dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa yang mengandung ikatan Sigma ( $\sigma$ ), Ikatan pi ( $\pi$ ) dan pasangan elektron bebas, kromofor, dan cincin aromatik (Bashyam, Thekkumalai, & Sivanandham, 2015). Profil spektra fraksi 3 menunjukkan puncak pada panjang gelombang 244, 300.5, 329.5, dan 666 nm dengan absorpsi 0.687, 0.014, 0.028, dan 0.006 (Gambar 5.3).



Gambar 5.3. Spektrum UV-Vis Fraksi 3 Hasil Kromatografi Kolom

Hasil karakterisasi spektra UV mengungkapkan bahwa pita absorpsi disebabkan oleh adanya steroid dan terpenoid serta turunannya dalam fraksi 3.

Senyawa terpene hidrokarbon terdeteksi pada panjang gelombang 222 – 232 nm (Walker & Hawkins, 1952 dan Jiang, Kempinski, & Chappell, 2016). Bailey, Medwick, & Dong (2006) juga mendeteksi senyawa turunan terpenoid pada

panjang gelombang 280 dan 545 nm. Senyawa turunan steroid terdeteksi pada panjang gelombang 280-296 nm (Görög & Chafetz, 1980). Senyawa turunan steroid dari berbagai pelarut terdeteksi pada panjang gelombang 230 – 284 nm (Kasal, Budesinsky, & Griffiths, 2010). Hasil pembacaan spektrum UV sesuai dengan absorpsi senyawa-senyawa pada 3 hasil kromatografi kolom yang terprediksi dengan LC-MS (Lampiran 7b).

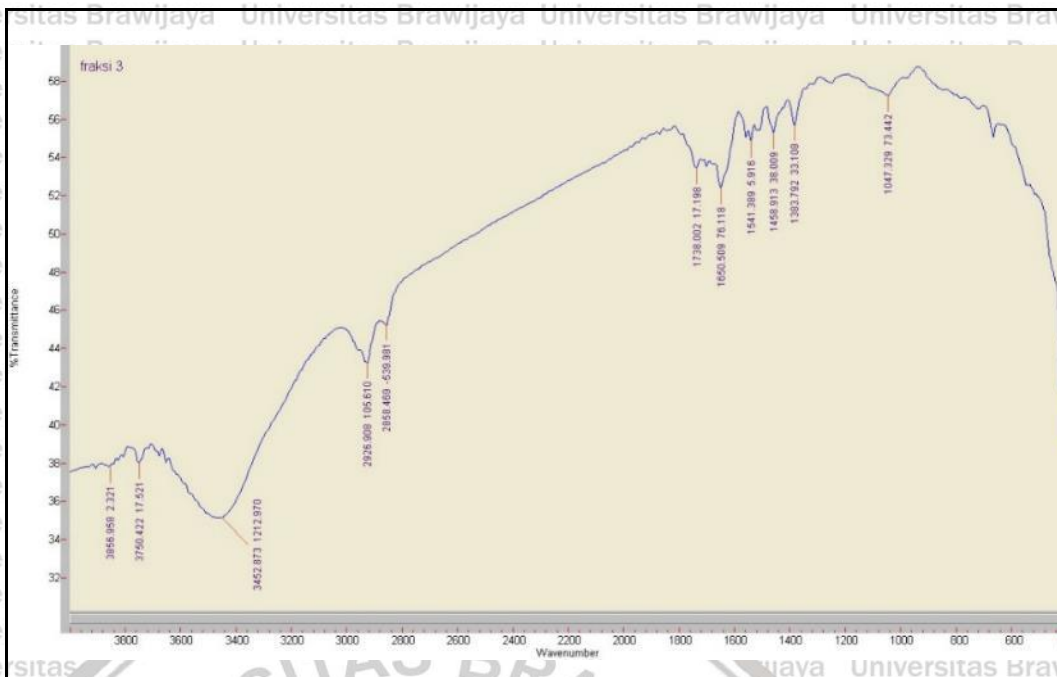
### 5.6.3 Karakterisasi Fraksi dengan FTIR

*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) merupakan teknik analisis resolusi tinggi untuk mengidentifikasi unsur kimia dan menjelaskan senyawa structural (J. K. Kumar & Prasad, 2011). FTIR menawarkan penyelidikan cepat dan tidak merusak ekstrak (Hashimoto & Kameoka, 2008). Spektrum FTIR mengidentifikasi kelompok fungsional komponen kimia aktif yang ada dalam ekstrak berdasarkan nilai puncak di wilayah radiasi infra merah. Ketika ekstrak dianalisis ke FTIR, kelompok fungsional komponen dipisahkan berdasarkan rasionya (Bashyam *et al.*, 2015).

Nilai-nilai puncak dan gugus fungsional dapat dilihat dalam Gambar 5.4. Analisis FTIR berdasarkan (Socrates, 2001). Hasil pembacaan frekuensi FTIR sesuai dengan analisis probabilitas senyawa dengan LC-MS pada fraksi 3 hasil kromatografi kolom (Lampiran 7b).

Spektrum IR mengkonfirmasi keberadaan alkana, alkena, keton, aromatik, asam karboksilat, ester, eter, amina alifatik, senyawa halogen, dan senyawa aromatik tersubstitusi (Tabel 5.8). Hasil penelitian Soliman, Brahim, Moustafa, & Hamed (2017) juga mengkonfirmasi keberadaan alkohol, fenol, amina, alkana, keton, alkena, senyawa aromatik, asam karboksilat, ester dan eter pada ekstrak karang lunak.





Gambar 5.4. Spektrum IR Fraksi 3 Hasil Kromatografi Kolom

Tabel 5.8. Identifikasi Gugus Fungsional Fraksi 3 Melalui Analisis FTIR

Frekuensi (cm <sup>-1</sup> )	Ikatan	Kelompok Gugus Fungsional
3856.95 (kuat, luas)	O–H dan N–H	Alkohol, Fenol dan Amina
3750.42 (kuat, luas)	O–H dan N–H	Alkohol, Fenol dan Amina
3452.87 (kuat, luas)	O–H dan N–H	Alkohol, Fenol dan Amina
2926.90 (moderat, luas)	C–H	Alkana, Methyl, Methylene, Methyne
2858.46 (moderat, luas)	C–H	Alkana, Methyl, Methylene, Methyne
1738 (moderat, sempit)	C=O	Ester, keton, Amida, Asam Karboksilat, dan Asam Anhidrida
1650.50 (moderat, sempit)	C=C, N=O	Alkena, Olefinik, dan Nitrit Organik
1541.38 (moderat, sempit)	C=C	Alkena dan Cincin Aromatik
1458.91 (moderat, sempit)	C–H	Methyl, Methylene, Methyne
1383.79 (moderat, sempit)	C–H	Methyl, Methylene, Methyne
1047.32 (moderat, sempit)	C=C, C–H	Alifatik Tidak Jenuh

Tabel 5.8 menunjukkan kelimpahan gugus –OH dengan struktur aromatik pada fraksi 3. Dari 42 senyawa aktif fraksi 3 terdapat 25 senyawa aktif (48.75%) dengan struktur aromatik dan memiliki gugus –OH. Berdasarkan analisa spektra UV dan FTIR diduga senyawa yang berperan sebagai anti-inflamasi, yaitu

senyawa aromatik dengan gugus –OH. Senyawa aromatik dengan gugus –OH diketahui dapat berperan sebagai anti-inflamasi dan antioksidan.

### 5.7 Analisis *In Silico* dengan Senyawa yang dideteksi dengan LC-MS

Hasil karakterisasi dengan spektrum UV, IR dan analisa LCMS menunjukkan dari 42 senyawa aktif fraksi 3, hanya 25 senyawa aktif yang memiliki struktur aromatik dengan gugus –OH. 25 senyawa aktif ini diduga berperan sebagai anti-inflamasi. 25 senyawa aktif pada fraksi 3 dianalisis dengan SwissADME (Lampiran 8) (Daina, Michielin, & Zoete, 2017), untuk mengetahui kemiripan sebagai obat (*druglikeness*) menurut aturan Lipinski (Lipinski, 2004). Hasil analisis Lipinski dari 25 senyawa aktif yang diduga berperan sebagai anti-inflamasi disajikan dapat dilihat pada Tabel 5.9.

Tabel 5.9. Analisis Senyawa Aktif dengan Lipinski

Puncak	Nama Senyawa	Berat Molekul <500 Dalton (g/mol)	Lipophilicity Tinggi (diekspresikan LogP <4.15)	Ikatan donor hydrogen <5	Ikatan aseptor hydrogen <10	Refraktifitas molar antara 40-130
2	Clavulazine	√ 166.18	√ -1.18	√ 1	√ 4	√ 41.71
3	Clavukerin C	√ 194.27	√ 2.65	√ 1	√ 2	√ 57.32
6	Coralloidin E	√ 220.35	√ 3.56	√ 1	√ 1	√ 69.98
7	(E,E) 5 (2,6 Dimethyl 1,5,7 octatrienyl) 3 furancarboxylic acid	√ 246.30	√ 2.44	√ 1	√ 3	√ 73.27
12	1,3,7,12(20) Cembratetraen 11 ol	√ 288.47	× 4.56	√ 1	√ 1	√ 95.41
13	1,4,8,13 Cembratetraen 12 ol	√ 288.47	× 4.56	√ 1	√ 1	√ 95.44
20	Lobophytol	√ 332.43	√ 2.63	√ 1	√ 4	√ 95.25
21	Mayolide A	√ 334.45	√ 2.63	√ 1	√ 4	√ 97.36
22	Sinularolide B	√ 348.43	√ 1.89	√ 2	√ 5	√ 95.22



	(5Z,9E,11E, 14E)	√	√	√	√	√
23	Ethyl 8 hydroxy 13 oxoicosa-5,9,11,14 tetraenoate	362.50	3.38	3	4	109.59
24	Sinulaflexiolide B	368.46	1.26	3	6	97.41
25	Sinulaflexiolide D	368.46	1.16	4	6	99.09
27	Chlorovulone II	380.91	2.99	1	4	106.53
29	24 Methylene cholesterol	398.66	6.43	1	1	127.95
30	Australin A	396.52	1.70	2	6	106.53
32	Australin D	422.55	2.03	2	6	115.64
33	Bromovulone II	425.36	3.10	1	4	109.61
34	Sinulaflexiolide C	426.50	0.74	3	8	109.54
36	Epoxycladine A	454.55	1.35	2	8	116.20
37	Ergostane 3,5,6,22,24 pentol	466.69	3.19	5	5	133.54
38	Australin B	466.61	2.86	2	7	126.37
39	Australin C	466.61	2.46	2	7	126.33
40	Pachyclavulide A	510.57	1.57	2	10	127.52
41	Sinulaflexiolide A	700.94	3.56	3	9	193.72
42	Firmacoside B	764.98	0.14	6	14	198.01
Kontrol	Dexamethasone	392.46	1.62	3	6	101.96

Tabel 5.9 menunjukkan dari 25 senyawa aktif fraksi 3 hanya 18 senyawa aktif yang memenuhi kaidah *druglikeness* menurut aturan Lipinski. Lalu 18 senyawa aktif, dianalisis dengan PASSonline untuk mengetahui nilai  $P_a$  (*probability to be active*) dan nilai  $P_i$  (*probability to be inactive*) sebagai anti-inflamasi (Tabel 5.10) (Filimonov et al., 2014 dan Druzhilovskiy et al., 2016). Jika nilai  $P_a > 0.7$ , maka 90% senyawa tersebut memiliki aktivitas anti-inflamasi.

Tabel 5.10. Prediksi Aktivitas (Pa) Senyawa Aktif Fraksi 3 Sebagai Anti-inflamasi

Puncak	Nama Senyawa	Pa	Pi
2	Clavulazine	0,281	0.180
3	Clavukerin C	0.288	0.098
6	Coralloidin E	0.715	0.014
7	(E,E) 5 (2,6 Dimethyl 1,5,7 octatrienyl) 3 furancarboxylic acid	0.501	0.057
20	Lobophytol	0.739	0.011
21	Mayolide A	0.401	0.095
22	Sinularolide B	0.841	0.005
23	(5Z,9E,11E, 14E) Ethyl 8 hydroxy 13 oxoicosa-5,9,11,14 tetraenoate	0.858	0.005
24	Sinulaflexiolide B	0.858	0.005
25	Sinulaflexiolide D	0.726	0.013
27	Chlorovulone II	0.260	0.202
30	Australin A	0.864	0.005
32	Australin D	0.765	0.009
33	Bromovulone II	0.438	0.015
34	Sinulaflexiolide C	0.740	0.011
36	Epoxycladine A	0.634	0.025
38	Australin B	0.746	0,011
39	Australin C	0.748	0.010
Kontrol	Dexamethasone	0.986	0.003

Tabel 5.10 menunjukkan dari 18 senyawa aktif, terdapat 11 senyawa aktif yang berpotensi kuat sebagai anti-inflamasi dengan nilai Pa > 0.7. Sedangkan 4 senyawa aktif berpotensi moderat sebagai anti-inflamasi dengan nilai Pa 0.3 – 0.7; dan 3 senyawa aktif lemah sebagai anti-inflamasi dengan nilai Pa < 0.3. Hal ini mengindikasikan senyawa dalam fraksi DCM *Sarcophyton* sp. berpotensi sebagai anti-inflamasi.

Selain dianalisis *druglikeness* mengikuti kaidah Lipinski, 18 senyawa aktif juga dianalisis prediksi LD<sub>50</sub> dengan software Protox II (Banerjee, Eckert, Schrey, & Preissner, 2018). Daya toksisitas dinilai dalam LD<sub>50</sub> dalam satuan mg/kg berat badan. LD<sub>50</sub> merupakan median dosis letal, di mana 50% subjek uji mati setelah



terpapar suatu senyawa. Kelas toksisitas didefinisikan menurut sistem klasifikasi klasifikasi pelabelan bahan kimia (GHS) yang diselaraskan secara global. Nilai  $LD_{50}$  diberikan dalam mg/kg, yaitu Kelas I: fatal jika tertelan ( $LD_{50} \leq 5$ ); Kelas II: fatal jika tertelan ( $5 < LD_{50} \leq 50$ ); Kelas III: beracun jika tertelan ( $50 < LD_{50} \leq 300$ ); Kelas IV: berbahaya jika tertelan ( $300 < LD_{50} \leq 2000$ ); Kelas V: mungkin berbahaya jika tertelan ( $2000 < LD_{50} \leq 5000$ ); dan Kelas VI: tidak beracun ( $LD_{50} > 5000$ ). Tabel 5.11 dan Lampiran 9 prediksi  $LD_{50}$  dari 18 senyawa aktif.

Tabel 5.11. Analisis Prediksi  $LD_{50}$  dari 18 Senyawa Aktif Sebagai Anti-inflamasi

Puncak	Nama Senyawa	Prediksi $LD_{50}$ (mg/kg)	Prediksi Kelas Toksisitas
2	Clavulazine	800	IV
3	Clavukerin C	10	II
6	Coralloidin E	3000	V
7	(E,E) 5 (2,6 Dimethyl 1,5,7 octatrienyl) 3 furancarboxylic acid	860	IV
20	Lobophytol	841	IV
21	Mayolide A	841	IV
22	Sinularolide B	452	IV
23	(5Z,9E,11E, 14E) Ethyl 8 hydroxy 13 oxoicosa-5,9,11,14 tetraenoate	5000	V
24	Sinulaflexiolide B	2550	V
25	Sinulaflexiolide D	2550	V
27	Chlorovulone II	200	III
30	Australin A	4490	V
32	Australin D	2550	V
33	Bromovulone II	1000	IV
34	Sinulaflexiolide C	2550	V
36	Epoxycladine A	33600	VI
38	Australin B	150	III
39	Australin C	39800	VI
Kontrol	Dexamethasone	3000	V

Selanjutnya, 18 senyawa aktif dianalisis *molecular docking* menggunakan PyRx – python prescription 0.8 (autoDock Vina) (Trott & Olson, 2010) dengan protein TLR4, NFkB dan IL-10. TLR 4 merupakan protein reseptor yang mengenal antigen LPS. NFkB merupakan faktor transkripsi utama dalam regulator inflamasi.

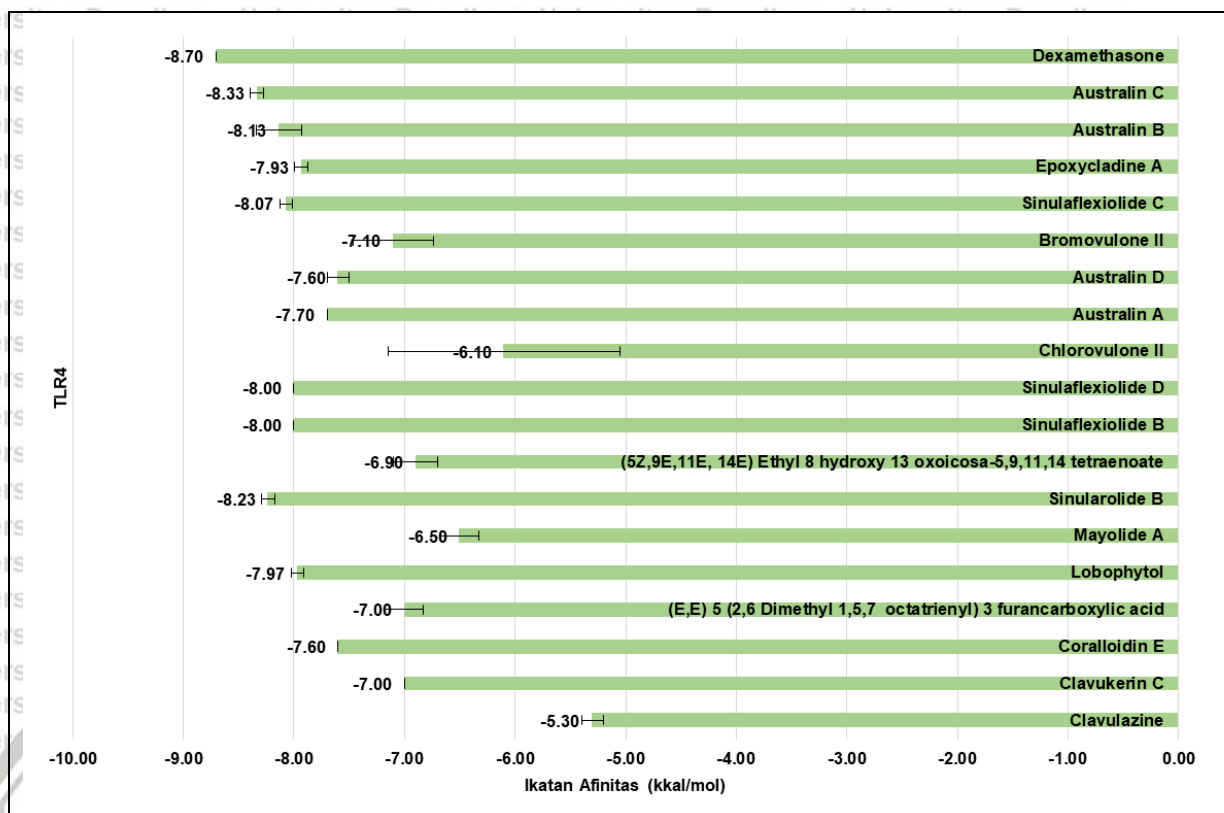
IL-10 merupakan protein sebagai regulator negatif inflamasi, yang berperan sebagai anti-inflamasi.

Visualisasi dengan *Discovery Studio Visualizer* bertujuan untuk mengetahui interaksi ikatan antara ligand (senyawa) dan reseptor (protein target) serta jarak interaksi antara ligand dan reseptor (asam amino). Dalam *drug discovery*, terdapat 3 jenis interaksi ikatan utama antara ligand dan reseptor, yaitu ikatan kovalen, ikatan elektrostatik dan ikatan hidrofobik. Ikatan kovalen merupakan ikatan yang sangat kuat antara ligand dan reseptor dan dalam kondisi biologis tidak reversibel. Ikatan elektrostatik merupakan ikatan yang jauh lebih umum daripada ikatan kovalen dalam interaksi reseptor dan ligand, di antaranya termasuk ikatan hidrogen dan ikatan van der waals. Sedangkan ikatan hidrofobik merupakan ikatan yang cukup lemah, tetapi sangat penting dalam interaksi ligand dan reseptor yang sangat larut lipid (terutama dengan membrane sel yang mengandung lipid), di antaranya ikatan alkil, pi-alkil dan pi-sigma.

### 5.7.1 Aktivitas Senyawa Aktif Fraksi 3 Sebagai Anti-inflamasi Melalui Jalur TLR4

Dari 18 senyawa aktif fraksi 3 yang memenuhi kaidah Lipinski, kemudian dianalisis dengan *PyRx* untuk mengetahui ikatan afinitas (kcal/mol) dengan protein TLR4 sebagai protein yang mengenali dan mengikat LPS. Hasil analisis dengan *software PyRx* (autoDock Vina) dan visualisasi dengan *Discovery Studio Visualizer* dari 18 senyawa aktif fraksi 3 dengan TLR4 dapat dilihat pada Gambar 5.5.



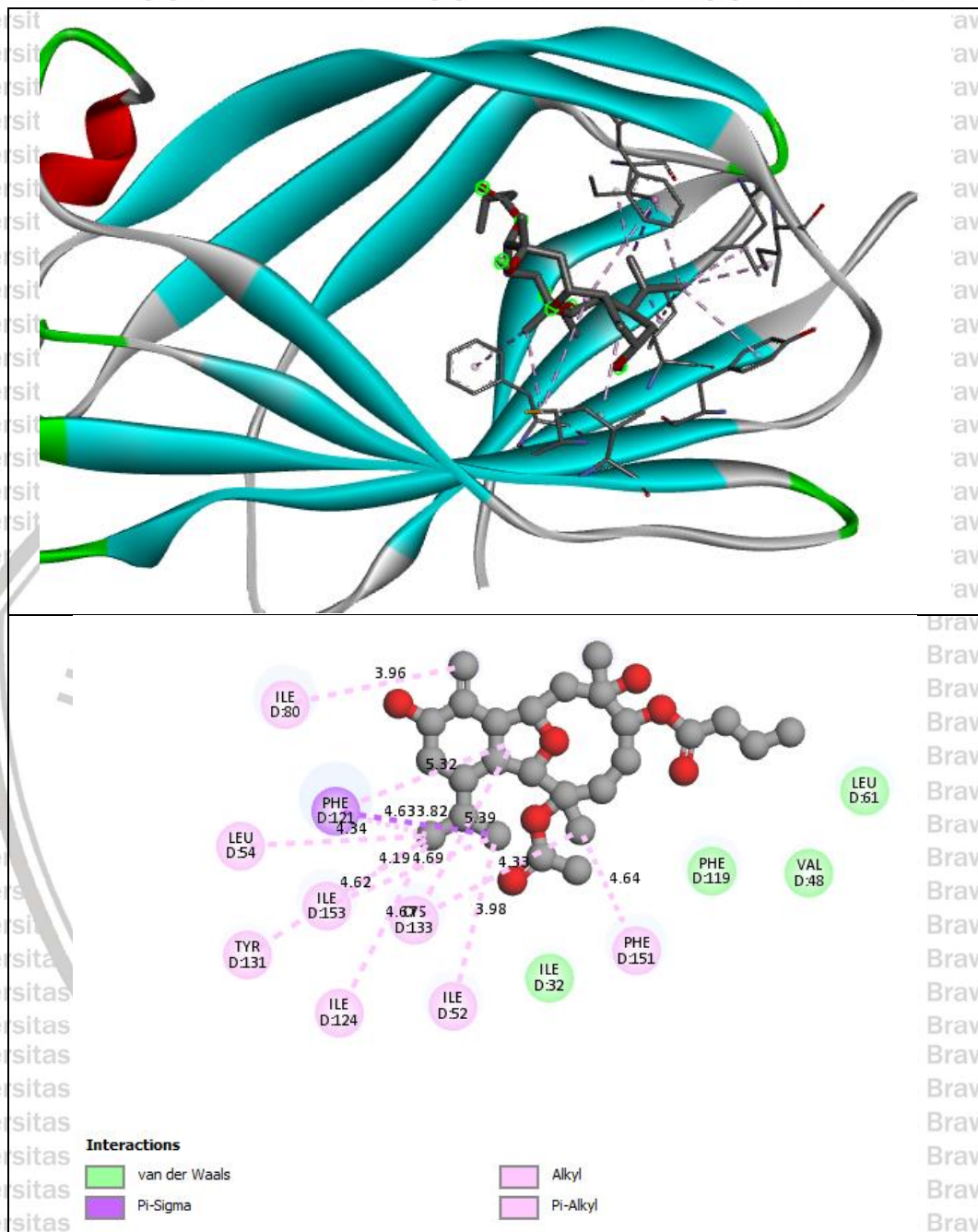


Gambar 5.5. Ikatan Afinitas Senyawa Aktif Fraksi 3 dengan Protein TLR4

Gambar 5.5 menunjukkan senyawa dexamethasone yang merupakan kontrol perbandingan memiliki ikatan afinitas  $-8.70 \pm 0.00$  kkal/mol dengan protein TLR4. Dari 18 senyawa aktif fraksi 3, terdapat 3 senyawa yang ikatan afinitasnya paling rendah dengan protein TLR4 dan mendekati ikatan afinitas dexamethasone, yaitu Australin C ( $-8.33 \pm 0.06$  kkal/mol); Sinularolide B ( $-8.23 \pm 0.06$  kkal/mol); dan Australin B ( $-8.13 \pm 0.21$  kkal/mol). Hasil molecular docking mengindikasikan bahwa senyawa Australin C, Sinularolide B, dan Australin B berpotensi sebagai anti-inflamasi melalui jalur TLR4.

Senyawa Australin C kemudian didocking untuk mengetahui posisi berikatan dengan reseptor TLR4. Pada protein TLR4, senyawa Australin C dapat berikatan melalui Fenilalanin (PHE D:121) dengan jarak  $3.82 \text{ \AA}$  dan interaksi ikatan

hidrofobik pi sigma , dan berikatan dengan isoleusin (ILE D:80) dengan jarak 3.96 Å dan interaksi ikatan hidrofobik pi alkyl seperti pada Gambar 5.6.

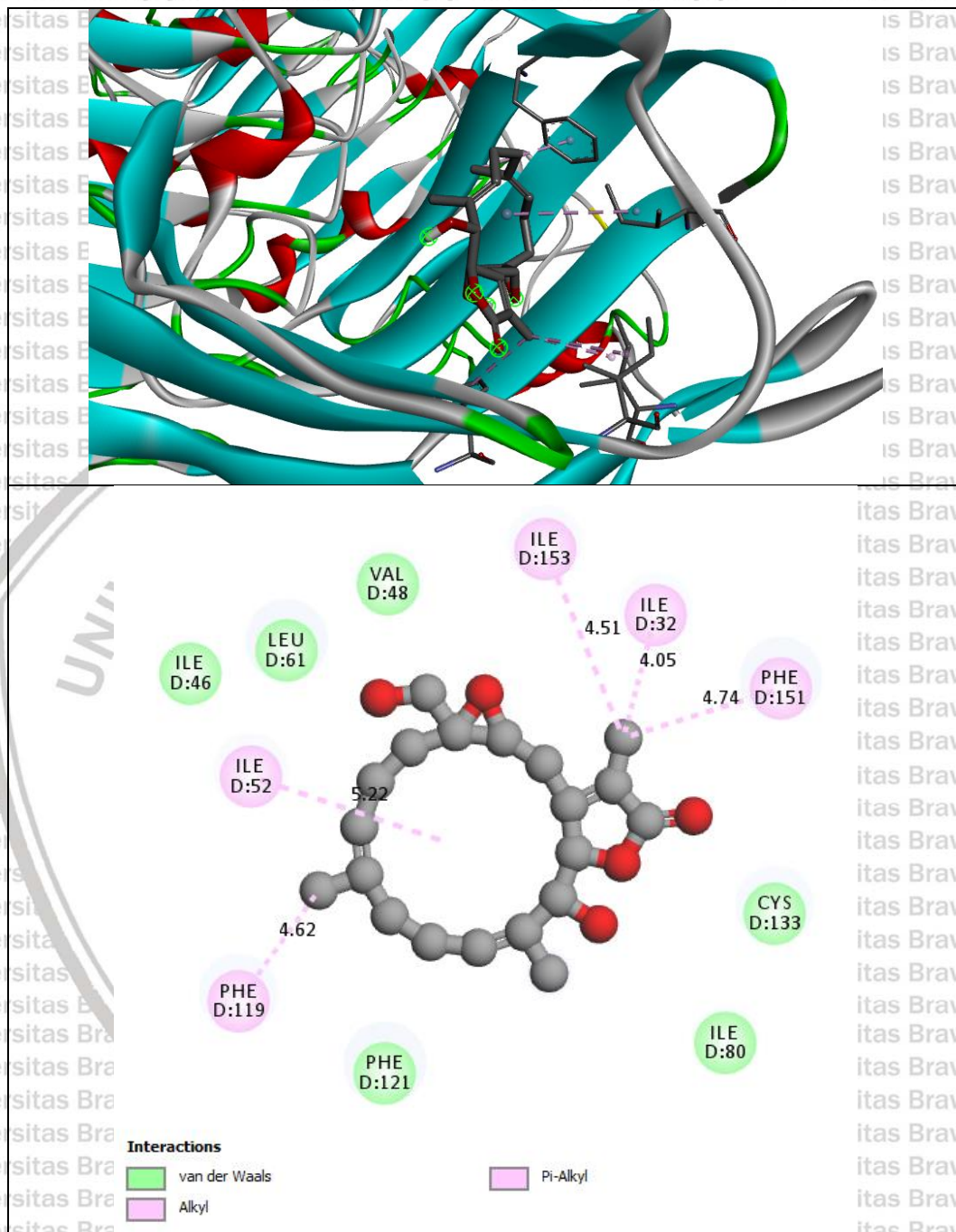


Gambar 5.6. Ikatan senyawa Australin C dan TLR4

Senyawa Sinularolide B kemudian didocking untuk mengetahui posisi berikatan dengan reseptor TLR4. Pada protein TLR4, senyawa Sinularolide B dapat berikatan melalui isoleusin (ILE D:32) dengan jarak 4.05 Å dan interaksi



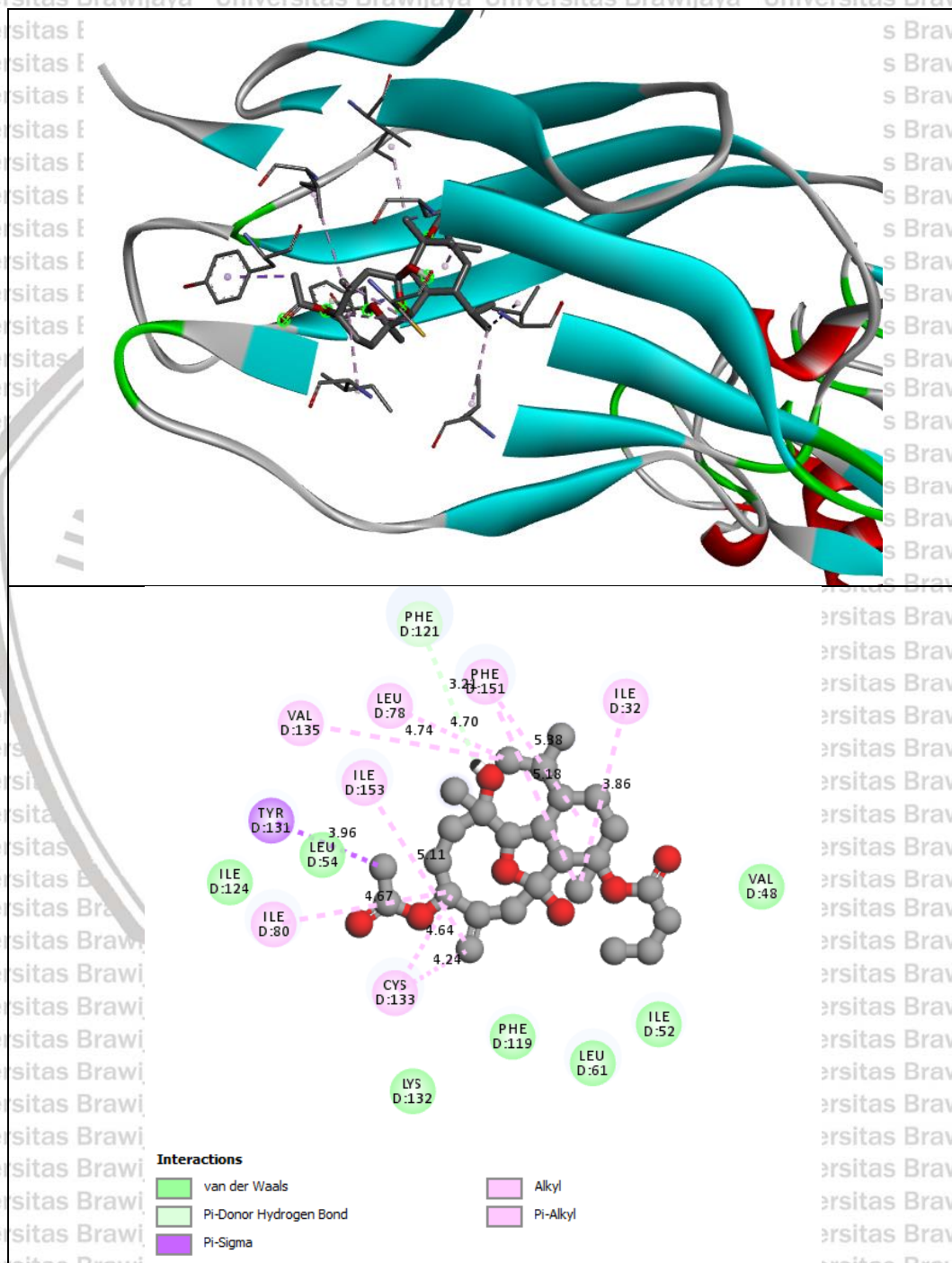
ikatan hidrofobik alkyl, dan berikatan dengan fenilalanin (PHE D:119) dengan jarak 4.62 Å dan interaksi ikatan hidrofobik pi alkyl seperti pada Gambar 5.7.



Gambar 5.7. Ikatan senyawa Sinularolide B dan TLR4

Senyawa Australin B kemudian didocking untuk mengetahui posisi berikatan dengan reseptor TLR4. Pada protein TLR4, senyawa Australin B dapat

berikatan melalui fenilalanin (PHE D:121) dengan jarak 3.21 Å dan interaksi ikatan donor hidrogen, melalui isoleusin (ILE D:32) dengan jarak 3.86 Å dan interaksi ikatan hidrofobik alkyl, dan melalui tirosin (TYR D:131) dengan jarak 3.96 Å dan interaksi ikatan hidrofobik pi alkyl seperti pada Gambar 5.8.



Gambar 5.8. Ikatan senyawa Australin B dan TLR4



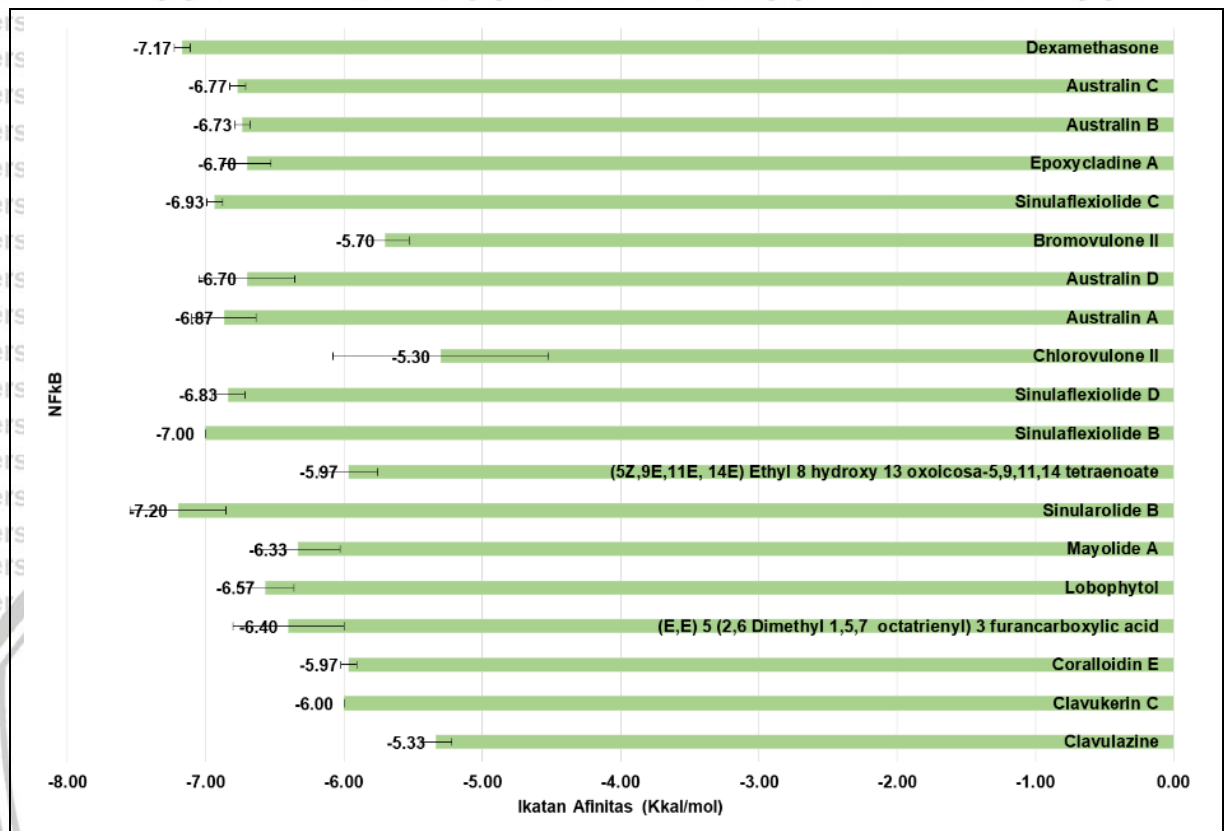
Gambar 5.6; 5.7 dan 5.8 menunjukkan bahwa senyawa Australin C, Sinularolide B dan Australin B dapat berikatan dengan TLR4, sehingga dapat menghambat interaksi TLR4 dengan LPS. TLR4 melalui jalur MYD88, TIRAP dan TRAF6, yang mengarah pada aktivasi NFkB, sekresi sitokin dan respon inflamasi. Dalam kompleks dengan TLR6, TLR4 menyebabkan inflamasi pada monosit/makrofag dalam menanggapi lipoprotein densitas rendah (oxLDL) atau amyloid-beta 42.

Dalam konteks ini, sinyal awal disediakan oleh oxLDL- atau amyloid-beta 42 yang mengikat CD36. Peristiwa ini menginduksi pembentukan heterodimer dari TLR4 dan TLR6, yang secara cepat diinternalisasi dan memicu respon inflamasi, yang mengarah ke produksi NFkB yang bergantung pada sitokin CXCL1, CXCL2 dan CCL9, melalui jalur pensinyalan MYD88, dan jalur sitokin CCL5, melalui jalur pensinyalan TICAM1, serta sekresi IL1B. Mekanisme jalur protein TLR4 dalam proses terjadinya inflamasi dapat dilihat pada Lampiran 10.

### 5.7.2 Aktivitas Senyawa Aktif Fraksi 3 Sebagai Anti-inflamasi Melalui Jalur NFkB

Dari 18 senyawa aktif fraksi 3 yang memenuhi kaidah Lipinski, kemudian dianalisis dengan *PyRx* untuk mengetahui ikatan afinitas (kcal/mol) dengan protein NFkB sebagai faktor transkripsi utama dalam respon inflamasi. Hasil analisis *PyRx* dari 18 senyawa aktif fraksi 3 terhadap NFkB dapat dilihat pada Gambar 5.9. Gambar 5.9 menunjukkan senyawa dexamethasone yang merupakan kontrol perbandingan memiliki ikatan afinitas  $-7.17 \pm 0.06$  kcal/mol dengan protein NFkB. Dari 18 senyawa aktif fraksi 3, terdapat 3 senyawa yang ikatan afinitasnya paling rendah dengan protein NFkB dan mendekati ikatan afinitas dexamethasone, yaitu Sinularolide B ( $-7.20 \pm 0.35$  kcal/mol); Sinulaflexiolide B ( $-7.00 \pm 0.00$  kcal/mol); dan Sinulaflexiolide C ( $-6.93 \pm 0.06$  kcal/mol). Hasil molecular docking

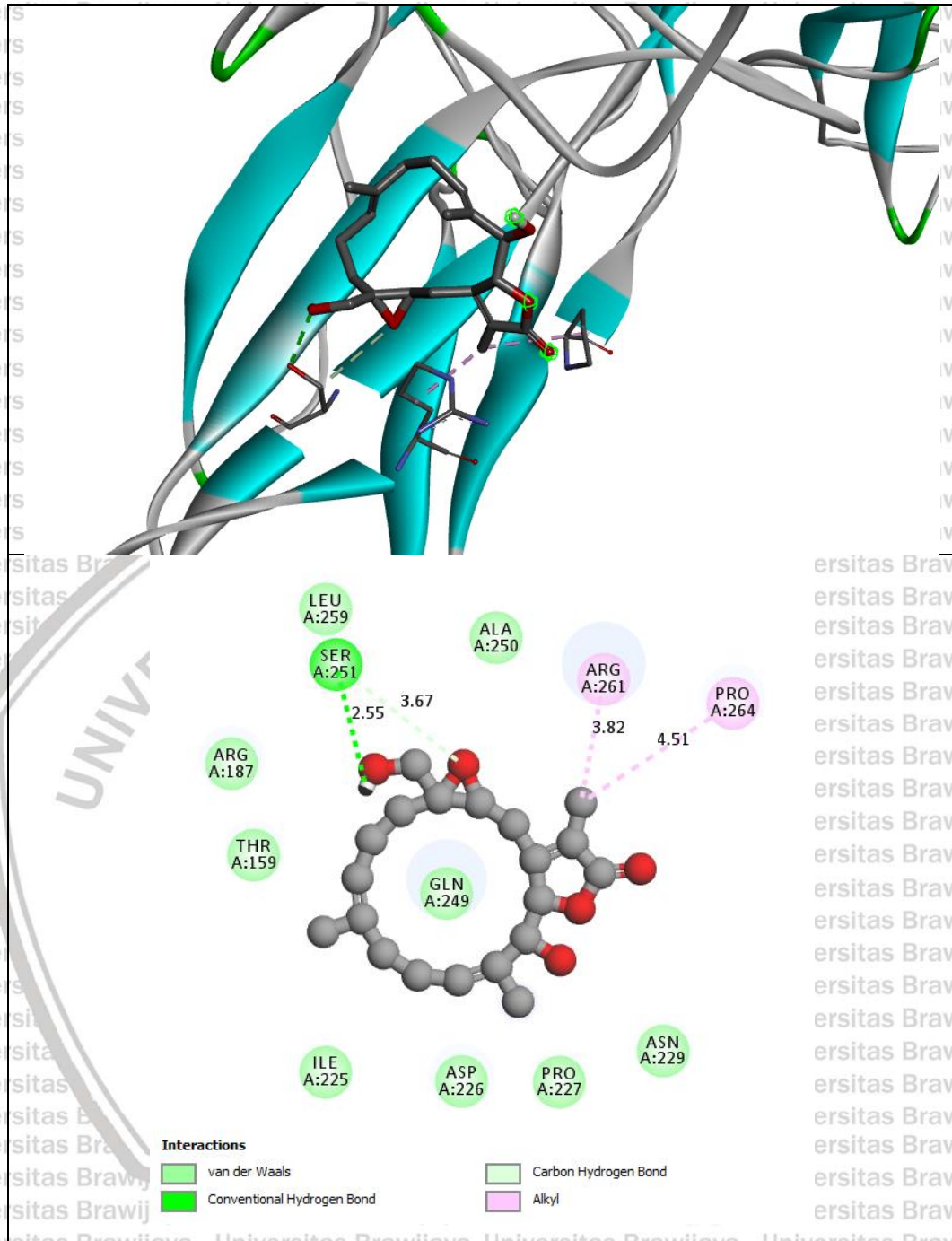
mengindikasikan bahwa senyawa Sinularolide B, Sinulaflexiolide B, dan Sinulaflexiolide C dapat berpotensi sebagai anti-inflamasi melalui jalur NFkB.



Gambar 5.9. Ikatan Afinitas Senyawa Aktif Fraksi 3 dengan Protein NFkB.

Senyawa Sinularolide B, kemudian didocking untuk mengetahui posisi berikatan dengan reseptor NFkB. Pada protein NFkB, senyawa Sinularolide B dapat berikatan melalui serin (SER A:251) dengan jarak 2.55 Å dan interaksi ikatan hydrogen konvensional, dan melalui arginine (ARG A:261) dengan jarak 3.82 Å dan interaksi ikatan alkyl hidrofobik Gambar 5.10.

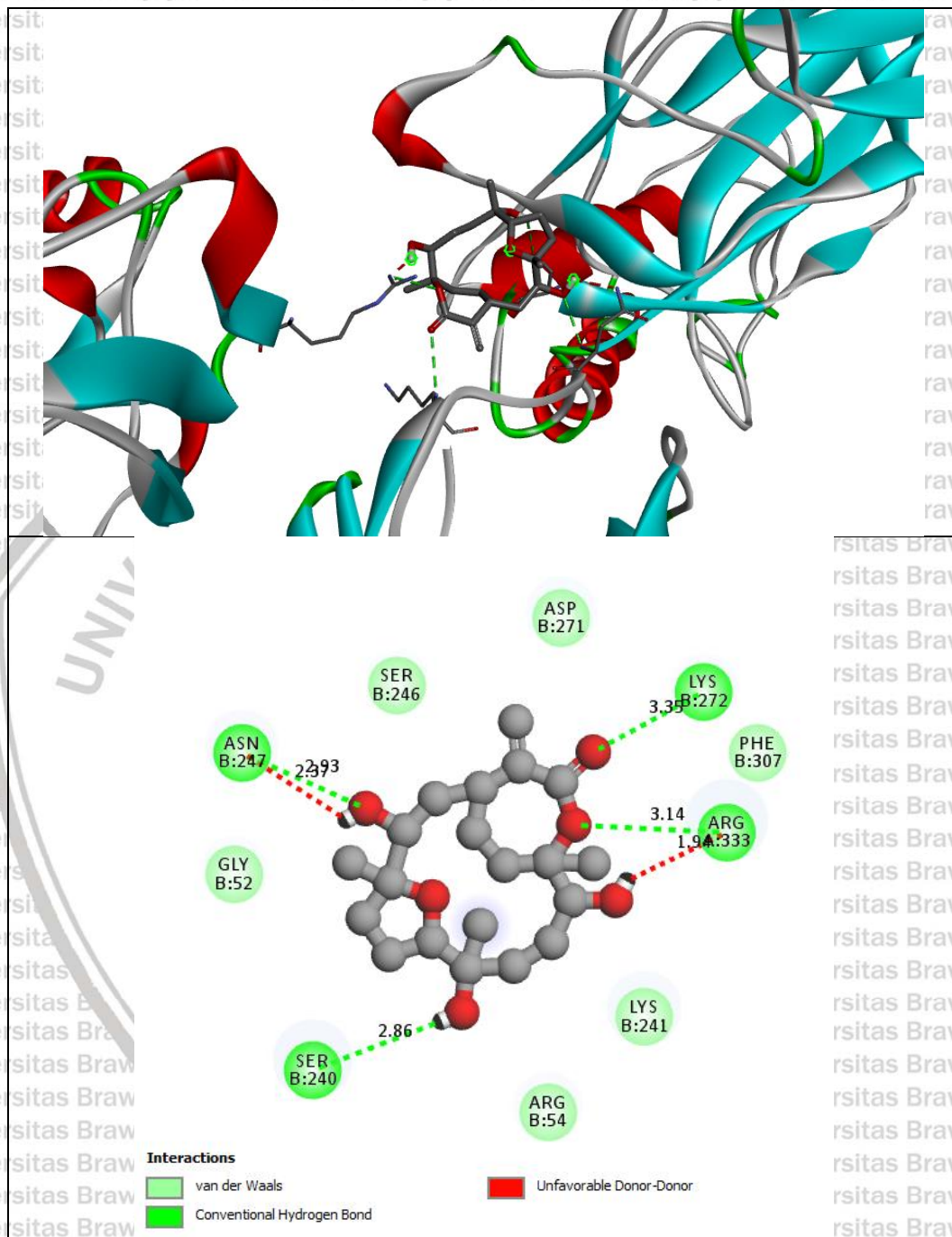




Gambar 5.10. Ikatan senyawa Sinularolide B dan NFKB

Senyawa Sinulaflexiolide B, kemudian didocking untuk mengetahui posisi berikatan dengan reseptor NFKB. Pada protein NFKB, senyawa Sinulaflexiolide B dapat berikatan melalui serin (SER B:240) dengan jarak 2.86 Å dan interaksi ikatan

hydrogen konvensional, dan melalui arginine (ARG A:333) dengan jarak 1.94 Å dan interaksi ikatan unfavorable donor (Gambar 5.11).

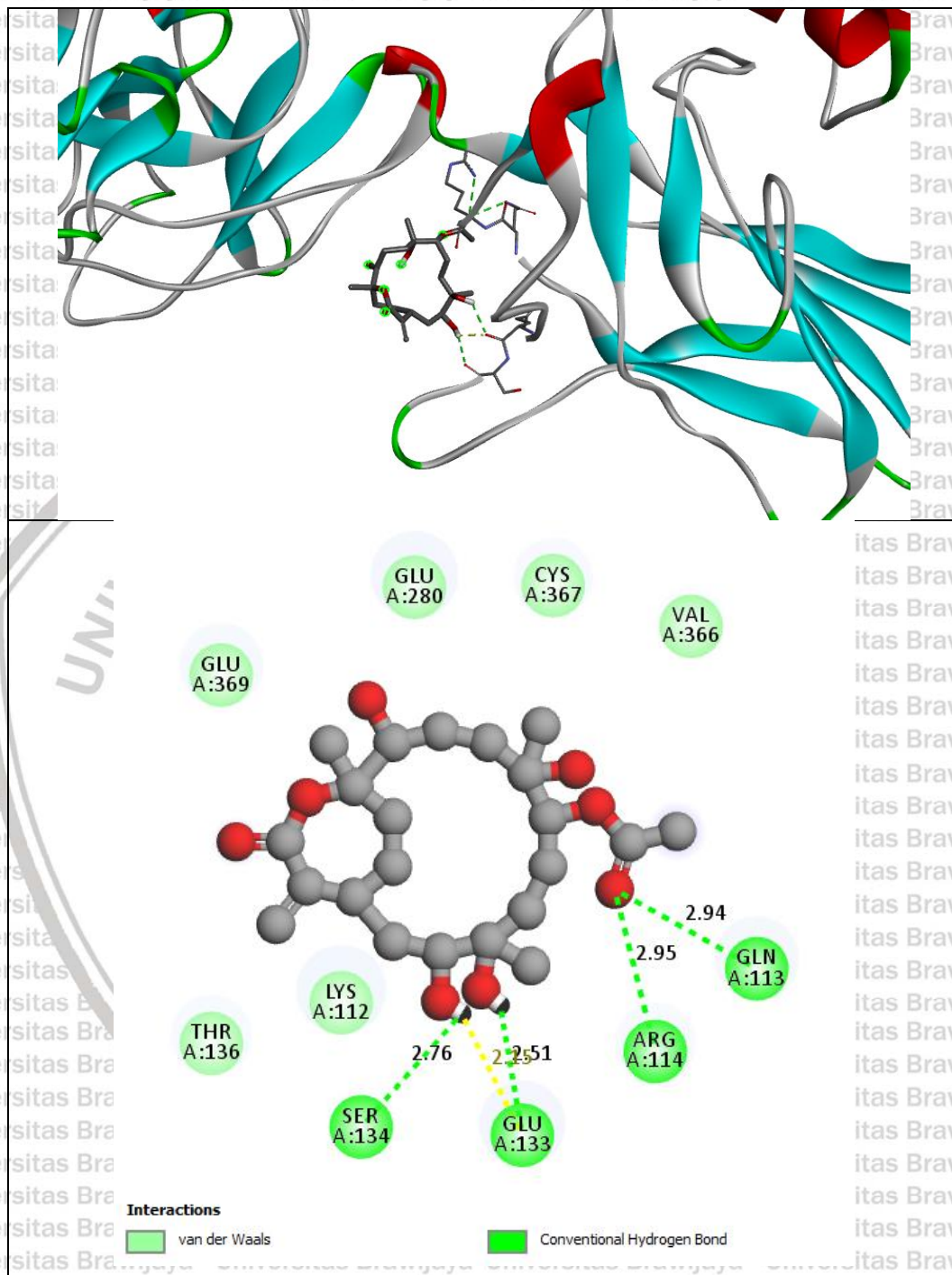


Gambar 5.11. Ikatan senyawa Sinulaflexiolide B dan NFκB

Senyawa Sinulaflexiolide C, kemudian didocking untuk mengetahui posisi berikatan dengan reseptor NFκB. Pada protein NFκB, senyawa Sinulaflexiolide C



dapat berikatan melalui asam glutamat (GLU A:133) dengan jarak 2.15 Å dan interaksi ikatan hydrogen konvensional (Gambar 5.12).



Gambar 5.12. Ikatan senyawa Sinulaflexiolide C dan NFKB

Gambar 5.10, 5.11 dan 5.12 menunjukkan bahwa ketiga senyawa mampu berikatan dengan NFKB lebih mudah dibanding dengan senyawa yang lain.

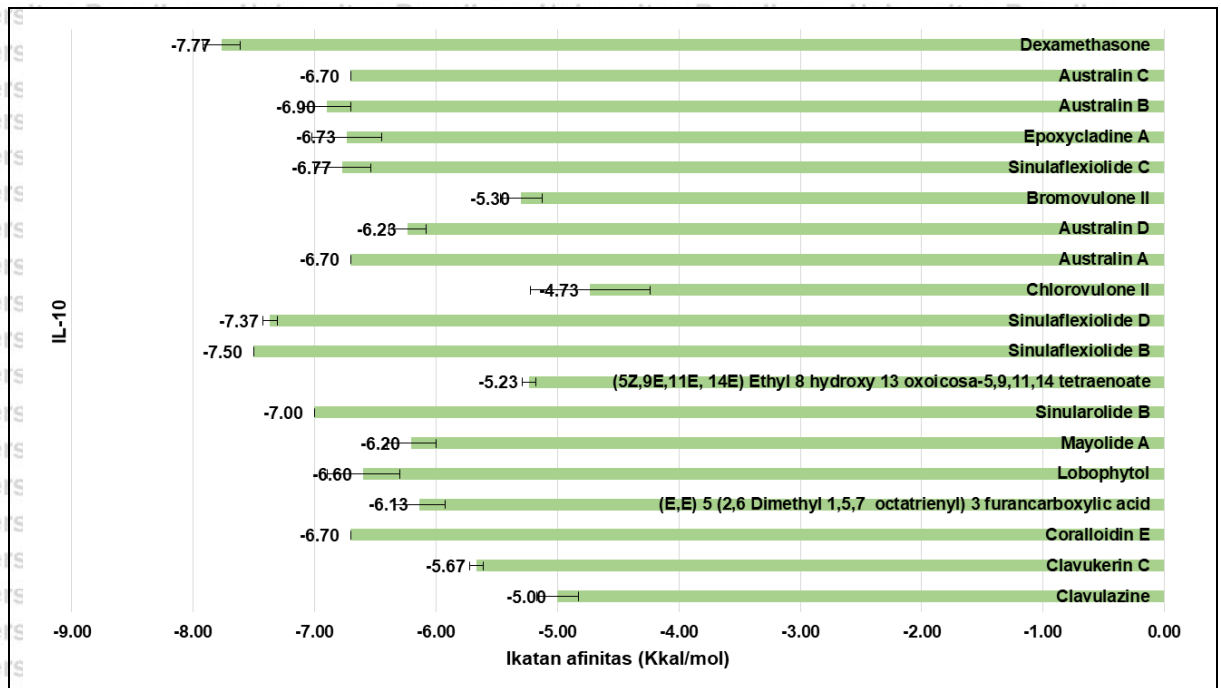
(mendekati senyawa pembanding dexamethasone). Ikatan antara NFkB dan ketiga senyawa ini yang diduga dapat menekan laju respon inflamasi.

Senyawa Sinularolide B, Sinulaflexiolide B dan Sinulaflexiolide C dapat berikatan dengan NFkB, sehingga dapat menghambat aktivasi NFkB akibat kehadiran antigen. NFkB merupakan nama generik dari keluarga faktor transkripsi yang berfungsi sebagai dimer dan mengatur gen yang terlibat dalam kekebalan, inflamasi dan kelangsungan hidup sel. Ada beberapa jalur menuju ke aktivasi NFkB. Jalur kanonik diinduksi oleh TNF- $\alpha$ , IL-1 atau produk sampingan dari infeksi bakteri dan virus. Jalur ini bergantung pada fosforilasi IkappaB-a (IKKBa) yang dimediasi IKK pada Ser32 dan 36, dan mengarah pada degradasinya, yang memungkinkan dimer B p50 / p65 NFkB untuk memasuki inti dan mengaktifkan transkripsi gen. Jalur atipikal adalah IKK-independen dan bergantung pada fosforilasi IKKBa pada Tyr42 atau residu Ser di domain Papp IKKBa. Jalur non-kanonik dipicu oleh anggota superfamili TNFR tertentu, seperti lymphotoxin-beta (LT-beta) atau BAFF. Ini melibatkan fosforilasi p100 NIK dan IKK yang dimediasi dan diproses menjadi p52, menghasilkan translokasi nuklir dari heterodimer p52 / RelB. Jalur signaling NFkB dapat dilihat pada Lampiran 10.

### 5.7.3 Aktivitas Senyawa Aktif Fraksi 3 Sebagai Anti-inflamasi Melalui Jalur BIL-10

Dari 18 senyawa aktif fraksi 3 yang memenuhi kaidah Lipinski, kemudian dianalisis dengan *PyRx* untuk mengetahui ikatan afinitas (kcal/mol) dengan protein IL-10 sebagai regulator negatif inflamasi. Hasil analisis *PyRx* dari 18 senyawa aktif fraksi 3 dengan IL-10 dapat dilihat pada Gambar 5.13.

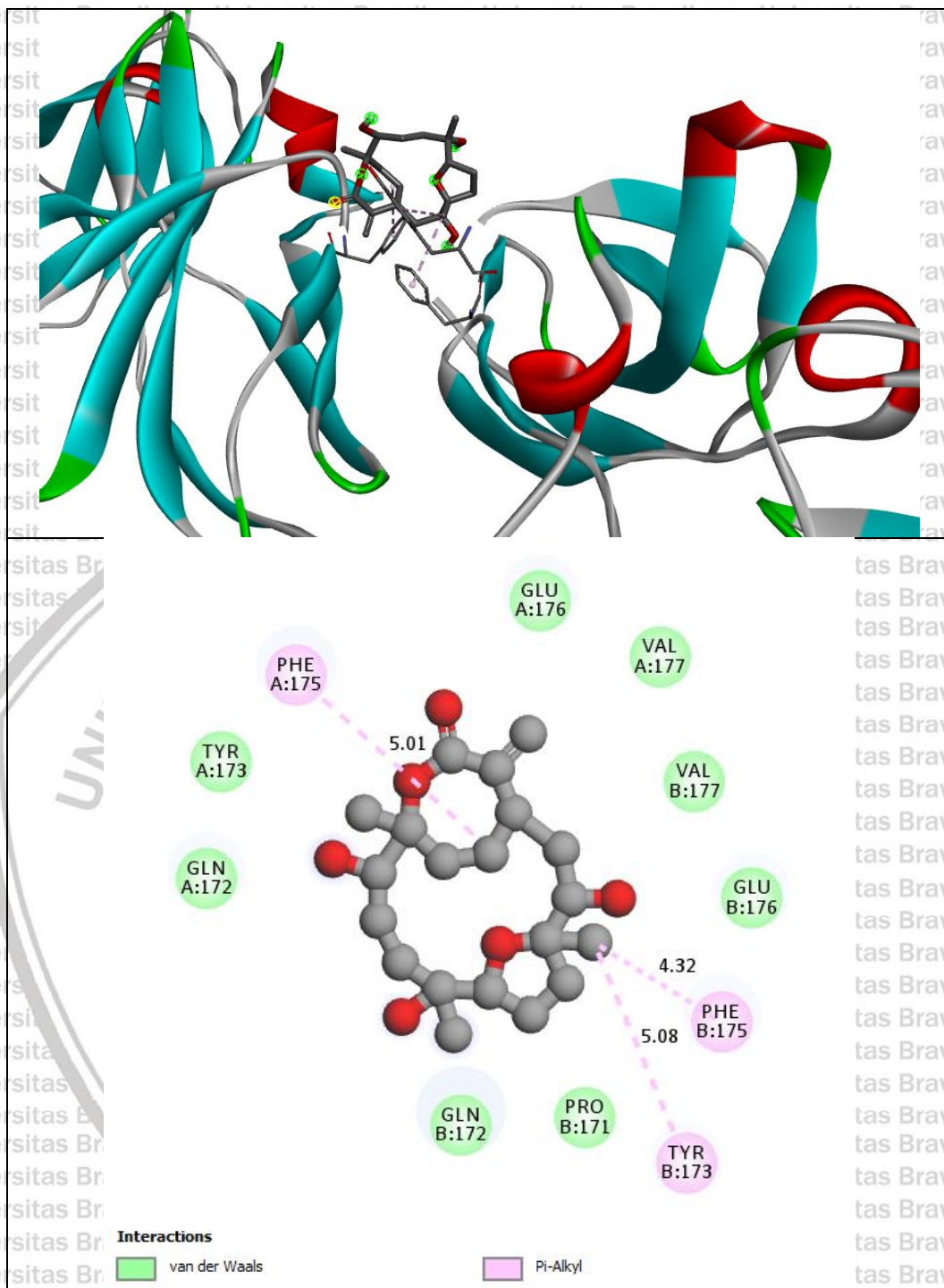




Gambar 5.13. Ikatan Afinitas Senyawa Aktif Fraksi 3 dengan Protein IL-10

Gambar 5.13 menunjukkan senyawa dexamethasone yang merupakan kontrol pembandingan memiliki ikatan afinitas  $-7.77 \pm 0.15$  kkal/mol dengan protein IL-10. Dari 18 senyawa aktif fraksi 3, terdapat 3 senyawa yang ikatan afinitasnya paling rendah dengan protein IL-10 dan mendekati ikatan afinitas dexamethasone, yaitu Sinulaflexiolide B ( $-7.50 \pm 0.00$  kkal/mol); Sinulaflexiolide D ( $-7.37 \pm 0.06$  kkal/mol); dan Sinularolide B ( $-7.00 \pm 0.00$  kkal/mol). Hasil molecular docking mengindikasikan bahwa senyawa Sinulaflexiolide B, Sinulaflexiolide D dan Sinularolide B berpotensi sebagai anti-inflamasi melalui jalur IL-10.

Senyawa Sinulaflexiolide B, kemudian didocking untuk mengetahui posisi berikatan dengan reseptor IL-10. Pada protein IL-10, senyawa Sinulaflexiolide B dapat berikatan melalui fenilalanin (PHE B:175) dengan jarak  $4.32 \text{ \AA}$  dan interaksi ikatan hidrofobik pi alkyl (Gambar 5.14).

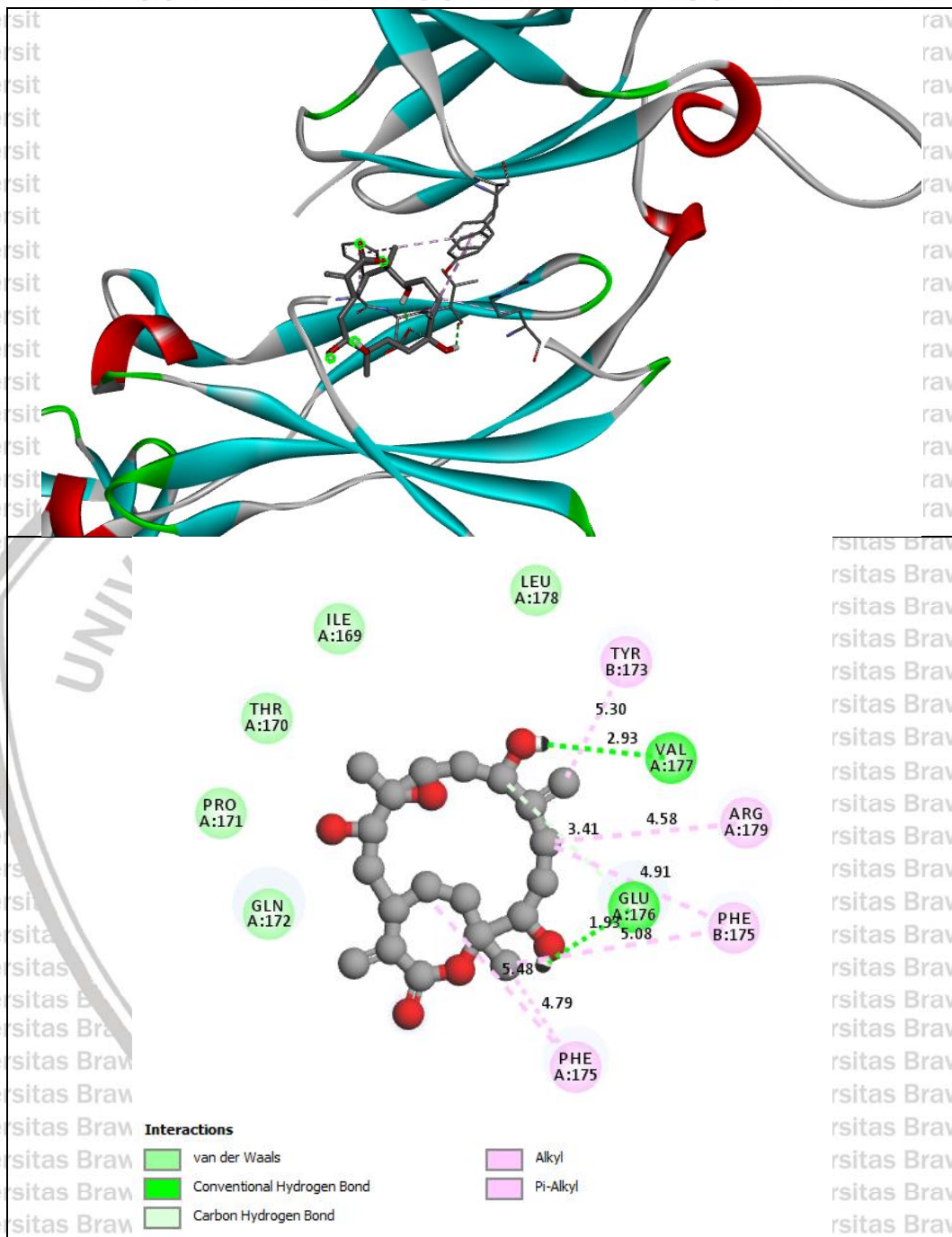


Gambar 5.14. Ikatan senyawa Sinulaflexiolide B dan IL-10

Senyawa Sinulaflexiolide D, kemudian didocking untuk mengetahui posisi berikatan dengan reseptor IL-10. Pada protein IL-10, senyawa Sinulaflexiolide D dapat berikatan melalui asam glutamat (GLU A:176) dengan jarak 1.93 Å dan



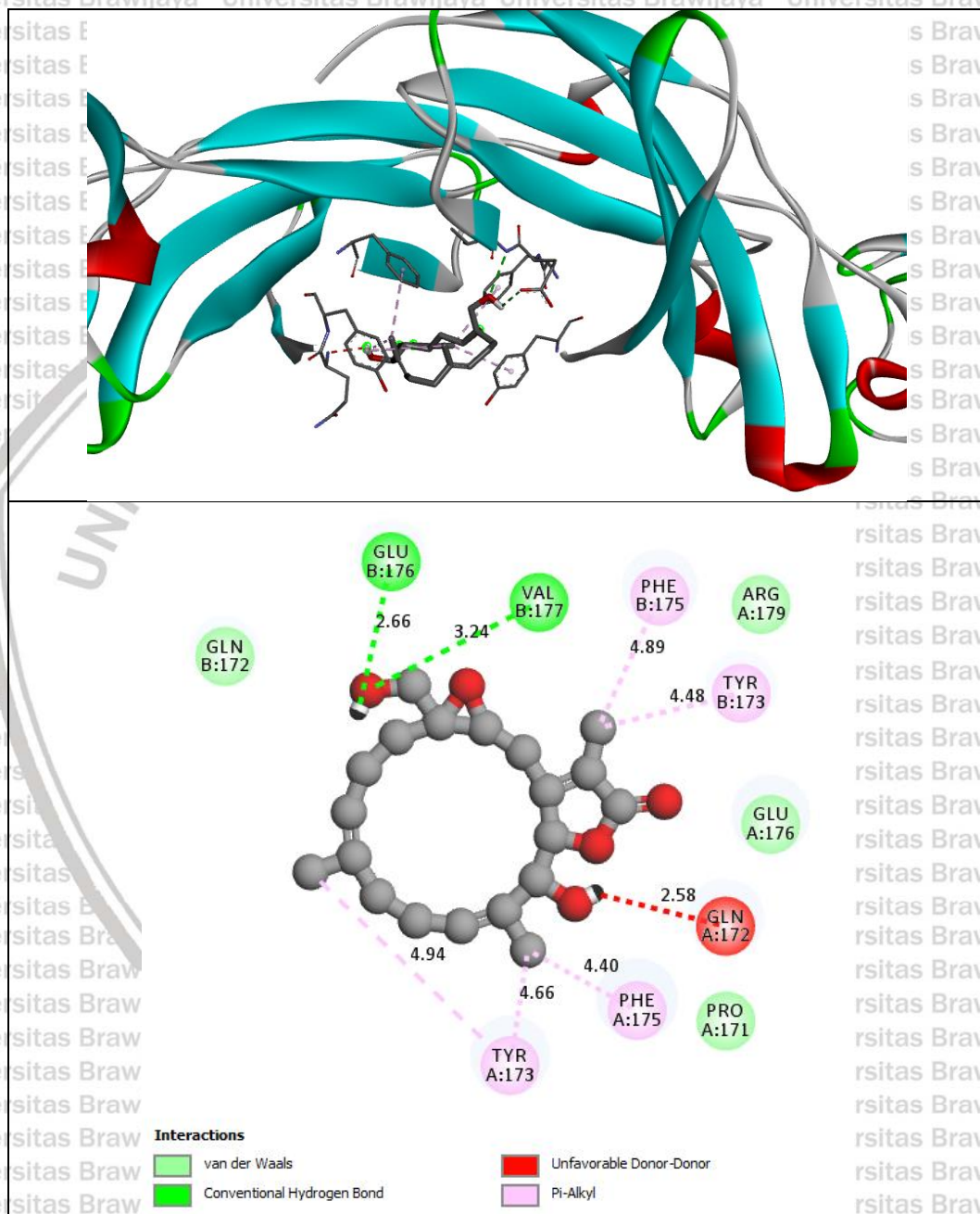
interaksi ikatan hydrogen konvensional; dan melalui arginine (ARG A:179) dengan jarak 4.58 Å dan interaksi ikatan hidrofobik alkil (Gambar 5.15).



Gambar 5.15. Ikatan senyawa Sinularolide B dan IL-10

Senyawa Sinularolide B, kemudian didocking untuk mengetahui posisi berikatan dengan reseptor IL-10. Pada protein IL-10, senyawa Sinularolide B dapat

berikatan melalui asam glutamat (GLU B:176) dengan jarak 2.66 dan interaksi ikatan hydrogen konvensional; melalui fenilalanin (PHE A:175) dengan jarak 4.40 Å dan interaksi ikatan hidrofobik pi-alkil; dan melalui glutamin (GLN A:172) dengan jarak 2.58 Å dan interaksi ikatan unfavorable donor (Gambar 5.16).



Gambar 5.16. Ikatan senyawa Sinularolide B dan IL-10



Gambar 5.14, 5.15 dan 5.16 menunjukkan bahwa senyawa Sinulaflexiolide B, Sinulaflexiolide D dan Sinularolide B dapat berikatan dengan IL-10. Ikatan ketiga senyawa dengan IL-10 dapat meningkatkan kerja sitokin anti-inflamasi IL-10 dalam mekanisme respon inflamasi. IL-10 terutama disekresikan oleh sel T yang telah diaktifkan, monosit, makrofag, sel dendritik, sel Natural Killer (NK) dan sel B. Dalam merespon antigen, sel-sel sistem imun memproduksi sitokin pro-inflamasi seperti tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon -gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin-2 (IL-2) dan interleukin-1 (IL-1). IL-10 terlibat dalam pembersihan patogen yang cepat dan nekrosis sel di lokasi antigen. Tindakan sitokin pro-inflamasi yang berkepanjangan dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang berlebihan, demam, inflamasi dan kematian pada kasus-kasus ekstrem. IL-10 meredam efek inflamasi dari sitokin pro-inflamasi pada patogenitas inflamasi. Jalur respon inflamasi dengan IL-10 dapat dilihat pada Lampiran 10.

### 5.8 Hasil Pengujian Uji *In Vivo* dan *In Vitro* Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC)

Pada pengujian *in vivo* dan *in vitro* menggunakan fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC), karena pada skrining awal paling baik dalam menghambat pelepasan Nitric Oxide (NO) dibandingkan dengan fraksi EtOAc dan BuOH maupun fraksi hasil kromatografi kolom. Uji *in vivo* dilakukan dengan memberikan secara oral fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) pada mencit BALB/c dengan konsentrasi 50 mg/kg BB, 125 mg/kg BB dan 250 mg/kg BB selama 14 hari. Sebagai pembanding dilakukan pemberian dexamethasone dengan konsentrasi 6 mg/kg BB pada mencit. Berat mencit ditimbang tiap 3 hari, untuk mengetahui efek perlakuan dari perubahan berat badan. Sebelum dikorbankan, pada hari ke-14 perlakuan mencit diinduksi LPS (4 mg/mL) melalui saluran pernapasan (intranasal).

Uji *in vitro* dilakukan sebagai bukti pendukung (*overexpression*) untuk



mengetahui efikasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC), dalam kondisi lingkungan terbatas dan terkontrol. Efikasi kemampuan ekstrak uji secara in vitro dilakukan dengan memberikan fraksi DCM *Sarcophyton* sp. pada sel limfosit dalam media kultur selama 3 hari dengan konsentrasi 0.5 mg/mL; 1.25 mg/mL dan 2.50 mg/mL. Sebagai pembanding dilakukan pemberian dexamethasone dengan konsentrasi 5 mg/mL. Kultur sel limfosit diinduksi dengan LPS 0.04 mg/mL untuk menstimuli respon inflamasi. Pembahasan yang dijelaskan pada tiap sub-bab di bawah ini merupakan jumlah relatif sel imunokompeten yaitu prosentase jumlah sel tersebut terhadap jumlah sel yang lain. Matriks hubungan antara parameter inflamasi yang diamati pada kondisi normal, terinduksi LPS dan pemberian ekstrak disajikan pada

Tabel 5.12.

Tabel 5.12. Matriks Hubungan Antara Parameter Inflamasi

Parameter Respon Seluler Inflamasi	Normal	Induksi LPS	LPS + Substansi Bioaktif	Keterangan	Analisis
Sel T naïve	Belum teraktivasi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Teraktivasi;</li> <li>- Kehilangan molekul CD62L<sup>+</sup>;</li> <li>- Mengurangi jumlah sel T naïve.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mengurangi aktivasi;</li> <li>- Mencegah molekul CD62L<sup>+</sup> aktif;</li> <li>- Jumlah sel T naïve terjaga.</li> </ul>	Sel T naïve merupakan sel T yang belum terpapar antigen dan mengekspresikan molekul CD62L <sup>+</sup> .	FCM
Sel T Regulator	Belum teraktivasi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fungsi sel T reg menurun;</li> <li>- Tanda sel T teraktivasi;</li> <li>- Jumlah sel T regulator menurun.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mengurangi aktivasi Sel T;</li> <li>- Meningkatkan jumlah Sel T regulator;</li> <li>- Mensekresikan sitokin anti-inflamasi IL-10.</li> </ul>	Sel T regulator berperan sebagai regulator negatif dari respon inflamasi	FCM
IL-10 (Interleukin 10)	Belum Meningkat	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Jumlah IL-10 menurun;</li> <li>- IL-10 bekerja untuk meminimalkan respon inflamasi;</li> <li>- Meningkatkan aktivitas makrofag.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Meningkatkan jumlah IL-10;</li> <li>- Membantu meminimalkan respon inflamasi;</li> <li>- Mengurangi aktivitas makrofag yang berlebih.</li> </ul>	Sitokin anti-inflamasi yang disekresikan oleh sel T regulator dan berperan penting dalam mencegah patogenitas inflamasi	FCM



TLR4 (Toll-Like Receptor 4)	Belum teraktivasi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TLR4 mengenali dan mengikatnya;</li> <li>- ditandai dengan meningkatnya jumlah TLR4</li> <li>- Mempercepat translokasi NFκB ke nukleus;</li> <li>- memicu ekspresi sitokin pro-inflamasi.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mencegah/mengurangi ikatan TLR4 dan LPS;</li> <li>- ditandai dengan menurunnya jumlah TLR4</li> <li>- Meghambat translokasi NFκB ke nukleus;</li> <li>- menghambat produksi sitokin pro-inflamasi.</li> </ul>	<p><i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i> dari LPS</p>	FCM
NFκB (Nuclear Factor kappa Beta)	Belum teraktivasi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Translokasi NFκB menuju nukleus sel makrofag;</li> <li>- peningkatan aktivasi NFκB;</li> <li>- Jumlah NFκB meningkat;</li> <li>- Memicu produksi sitokin pro-inflamasi dan iNOS;</li> <li>- Meningkatkan ekspresi <i>cell adhesion molecules</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Menghambat translokasi NFκB menuju sel makrofag;</li> <li>- Deaktivasi NFκB;</li> <li>- Jumlah NFκB menurun;</li> <li>- Mengurangi produksi sitokin pro-inflamasi dan iNOS;</li> <li>- Menghambat ekspresi <i>cell adhesion molecules</i>.</li> </ul>	<p>Faktor transkripsi yang meregulasi respon inflamasi dan memicu produksi sitokin pro-inflamasi.</p>	FCM
TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α)	Belum Meningkat	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NFκB teraktivasi;</li> <li>- Produksi TNF-α meningkat;</li> <li>- Memperantari produksi sitokin pro-inflamasi IL-6;</li> <li>- Meningkatkan ekspresi <i>Cell adhesion molecules</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reduksi jumlah NFκB;</li> <li>- menghambat dan mengurangi produksi TNF-α;</li> <li>- mengurangi produksi sitokin pro-inflamasi IL-6;</li> <li>- menekan ekspresi <i>Cell adhesion molecules</i>.</li> </ul>	<p>Sitokin pro-inflamasi yang mengatur fungsi dari makrofag dan salah satu mediator awal yang jumlahnya paling melimpah dalam jaringan yang mengalami inflamasi.</p>	FCM
IL-6 (Interleukin 6)	Belum Meningkat	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aktivasi NFκB;</li> <li>- Produksi TNF-α meningkat;</li> <li>- Meningkatkan produksi IL-6;</li> <li>- Menginduksi respon inflamasi.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Deaktivasi NFκB;</li> <li>- Menghambat produksi TNF-α;</li> <li>- produksi IL-6 menurun;</li> <li>- mengurangi respon infalamasi.</li> </ul>	<p>Sitokin pro-inflamasi pleiotropic yang disekresikan oleh makrofag sebagai respons terhadap mikroba.</p>	FCM



iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase)	Belum Meningkatkan	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aktivasi NFkB;</li> <li>- Produksi sitokin pro-inflamasi Meningkatkan;</li> <li>- Meningkatkan ekspresi iNOS;</li> <li>- Mengkatalisasi produksi NO;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Deaktivasi NFkB;</li> <li>- Menghambat produksi sitokin pro-inflamasi; menekan ekspresi iNOS;</li> <li>- menghambat produksi NO.</li> </ul>	Isoform NOS yang paling berperan dalam peristiwa induksi LPS.	IHC
MDA (Malondialdehyd)	Belum Meningkatkan	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Produksi sitokin pro-inflamasi Meningkatkan;</li> <li>- Meningkatkan produksi ROS;</li> <li>- Menurunnya antioksidan intraseluler; menyebabkan peroksidasi lipid dan kerusakan oksidatif.</li> <li>- elemen stres oksidatif MDA meningkat.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Produksi sitokin pro-inflamasi Menurun;</li> <li>- Jumlah ROS menurun;</li> <li>- Meningkatkan antioksidan intraseluler; menghambat dan mengurangi peroksidasi lipid dan kerusakan oksidatif.</li> <li>- elemen stres oksidatif MDA menurun.</li> </ul>	Penanda stres oksidatif akibat induksi antigen seperti LPS.	SV
SOD (Superoxide Dismutase)	Stabil	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pelepasan sitokin pro-inflamasi;</li> <li>- Meningkatkan ROS;</li> <li>- Meningkatkan elemen stres oksidatif MDA;</li> <li>- Menurunnya jumlah SOD;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Jumlah sitokin pro-inflamasi menurun;</li> <li>- Menurunnya jumlah ROS;</li> <li>- Menurunnya elemen stres oksidatif MDA;</li> <li>- Meningkatkan jumlah SOD;</li> </ul>	Elemen antioksidan lini pertama yang sangat diperlukan tubuh dalam strategi pertahanan antioksidan, terutama yang mengacu pada radikal anion super oksida.	FCM
HO-1 (Heme Oxygenase 1)	Stabil	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aktivasi NFkB;</li> <li>- Pelepasan sitokin pro-inflamasi;</li> <li>- Meningkatkan ROS;</li> <li>- Meningkatkan elemen stres oksidatif MDA;</li> <li>- Menurunnya jumlah HO-1;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Deaktivasi NFkB;</li> <li>- Menghambat Pelepasan sitokin pro-inflamasi;</li> <li>- Menurunkan ROS;</li> <li>- Menurunkan elemen stres oksidatif MDA;</li> <li>- Meningkatkan jumlah HO-1;</li> <li>- Meningkatkan produksi IL-10;</li> </ul>	Elemen antioksidan yang dapat menguraikan heme menjadi biliverdin, karbon monoksida (CO), dan zat besi bebas. Biliverdin dan CO memiliki sifat antioksidan.	FCM



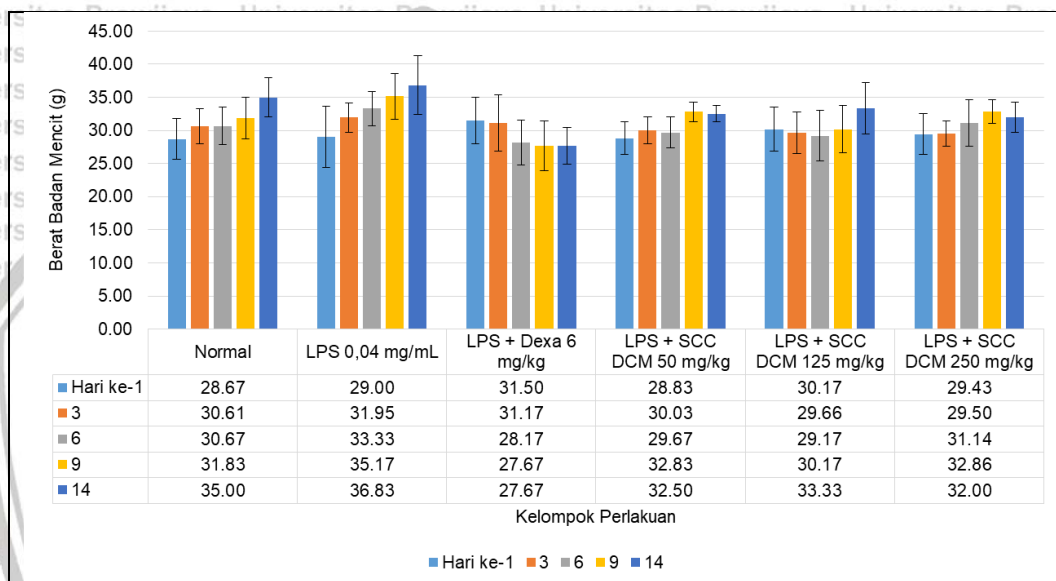
				– Memproduksi biliverdin dan CO.	
				– Aktivasi NFkB; – Pelepasan sitokin pro-inflamasi; – Meningkatkan ROS; – Meningkatkan elemen stres oksidatif MDA; – Menurunnya jumlah Nrf-2;	Regulator FCM antioksidan dan kemoprotektif. Nrf-2 menginduksi sintesis elemen antioksidan seluler dan jalur detoksifikasi.
Nrf-2 (Nuclear factor-erythroid-2 related factor 2)	Belum teraktivasi			– Menurunkan ROS; – Menurunkan elemen stres oksidatif MDA; – Meningkatkan aktivasi Nrf-2; – Meningkatkan jumlah HO-1; – Menghambat respon inflamasi.	
VCAM-1/ ICAM-1 (Cell adhesion molecules)	Belum terekspresi			– Aktivasi NFkB; – Produksi TNF- $\alpha$ meningkat; – Produksi MDA meningkat; – Meningkatkan ekspresi <i>Cell adhesion molecules</i> . – Meningkatkan rekrutmen leukosit ke jaringan yang mengalami inflamasi.	IHC – VCAM-1 merupakan penanda prediktif endotel pro-inflamasi. – ICAM-1 berperan untuk pelekatan yang kuat dan transmigrasi leukosit keluar dari pembuluh darah dan ke dalam jaringan.

Keterangan : FCM-Flowcytometry; IHC-Immunohistochemistry; SV-Spectrophotometry Visible.

### 5.8.1 Pengaruh Perlakuan Terhadap Berat Badan Mencit

Penelitian ini menggunakan mencit Balb/C yang diinduksi dengan LPS melalui saluran pernapasan (intranasal). Mencit diberikan perlakuan ekstrak secara oral selama 14 hari. Hasil penimbangan berat badan mencit menunjukkan peningkatan berat badan mencit (Gambar 5.17). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak dapat bermediasi baik pada saluran pencernaan mencit, sehingga tidak mengganggu aktivitas makan mencit.

Sebaliknya Gambar 5.17 menunjukkan perlakuan pemberian dexamethasone berat badan mencit menurun. Hasil ini sesuai dengan penelitian Lerario, Ferreira, Miranda, & Chacra (2001) yang menunjukkan dexamethasone dapat mempengaruhi kehilangan berat mencit. Hal ini karena dexamethasone mempengaruhi hormon adiposit leptin. Hormon leptin berperan meregulasi sinyal ke sistem saraf pusat yang merefleksikan status simpanan lemak. Penurunan kadar hormon leptin mempengaruhi perubahan massa lemak dan interaksi nutrisi.



Gambar 5.17. Efek Perlakuan Terhadap Berat Badan Mencit

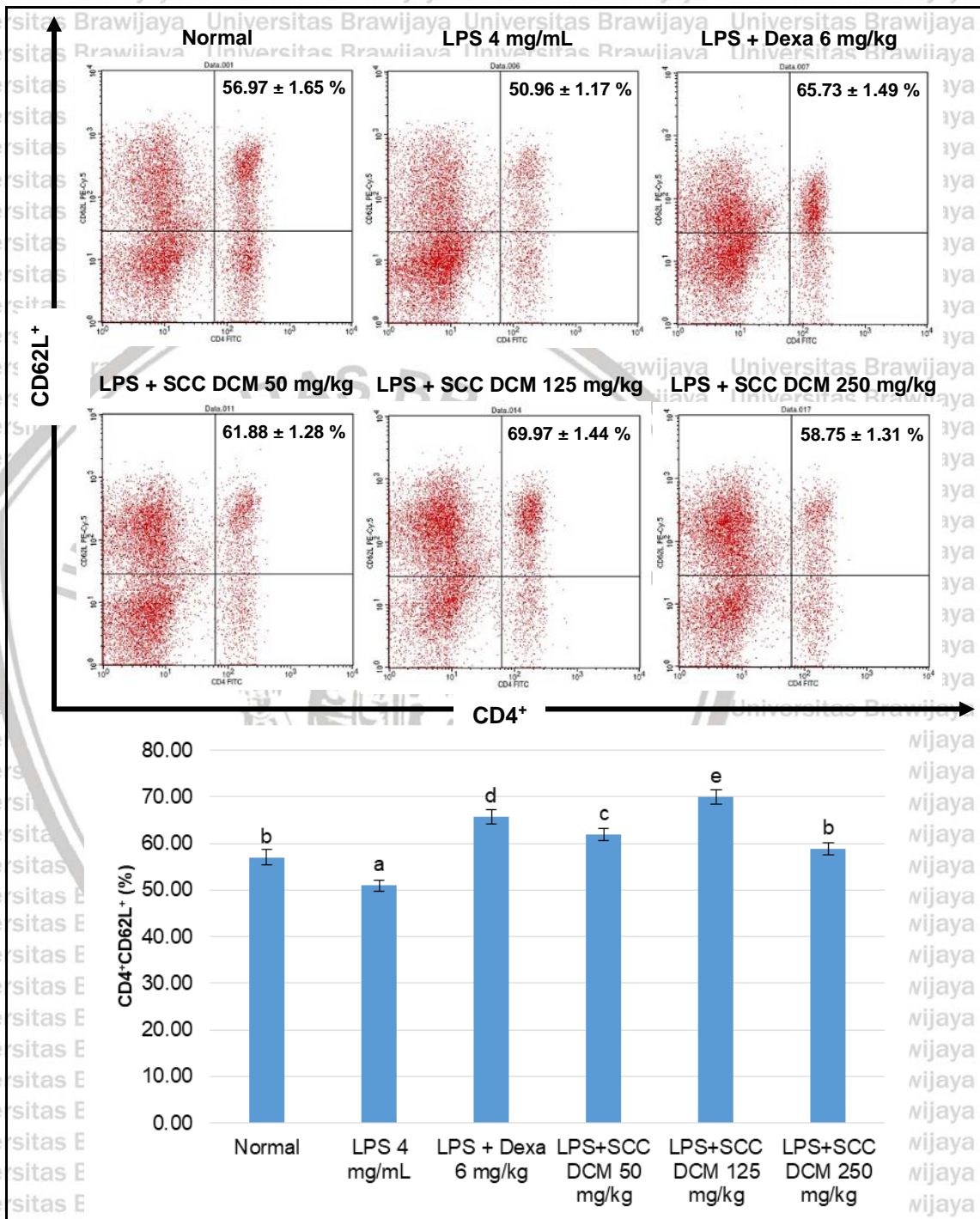
### 5.8.2 Pengaruh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap Jumlah Relatif Sel T Naive Secara *In Vivo*.

Ekspresi sel T naive atau sel T CD4<sup>+</sup> yang belum teraktivasi dapat diketahui melalui profil CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. Ketika profil sel T naive rendah maka banyak sel T yang telah teraktivasi atau menjadi sel efektor. Hasil pengujian *in vivo* dengan analisis *flowcytometry* menunjukkan jumlah relatif sel T Naive CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> menurun pada mencit yang terinduksi LPS dibandingkan dengan jumlah relatif sel T Naive mencit normal ( $P < 0.05$ ). Namun, pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan dexamethasone dapat meningkatkan jumlah relatif sel T Naive ( $P < 0.05$ ).



(Gambar 5.18). Walaupun perlakuan konsentrasi ekstrak 250 mg/kg menunjukkan penurunan, tetapi tidak lebih kecil dari jumlah relatif sel T naïve mencit normal.

Hasil analisis statistik pengujian *in vivo* dapat dilihat Lampiran 11.



Gambar 5.18. Peningkatan sel T Naïve (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vivo*

Hasil analisis uji tukey menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal dan perlakuan dexamethasone sebagai kontrol pembanding. Perlakuan konsentrasi ekstrak 50 dan 125 mg/kg berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal dan LPS, sedangkan perlakuan konsentrasi ekstrak 250 mg/kg tidak berbeda nyata dengan perlakuan normal. Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 50 dan 125 mg/kg dapat meningkatkan jumlah sel T naïve dibandingkan perlakuan mencit yang diinduksi LPS.

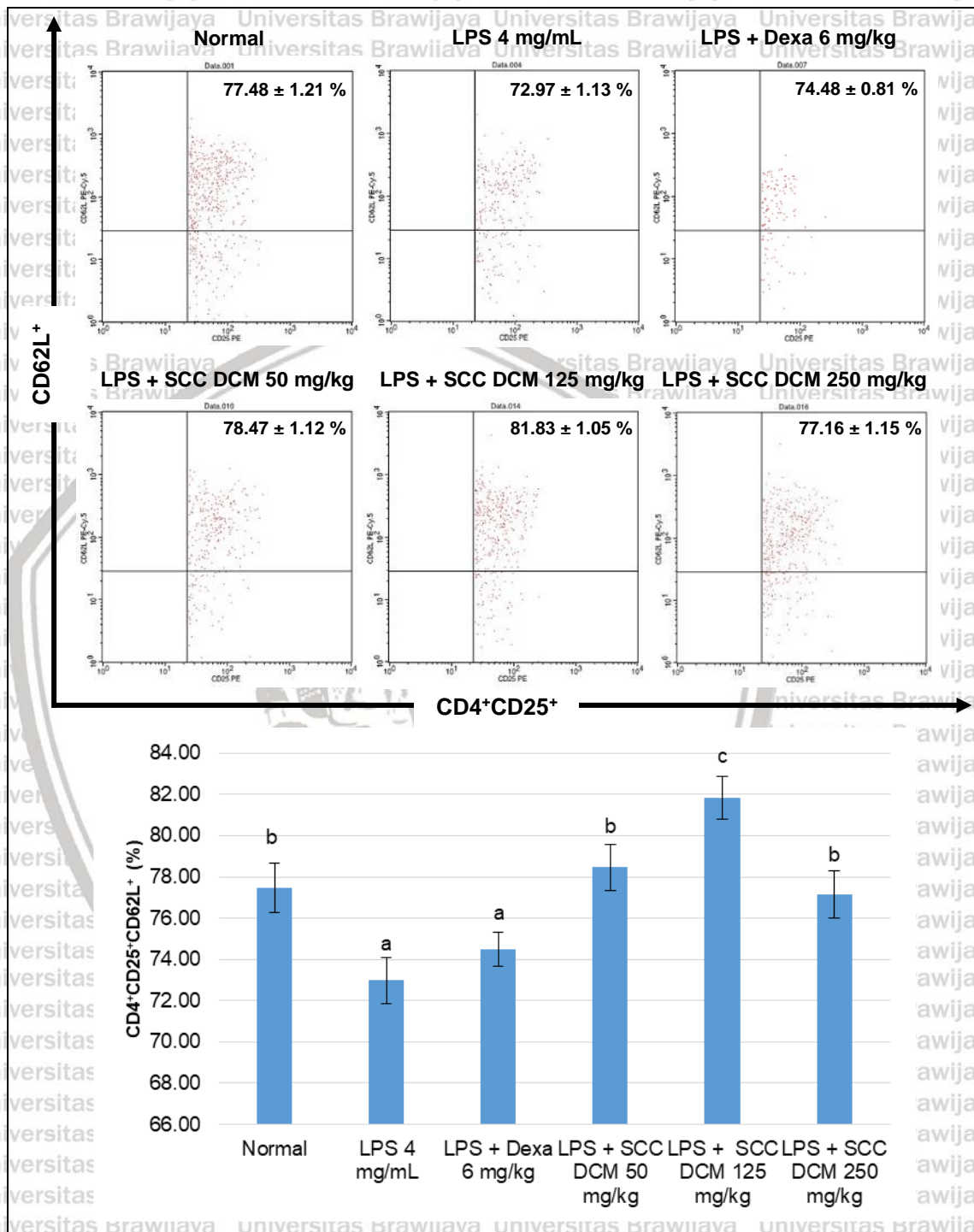
Sel T naïve merupakan sel T yang belum terpapar antigen seperti LPS dan akan mengekspresikan molekul CD62L<sup>+</sup> (L-selektin). L-selektin merupakan *cell adhesion molecules* yang berfungsi dalam pelekatan dan *rolling* pada sel endotel. Sel T naïve berada dalam darah, limpa dan *lymph node peripheral*. Pada saat sel T naïve bertemu dengan suatu antigen, maka sel T naïve akan teraktivasi dan kehilangan molekul CD62L<sup>+</sup>. Pada individu normal, molekul CD62L<sup>+</sup> diekspresikan oleh sel T naïve, sedangkan pada individu yang tidak sehat (misalnya karena terinduksi LPS), ekspresi molekul CD62L<sup>+</sup> akan mengalami penurunan pada organ *lymph node peripheral*. Penurunan ekspresi CD 62L<sup>+</sup> oleh sel T naïve akan mengaktivasi sel T menjadi sel efektor (Tedder, Steeber, Chen, & Engel, 1995).

### **5.8.3 Pengaruh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap Jumlah Relatif Sel T Regulator Secara *In vivo* dan *In vitro***

Sel T regulator berperan sebagai regulator negatif inflamasi. Pada saat LPS sebagai agen stimuli respon inflamasi terdeteksi, fungsi sel Treg akan menurun sebagai tanda sel T teraktivasi dengan LPS. Hasil pengujian *in vivo* dengan analisis *flowcytometry* menunjukkan jumlah relatif sel T regulator CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> menurun pada mencit yang terinduksi LPS dibandingkan dengan jumlah relatif sel T regulator mencit normal (P<0,05). Namun, pemberian



fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan dexamethasone dapat meningkatkan jumlah relatif sel T regulator ( $P < 0,05$ ) (Gambar 5.19).



Gambar 5.19. Peningkatan sel T Regulator ( $CD4^+CD25^+CD62L^+$ ) oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vivo*

Akan tetapi, Gambar 5.19 menunjukkan perlakuan konsentrasi ekstrak 250 mg/kg menunjukkan penurunan jumlah relatif sel T regulator, tetapi jumlah relatif penurunannya tidak lebih rendah bila dibandingkan dengan perlakuan mencit yang hanya diinduksi LPS. Hasil analisis statistik pengujian *in vivo* dapat dilihat pada Lampiran 11.

Hasil analisis uji tukey pengujian *in vivo* menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 50, 125 dan 250 mg/kg berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS, sedangkan perlakuan konsentrasi ekstrak 50 dan 250 mg/kg tidak berbeda nyata dengan perlakuan normal. Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 125 mg/kg dapat meningkatkan jumlah sel T regulator dibandingkan perlakuan mencit normal dan diinduksi LPS.

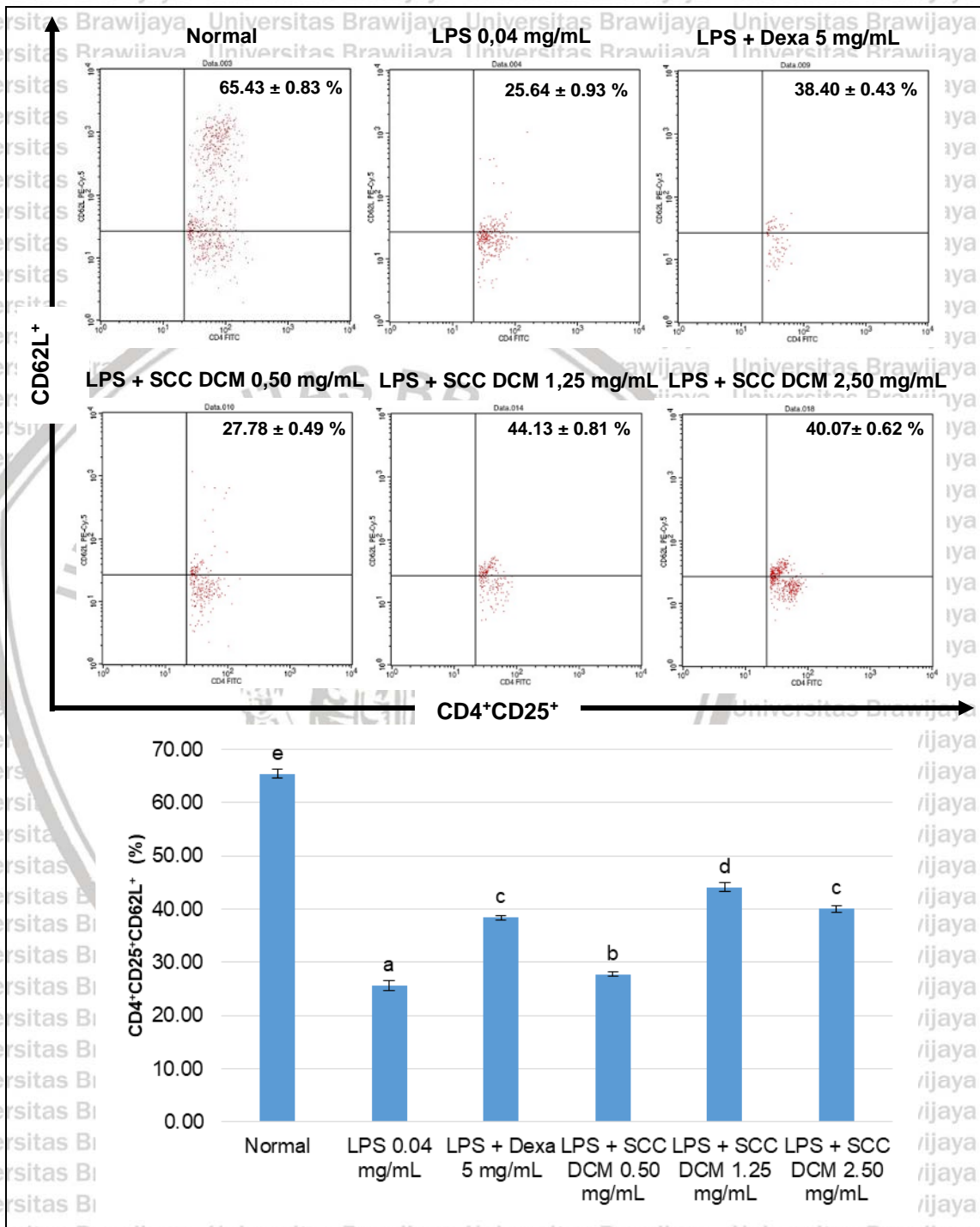
Lebih lanjut, dilakukan pengujian *in vitro* sebagai *overexpression* dari pengujian *in vivo* untuk membuktikan efikasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dalam menurunkan jumlah relatif sel T regulator. Hasil pengujian *in vitro* dengan analisis *flowcytometry*, menunjukkan bahwa jumlah relatif sel T regulator secara signifikan menurun pada mencit yang diinduksi LPS dibandingkan dengan mencit normal ( $P < 0.05$ ). Pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan dexamethasone juga dapat meningkatkan jumlah relatif sel T regulator ( $P < 0.05$ ).

Walaupun perlakuan konsentrasi ekstrak 2.50 mg/mL menunjukkan penurunan jumlah relatif sel T regulator, tetapi jumlah relatif penurunannya tidak lebih rendah dari perlakuan mencit yang hanya diinduksi LPS (Gambar 5.20). Hasil analisis statistik pengujian *in vitro* dapat dilihat pada Lampiran 12.

Hasil analisis uji tukey dari pengujian *in vitro* menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 0.50, 1.25 dan 2.50 mg/mL berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS, sedangkan perlakuan konsentrasi ekstrak 2.50 mg/mL tidak berbeda nyata dengan



perlakuan kontrol dexamethasone. Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 1.25 mg/mL dapat meningkatkan jumlah sel T regulator lebih baik pada mencit induksi LPS, dibandingkan perlakuan konsentrasi 0.50 dan 2.50 mg/mL.



Gambar 5.20. Peningkatan sel T Regulator (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vitro*

Sel T regulator merupakan sub populasi khusus dari sel T yang mengekspresikan CD4 dan CD25 pada sel endotel dan faktor transkripsi *forkhead box protein 3* (Foxp3) (Josefowicz, Lu, & Rudensky, 2012). Sel Treg mempertahankan toleransi perifer dengan memberikan supresi esensial terhadap sel T CD4 autoreaktif yang telah lolos dari seleksi negatif dalam timus. Selain itu, sel T regulator bertindak sebagai regulator negatif penting dari respon inflamasi dalam berbagai konteks biologis, termasuk infeksi, penyakit metabolisme, perbaikan jaringan, dan kanker (Belkaid & Tarbell, 2009 dan Burzyn, Benoist, & Mathis, 2013).

Venturi, Conway, Steeber, & Tedder (2007) menyatakan sel T regulator banyak mengekspresikan molekul CD62L (L-selektin) pada sel endotel. Sel T regulator berperan penting sebagai regulator kunci dalam menekan sel imun, mencegah respon imun yang berlebih, respon inflamasi dan kerusakan jaringan (Sakaguchi, Wing, Onishi, Prieto-Martin, & Yamaguchi, 2009 dan Zhou, Tang, Cao, Fan, & Li, 2015). B. Wang *et al.* (2014) menyatakan fungsi dan jumlah sel T regulator akan berkurang apabila berada dalam lingkungan pro-inflamasi.

Pada saat antigen terdeteksi, sel T regulator bermigrasi ke perifer dan berusaha mengatasinya dengan mensekresikan sitokin anti-inflamasi IL-10 dan *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  (Nilsson, Wigren, & Shah, 2009). Sel T regulator bekerja dengan menekan aktivasi sel T efektor baik dengan interaksi langsung maupun melalui penghambatan *Antigen Presenting Cells* (APCs).

Ponnuswamy, Vré, Mallat, & Tedgui (2012) menyatakan mekanisme kerja sel T regulator dalam menekan respon imun bekerja melalui kontak seluler (melalui CTLA-4 pada Treg dengan B7 pada APCs atau sel T), konsumsi faktor pertumbuhan IL-2, dan sekresi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10, TGF- $\beta$ , dan IL-35. Sel T regulator melakukan interaksi langsung dengan sel makrofag CD11b dan menghambat aktivasi sel T dengan cara mencegah interaksi dengan sel T



efektor CD4<sup>+</sup>. Jumlah sel T regulator yang menurun akan diikuti dengan aktivasi makrofag yang berinteraksi dengan sitokin-sitokin pro-inflamasi.

#### **5.8.4 Pengaruh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap Jumlah Relatif Sitokin Anti-inflamasi IL-10 Secara *In vivo* dan *In vitro***

Interleukin 10 (IL-10) merupakan sitokin anti-inflamasi yang disekresikan oleh sel T regulator dan berperan penting dalam mencegah pagenitas inflamasi.

IL-10 diproduksi sebagai tanggapan dalam respon inflamasi terhadap induksi LPS.

Hasil pengujian *in vivo* dengan analisis *flowcytometry* menunjukkan jumlah relatif

IL-10 menurun pada mencit yang terinduksi LPS dibandingkan dengan jumlah relatif IL-10 mencit normal ( $P < 0.05$ ). Namun, pemberian fraksi DCM *Sarcophyton*

sp. (SCC) dan dexamethasone dapat meningkatkan jumlah relatif IL-10 ( $P < 0.05$ )

(Gambar 5.21). Walaupun perlakuan konsentrasi ekstrak 50 dan 125 mg/kg tidak

berbeda nyata dengan perlakuan mencit yang hanya diinduksi LPS, tetapi tetap

menunjukkan peningkatan jumlah relatif IL-10 secara bertahap. Hasil analisis

statistik pengujian *in vivo* dapat dilihat pada Lampiran 11.

Hasil analisis uji tukey dari pengujian *in vivo* menunjukkan perlakuan LPS

berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak

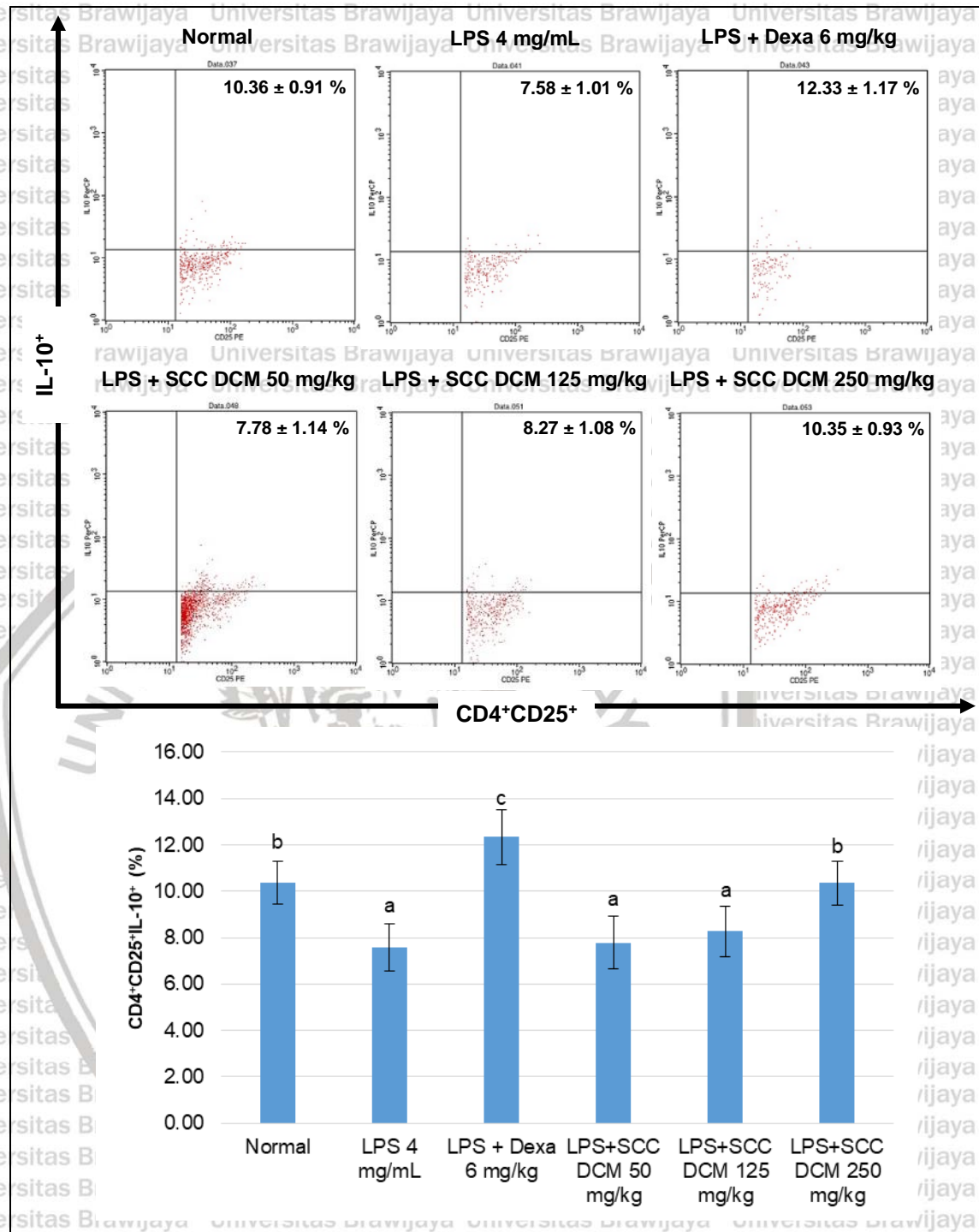
250 mg/kg berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS, sedangkan

perlakuan konsentrasi ekstrak 50 dan 125 mg/kg tidak berbeda nyata dengan

perlakuan mencit induksi LPS. Hal ini berarti bahwa pemberian ekstrak 250 mg/kg

dapat meningkatkan jumlah IL-10 dari mencit induksi LPS, mendekati jumlah IL-

10 perlakuan mencit normal.



Gambar 5.21. Peningkatan Sitokin Anti-inflamasi IL-10 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) oleh Ekstrak DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vivo*

Lebih lanjut, dilakukan pengujian *in vitro* sebagai *overexpression* dari pengujian *in vivo* untuk membuktikan efikasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dalam meningkatkan jumlah relatif IL-10. Hasil pengujian *in vitro* dengan analisis



*flowcytometry*, menunjukkan bahwa jumlah relatif IL-10 secara signifikan menurun pada mencit yang diinduksi LPS dibandingkan dengan mencit normal ( $P < 0.05$ ).

Pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan dexamethasone secara bertahap juga dapat meningkatkan jumlah relatif IL-10 ( $P < 0.05$ ) (Gambar 5.22).

Hasil analisis statistik pengujian *in vitro* dapat dilihat pada Lampiran 12.

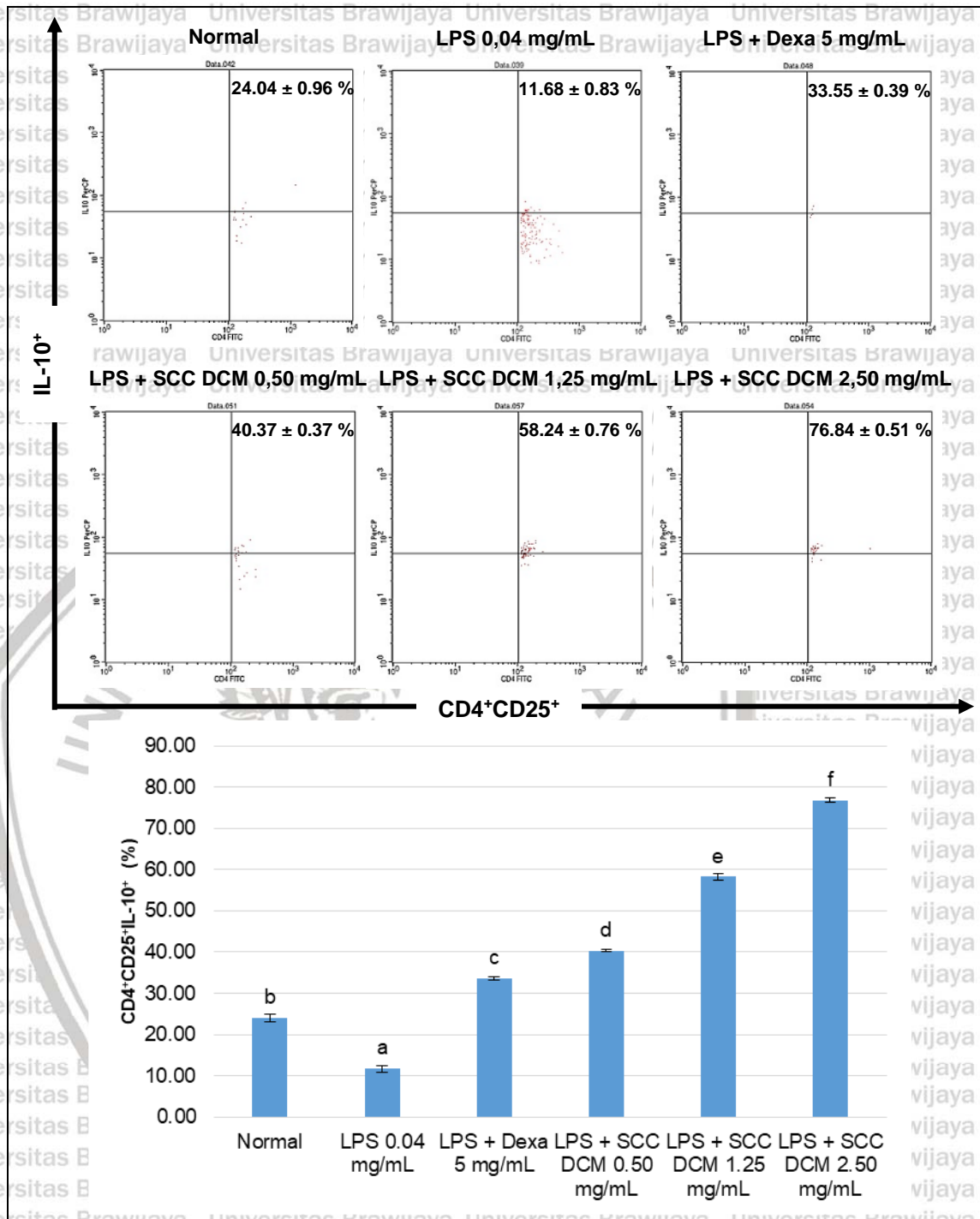
Hasil analisis uji tukey dari pengujian *in vitro* menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 0.50, 1.25 dan 2.50 mg/mL berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS.

Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 0.50, 1.25 dan 2.50 mg/mL dapat meningkatkan jumlah IL-10, dibandingkan perlakuan LPS.

IL-10 memainkan peran utama dalam pembatasan dan penghentian respons inflamasi. IL-10 menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi *monocyte/macrophage-derived* seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 dan IL-12 (Opal & Depalo, 2000). IL-10 diproduksi terutama dari monosit dan mengatur pertumbuhan dan/atau diferensiasi berbagai sel imun, serta keratinosit dan sel endotel selama proses penyembuhan luka (Gallucci *et al.*, 2000).

Hasil penelitian Liechty, Kim, Adzick, & Crombleholme (2000) menggunakan mencit (*null*) yang luka, peningkatan IL-10 dikarakterisasi dengan infiltrasi sel inflamasi dan deposisi kolagen yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan mencit normal. Hal ini menunjukkan bahwa IL-10 menghambat infiltrasi neutrofil dan makrofag menuju lokasi cedera serta menghambat ekspresi beberapa kemokin dan sitokin pro-inflamasi. Ekspresi IL-10 mengarah pada *downregulation* sejumlah regulator negatif dari pensinyalan TLR

(Hedl & Abraham, 2013). Pada penelitian ini TLR yang menjadi *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP) dari LPS, yakni TLR4. Ekspresi IL-10 dipromosikannya oleh pensinyalan TLR4 dan *Downregulation* TLR4 dapat menghambat ekspresi gen pro-inflamasi (Sheedy *et al.*, 2009).



Gambar 5.22. Peningkatan Sitokin Anti-inflamasi IL-10 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vitro*



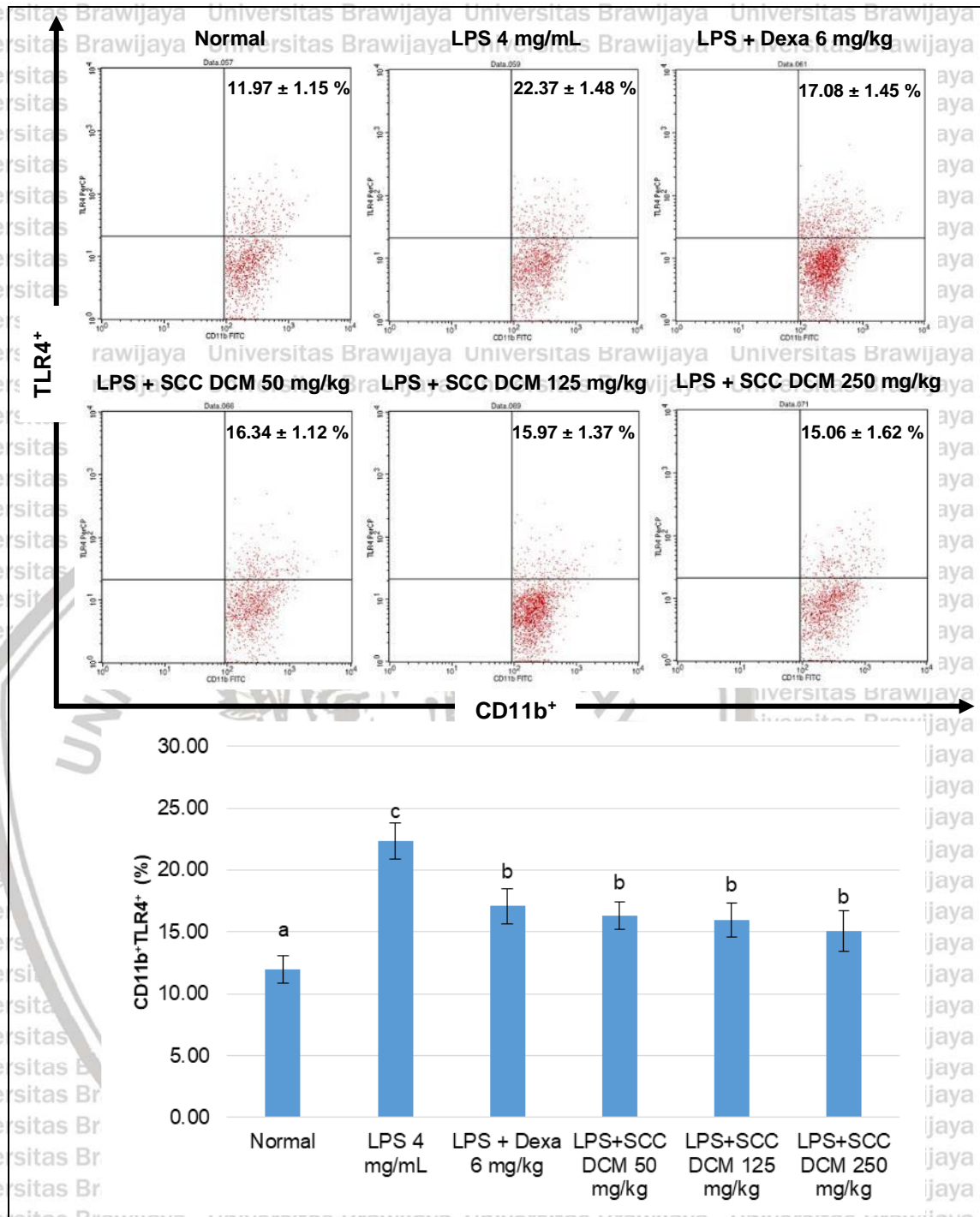
### 5.8.5 Pengaruh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap *downregulation* TLR4 Secara *In vivo* dan *In vitro*

TLR 4 merupakan *Pathogen Associated Molecular Pattern* dari LPS. Pada saat LPS melekat pada permukaan sel, maka TLR4 mengenali dan mengikatnya.

Hasil pengujian *in vivo* dengan analisis *flowcytometry* menunjukkan jumlah relatif TLR4 meningkat pada mencit yang terinduksi LPS dibandingkan dengan jumlah relatif TLR4 mencit normal ( $P < 0.05$ ). Namun, pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan dexamethasone dapat menurunkan jumlah relatif TLR4 ( $P < 0.05$ ) (Gambar 5.23). Walaupun perlakuan konsentrasi ekstrak dan dexamethasone tidak berbeda nyata dalam menurunkan jumlah relatif TLR4. Hasil analisis statistik pengujian *in vivo* dapat dilihat pada Lampiran 11.

Hasil analisis uji tukey dari pengujian *in vivo* menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 50, 125 dan 250 mg/kg berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS. Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 50, 125 dan 250 mg/kg dapat menurunkan jumlah TLR4 mencit yang diinduksi LPS, dibandingkan perlakuan LPS.

Lebih lanjut, dilakukan pengujian *in vitro* sebagai *overexpression* dari pengujian *in vivo* untuk membuktikan efikasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dalam menurunkan jumlah relatif TLR4. Hasil pengujian *in vitro* dengan analisis *flowcytometry*, menunjukkan bahwa jumlah relatif TLR4 secara signifikan meningkat pada mencit yang diinduksi LPS dibandingkan dengan mencit normal ( $P < 0.05$ ). Pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan dexamethasone juga dapat menurunkan jumlah relatif TLR4 ( $P < 0.05$ ) (Gambar 5.24). Hasil analisis statistik pengujian *in vitro* dapat dilihat pada Lampiran 12.



Gambar 5.23. *Downregulation* TLR4 oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vivo*

Hasil analisis uji tukey dari pengujian *in vitro* menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 0.50, 1.25 dan 2.50 mg/mL berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS.



Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 0.50, 1.25 dan 2.50 mg/mL dapat menurunkan jumlah TLR4, dibandingkan perlakuan LPS.

Toll-like receptors (TLRs) merupakan reseptor *germline-encoded* yang diekspresikan oleh sistem imun bawaan dan distimulasi oleh motif struktural yang secara khas diekspresikan oleh bakteri, virus dan jamur yang dikenali dengan pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Janeway & Medzhitov, 2002).

Interaksi TLR memicu ekspresi sitokin pro-inflamasi serta pematangan fungsional sel penyajian antigen dari sistem imun bawaan (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006).

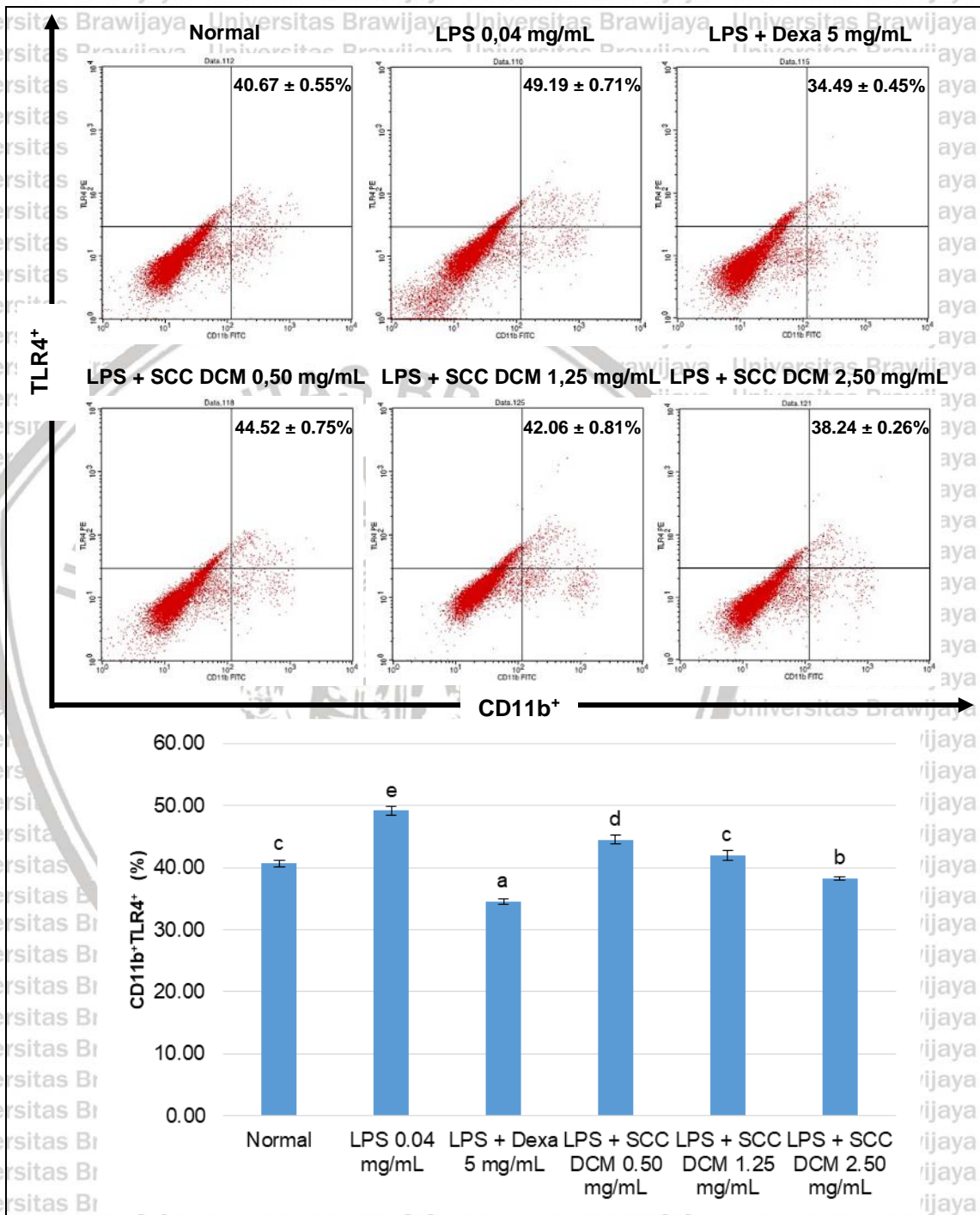
LPS merupakan PAMPs dari TLR4. Komponen lipid A dari LPS yang berperan sebagai PAMPs. Beutler menunjukkan bahwa TLR4 merupakan sensor penting dari pengenalan LPS (Poltorak *et al.*, 1998). Stimulasi LPS terjadi melalui serangkaian interaksi dengan beberapa protein termasuk protein pengikat LPS, yaitu CD14, MD-2 dan TLR4 (Gioannini & Weiss, 2007 dan Miyake, 2007). Protein pengikat LPS memfasilitasi interaksi Antara LPS dan CD14 (Tobias, Soldau, & Ulevitch, 1986 dan Wright, Tobias, Ulevitch, & Ramos, 1989).

CD14 memfasilitasi transfer LPS ke kompleks reseptor TLR4/MD-2 dan memodulasi pengenalan LPS (Wright, Ramos, Tobias, Ulevitch, & Mathison, 1990). MD-2 merupakan protein larut yang tidak berasosiasi secara non-kovalen dengan TLR4 tetapi dapat langsung membentuk kompleks dengan LPS jika TLR4 tidak ada (Shimazu *et al.*, 1999; Nagai *et al.*, 2002; dan T. L. Gioannini *et al.*, 2004).

TLR4 dapat meningkatkan pengikatan LPS ke MD-2 (Mitsuzawa *et al.*, 2006).

Dengan mengetahui interaksi antara LPS dan TLR4, maka salah satu cara mengontrol aktivasi jalur *signaling downstream* inflamasi, yaitu melalui penghambatan dimerisasi reseptor supaya dapat menekan *upregulation* TLR4 (Niessner *et al.*, 2006). Pelekatan LPS dan TLR4 dapat dicegah dengan mekanisme penghambatan dimerisasi TLR4 dan translokasi NFκB ke nukleus,

sehingga mengurangi *downregulation* respon inflamasi (Jeong *et al.*, 2014 dan Xin Zhou *et al.*, 2014). Feng, Sun, & Li (2015) menyatakan ekspresi TLR4 dapat dihambat melalui jalur TLR4-MyD88-NFκB.



Gambar 5.24. *Downregulation* TLR4 oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp.: (SCC) secara *In Vitro*

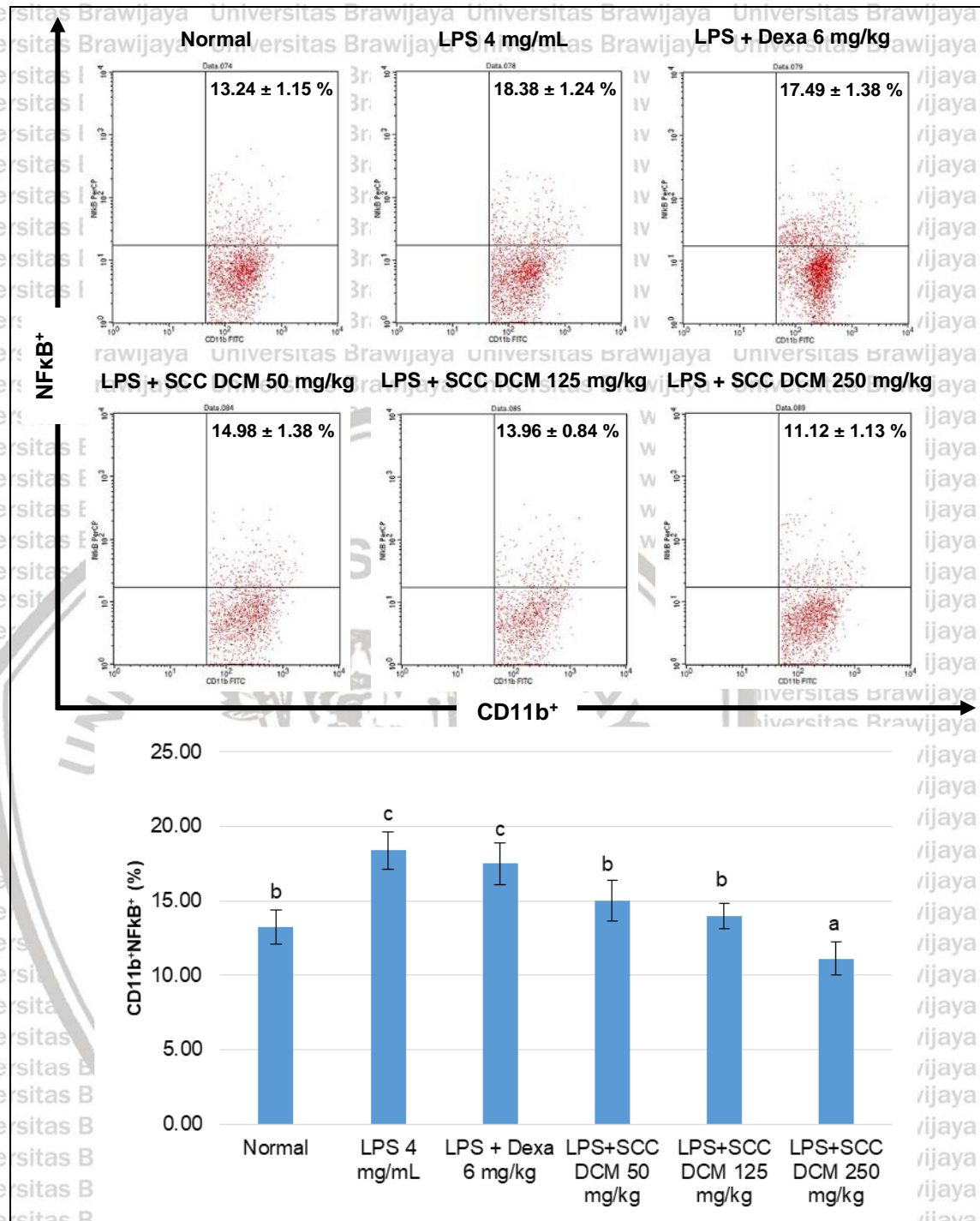


### 5.8.6 Pengaruh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap Jumlah Relatif NFkB Secara *In vivo* dan *In vitro*

NFkB merupakan faktor transkripsi penting yang meregulasi respon inflamasi. Faktor transkripsi NFkB berikatan dengan promotor protein mediator inflamasi sehingga mengakibatkan produksi dan sekresi sitokin pro-inflamasi (Schottelius & Dinter, 2006 dan Karin, 2006). Peranan NFkB dalam meregulasi respon inflamasi, tidak dapat dijelaskan hanya melalui pengujian *in vitro* pada kultur sel. Hal ini karena inflamasi merupakan proses fisiologis kompleks. Pada penelitian ini membuktikan peran penting NFkB dalam respon inflamasi karena menyebabkan terjadi peningkatan jumlah relatif NFkB pada mencit maupun pada kultur sel makrofag yang diinduksi LPS.

Hasil pengujian *in vivo* dengan analisis *flowcytometry* menunjukkan jumlah relatif NFkB meningkat pada mencit yang terinduksi LPS dibandingkan dengan jumlah relatif NFkB mencit normal ( $P < 0.05$ ). Namun, pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan dexamethasone dapat menurunkan jumlah relatif NFkB ( $P < 0.05$ ) (Gambar 5.25). Walaupun perlakuan konsentrasi ekstrak 50 mg/kg tidak berbeda nyata dengan konsentrasi ekstrak 125 mg/kg, dan perlakuan dexamethasone tidak berbeda nyata dengan perlakuan mencit yang hanya diinduksi LPS. Hasil analisis statistik pengujian *in vivo* pada Lampiran 11.

Hasil analisis uji tukey dari pengujian *in vivo* menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 50, 125 dan 250 mg/kg berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS. Perlakuan pemberian ekstrak 50 dan 125 mg/kg tidak berbeda nyata dengan perlakuan normal. Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 50, 125 dan 250 mg/kg dapat menurunkan jumlah NFkB mencit yang diinduksi LPS dan mendekati jumlah NFkB mencit normal.



Gambar 5.25. Penurunan Faktor Transkripsi NFκB (CD11b<sup>+</sup>NfκB<sup>+</sup>) oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vivo*

Lebih lanjut, dilakukan pengujian *in vitro* sebagai *overexpression* dari pengujian *in vivo* untuk membuktikan efikasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC)

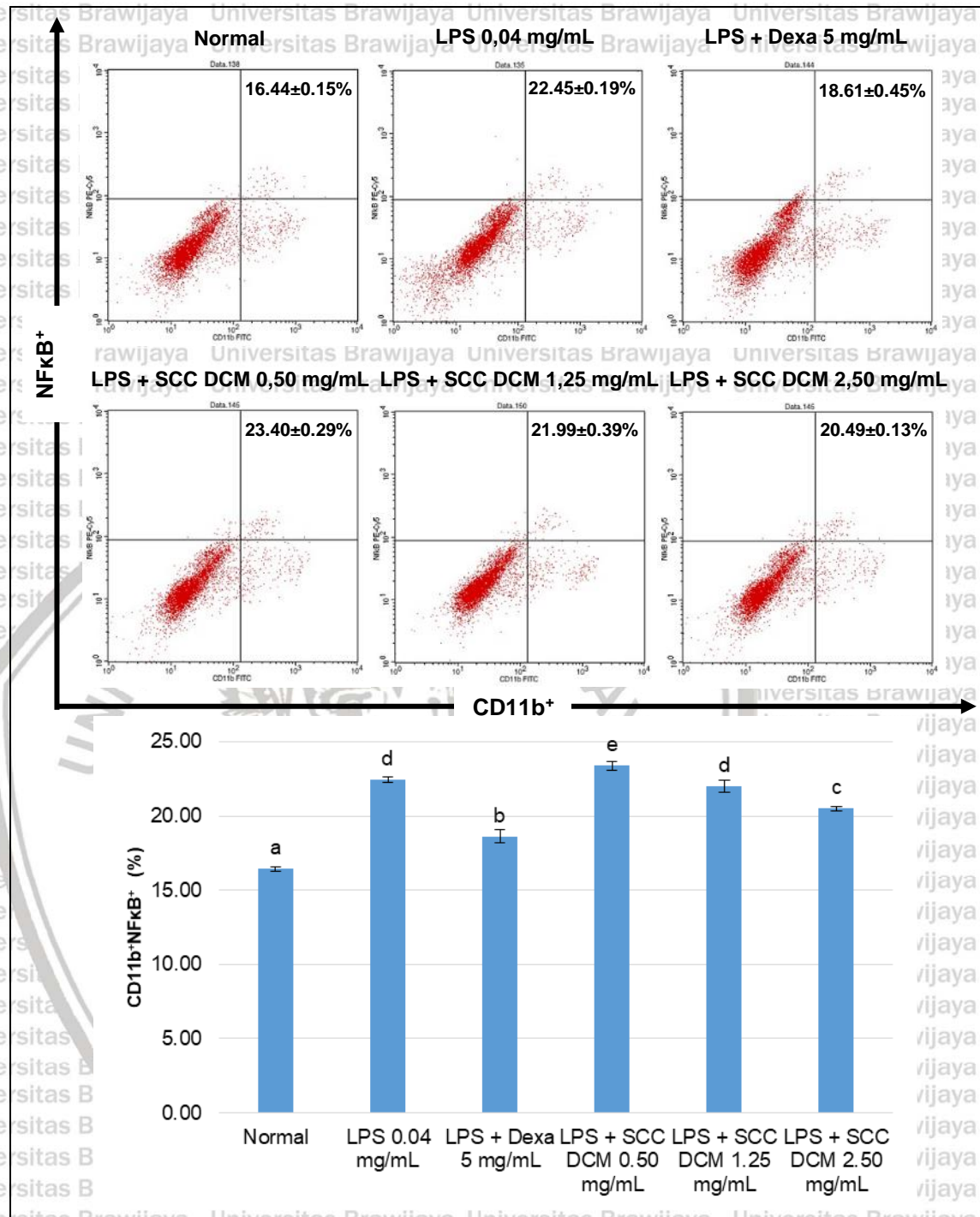
dalam menurunkan jumlah relatif NFκB. Hasil pengujian *in vitro* dengan analisis



*flowcytometry*, menunjukkan bahwa jumlah relatif NFκB secara signifikan meningkat pada mencit yang diinduksi LPS dibandingkan dengan mencit normal ( $P < 0.05$ ). Pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) juga dapat menurunkan jumlah relatif NFκB, khususnya pada konsentrasi 2.50 mg/mL ( $P < 0.05$ ). Sedangkan konsentrasi ekstrak 1.25 mg/mL tidak berbeda nyata dengan perlakuan hanya induksi LPS (Gambar 5.26). Perlakuan dexamethasone berbeda nyata dengan perlakuan mencit yang hanya diinduksi LPS. Hasil analisis statistik pengujian *in vitro* dapat dilihat pada Lampiran 12.

Hasil analisis uji tukey dari pengujian *in vitro* menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 0.50 dan 2.50 mg/mL berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS, sedangkan perlakuan ekstrak 1.25 mg/mL tidak berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS. Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 0.50 dan 1.25 belum dapat menurunkan jumlah NFκB, sedangkan pemberian ekstrak 2.50 mg/mL dapat menurunkan jumlah NFκB bila dibandingkan perlakuan LPS.

Hasil pengujian inhibitori aktivitas pelepasan NO menunjukkan bahwa fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dapat menghambat produksi NO melalui pengaturan tingkat transkripsi iNOS, dan molekul hulu pada sel makrofag yang diinduksi LPS. Terdapat sejumlah besar sisi pengikatan untuk faktor transkripsi pada wilayah yang mempromosikan iNOS, termasuk NFκB (A. K. Lee, Sung, Kim, & Kim, 2003). Faktor transkripsi NFκB bertanggungjawab dalam proses transkripsi untuk mempromosikan iNOS dengan stimulasi LPS (Q.-W. Xie, Kashiwabara, & Nathan, 1994). Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dapat menghambat aktivitas transkripsi dan translokasi nuclear dari NFκB pada sel makrofag yang diinduksi LPS. Penghambatan aktivasi NFκB oleh fraksi DCM diduga melalui penekanan fosforilasi dan degradasi IκB.



Gambar 5.26. Penurunan Faktor Transkripsi NFkB (CD11b<sup>+</sup>NFkB<sup>+</sup>) oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vitro*

Potensi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dalam menghambat inflamasi dibuktikan dengan aktivitasnya dalam mengurangi jumlah relatif NFkB. Reduksi NFkB dapat terjadi melalui ekspresi supresor IκBα yang efektif dalam menghambat

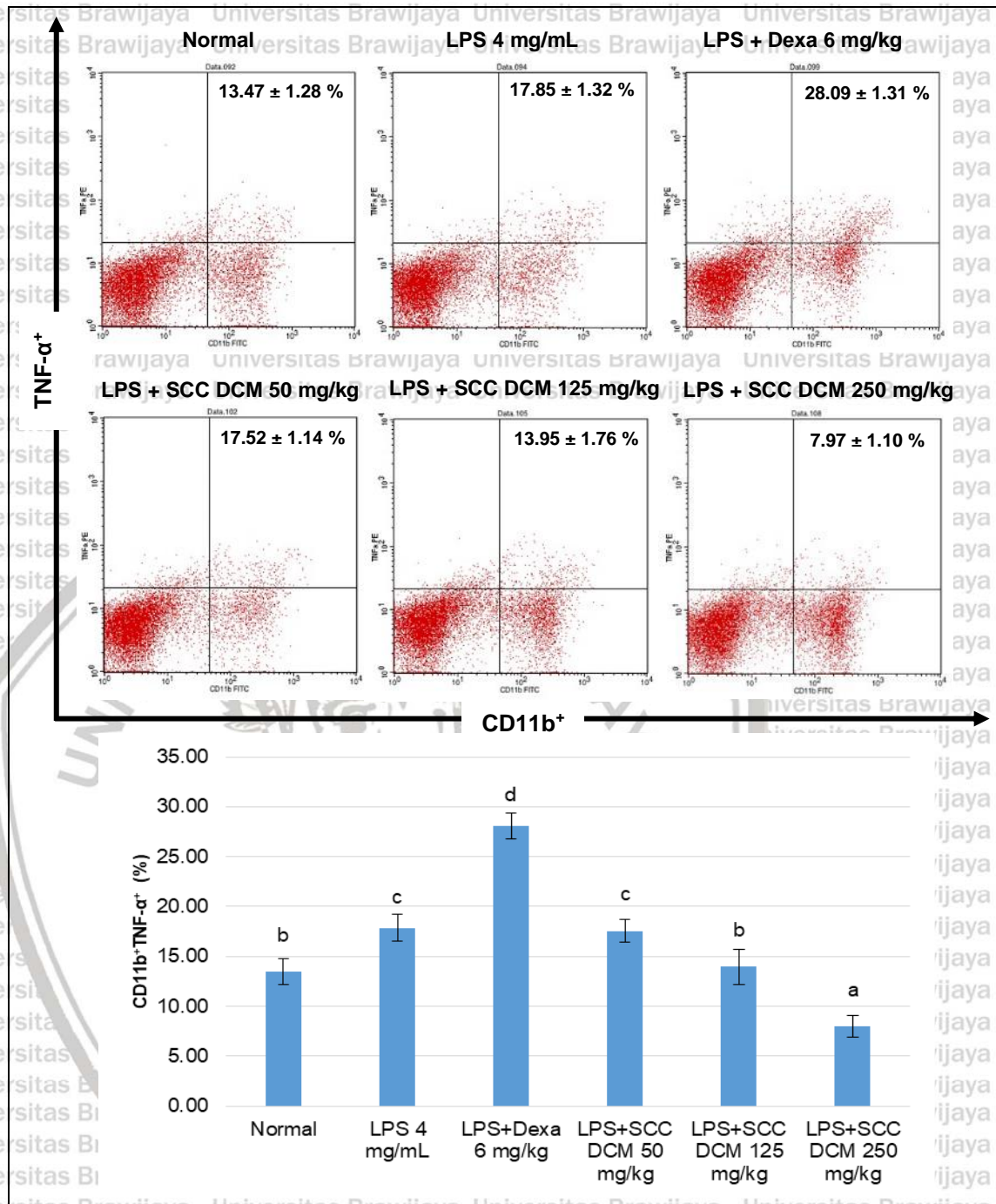


dan mengurangi produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-6. Senyawa bioaktif dalam ekstrak menunjukkan efek dalam penurunan aktivasi NF $\kappa$ B, hal ini diduga karena senyawa bioaktif pada ekstrak dapat menjaga integritas I $\kappa$ B $\alpha$  sehingga dapat menghambat translokasi NF $\kappa$ B menuju nukleus sel makrofag. Perlakuan induksi LPS pada penelitian ini menyebabkan peningkatan aktivasi NF $\kappa$ B secara signifikan bila dibandingkan dengan kontrol normal (tanpa induksi LPS). Hal ini sesuai dengan teori bahwa induksi LPS dapat menstimulasi aktivasi NF $\kappa$ B dan ekspresi molekul pro-inflamasi (Bremner & Heinrich, 2002).

#### **5.8.7 Pengaruh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap Jumlah Relatif Sitokin Pro-Inflamasi TNF- $\alpha$ dan IL-6 Secara *In vivo* dan *In vitro***

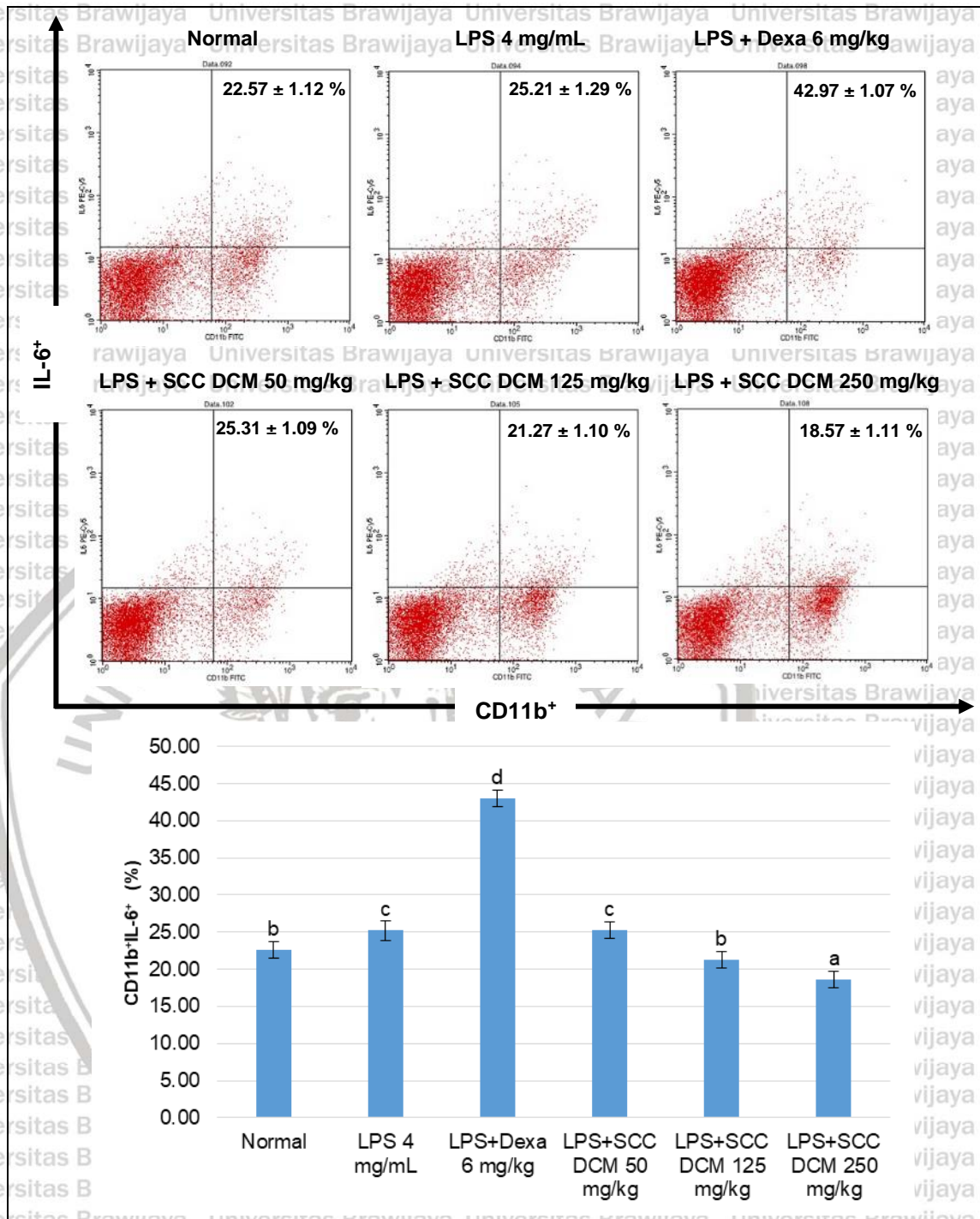
Penghambatan jumlah relatif NF $\kappa$ B diikuti dengan berkurangnya jumlah relatif sitokin pro-inflamasi TNF- $\alpha$  dan IL-6. Hasil pengujian *in vivo* dengan analisis *flowcytometry* menunjukkan jumlah relatif TNF- $\alpha$  dan IL-6 meningkat pada mencit yang terinduksi LPS dibandingkan dengan mencit normal ( $P < 0.05$ ). Namun, pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dapat menurunkan jumlah relatif TNF- $\alpha$  dan IL-6 ( $P < 0.05$ ) (Gambar 5.27 dan 5.28). Hasil analisis statistik pengujian *in vivo* dapat dilihat pada Lampiran 11.

Hasil analisis uji tukey dari pengujian *in vivo* TNF- $\alpha$  dan IL-6 menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 125 dan 250 mg/kg berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS, sedangkan perlakuan pemberian ekstrak 50 mg/kg tidak berbeda nyata. Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 125 dan 250 mg/kg dapat menurunkan jumlah TNF- $\alpha$  dan IL-6 mencit yang diinduksi LPS dan mendekati jumlah TNF- $\alpha$  dan IL-6 mencit normal.



Gambar 5.27. Penurunan Sitokin Pro-inflamasi TNF-α CD11b<sup>+</sup>TNF-α<sup>+</sup> oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vivo*





Gambar 5.28. Penurunan Sitokin Pro-inflamasi IL-6 CD11b<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup> oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vivo*

Lebih lanjut, dilakukan pengujian *in vitro* sebagai *overexpression* dari pengujian *in vivo* untuk membuktikan efikasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dalam menurunkan jumlah relatif TNF- $\alpha$  dan IL-6. Hasil pengujian *in vitro* dengan

analisis *flowcytometry*, menunjukkan bahwa jumlah relatif TNF- $\alpha$  dan IL-6 secara signifikan meningkat pada mencit yang diinduksi LPS dibandingkan dengan mencit normal ( $P < 0.05$ ). Pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) juga dapat menurunkan jumlah relatif TNF- $\alpha$  dan IL-6, khususnya pada konsentrasi 1,25 dan 2,50 mg/mL ( $P < 0.05$ ). Akan tetapi, pada pengujian IL-6, tidak menunjukkan perbedaan nyata dengan perlakuan hanya induksi LPS (Gambar 5.29 dan 5.30).

Hasil analisis statistik pengujian *in vitro* dapat dilihat pada Lampiran 12.

Hasil analisis uji tukey dari pengujian *in vitro* TNF- $\alpha$  dan IL-6 menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 1.25 dan 2.50 mg/mL berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS, sedangkan perlakuan ekstrak 0.50 mg/mL tidak berbeda nyata. Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 0.50 mg/mL belum dapat menurunkan jumlah TNF- $\alpha$  dan IL-6, sedangkan pemberian ekstrak 1.25 dan 2.50 mg/mL dapat menurunkan jumlah TNF- $\alpha$  dan IL-6 bila dibandingkan perlakuan LPS.

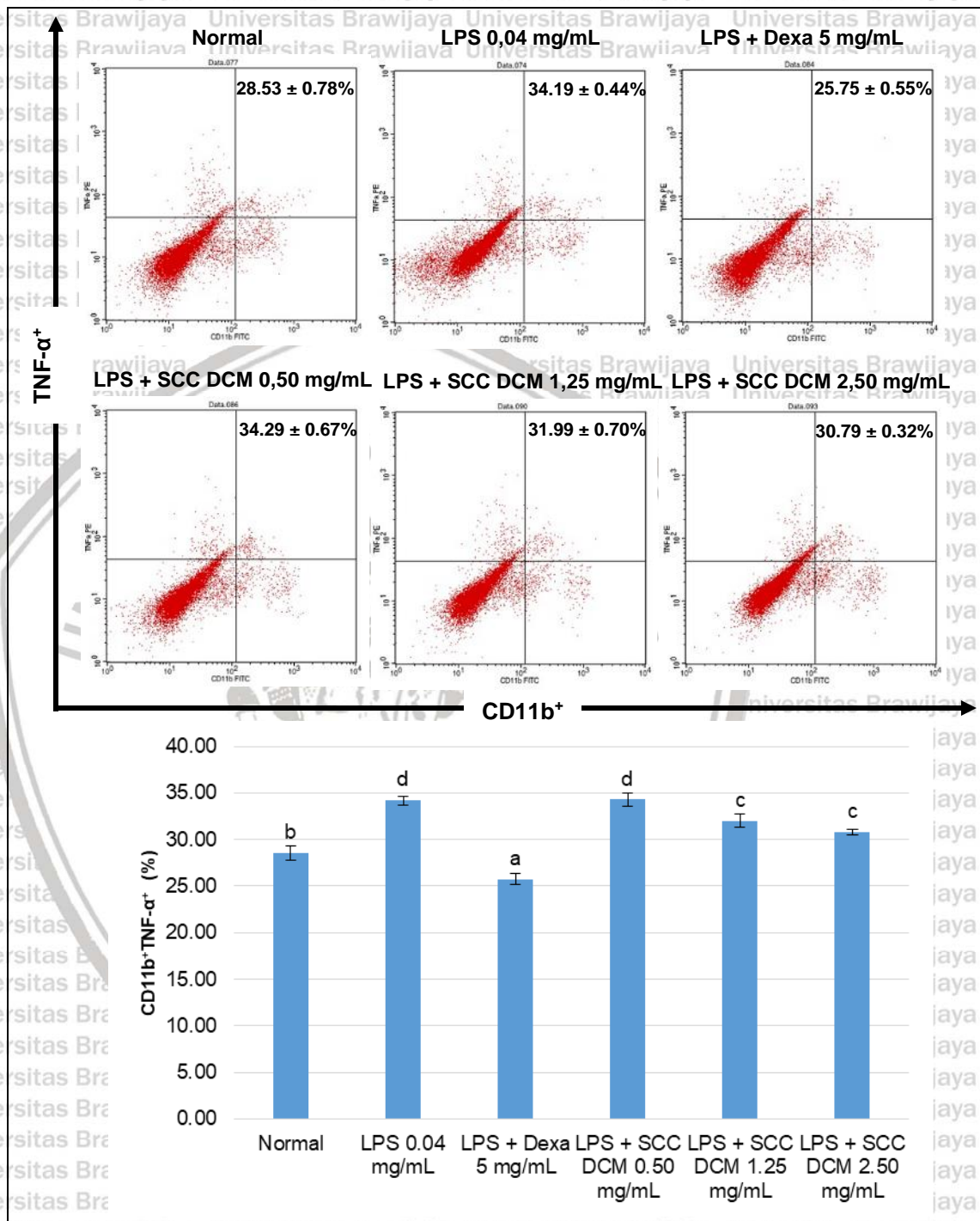
Sitokin pro-inflamasi, seperti TNF- $\alpha$  dan IL-6 memainkan peranan kunci dalam patofisiologi iskemia dan cedera reperfusi (Valen, Yan, & Hansson, 2001).

Jika dibandingkan dengan perlakuan pada mencit yang diinduksi LPS, mencit dengan perlakuan pemberian ekstrak dapat menekan peningkatan jumlah relatif TNF- $\alpha$  dan IL-6 setelah 6 jam induksi LPS.

TNF- $\alpha$  merupakan sitokin pro-inflamasi yang mengatur banyak sisi fungsi dari makrofag. TNF- $\alpha$  disekresikan dan dilepaskan setelah paparan LPS. TNF- $\alpha$  merupakan salah satu mediator awal yang jumlahnya paling melimpah dalam jaringan yang mengalami inflamasi (Feldmann, Brennan, Elliott, Williams, & Maini, 1995). Salah satu fungsi yang paling penting dari TNF- $\alpha$ , yaitu mengatur suatu produksi kaskade sitokin pro-inflamasi. Oleh karena itu, TNF- $\alpha$  dapat dianggap sebagai "master regulator" dari produksi sitokin pro-inflamasi lainnya (Maini, Elliott, Brennan, & Feldmann, 1995). Selain memproduksi sitokin pro-inflamasi, TNF- $\alpha$



juga meningkatkan mediator transduksi sinyal lipid seperti faktor yang mengaktifasi prostaglandin dan platelet (Vassalli, 1990).



Gambar 5.29. Penurunan Sitokin Pro-inflamasi TNF- $\alpha$  (CD11b<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>) oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vitro*

IL-6 merupakan sitokin pro-inflamasi dengan aktivitas biologis pleiotropik.

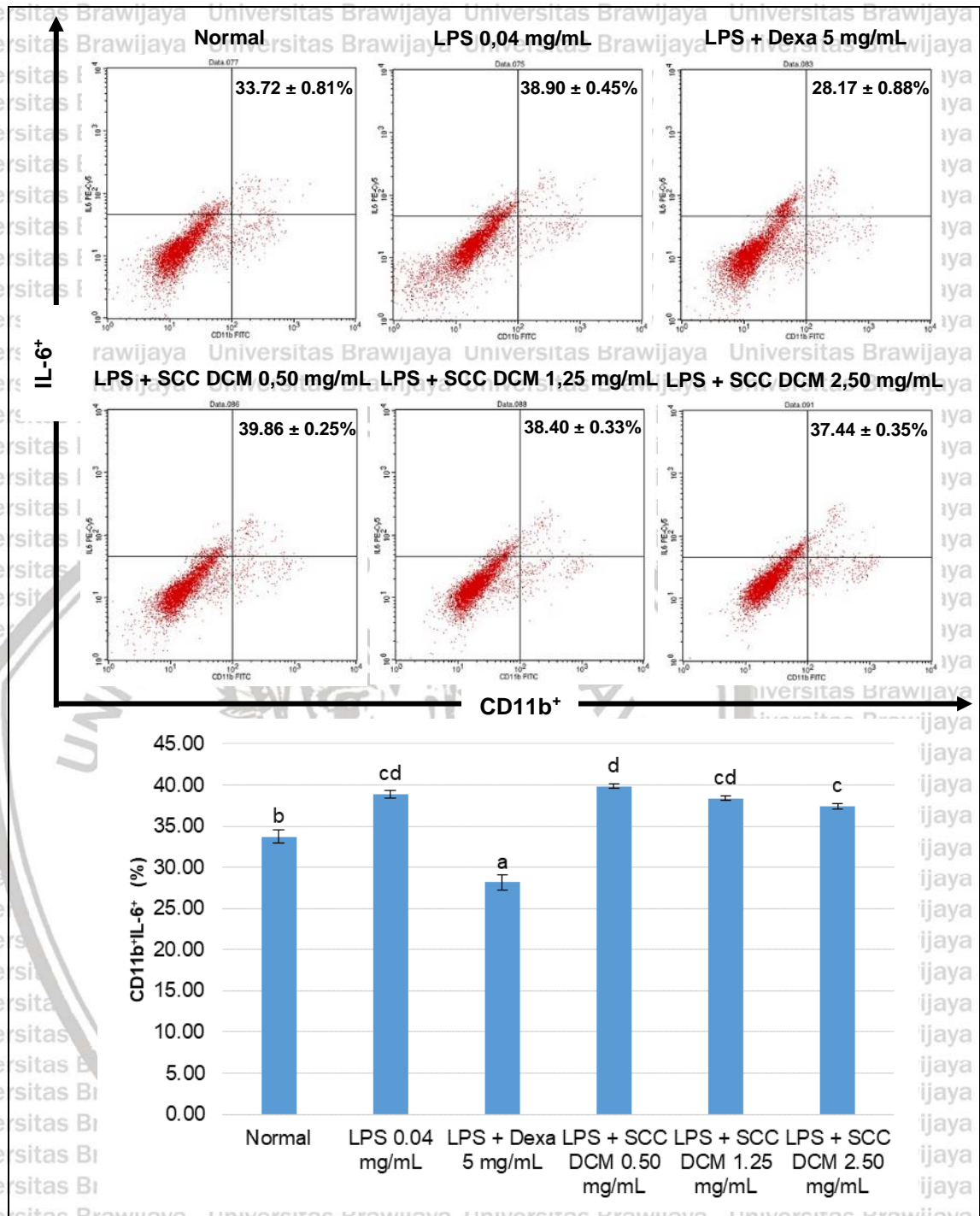
Jalur pensinyalan IL-6 mencakup dua molekul, reseptor spesifik untuk IL-6 dan glikoprotein permukaan sel yang disebut gp130 sebagai transduser sinyal (Hibi & Murakami, 1990). IL-6 mentransmisikan sinyalnya melalui pengikatan ke IL-6R yang terikat membran (mIL-6R) atau IL-6R yang dapat larut (sIL-6R) yang masing-masing disebut pensinyalan klasik dan pensinyalan sinyal. Ikatan IL-6 ke mIL-6R atau sIL-6R merekrut dua molekul gp130 yang diekspresikan di mana-mana dan menginduksi homodimerisasi mereka. Pembentukan kompleks reseptor fungsional IL-6, IL-6R, dan gp130 selanjutnya memicu jalur pensinyalan hilir melalui Janus kinase (JAK) yang mengarah pada regulasi faktor transkripsi termasuk STAT3 dalam sel target. sIL-6R yang dihasilkan oleh proteolisis terbatas mIL-6R atau splicing alternatif memainkan peran penting terutama dalam sel-sel yang tidak mengekspresikan mIL-6R.

Dalam serum pasien inflamasi kronis seperti rheumatoid arthritis, peningkatan kadar IL-6 dan sIL-6R terdeteksi dengan korelasi positif dengan keparahan penyakit rheumatoid arthritis dan kerusakan sendi radiologis (Kotake *et al.*, 1996 dan Kishimoto, 2005). Selain itu, kelebihan produksi IL-6 telah ditemukan di sel sinovial dan makrofag pada pasien inflamasi kronis (Dayer & Choy, 2009).

IL-6 berkontribusi pada induksi dan pemeliharaan proses autoimun melalui modulasi sel B dan diferensiasi sel Th17 (Navarro-millán, Singh, & Curtis, 2012).

IL-6 juga berperan dalam angiogenesis dengan menginduksi molekul adhesi intraseluler (ICAM-1) (Nakahara *et al.*, 2003).





Gambar 5.30. Penurunan Sitokin Pro-inflamasi IL-6 (CD11b<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup>) oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vitro*

IL-6 berfungsi sebagai mediator untuk pemberitahuan terjadinya beberapa reaksi imunologis. IL-6 dihasilkan dalam lesi yang terinfeksi dan mengirimkan sinyal peringatan ke seluruh tubuh. Tanda patogen eksogen, yang dikenal sebagai

*pathogen-associated molecular patterns*, dikenali dalam lesi yang terinfeksi oleh pathogen-recognition receptors (PRRs) dari sel-sel imun seperti monosit dan makrofag (H. Kumar, Kawai, & Akira, 2011). PRRs ini terdiri dari Toll-like receptors (TLRs), retinoic acid-inducible gene-1-like receptors, nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, and DNA receptors. Mereka menstimulasi berbagai jalur pensinyalan termasuk NF- $\kappa$ B dan meningkatkan transkripsi mRNA sitokin pro-inflamasi seperti IL-6, tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), dan IL-1 $\beta$ . TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  juga mengaktifkan faktor transkripsi untuk menghasilkan IL-6.

Pada penelitian ini, fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dapat menghambat peningkatan jumlah relatif IL-6, diduga karena ekstrak mampu meregulasi ketat sintesis IL-6 baik gen transkripsi maupun post-transkripsi. Diketahui sejumlah faktor transkripsi terbukti mengatur faktor transkripsi gen IL-6, salah satunya yaitu NF $\kappa$ B. Selain itu ekstrak juga diduga dapat menghambat stimulasi TNF yang pada akhirnya mengarah pada pencegahan aktivasi promotor IL-6 (Liebermann & Baltimore, 1990 dan Matsusaka *et al.*, 1993). Hasil penelitian Lillsunde *et al.* (2014) menunjukkan senyawa bioaktif karang lunak *Sinularia kavarattiensis*, dapat menghambat jumlah TNF- $\alpha$  dan IL-6. Oleh karena itu, penghambatan level TNF- $\alpha$  dan IL-6 dapat menjadi salah satu jalan dalam pengembangan mekanisme pencegahan dan pengobatan patogenesis inflamasi.

#### **5.8.8 Pengaruh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap Jumlah MDA, SOD, HO-1 dan Nrf-2 Secara *In vivo***

Hasil penelitian sebelumnya membuktikan induksi LPS dapat menyebabkan pengembangan dan perkembangan cedera hati (Soares, Pimentel-Nunes, Roncon-Albuquerque Jr, & Leite-Moreira, 2010; Nolan, 2010 dan Gao, Cui, Wang, & Wang, 2013). Eksperimen klinis pada hewan uji menunjukkan bahwa



tingkat LPS dalam plasma dapat dikaitkan dengan fibrosis dan sirosis (Lin *et al.*, 1995 dan Chan *et al.*, 1997).

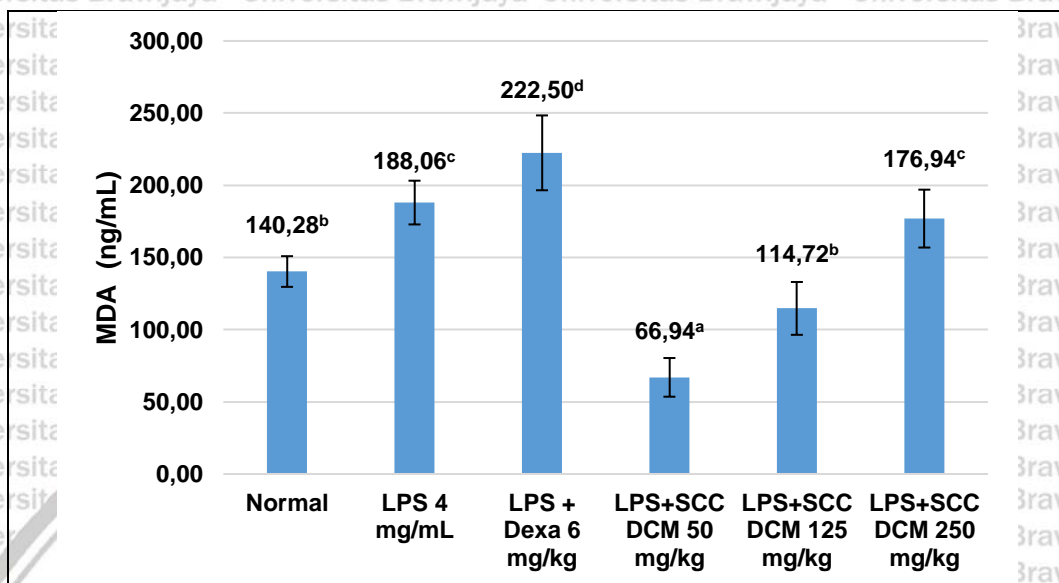
Hasil pengujian juga menunjukkan induksi LPS dapat meningkatkan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-6. Peningkatan jumlah TNF- $\alpha$  dan IL-6 berkontribusi terhadap cedera hati dengan berkurangnya antioksidan intraseluler, dan menyebabkan peroksidasi lipid dan kerusakan oksidatif (Sun *et al.*, 2006 dan Sebai, Ben-attia, Sani, Aouani, & Ghanem-Boughanmi, 2008). Senyawa bioaktif pada karang lunak diduga memiliki efek antioksidan yang berperan penting dalam perlindungan dari kerusakan oksidatif.

Penelitian ini mengevaluasi efek senyawa bioaktif karang lunak terhadap stres oksidatif, yaitu dengan mengevaluasi *Oxidative Stress Response Element* MDA dalam serum mencit dan aktivitas *Antioxidant Response Element* SOD, HO-1 dan Nrf-2 dalam sel hepar mencit. Hasil pengujian menunjukkan level MDA meningkat pada mencit yang terinduksi LPS dibandingkan dengan mencit normal ( $P < 0.05$ ) (Gambar 5.31), sedangkan jumlah relatif SOD berkurang pada mencit yang diinduksi LPS ( $P < 0.05$ ). Namun, pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) menurunkan jumlah MDA (ng/mL), dan meningkatkan jumlah relatif SOD bila dibandingkan dengan perlakuan induksi LPS ( $P < 0.05$ ) (Gambar 5.32).

Hasil analisis uji tukey dari pengujian MDA menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 50 dan 125 mg/kg berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS, sedangkan perlakuan pemberian ekstrak 250 mg/kg tidak berbeda nyata. Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 50 dan 125 mg/kg dapat menurunkan jumlah MDA mencit yang diinduksi LPS dan mendekati jumlah MDA mencit normal.

Hasil analisis uji tukey dari pengujian SOD menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 50, 125 dan 250 mg/kg berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS. Hal

ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 50, 125 dan 250 mg/kg dapat meningkatkan jumlah SOD mencit yang diinduksi LPS dan mendekati jumlah SOD mencit normal.

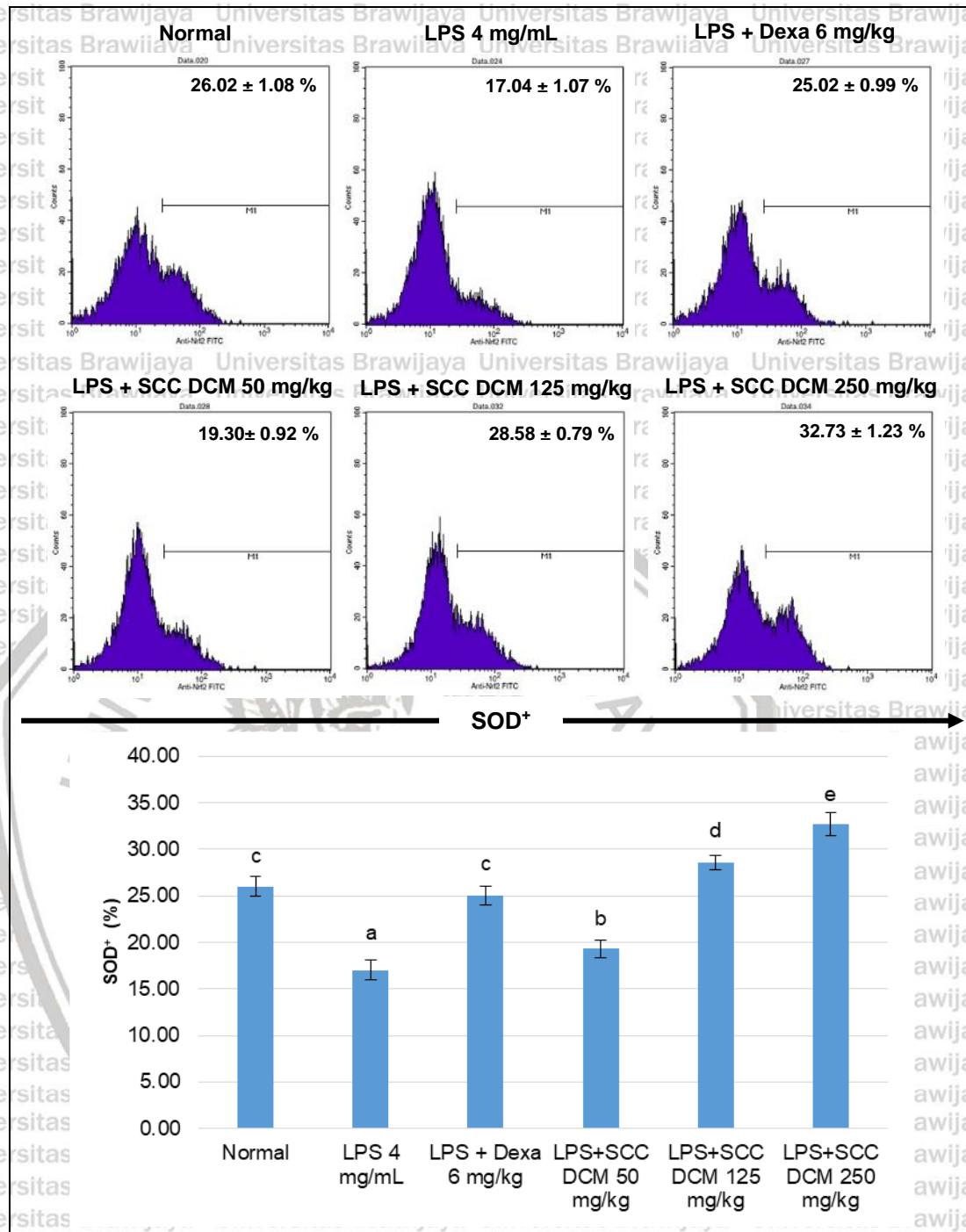


Gambar 5.31. Penurunan *Oxidative Stress Response Element* MDA oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vivo*

Lebih lanjut, dilakukan pengujian untuk mengetahui jumlah relatif *Antioxidant Response Element* (ARE) seperti HO-1 dengan analisis *flowcytometry*, dan diamati bahwa ekspresi HO-1 secara signifikan meningkat pada mencit yang diberi perlakuan ekstrak konsentrasi 125 mg/kg bila dibandingkan dengan mencit yang hanya diinduksi LPS ( $P < 0.05$ ) (Gambar 5.33).

Hasil analisis uji tukey dari pengujian HO-1 menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 125 dan 250 mg/kg berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS. Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 125 dan 250 mg/kg dapat meningkatkan jumlah HO-1 mencit yang diinduksi LPS.





Gambar 5.32. Peningkatan *Antioxidant Response Element* SOD oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vivo*

Untuk mengeksplorasi lebih lanjut mekanisme kerja fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) pada cedera hati yang diinduksi LPS, dievaluasi juga jumlah relatif ARE seperti Nrf-2 dengan analisis *flowcytometry*. Hasil penelitian

menunjukkan bahwa jumlah relatif Nrf-2 pada mencit perlakuan ekstrak khususnya, konsentrasi 125 mg/kg meningkat bila dibandingkan pada perlakuan mencit yang diinduksi LPS dan dibandingkan dengan mencit normal ( $P < 0.05$ ) (Gambar 5.34). Walaupun pada perlakuan konsentrasi ekstrak 250 mg/kg terjadi penurunan jumlah relatif HO-1 dan Nrf-2, tetapi jumlah relatif penurunannya lebih kecil daripada perlakuan mencit yang hanya diinduksi LPS. Hasil analisis statistik pengujian MDA, SOD, HO-1 dan Nrf-2 dapat dilihat pada Lampiran 11.

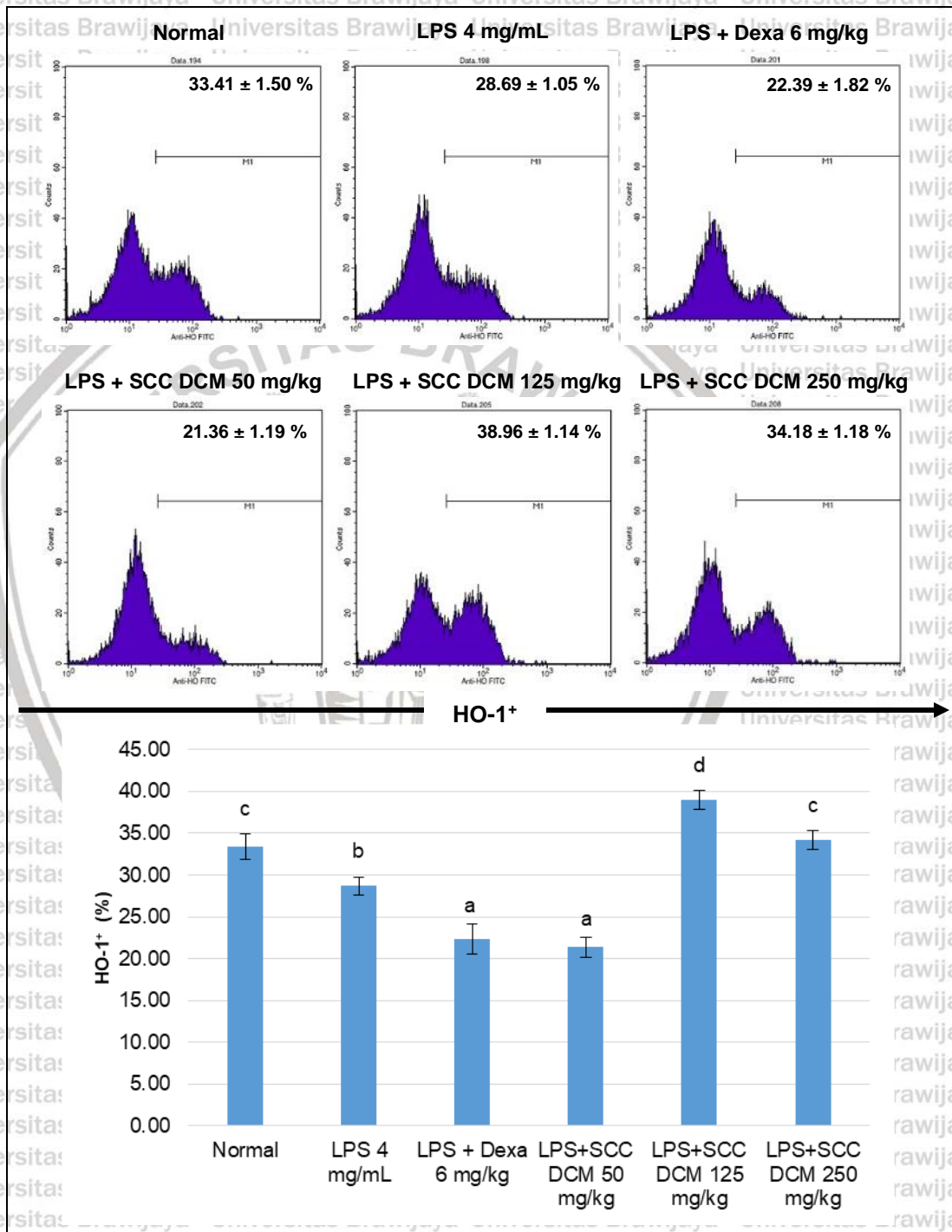
Hasil analisis uji tukey dari pengujian Nrf-2 menunjukkan perlakuan LPS berbeda nyata dengan perlakuan mencit normal. Perlakuan konsentrasi ekstrak 125 dan 250 mg/kg berbeda nyata dengan perlakuan mencit induksi LPS. Hal ini berarti bahwa dengan pemberian ekstrak 125 dan 250 mg/kg dapat meningkatkan jumlah Nrf-2 mencit yang diinduksi LPS.

Pada perlakuan pemberian dexamethasone menunjukkan peningkatan level MDA (Gambar 5.31), yang berimplikasi pada penurunan jumlah relatif HO-1 dan Nrf-2 (Gambar 5.33 dan 5.34). Hal ini menunjukkan dexamethasone memberikan efek stres oksidatif jika berlebihan, sehingga mengarah pada penurunan *antioxidant response element* (ARE), HO-1 dan Nrf-2.

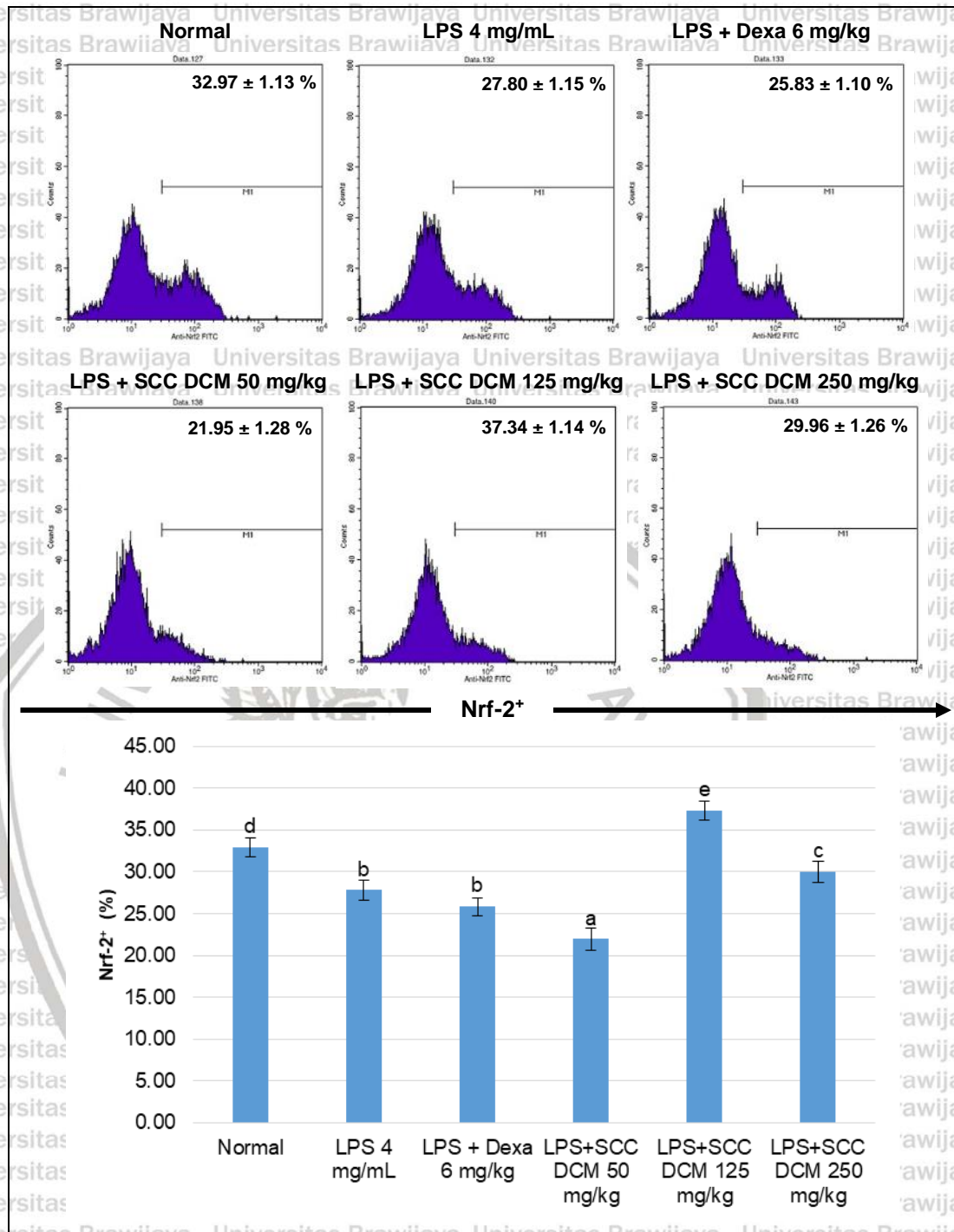
Hasil penelitian Y. Feng & Tang (2014) menunjukkan bahwa dexamethasone dapat menginduksi produksi berlebihan *reactive oxygen species* (ROS), sehingga menyebabkan stres oksidatif pada kultur irisan hippocampal mencit. Hal ini diduga karena paparan dexamethasone menginduksi stres oksidatif yang mengarah pada penurunan ekspresi Cbfa1 mRNA. Cbfa1 merupakan protein penanda osteoblas (sel mesenkimal yang bertanggung jawab dalam pembentukan dan perkembangan tulang) (Valko *et al.*, 2007). Faktor transkripsi Cbfa1 merupakan mediator kritis fenotip osteoblas dan memainkan peran penting dalam proses diferensiasi dan fungsi osteoblas dengan mengatur gen, seperti osteocalcin, osteopontin, dan sialoprotein tulang, yang penting dalam mengikat sel



ke garis turunan osteoblast (Visioli, Riso, Grande, Galli, & Porrini, 2003). Cbfa1 juga berperan sebagai protektif terhadap osteoporosis pada wanita pascamenopause dengan mengatur kepadatan mineral tulang (Devaraj *et al.*, 2008).



Gambar 5.33. Peningkatan *Antioxidant Response Element* HO-1 oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vivo*



Gambar 5.34. Peningkatan *Antioxidant Response Element* Nrf-2 oleh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) secara *In Vivo*

Dalam penelitian ini, mengevaluasi efek fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) pada cedera hati yang diinduksi LPS. Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi DCM dapat mengurangi cedera hati akut yang diinduksi LPS dengan mengurangi



stres oksidatif dan respon inflamasi. Fraksi DCM dapat menurunkan level MDA dan meningkatkan jumlah relatif SOD, HO-1 dan Nrf-2.

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan LPS berperan penting dalam patogenesis infeksi (Westphal *et al.*, 2003), dan penelitian ini mengkonfirmasi bahwa perlakuan konsentrasi LPS menyebabkan kerusakan hati pada mencit (Ferluga & Allison, 1978). LPS mengakibatkan cedera jaringan karena respon inflamasi berlebihan, peningkatan stres oksidatif dan kerusakan mitokondria (Lowes, Webster, Murphy, & Galley, 2013). Sel-sel K pffer yang diaktifkan oleh LPS berinteraksi dengan Toll-like receptor 4 (TLR-4) dapat secara berlebihan melepaskan sitokin pro-inflamasi dan menghasilkan sejumlah besar ROS, yang memicu apoptosis sel-sel hati, bahkan nekrosis (Y. Wang, Gao, Cui, & Jiang, 2014). Oleh karena itu, stres oksidatif dan patogenitas inflamasi terlibat dalam cedera hati yang diinduksi LPS (Ajuwon, Oguntibeju, & Marnewick, 2014). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa berbagai antioksidan dapat mencegah cedera hati yang diinduksi LPS dan stres oksidatif (Kao *et al.*, 2009;  zkaya & Nazrolu, 2010; dan Park, Cheenpracha, Chang, & Pezzuto, 2011).

Stres oksidatif memiliki ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan seperti konsumsi antioksidan yang berlebihan dan produksi ROS yang berlebihan (Klein, Neuhaus, Reutter, & Nusing, 2001). Superoksida, salah satu ROS yang paling umum, ditransformasikan menjadi hidrogen peroksida yang dikatalisis oleh SOD, kemudian lebih lanjut menjadi hidrogen peroksida menjadi air oleh peroksidase seperti katalase dan glutathion peroksidase (Brown, Cox, & Hampton, 2010). Berkurangnya enzim antioksidan seperti SOD, katalase dan glutathion peroksidase menyebabkan produksi berlebih dari ROS termasuk superoksida, yang merusak makromolekul dan meningkatkan lipid peroksida (Sewerynek, Melchiorri, Chen, & Reiter, 1995).



Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) mampu meningkatkan *antioksidant response element* (ARE), SOD, HO-1 dan NrF-2 dan menurunkan level *Oxidative Stress Response Element* MDA. Hal ini diduga senyawa bioaktif fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dapat mengatur sistem transkripsi dan jalur pensinyalan sel.

Pelepasan sitokin pro-inflamasi yang berlebihan terlibat dalam berbagai penyakit akut dan kronis seperti trauma, sepsis, dan penyakit vaskular kronis (Popa, Netea, Van Riel, Van Der Meer, & Stalenhoef, 2007). Sitokin pro-inflamasi terlibat dalam patogenesis cedera hati akut dan kronis (Nolan, 2010). Pada penyakit hati non-alkoholik, sitokin pro-inflamasi yang diinduksi oleh LPS memperburuk cedera hati dengan mempercepat apoptosis sel-sel hati, dan terkait erat dengan keparahan cedera hati (Fukui, 2005). Penelitian ini juga menunjukkan bahwa pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dapat menurunkan jumlah relatif TNF- $\alpha$  dan IL-6. Penelitian sebelumnya mengkonfirmasi bahwa senyawa bioaktif karang lunak dapat melemahkan respon inflamasi, dengan mengurangi level TNF- $\alpha$  (Takaki, Koganemaru, Iwakawa, Higuchi, & Miyamoto, 2003) dan NF $\kappa$ B (Yang *et al.*, 2012).

Hasil-hasil penelitian membuktikan bahwa respons inflamasi dan stres oksidatif sangat erat kaitannya. Telah dilaporkan bahwa ROS dihasilkan dari sitokin pro-inflamasi yang diatur oleh stres oksidatif dari pensinyalan NF $\kappa$ B (Naik & Dixit, 2011). Faktor transkripsi NF $\kappa$ B dapat diaktifkan dalam keadaan stres oksidatif. NF $\kappa$ B teraktivasi mengatur pengkodean berbagai gen seperti sitokin pro-inflamasi, dan kemokin melalui peningkatan regulasi iNOS, yang menyebabkan respon inflamasi (Pahl, 1999). Telah dilaporkan bahwa LPS mengatur respon inflamasi dengan mengaktifkan NF $\kappa$ B (Hayden & Ghosh, 2008). Mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) terlibat dalam respon inflamasi yang diinduksi LPS (Jang, Kim, Kim, Jeong, & You, 2006). ERK



diaktivasi oleh translokasi fosforilasi yang memediasi NF- $\kappa$ B menjadi nuklir, dan iNOS (E. D. Chan & Riches, 2001 dan Kregel & Zhang, 2007).

iNOS sangat penting untuk regulasi pensinyalan inflamasi, dan dianggap sebagai salah satu target pengobatan. iNOS dapat mengkatalisasi sintesis prostaglandin (Gookin *et al.*, 2004; Dahiya, Pandey, Bhatt, & Sodhi, 2010; dan S. F. Kim, 2011), yang memainkan peran penting dalam berbagai proses fisiologis.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa prostaglandin terlibat dalam pembentukan sitokin pro-inflamasi (Rola-Pleszczynski & Stankova, 1992).

HO-1 merupakan *antioksidant response element*, yang dapat menguraikan heme menjadi biliverdin, karbon monoksida (CO), dan zat besi bebas. Produk katalitik HO-1 seperti biliverdin dan CO telah terbukti memiliki sifat antioksidan (Stocker, Yamamoto, McDonagh, Glazer, & Ames, 1984) (Ryter, Alam, & Choi, 2006), dan CO dapat mengurangi respon inflamasi dan apoptosis sel (X. M. Wang, Kim, Nakahira, Ryter, & Choi, 2009; Lancel *et al.*, 2009; dan Chhikara *et al.*, 2009). Studi lebih lanjut menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi HO-1 mengurangi kerusakan stres oksidatif pada sel dan jaringan (Kapturczak *et al.*, 2004 dan Morse, Lin, Choi, & Ryter, 2009). Hasil penelitian sebelumnya melaporkan bahwa CO memberikan efek anti-inflamasi dengan memodulasi sinyal inflamasi termasuk NF $\kappa$ B, dan melemahkan respons inflamasi yang diinduksi LPS melalui pengurangan NF $\kappa$ B (Sarady, Otterbein, Liu, Otterbein, & Choi, 2002 dan Morse *et al.*, 2003).

Nrf-2 merupakan faktor transkripsi penting yang memediasi ekspresi berbagai antioksidan termasuk HO-1 dan SOD (Nguyen, Nioi, & Pickett, 2009 dan Choi *et al.*, 2016). Pada kondisi stres oksidatif, Nrf-2 yang teraktivasi mentranslokasi ke dalam nukleus, dan memodulasi ekspresi gen terkait antioksidan pada level transkripsional (Johnson *et al.*, 2008). Nrf-2 memainkan peran penting dalam sistem pertahanan antioksidan dengan mengurangi respon



inflamasi dan stres oksidatif (Hwang & Jeong, 2010). Dalam penelitian ini, data menunjukkan bahwa pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dapat meningkatkan jumlah relatif Nrf2, dan penurunan ekspresi iNOS dan fosforilasi NFκB. Hasil pengujian ini menunjukkan bahwa diduga efek perlindungan fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap cedera hati yang diinduksi LPS dapat dikaitkan dengan penekanan NFκB/iNOS oleh aktivasi Nrf-2/HO-1.

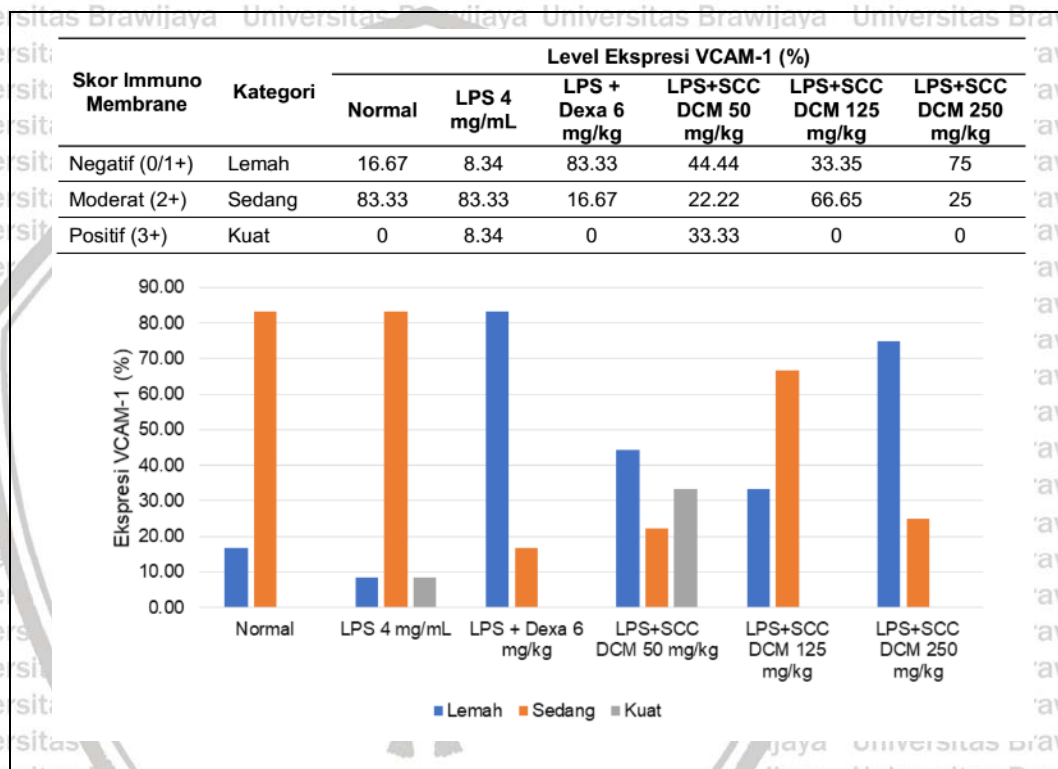
Hasil pengujian terhadap *antioxidant response element* menunjukkan bahwa fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) diduga dapat melindungi hati terhadap cedera akibat LPS. Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) diduga memberikan efek yang menguntungkan dengan mengurangi *Oxidative Stress Response Element* MDA dan kerusakan akibat inflamasi, yang mungkin terkait dengan upregulasi jalur pensinyalan Nrf2/HO-1, dan penghambatan pensinyalan inflamasi yang diaktifkan LPS (NFκB/iNOS). Meskipun mekanisme jalur yang tepat membutuhkan penelitian lebih lanjut, hasil penelitian ini dapat menjadi landasan dalam mengeksplorasi efek fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) untuk mencegah dan mengobati inflamasi serta cedera hati akut.

#### **5.8.9 Pengaruh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap Ekspresi Cell Adhesion Molecules (VCAM-1 dan ICAM-1) Pada Mencit yang Diinduksi LPS**

Aktivasi faktor transkripsi NFκB dapat mengakibatkan upregulasi sejumlah gen, termasuk growth factor, yaitu vascular endothelial growth factor (VEGF), sitokin-sitokin pro-inflamasi (TNF-α, IL-1β, IL-6, RAGE), molekul adesi sel (VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin), dan iNOS (Hernani, 2008). Pada penelitian ini, induksi LPS mengakibatkan peningkatan jumlah relatif faktor transkripsi NFκB, sehingga dapat mempengaruhi ekspresi dari molekul adesi sel dan iNOS.



Hasil pengujian *in vivo* berdasarkan analisis IHK dengan ImmunoMembrane pada mencit yang diinduksi LPS menunjukkan ekspresi VCAM-1 meningkat pada otak mencit yang terinduksi LPS dibandingkan dengan otak mencit normal (Gambar 5.35). Namun, pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan dexamethasone dapat mengurangi ekspresi VCAM-1 (Gambar 5.36). Walaupun perlakuan konsentrasi ekstrak 50 mg/kg belum dapat menekan ekspresi VCAM-1 dengan baik.

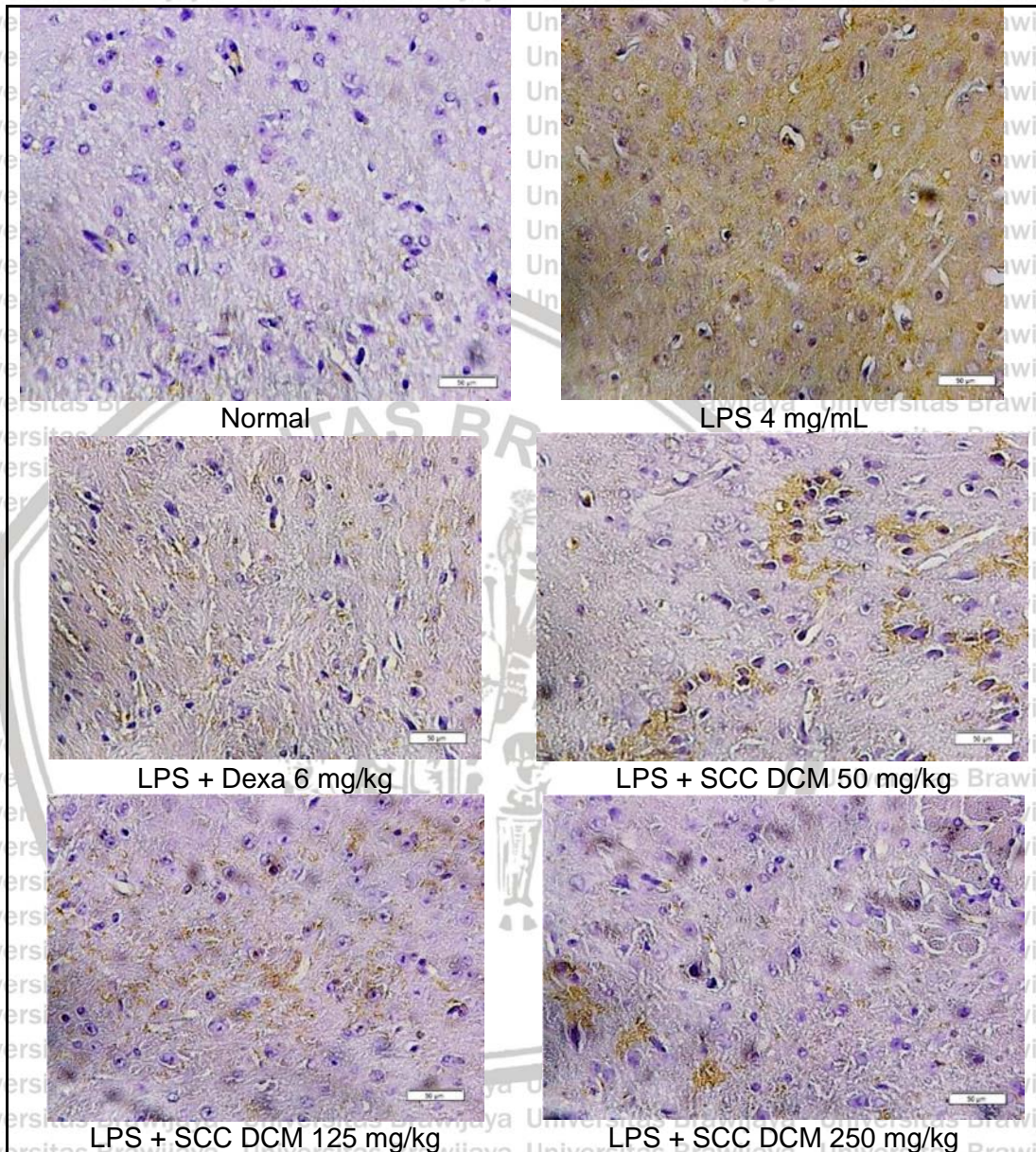


Gambar 5.35. Efek Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap Ekspresi VCAM-1 dengan analisis ImmunoMembrane

Lebih lanjut, induksi LPS pada mencit juga mengakibatkan peningkatan ekspresi ICAM-1 pada otak mencit, bila dibandingkan dengan otak mencit normal (Gambar 5.37). Pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan dexamethasone dapat mengurangi ekspresi ICAM-1 (Gambar 5.38). Akan tetapi, perlakuan konsentrasi ekstrak 250 mg/kg menstimuli peningkatan ekspresi ICAM-1. Hal ini diduga, karena ekstrak dengan konsentrasi 250 mg/kg dapat

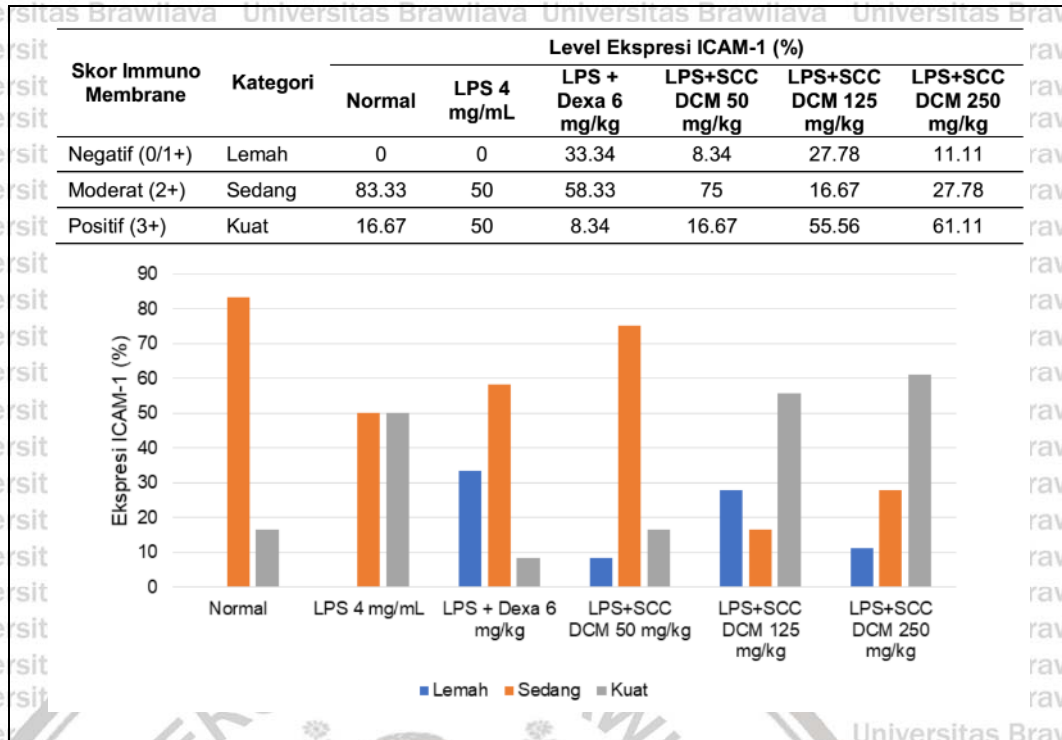


meningkatkan stres oksidatif (MDA), sehingga dapat meningkatkan interaksi leukosit dan endothelium yang memicu perkembangan respon inflamasi (Sumagin, Lomakina, & Sarelius, 2008).



Gambar 5.36. Ekspresi VCAM-1 pada Otak Mencit yang Terinduksi LPS (Pembesaran 400x; 1 bar = 50µm; Lokasi pengamatan: cerebral korteks; Lokasi ekspresi: sel endotel di sekitar pembuluh darah; Warna Kecoklatan Menunjukkan Ekspresi VCAM-1)





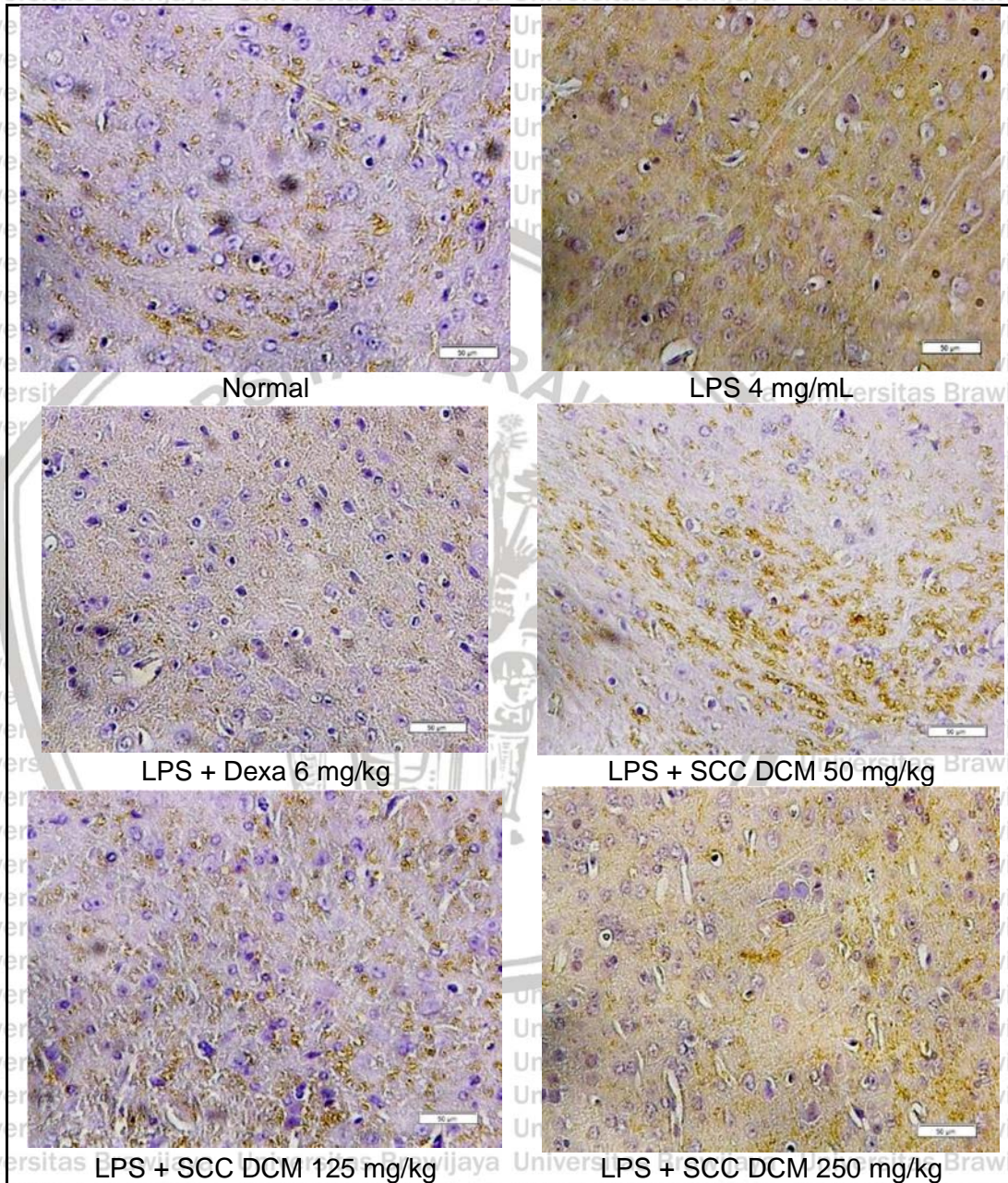
Gambar 5.37. Efek Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap Ekspresi ICAM-1 dengan analisis ImmunoMembrane

Penelitian ini juga mengevaluasi mekanisme sel adhesi molekul (VCAM-1 dan ICAM-1) akibat induksi LPS. LPS merupakan glikolipid utama dari membrane luar bakteri gram negatif yang dapat menyebabkan respon biologi seperti apoptosis dan respon inflamasi. Inflamasi merupakan reaksi kompleks pada sistem imun bawaan dalam jaringan vaskuler, dengan memicu aktivitas dan akumulasi leukosit serta plasma di bagian yang terinfeksi dan atau bagian yang cedera. Walaupun respon inflamasi berperan dalam meregulasi infeksi dan apoptosis sel, namun respon inflamasi berlebih dapat berakibat patogenitas, merusak jaringan dan menyebabkan penyakit (Tucker Collins *et al.*, 1995).

Molekul yang mengatur rekrutmen leukosit seperti VCAM-1 dan ICAM-1 telah menjadi fokus perhatian dalam mengatasi respon inflamasi (Jafarian *et al.*, 2017). Rekrutmen leukosit dapat menyebabkan berkurangnya respon cedera jaringan pada inflamasi hewan uji, setelah aktivasi ekspresi cell adhesi



molecules, antara lain VCAM-1 dan ICAM-1 (Podolsky *et al.*, 1993; Picarella *et al.*, 1997; dan Pane's & Granger, 1998). Tetapi rekrutmen leukosit yang diperantai oleh ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1 secara berlebihan dapat berimplikasi dalam patogenesis inflamasi yang berlebihan juga.



Gambar 5.38. Ekspresi ICAM-1 pada Otak Mencit yang Terinduksi LPS (Pembesaran 400x; 1 bar = 50µm; Lokasi pengamatan: cerebral korteks; Lokasi ekspresi: sel endotel di sekitar pembuluh darah; Warna Kecoklatan Menunjukkan Ekspresi ICAM-1)



Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan dexamethasone dapat menekan peningkatan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1 yang disebabkan oleh induksi LPS pada jaringan otak mencit. Efek pengurangan ekspresi VCAM-1 pada konsentrasi ekstrak 125 mg/kg dan ICAM-1 pada konsentrasi ekstrak 50 mg/kg, diketahui pemberian dexamethasone juga memberikan efek penghambatan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1.

Senyawa bioaktif karang lunak yang terdeteksi dengan LCMS merupakan turunan dari kelompok terpenoid dan steroid. Hasil analisis *in silico* menunjukkan bahwa senyawa-senyawa volatile yang terdeteksi pada ekstrak kasar *Sarcophyton* sp. (SCC) menunjukkan peran sebagai anti-inflamasi steroid. Senyawa turunan steroid seperti kortikosteroid telah berhasil digunakan untuk mengobati patogenitas inflamasi dari level sedang sampai berat sejak 1950-an. Meskipun cara kerja kortikosteroid tetap tidak terdefinisi, ada banyak bukti dalam literatur yang berimplikasi pada interaksi *leucocyte-endothelial cell adhesion* sebagai target utama untuk senyawa turunan steroid. Model *leucocyte-endothelial cell adhesion* baik secara *in vitro* (Cronstein, Kimmeli, Levin, Martiniuk, & Weissmann, 1992 dan Aziz & Wakefield, 1996) maupun *in vivo* (McCafferty, Granger, & Wallace, 1995 dan Klemm, Harris, & Perretti, 1995), telah mengungkapkan efek anti-adhesif dari pengobatan dengan senyawa turunan steroid.

Perlakuan dexamethasone menunjukkan kemampuan pengurangan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1. Taylor, Flower, & Perretti (1997) melaporkan pemberian dexamethasone menunjukkan efek pengurangan (sekitar 50%) dari pelekatan leukosit dan efek yang lebih mendalam (lebih dari 90%) pada migrasi leukosit pada vena mesenterika tikus yang distimulasi dengan IL-1 $\beta$ .

Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan dexamethasone dapat menghambat ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1 yang diinduksi sitokin pro-inflamasi. Efek penghambatan ini diduga, karena kemampuan ekstrak dan dexamethasone



dalam menghambat aktivasi faktor transkripsi nuklir NFkB (Brostjan, Anrather, Csizmadia, Natarajan, & Winkler, 1997), yang ditemukan di wilayah promotor dari gen yang mengkode VCAM-1 dan ICAM-1 (T Collins, 1993).

Dari serangkaian pengujian yang sudah dilakukan, fraksi DCM *Sarcophyton* sp. menghambat pelepasan sitokin pro-inflamasi TNF- $\alpha$  pada pengujian dengan kultur sel maupun pada hewan coba yang diinduksi LPS.

Penghambatan produksi dan atau pelepasan sitokin pro-inflamasi, berimplikasi pada pemblokiran peningkatan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1. Hal ini sesuai dengan penelitian Klemm *et al.* (1995) yang menunjukkan bahwa pemblokiran peningkatan ekspresi *Cell Adhesion Molecules* disebabkan oleh penghambatan TNF- $\alpha$ .

Hasil pengujian juga menunjukkan bahwa fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) juga dapat menurunkan *stress oxidative response element* MDA dan meningkatkan antioxidant response element SOD, HO-1 dan Nrf-2. Oleh Karena itu, diduga bahwa hal ini bertanggung jawab atas pengaruh ekstrak dalam memodulasi ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1. Hasil penelitian Meyer, Schreck, & Baeuerle (1993) menunjukkan bahwa pengurangan upregulasi *Cell Adhesion Molecules* dapat dilakukan dengan mengganggu agen stres oksidator yang diinduksi LPS dalam sel endotel, sehingga dapat mencegah aktivasi NFkB.

Data juga menunjukkan bahwa fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dapat mengurangi produksi NO. Nitric oxide (NO) merupakan molekul gas multifungsi yang memainkan peran penting dalam fisiologi dan patologi pembuluh darah (Fukumura, Kashiwagi, & Jain, 2006). NO memediasi migrasi dan proliferasi sel endotelial dan perekrutan prekursor endotel dan sel-sel perivaskular, dan dengan demikian, memfasilitasi angiogenesis dan maturasi pembuluh. NO mengatur tonus pembuluh darah dan aliran darah melalui relaksasi sel otot polos pembuluh darah.

NO juga menghambat agregasi trombosit dan adhesi leukosit, dan memediasi



hiperpermeabilitas vaskular dalam pengaturan patologis. Endothelial NO synthase (eNOS) secara dominan memediasi fungsi-fungsi vaskular dari NO.

Sawa *et al.* (2008) sebelumnya melaporkan bahwa LPS mengaktifkan sel endotel vaskular dan menginduksi ekspresi cell adhesion molecules (VCAM-1 dan ICAM-1), pembentukan saluran pipa endotel dan angiogenesis pada sel endotelium limfatik manusia. LPS dapat meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan berbagai kejadian vascular, ekstrasvasi leukosit, peningkatan permeabilitas, dan angiogenesis; dimana hal ini dimediasi oleh eNOS. LPS diterapkan secara eksogen dalam eNOS melalui tumor necrosis factor-related factor 6 (TRAF6) dan jalur PI3K-Akt. eNOS-NO memediasi migrasi sel endotel dan pembentukan saluran pipa endotel yang diinduksi LPS serta angiogenesis. NO juga menginduksi relokasi VE-cadherin dari membran sel endotel ke sitosol dan meningkatkan kebocoran pewarna biru Evans di kulit dan FITC-dekstran di retina (Fukumura & Jain, 2007). LPS berperan dalam sistem vaskular dan mengungkapkan peran sentral eNOS sebagai mediator fungsi LPS dalam pembuluh darah.

Hasil penelitian ini membutuhkan penelitian lebih lanjut yang membuktikan interaksi LPS-eNOS-VCAM-1/ICAM-1. Sebagai contoh, bagaimana pengaruh LPS eksogen pada pembuluh darah dalam kondisi fisiologis atau patologis? Apa regulasi spasial dan temporal dari interaksi LPS-eNOS- VCAM-1/ICAM-1 selama angiogenesis dan/atau inflamasi? Bagaimana peran kausal LPS eksogen pada eNOS dan pembuluh darah terurai dengan memblokir pensinyalannya NFkB dan menghambat aktivitas VCAM-1 dan ICAM-1?.

Efek LPS tidak bergantung secara eksklusif pada eNOS-NO. Misalnya, penghambat NOS atau penghapusan eNOS secara signifikan mengurangi, tetapi tidak sepenuhnya menghapus, efek dari LPS. Demikian pula, ekspresi TRAF2 dominan-negatif atau inhibitor Src menghambat migrasi sel endotel yang diinduksi



LPS tetapi tidak mempengaruhi aktivitas eNOS. LPS mengaktifkan NFκB melalui aktivasi IKKα. Pada gilirannya, NFκB memediasi pengaturan-molekul adhesi sel seperti ICAM-1 dan VCAM-1 yang diinduksi oleh LPS (Aziz & Wakefield, 1996). NFκB juga merupakan penginduksi kuat dari iNOS. iNOS dapat terlibat dan/atau mengganggu fungsi LPS secara *in vivo*.

Dengan demikian, penekanan ekspresi VCAM-1/ICAM-1 diduga berhubungan dengan penghambatan aktivasi NFκB, sehingga mempengaruhi angiogenesis, respon inflamasi akibat induksi LPS dan hiperpermeabilitas vaskular. Deaktivasi NFκB dapat menyebabkan pengurangan ekstravasasi leukosit pada sel endotel mencit yang terinduksi LPS. Penghambatan kadar NO juga berhubungan dengan ekspresi VCAM-1/ICAM-1, karena NO berperan dalam mengatur molekul adhesi sel. Tetapi hal ini diperlukan studi lebih lanjut untuk mengamati efek penekanan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1 dalam merespon patogenesis inflamasi.

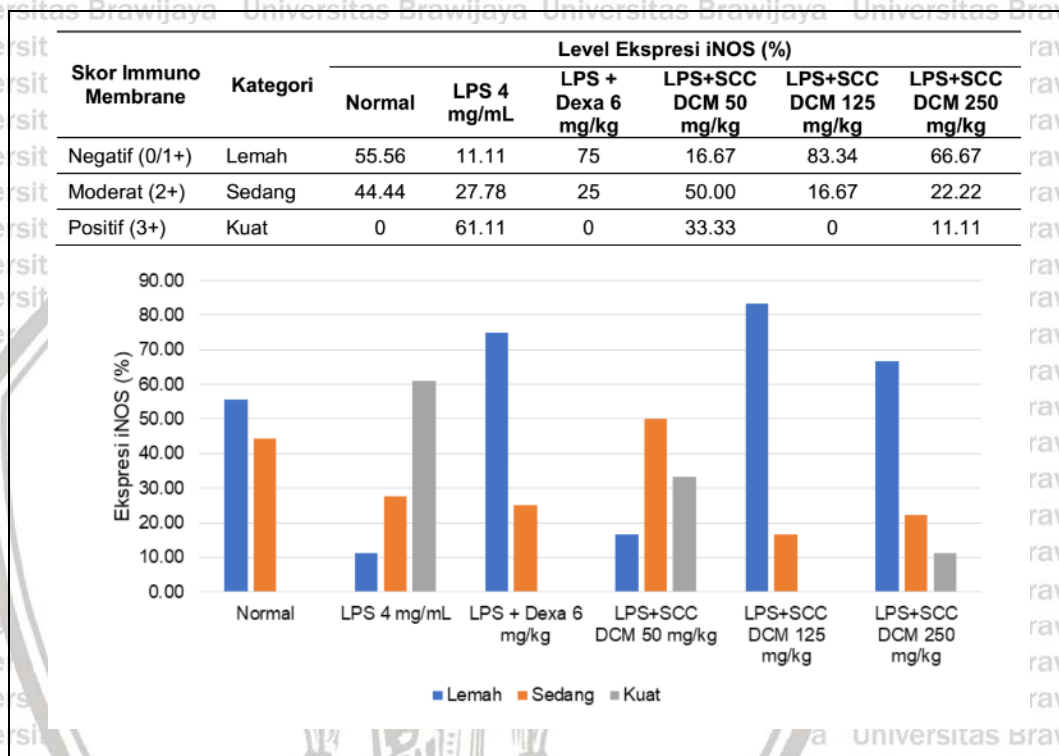
#### **5.8.10 Pengaruh Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap Ekspresi iNOS Pada Mencit yang Diinduksi LPS**

iNOS merupakan isoform NOS yang paling berperan dalam peristiwa induksi LPS. Secara fisiologis iNOS tidak pernah ditemukan pada sel yang normal. Namun iNOS akan cepat terekspresi jika distimuli oleh sitokin pro-inflamasi. Sekali terbentuk, iNOS dapat tetap aktif selama 24-36 jam. iNOS dapat mensintesis jumlah NO 100-1000 kali lebih banyak daripada neuronal NOS (nNOS) dan endothelial NOS (eNOS). Produksi NO berlebih dapat menyebabkan terjadinya vasodilatasi arterial sehingga menyebabkan terjadinya penurunan resistensi vaskuler sistemik (Hernani, 2008).

Hasil pengujian *in vivo* berdasarkan analisis IHK dengan ImmunoMembrane menunjukkan efek induksi LPS pada mencit dapat



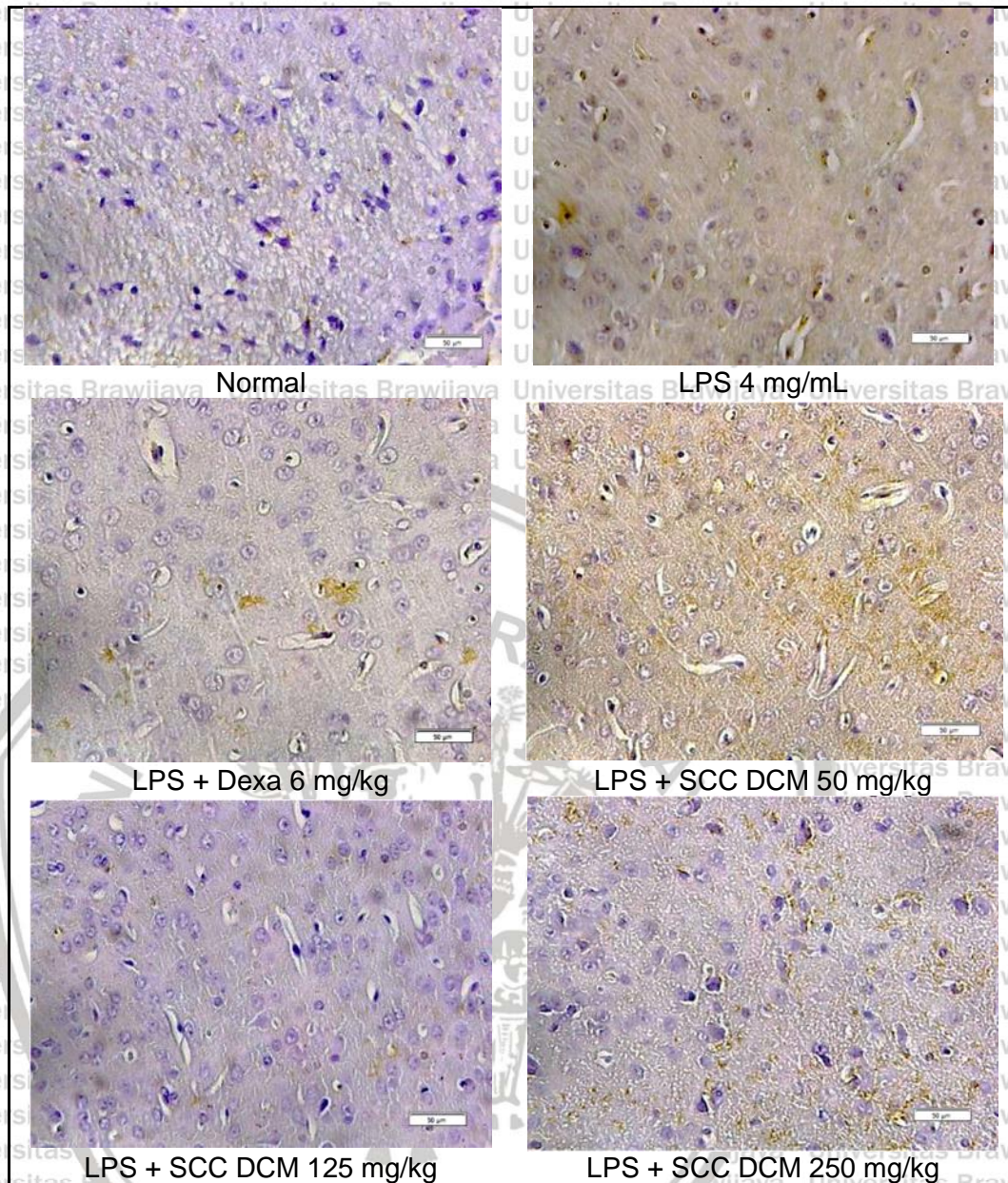
mengakibatkan peningkatan ekspresi iNOS pada otak mencit, bila dibandingkan dengan otak mencit normal (Gambar 5.39). Pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan dexamethasone dapat mengurangi ekspresi iNOS (Gambar 5.40). Walaupun, pada perlakuan konsentrasi ekstrak 250 mg/kg, ekspresi iNOS sedikit meningkat, tetapi tidak melebihi ekspresi iNOS pada otak mencit yang terinduksi LPS.



Gambar 5.39. Efek Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) terhadap Ekspresi iNOS dengan Analisis Immu-  
noMembrane

Inducible nitric oxide synthase (iNOS), sebagai salah satu tiga enzim kunci yang mengkatalisasi produksi nitric oxide (NO), adalah molekul pengatur penting dalam respon inflamasi dan perkembangan kanker (Baydoun, Cherian, Green, & Ratner, 2015). Meskipun iNOS biasanya tidak diekspresikan dalam sel dalam situasi fisiologis yang normal, iNOS dapat diinduksi setelah aktivasi oleh berbagai rangsangan, terutama mediator pro-inflamasi (Goto *et al.*, 1997).





Gambar 5.40. Ekspresi iNOS pada Otak Mencit yang Terinduksi LPS (Pembesaran 400x; 1 bar = 50µm; Lokasi pengamatan: cerebral korteks; Lokasi ekspresi: sel endotel di sekitar pembuluh darah; Warna Kecoklatan Menunjukkan Ekspresi iNOS)

Dalam pengujian yang telah dilakukan menunjukkan induksi LPS dapat memodulasi jalur persinyalan NFκB baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Jalur persinyalan NFκB memainkan peran penting dalam mengatur respon inflamasi melalui transkripsi gen iNOS dan sitokin (Soonthornsit, Pitaksutheepong,



Hemstapat, Utaisincharoen, & Pitaksuteepong, 2017). Sel yang terpapar rangsangan pro-inflamasi eksternal seperti mitogen, sitokin pro-inflamasi, dan LPS menyebabkan fosforilasi I $\kappa$ B yang cepat oleh I $\kappa$ B kinase (IKK), menghasilkan translokasi nuklir NF $\kappa$ B (S. H. Lee *et al.*, 2016). Dalam nukleus, NF $\kappa$ B menginduksi transkripsi sejumlah besar target gen pro-inflamasi termasuk iNOS. iNOS kemudian memfasilitasi konversi L-arginin menjadi L-sitruilin dan sejumlah besar NO (Soonthornsit *et al.*, 2017).

Ekspresi gen iNOS terutama diatur pada tingkat transkripsional dan induksi iNOS sebagian besar tergantung pada aktivitas faktor transkripsi yang berinteraksi dengan cognate cis-acting elements dalam promotor iNOS (Q. W. Xie, 1993 dan Marks-Konczalik, Chu, & Moss, 1998). NF $\kappa$ B adalah faktor transkripsi aktif terlibat dalam induksi transkripsi gen iNOS (Janssen-Heininger, Poynter, & Baeuerle, 2000 dan Vaillancourt *et al.*, 2007). Telah dipelajari dengan baik bahwa aktivasi NF $\kappa$ B dikaitkan dengan fosforilasi, ubiquitinasi, dan degradasi I $\kappa$ B- $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) selanjutnya melalui jalur ubiquitin-proteasome (Janssen-Heininger *et al.*, 2000).

Pada penelitian ini fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dapat menghambat peningkatan jumlah relatif NF $\kappa$ B. Oleh karena itu diduga bahwa penekanan ekspresi iNOS dan sitokin pro-inflamasi, sebagian besar terkait dengan aktivasi/deaktivasi jalur NF $\kappa$ B. Hasil penelitian ini dapat memberikan dasar molekuler untuk respon anti-inflamasi dari ekstrak karang lunak dan memiliki kemungkinan potensial untuk penemuan/pengembangan agen farmaka untuk berbagai penyakit yang melibatkan respons inflamasi.

## 5.9 Pembahasan Umum

Karang lunak *Sarcophyton* sp. memiliki karakteristik seperti piring dengan pinggirang bergelombang. *Sarcophyton* sp. memproduksi senyawa bioaktif terpenoid dan steroid yang berpotensi memiliki aktivitas biologis anti-inflamasi.



Ekstrak kasar karang lunak *Sarcophyton* sp. memiliki kemampuan sebagai inhibitor dalam pelepasan NO. Dimana *Nitric oxide* (NO) merupakan mediator dari proses fisiologis respon inflamasi. Ekstrak kasar *Sarcophyton* sp. (SCC), dipartisi dengan tiga pelarut sesuai polaritas. Skrining dilakukan dengan melihat aktivitas inhibitor pelepasan NO, untuk memilih fraksi terbaik dari *Sarcophyton* sp. Hasil pengujian menunjukkan fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) menunjukkan aktivitas inhibitori pelepasan NO terbaik. Selain itu, ekstrak kasar *Sarcophyton* sp. dan fraksi DCM juga memiliki aktivitas antioksidan dengan menghambat radikal bebas DPPH.

Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. dipurifikasi lanjut dengan kromatografi kolom Si-60 dengan fase gerak n-heksan:EtOAc untuk memisahkan fraksi berdasarkan ukuran berat molekul dan daya afinitasnya. Hasil purifikasi ini diperoleh 6 fraksi dan dilakukan pengujian sebagai inhibitori pelepasan NO, untuk memilih fraksi terbaik. Hasil pengujian menunjukkan fraksi 3 dapat menghambat aktivitas pelepasan NO terbaik.

Analisa LCMS menunjukkan dari fraksi 3 hasil kromatografi kolom *Sarcophyton* sp. terdapat 10 senyawa sesquiterpenoid (26.59%), 19 senyawa diterpen (50.58%), 1 senyawa terpenoid (1.14%) dan 12 senyawa steroid (21.52%).

Hasil karakterisasi spektra UV mengungkapkan bahwa pita absorpsi disebabkan oleh adanya steroid dan terpenoid serta turunannya dalam fraksi 3.

Hasil karakterisasi spektrum IR mengkonfirmasi kelimpahan gugus -OH dengan struktur aromatik pada fraksi 3. Dari 42 senyawa aktif fraksi 3 terdapat 25 senyawa aktif (48.75%) dengan struktur aromatik dan memiliki gugus -OH, yang diduga berperan sebagai anti-inflamasi.

Dari 25 senyawa aktif fraksi 3 hanya 18 senyawa aktif yang memenuhi kaidah *druglikeness* menurut aturan Lipinski. 18 senyawa aktif ini, dianalisis



PASSonline untuk melihat probabilitas aktif ( $P_a$ ) sebagai anti-inflamasi (nilai  $P_a > 0.7$ ). Dari 18 senyawa aktif, terdapat 11 senyawa aktif yang berpotensi kuat sebagai anti-inflamasi dengan nilai  $P_a > 0.7$ . Hal ini mengindikasikan senyawa dalam ekstrak *Sarcophyton* sp. berpotensi sebagai anti-inflamasi.

18 senyawa aktif yang memenuhi kaidah *druglikeness* dianalisis molecular docking dengan *PyRx* untuk mengetahui ikatan afinitas (kcal/mol) dengan protein TLR4, NF $\kappa$ B dan IL-10. TLR 4 merupakan protein reseptor yang mengenal antigen LPS. NF $\kappa$ B merupakan faktor transkripsi utama dalam regulator inflamasi. IL-10 merupakan protein sebagai regulator negatif inflamasi, yang berperan sebagai anti-inflamasi.

Hasil molecular docking menunjukkan senyawa Australin C, Sinularolide B, dan Australin B berpotensi sebagai anti-inflamasi melalui jalur TLR4 dengan ikatan afinitas terendah dan mendekati ikatan afinitas dexamethasone sebagai kontrol. Analisis molecular docking dengan protein NF $\kappa$ B mengindikasikan bahwa senyawa Sinularolide B, Sinulaflexiolide B, dan Sinulaflexiolide C dapat berpotensi sebagai anti-inflamasi, dengan ikatan afinitas terendah dan mendekati ikatan afinitas dexamethasone sebagai kontrol. Sedangkan hasil molecular docking melalui jalur IL-10 mengindikasikan bahwa senyawa Sinulaflexiolide B, Sinulaflexiolide D dan Sinularolide B berpotensi sebagai anti-inflamasi, dengan ikatan afinitas terendah dan mendekati ikatan afinitas dexamethasone sebagai kontrol.

Pada pengujian *in vivo* dan *in vitro* terhadap parameter respon imun terkait inflamasi menggunakan fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC), karena pada skrining awal paling baik dalam menghambat pelepasan Nitric Oxide (NO) dan memiliki nilai  $IC_{50}$  tertinggi sebagai antioksidan (bila dibandingkan dengan fraksi EtOAc dan BuOH maupun fraksi hasil kromatografi kolom).

Karang lunak *Sarcophyton* sp. (SCC) menunjukkan kemampuan meregulasi parameter inflamasi pada mencit yang diinduksi LPS. Pada penelitian ini LPS digunakan dalam menstimuli respon inflamasi pada mencit sebagai hewan coba maupun pada kultur sel. Stimulasi LPS ditandai dengan menurunnya jumlah sel T naïve, karena sel T telah teraktivasi menjadi sel efektor. Pada penelitian ini menfokuskan MyD88-dependent sebagai jalur persinyalan TLR4-LPS.

TLR4 merupakan sensor yang mengenal LPS. Hasil pengujian menunjukkan ekstrak *Sarcophyton* sp. (SCC) mampu menekan aktivasi TLR4.

Analisis *in silico* menunjukkan senyawa volatil dari ekstrak *Sarcophyton* sp. (SCC) mampu mencegah pengikatan LPS-TLR4 dengan sebagai kompetitif binding dalam berikatan dengan MD2 pocket, sehingga mencegah LPS berikatan dengan TLR4.

Setelah stimulasi LPS, MyD88 merekrut dan mengaktifkan kinase yang mengandung domain kematian, IL-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4).

Makrofag knockout IRAK-4 menunjukkan peningkatan produksi sitokin pro-inflamasi pada stimulasi LPS. Aktivitas IRAK-4 kinase untuk mentransmisikan sinyal TLR, termasuk induksi sitokin pro-inflamasi. Selain itu, aktivitas IRAK-4 kinase dapat berperan dalam stabilitas mRNA sitokin dan kemokin tertentu, seperti TNF- $\alpha$ .

Protein adaptor TRAF (TNF receptor-associated factor), sangat penting untuk jalur hilir MyD88-dependent dari IRAK4 dan IRAK1. TRAF mengaktifkan TAK (transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase). TAK kemudian mengaktifkan

jalur hilir IKK (I $\kappa$ B kinase) dan MAPK (mitogen-activated protein kinase). IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , dan IKK $\gamma$  membentuk kompleks dan terfosforilasi dari protein I $\kappa$ B (*inhibitor of  $\kappa$  light chain gene enhancer in B cells*). Fosforilasi ini mengarah pada degradasi protein I $\kappa$ B dan translokasi selanjutnya dari faktor transkripsi NF $\kappa$ B, yang mengontrol ekspresi sitokin pro-inflamasi. Aktivasi jalur hilir MAPK mengarah pada



induksi faktor transkripsi lain AP-1, yang juga memiliki peran dalam ekspresi sitokin pro-inflamasi.

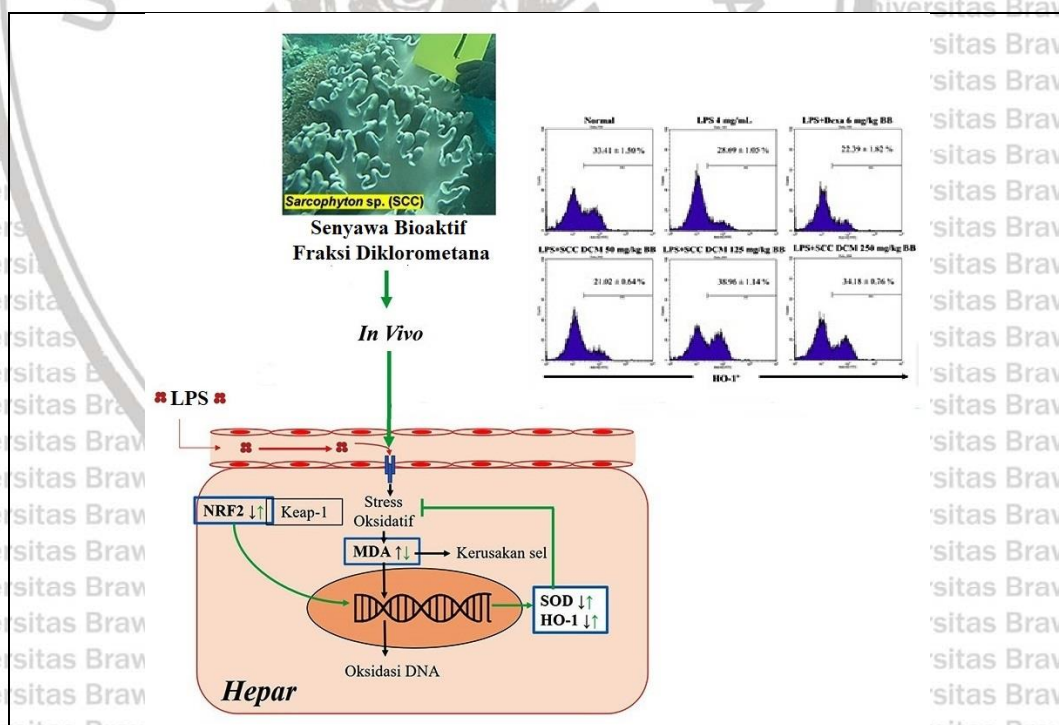
Aktivasi jalur hilir MyD88 dependent dapat diganggu oleh fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC). Rangkaian MyD88 dependent yang diggangu, yaitu jalur hilir MyD88 dependent-IRAK-TRAF-TAK, sehingga menekan fosforilasi dan degradasi I $\kappa$ B. Penghambatan fosforilasi dan degradasi I $\kappa$ B, mengakibatkan gangguan translokasi dari faktor transkripsi NF $\kappa$ B. Penghambatan aktivasi NF $\kappa$ B ini menyebabkan berkurangnya produksi sitokin pro-inflamasi TNF- $\alpha$  dan IL-6 serta ekspresi iNOS.

Disamping itu pada saat LPS terdeteksi, sel T regulator sebagai regulator negatif inflamasi mensekresikan IL-10 untuk mengimbangi produksi sitokin pro-inflamasi TNF- $\alpha$  dan IL-6. Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) mampu meningkatkan aktivitas sel T regulator sehingga juga meningkatkan produksi IL-10. Produksi IL-10 dapat mengganggu jalur persinyalan TLR4 dan interaksi LPS-MD2-TLR4.

Dari analisis probabilitas senyawa juga diketahui bahwa ekstrak *Sarcophyton* sp. (SCC) menunjukkan potensi sebagai antioksidan. Substansi antioksidan ini dapat menginduksi produksi berlebihan *reactive oxygen species* (ROS). Induksi LPS dapat mengakibatkan cedera jaringan kerana respon inflamasi berlebihan, peningkatan stres oksidatif dan kerusakan mitokondria, yang ditandai dengan meningkatnya level MDA. Sel-sel K $\ddot{u}$ ppfer yang diaktifkan oleh LPS berinteraksi dengan TLR-4 dapat secara berlebihan melepaskan sitokin pro-inflamasi dan menghasilkan sejumlah besar ROS, yang memicu apoptosis sel-sel hati. ROS dihasilkan dari sitokin pro-inflamasi yang diatur oleh stres oksidatif dari pensinyalan NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B meregulasi pengkodean berbagai gen seperti sitokin pro-

inflamasi, dan kemokin melalui peningkatan regulasi iNOS, yang menyebabkan respon inflamasi.

Dalam keadaan normal, sel-sel yang dipengaruhi induksi LPS mempertahankan diri terhadap kerusakan ROS dengan berbagai substansi antioksidan endogen, seperti superoksida dismutase (SOD). SOD diregulasi oleh faktor transkripsi Nrf-2. Nrf-2 memainkan peran kunci dalam menghambat stres oksidatif. Selanjutnya, Nrf-2 tidak hanya meningkatkan SOD tetapi juga berperan untuk meningkatkan enzim yang terlibat dalam pertahanan antioksidan, seperti HO-1. HO-1 memproduksi karbon monoksida (CO) yang dapat memberikan efek anti-inflamasi dengan memodulasi sinyal inflamasi termasuk NFκB, dan melemahkan respons inflamasi yang diinduksi LPS melalui pengurangan NFκB. Mekanisme fraksi DCM *Sarcophyton* sp. dalam meregulasi Nrf-2, SOD, HO-1 dan MDA dapat dilihat pada Gambar 5.41.



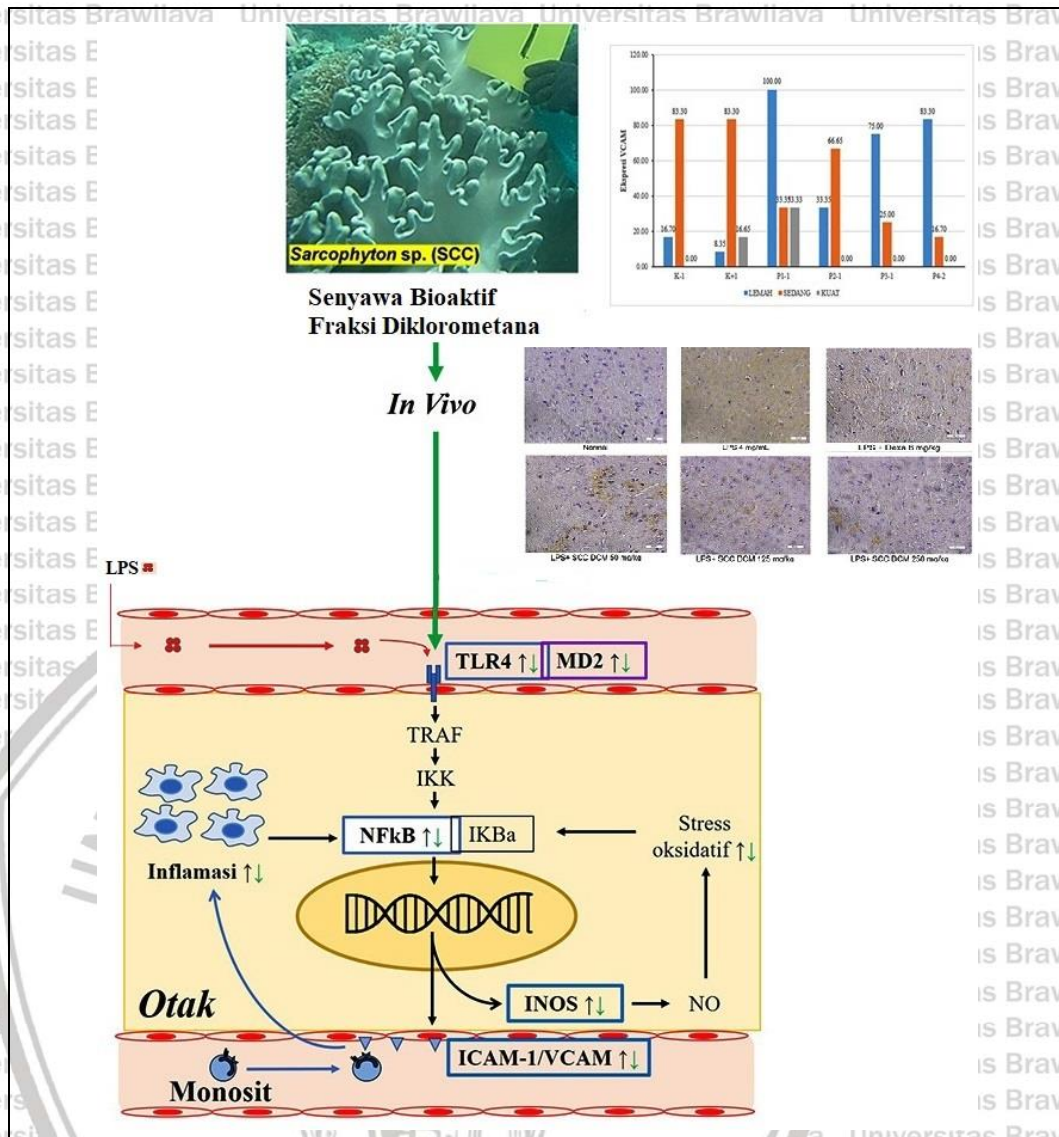
Gambar 5.41. Mekanisme fraksi DCM *Sarcophyton* sp. dalam meregulasi Nrf-2, SOD, HO-1 dan MDA



LPS mengaktifkan sel endotel vaskular dan menginduksi ekspresi cell adhesion molecules (VCAM-1 dan ICAM-1), pembentukan saluran pipa endotel, dan angiogenesis pada sel endotelium limfatik manusia. LPS dapat meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan berbagai kejadian vascular, ekstrasvasasi leukosit, peningkatan permeabilitas, dan angiogenesis; dimana hal ini dimediasi oleh eNOS. LPS diterapkan secara eksogen dalam eNOS melalui tumor necrosis factor-related factor 6 (TRAF6) dan jalur PI3K-Akt. eNOS-NO memediasi migrasi sel endotel dan pembentukan saluran pipa endotel yang diinduksi LPS serta angiogenesis. LPS berperan dalam sistem vaskular dan eNOS bertindak sebagai mediator fungsi LPS dalam pembuluh darah. LPS mengaktifkan NFκB melalui aktivasi IKKα. Pada gilirannya, NFκB memediasi pengaturan-molekul adhesi sel seperti ICAM-1 dan VCAM-1 yang diinduksi oleh LPS. NFκB merupakan penginduksi kuat dari iNOS.

Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dapat menekan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1, diduga sebagai akibat dari deaktivasi faktor transkripsi NFκB. Penghambatan aktivasi NFκB dapat mempengaruhi angiogenesis dan respon inflamasi akibat induksi LPS dan hiperpermeabilitas vaskular. Deaktivasi NFκB, menyebabkan pengurangan ekstrasvasasi leukosit pada sel endotel mencit yang terinduksi LPS. NO berperan untuk mengatur molekul adhesi sel termasuk ICAM-1 dan VCAM-1. Efek penghambatan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1 menyebabkan penurunan stres fibrosa, tegangan sentripetal dan retraksi sel. Penurunan ini mengganggu regulasi interaksi *leucocyte-endothelial cell adhesion*, sehingga mencegah migrasi leukosit keluar dari pembuluh darah antara sel-sel endotel dan ke dalam jaringan secara berlebihan. Tetapi, diperlukan studi lebih lanjut untuk mengamati hubungan antara LPS-NFκB-NO-VCAM-1/ICAM-1 dalam merespon patogenitas inflamasi akibat induksi LPS. Mekanisme fraksi DCM *Sarcophyton* sp. dalam meregulasi VCAM-1 dan ICAM-1 dapat dilihat pada Gambar 5.42.





Gambar 5.42. Mekanisme fraksi DCM *Sarcophyton* sp. dalam meregulasi VCAM-1 dan ICAM-1

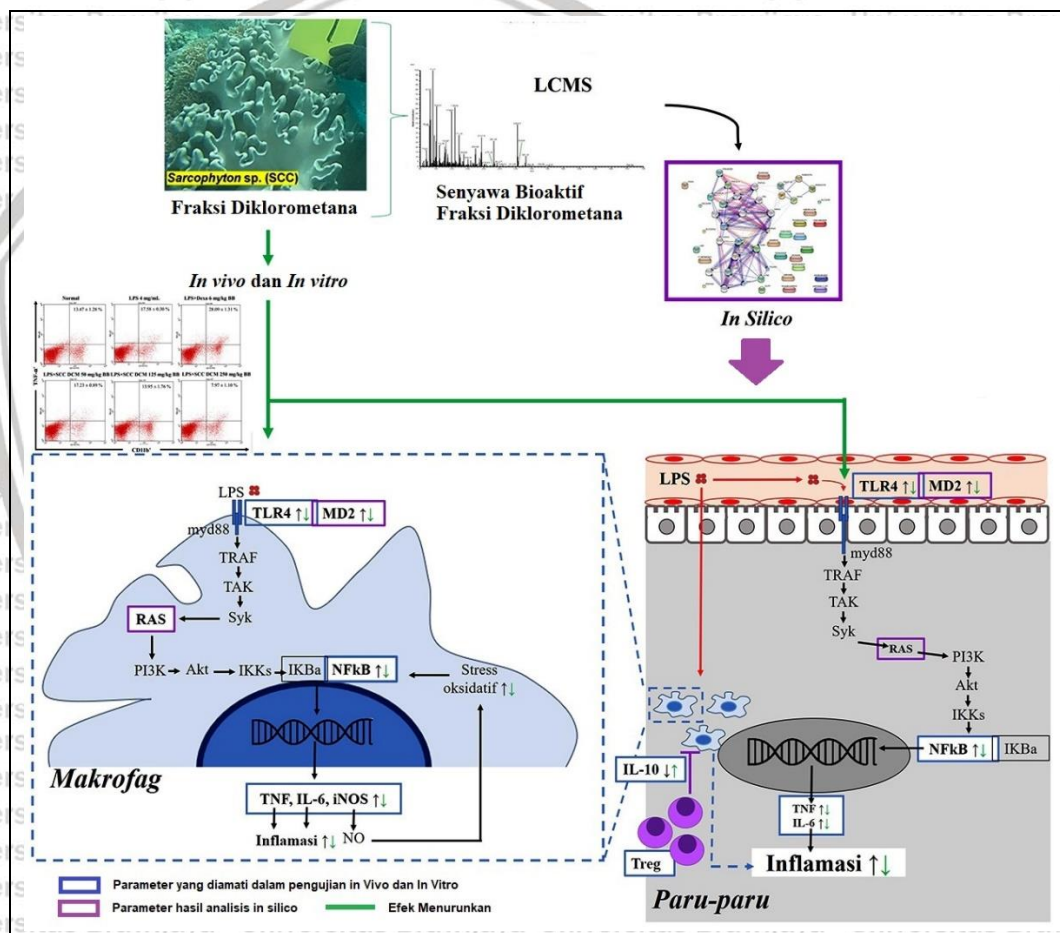
### 5.10 Kebaruan Penelitian/Novelty

Kebaruan penelitian ini, yaitu mekanisme fraksi DCM *Sarcophyton* sp. sebagai inhibitor *MyD88 dependent pathway*. Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. terbukti dapat memodulasi parameter inflamasi akibat induksi LPS, seperti sel T naïve, sel T regulator, IL-10, NFκB, TNF-α, IL-6, NO dan iNOS dalam pengujian *in vivo*, *in vitro* dan *in silico*. Mekanisme (*pathway*) anti-inflamasi dari fraksi DCM *Sarcophyton*



sp. (SCC) sebagai inhibitor *MyD88 dependent pathway* dalam merespon Inflamasi akibat induksi LPS dapat dilihat pada Gambar 5.43.

Dalam fraksi diklorometana *Sarcophyton sp.* berdasarkan *database NIST library*, terdeteksi 11 senyawa aktif yang diduga kuat berpotensi sebagai anti-inflamasi dan memiliki sifat *druglikeness*, yaitu Coralloidin E; Lobophytol; Sinularolide B; (5Z,9E,11E, 14E) Ethyl 8 hydroxy 13 oxoicosa-5,9,11,14 tetraenoate; Sinulaflexiolide B; Sinulaflexiolide C; Sinulaflexiolide D; Australin A; Australin B; Australin C; dan Australin D.



Gambar 5.43. Mekanisme Anti-inflamasi dari Fraksi DCM *Sarcophyton sp.* (SCC) Sebagai Inhibitor *MyD88 Dependent Pathway* dalam Merespon Inflamasi Akibat Induksi LPS

## BAB VI

## KESIMPULAN DAN SARAN

## 6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Fraksi diklorometana (DCM) *Sarcophyton* sp. menunjukkan aktivitas inhibitori pelepasan NO dan penghambatan radikal DPPH.
2. Senyawa yang diduga berpotensi anti-inflamasi dari ekstrak *Sarcophyton* sp. berdasarkan analisa LC-MS, karakterisasi Spektra UV dan FTIR, yaitu senyawa turunan steroid dan terpenoid, memiliki struktur aromatik dan gugus fungsional –OH.
3. Konsentrasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) 125 mg/kg (*in vivo*) dan 1.25 mg/mL (*in vitro*) dapat meregulasi respon inflamasi akibat induksi LPS dengan baik, karena mampu meningkatkan jumlah relatif sel T naïve dan sel T regulator, yang diikuti produksi IL-10.
4. Konsentrasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) 125 mg/kg (*in vivo*) dan 1.25 mg/mL (*in vitro*) dapat meregulasi respon inflamasi akibat induksi LPS dengan baik, karena mampu menghambat aktivasi TLR4 dan NFκB, yang diikuti dengan menurunnya produksi TNF-α, IL-6, ekspresi iNOS, VCAM-1 dan ICAM-1.
5. Penghambatan dan penekanan ini dapat mengurangi dan mencegah respon inflamasi serta aktivitas fagositosis yang berlebihan.
6. Konsentrasi fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) 125 mg/kg (*in vivo*) dapat merespon stres oksidatif akibat induksi LPS dengan baik, karena mampu menurunkan level MDA, yang diikuti dengan peningkatan jumlah relatif SOD dan HO-1 yang diregulasi oleh Nrf-2, sehingga dapat mencegah aktivasi faktor transkripsi NFκB.



### 5.1 Saran

Perlu penelitian lanjutan dari penekanan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1 akibat fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dalam mempengaruhi regulasi interaksi *leucocyte-endothelial cell adhesion* sehingga dapat mencegah respon inflamasi berlebihan. Efek dari pemberian fraksi DCM *Sarcophyton* sp. (SCC) dan LPS terhadap histopatologi jaringan mencit juga perlu diamati. Fraksi DCM *Sarcophyton* sp. perlu dianalisa dengan LCMS, untuk melihat kelimpahan senyawa secara lengkap.





## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., & Lichtman, A. H. (2003). *Cellular and Molecular Immunology* (5th Ed.). Saunders, Philadelphia.
- Agati, G., Stefano, G., Biricolti, S., & Tattini, M. (2009). Mesophyll distribution of "antioxidant" flavonoid glycosides in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance. *Annals of Botany*, *104*(5), 853–861.
- Aggarwal, B. B., Vijayalekshmi, R. V., & Sung, B. (2009). Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(2), 425–430.
- Ahmed, A. F., Tai, S.-H., Wen, Z.-H., Su, J.-H., Wu, Y.-C., Hu, W.-P., & Sheu, J.-H. (2008). A C-3 methylated isocembranoid and 10-oxocembranoids from a formosan soft coral, *Sinularia grandilobata*. *Journal of Natural Products*, *71*(6), 946–951.
- Ahmed, A. F., Wu, M., Wang, G., Wu, Y., & Sheu, J. (2005). Eunicellin-Based Diterpenoids, Australins A - D, Isolated from the Soft Coral *Cladiella australis*. *Journal of Natural Products*, *68*(7), 1051–1055.
- Ajuwon, O. R., Oguntibeju, O. O., & Marnewick, J. L. (2014). Amelioration of lipopolysaccharide-induced liver injury by aqueous rooibos (*Aspalathus linearis*) extract via inhibition of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*(392), 1–12.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783–801.
- Albizati, K. F., Martin, V. A., Agharahimi, M. R., Stolze, D. A., Heidelberg, B., York, N., ... Budapest, B. (1992). *Bioorganic Marine Chemistry Vol 6: Synthesis of Marine Natural Products 2 Nonterpenoids*.
- Allan, S. M., & Rothwell, N. J. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(October), 734–744.
- Ambrosio, M. D., Guerriero, A., & Pietra, F. (1987). Coralloidin C, D, and E: Novel Eudesmane Sesquiterpenoids from the Mediterranean Alcyonacean *Alcyonium coralloides*. *Helvetica Chimica Acta*, *70*(3), 612–620.
- Ambrosio, M. D., Guerriero, A., & Pietra, F. (1989). Novel cembranolides (Coralloidolide D and E) and a 3,7-Cyclized cembranolidide (Coralloidolide C) from the mediterranean coral *Alcyonium coralloides*. *Helvetica Chimica Acta*, *72*(7), 1590–1596.
- Amiri, K. I., & Richmond, A. (2005). Role of Nuclear Factor- $\kappa$ B in melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews*, *24*(2), 301–313.
- An, H., Zhao, W., Hou, J., Zhang, Y., Xie, Y., Zheng, Y., ... Cao, X. (2006). SHP-2 Phosphatase Negatively Regulates the TRIF Adaptor Protein-Dependent Type I Interferon and Proinflammatory Cytokine Production. *Immunity*, *25*(6), 919–928.
- Annunziata, C. (2011). One Molecule, Multiple Cancers: The Devil is in the Details. *Center For Cancer Research*, *5*(1), 28–31.
- Anta, C., González, N., Santafé, G., Rodríguez, J., & Jiménez, C. (2002). New



Xenia diterpenoids from the Indonesian soft coral *Xenia* sp. *Journal of Natural Products*, 65(5), 766–768.

Apri, R., Zamani, N. P., & Effendi, H. (2013). Exploration of Soft Coral as Antioxidant at Pongok Island, South Bangka. *Journal of Fisheries and Marine Technology*, 4(2), 211–217.

Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iryama, R., ... Watanabe, M. (2005). MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *Journal of Gastroenterology*, 40, 16–23.

Aratake, S., Tomura, T., Saitoh, S., Yokokura, R., Kawanishi, Y., Shinjo, R., ... Maekawa, H. (2012). Soft coral sarcophyton (cnidaria: Anthozoa: Octocorallia) species diversity and chemotypes. *PLoS ONE*, 7(1), 1–10.

Armentero, M.-T., Levandis, G., Bazzini, E., Cerri, S., Ghezzi, C., & Blandini, F. (2011). Adhesion molecules as potential targets for neuroprotection in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 43(3), 663–668.

Artemov, V. G., Volkov, A. A., Sysoev, N. N., & Volkov, A. A. (2015). Conductivity of aqueous HCl, NaOH and NaCl solutions: Is water just a substrate? *Europhysics Letters*, 109, 26002-P1-26002-p6.

Arvey, A., Van Der Veecken, J., Samstein, R. M., Feng, Y., Stamatoyannopoulos, J. A., & Rudensky, A. Y. (2014). Inflammation-induced repression of chromatin bound by the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nature Immunology*, 15(6), 580–587.

Azimi-Nezhad, M., Stathopoulou, M. G., Bonnefond, A., Rancier, M., Saleh, A., Lamont, J., ... Visvikis-Siest, S. (2013). Associations of vascular endothelial growth factor (VEGF) with adhesion and inflammation molecules in a healthy population. *Cytokine*, 61(2), 602–607.

Aziz, K. E., & Wakefield, D. (1996). Modulation of Endothelial Cell Expression of ICAM-1, E-Selectin, and VCAM-1 by  $\beta$ -Estradiol, Progesterone, and Dexamethasone. *Cellular Immunology*, 167(1), 79–85.

Bailey, L. C., Medwick, T., & Dong, Y. (2006). Steroid Analysis. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 1–31).

Balaci, L., Spada, M. C., Olla, N., Sole, G., Loddo, L., Anedda, F., ... Pilia, G. (2007). IRAK-M Is Involved in the Pathogenesis of Early-Onset Persistent Asthma. *The American Journal of Human Genetics*, 80(June), 1103–1114.

Balboa, E. M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., & Domínguez, H. (2013). In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1764–1785.

Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., & Preissner, R. (2018). ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W257–W263.

Barajas, B., Che, N., Yin, F., Rowshanrad, A., Orozco, L. D., Gong, K. W., ... Araujo, J. A. (2011). NF-E2 – Related Factor 2 Promotes Atherosclerosis by Effects on Plasma Lipoproteins and Cholesterol Transport That Overshadow Antioxidant Protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(1), 58–66.



- Barbier, M., Reichstein, T., Schindler, O., & Lederer, E. (1959). Isolation of 24-Methylene-cholesterol from Honey Bees (*Apis mellifica* L.). *Nature*, *184*(Suppl 10), 732–733.
- Bashyam, R., Thekkumalai, M., & Sivanandham, V. (2015). Evaluation of Phytoconstituents of *Bryonopsis laciniosa* fruit by UV-Visible Spectroscopy and FTIR analysis. *Pharmacognosy Journal*, *7*(3), 165–170.
- Baud, V., & Karin, M. (2001). Signal transduction by Tumor Necrosis Factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*, *11*(9), 372–377.
- Baydoun, H. H., Cherian, M. A., Green, P., & Ratner, L. (2015). Inducible nitric oxide synthase mediates DNA double strand breaks in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-induced leukemia/lymphoma. *Retrovirology*, *12*(1), 1–16.
- Beck, S. (1999). Acute and chronic inflammation. In *Pathologic basis of disease* (p. 69). Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Acute+and+chronic+inflammation#2>
- Bellik, Y., Boukraâ, L., Alzahrani, H. A., Bakhotmah, B. A., Abdellah, F., Hammoudi, S. M., & Iguer-Ouada, M. (2013). Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. *Molecules*, *18*(1), 322–353.
- Belkaid, Y., & Tarbell, K. (2009). Regulatory T Cells in the Control of Host-Microorganism Interactions. *Annual Review of Immunology*, *27*(1), 551–589.
- Bellocchio, S., Moretti, S., Perruccio, K., Bozza, S., Montagnoli, C., Mosci, P., Romani, L. (2004). TLRs Govern Neutrophil Activity in Aspergillosis. *The Journal of Immunology*, *173*, 7406–7415.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (Fifth). New York: W. H. Freeman and Company.
- Beutler, B., & Rietschel, E. T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*, *3*(February), 169–176.
- Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M., Mannori, G., & Cecconi, O. (1994). Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annual Review of Medicine*, *45*, 361–378.
- Biswas, A., Wilmanski, J., Forsman, H., Hrncir, T., Hao, L., Tlaskalova-hogenova, H., & Kobayashi, K. S. (2011). Negative regulation of Toll-like receptor signaling plays an essential role in homeostasis of the intestine. *European Journal of Immunology*, *41*(1), 182–194.
- Biswas, S. K., & Lopez-collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance : new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology*, *30*(10), 475–487.
- Bhardwaj, A., Batchu, S. N., Kaur, J., Huang, Z., Seubert, J. M., & Knaus, E. E. (2012). Cardiovascular Properties of a Nitric Oxide Releasing Rofecoxib Analogue: Beneficial Anti-hypertensive Activity and Enhanced Recovery in an Ischemic Reperfusion Injury Model. *ChemMedChem*, *7*(8), 1365–1368.
- Bhardwaj, A., Huang, Z., Kaur, J., & Knaus, E. E. (2012). Rofecoxib analogues possessing a nitric oxide donor sulfohydroxamic acid (SO 2NHOH) cyclooxygenase-2 pharmacophore: Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation as anti-inflammatory agents. *ChemMedChem*, *7*(1), 62–





67.

Blois, M. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Hu, W.-P., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R. (2008). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 25(1), 35–94.

Blunt, J. W., & Munro, M. H. G. (2008). *Dictionary of Marine Natural Products*. Chapman & Hall/CRC.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. a., Munro, M. H. G., & Prinsep, M. R. (2012). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 29(2), 144–222.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. a, Munro, M. H. G., & Prinsep, M. R. (2013). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 30(2), 237–323.

Boone, D. L., Turer, E. E., Lee, E. G., Ahmad, R. C., Wheeler, M. T., Tsui, C., ... Ma, A. (2004). The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nature Immunology*, 5(10), 1052–1060.

Bowden, B. F., Coll, J. C., de Silva, E. D., de Costa, M. S. L., Djura, P. J., Mahendran, M., & Tapiolas, D. M. (1983). Studies of australian soft corals. XXXI: Novel furanosesquiterpenes from several sinularian soft corals (coelenterata, octocorallia, alcyonacea). *Australian Journal of Chemistry*, 36(2), 371–376.

Bremner, P., & Heinrich, M. (2002). Natural products as targeted modulators of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54(4), 453–472.

Brint, E. K., Xu, D., Liu, H., Dunne, A., Mckenzie, A. N. J., Neill, L. A. J. O., & Liew, F. Y. (2004). ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nature Immunology*, 5(4), 373–379.

Brostjan, C., Anrather, J., Csizmadia, V., Natarajan, G., & Winkler, H. (1997). Glucocorticoids inhibit E-selectin expression by targeting NF- $\kappa$ B and not ATF/c-Jun. *The Journal of Immunology*, 158(8), 3836–3844.

Brown, K. K., Cox, A. G., & Hampton, M. B. (2010). Mitochondrial respiratory chain involvement in peroxiredoxin 3 oxidation by phenethyl isothiocyanate and auranofin. *FEBS Letters*, 584(6), 1257–1262.

Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., ... Volpe, F. (2000). Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nature Cell Biology*, 2(6), 346–351.

Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R., & Tschopp, J. (2003). Inhibition of Interleukin 1 Receptor / Toll-like Receptor Signaling through the Alternatively Spliced, Short Form of MyD88 Is Due to Its Failure to Recruit IRAK-4. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(2), 263–268.

Burzyn, D., Benoist, C., & Mathis, D. (2013). Regulatory T cells in nonlymphoid tissues. *Nature Immunology*, 14(10), 1007–1013.

Byju, K., Anuradha, V., Rosmine, E., Sankar, H. S. H., Gopinath, A., Peter, K. J. P., ... Nair, S. M. (2015). DPPH Scavenging Property of Active Principles from Soft Coral Sarcophyton Flexuosum Tixier-Durivault. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 49(3), 178–182.



- Caramalho, I., Lopes-carvalho, T., Ostler, D., Zelenay, S., Haury, M., & Demengeot, J. (2003). Regulatory T Cells Selectively Express Toll-like Receptors and Are Activated by Lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(4), 403–411.
- Carmody, R. J., & Chen, Y. H. (2007). Nuclear factor-kappaB: Activation and Regulation during Toll-Like Receptor Signaling. *Cellular and Molecular Immunology*, 4(1), 31–41.
- Carté, B. K. (1996). Biomedical potential of marine natural products. *BioScience*, 46, 271–286.
- Carty, M., Goodbody, R., Schröder, M., Stack, J., Moynagh, P. N., & Bowie, A. G. (2006). The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nature Immunology*, 7(10), 1074–1081.
- Cerutti, P. A. (1994). Oxy-radicals and cancer. *The Lancet*, 344(8926), 862–863.
- Chan, C. C., Hwang, S. J., Lee, F. Y., Wang, S. S., Chang, F. Y., Li, C. P., ... Lee, F. Y. (1997). Prognostic Value of Plasma Endotoxin Levels in Patients with Cirrhosis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(9), 942–945.
- Chan, E. D., & Riches, D. W. H. (2001). IFN- $\gamma$  + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38 mapk in a mouse macrophage cell line. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(3), 441–450.
- Chang, J., Kunkel, S. L., & Chang, C.-H. (2009). Negative regulation of MyD88-dependent signaling by IL-10 in dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(43), 18327–18332.
- Chao, C.-H., Chou, K.-J., Huang, C.-Y., Wen, Z.-H., Hsu, C.-H., Wu, Y.-C., ... Sheu, J.-H. (2012). Steroids from the soft coral *Sinularia crassa*. *Marine Drugs*, 10(2), 439–450.
- Chasanah, E. (2008). Marine biodiscovery research in indonesia : challenges and rewards. *Journal of Coastal Development*, 12(1), 1–12.
- Checker, R., Sandur, S. K., Sharma, D., Patwardhan, R. S., Jayakumar, S., Kohli, V., ... Sainis, K. B. (2012). Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- $\kappa$ B, AP-1 and NF-AT. *PloS One*, 7(2), e31318.
- Chen, Y.-H., Tai, C.-Y., Kuo, Y.-H., Kao, C.-Y., Li, J.-J., Hwang, T.-L., ... Sung, P.-J. (2011). Cladieunicellins A-E, new eunicellins from an Indonesian soft coral *Cladiella* sp. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 59(3), 353–358.
- Chen, W., Li, Y., & Guo, Y. (2012). Terpenoids of *Sinularia* soft corals: chemistry and bioactivity. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(3), 227–237.
- Cheng, S. Y., Chuang, C. T., Wang, S. K., Wen, Z. H., Chiou, S. F., Hsu, C. H., ... Duh, C. Y. (2010). Antiviral and anti-inflammatory diterpenoids from the soft coral *Sinularia gyrosa*. *Journal of Natural Products*, 73, 1184–1187.
- Cheng, S.-Y., Wen, Z.-H., Chiou, S.-F., Tsai, C.-W., Wang, S.-K., Hsu, C.-H., ... Duh, C.-Y. (2009). Ceramide and cerebrosides from the octocoral *Sarcophyton ehrenbergi*. *Journal of Natural Products*, 72(3), 465–468.
- Chhikara, M., Wang, S., Kern, S. J., Ferreyra, G. A., Barb, J. J., Peter, J., & Danner, R. L. (2009). Carbon Monoxide Blocks Lipopolysaccharide-Induced Gene Expression by Interfering with Proximal TLR4 to NF- $\kappa$ B Signal Transduction



in Human Monocytes. *PLoS One*, 4(12), e8139.

Chill, L., Berrer, N., Benayahu, Y., & Kashman, Y. (2005). Eunicellin Diterpenes from Two Kenyan Soft Corals. *Journal of Natural Products*, 68(1), 19–25.

Choi, E. M., Suh, K. S., Kim, Y. J., Hong, S. M., Park, S. Y., & Chon, S. (2016). Glabridin Alleviates the Toxic Effects of Methylglyoxal on Osteoblastic MC3T3-E1 Cells by Increasing Expression of the Glyoxalase System and Nrf2/HO-1 Signaling and Protecting Mitochondrial Function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(1), 226–235.

Coll, J. C., Bowden, B. F., Tapiolas, D. M., Willis, R. H., Djura, P., Streamer, M., & Trott, L. (1985). Studies of Australian soft corals—XXXV. *Tetrahedron*, 41(6), 1085–1092.

Coll, J., La Barre, S., Sammarco, P., Williams, W., & Bakus, G. (1982). Chemical Defences in Soft Corals (Coelenterata: Octocorallia) of the Great Barrier Reef: A Study of Comparative Toxicities. *Marine Ecology Progress Series*, 8, 271–278.

Coll, J. C. (1992). The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). *Chemical Reviews*, 100(2), 613–631.

Collins, P., & Wege, D. (1979). The Total Synthesis of Sinularene, a Sesquiterpene Hydrocarbon from the Soft Coral *Sinularia mayi*. *Australian Journal of Chemistry*, 32(8), 1819–1826.

Collins, T. (1993). Endothelial nuclear factor- $\kappa$ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Laboratory Investigation*, 68(5), 499–508.

Collins, T., Tucker, Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D., & Maniatis, T. (1995). Transcriptional molecules: regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- $\kappa$ B and cytokine-inducible enhancers. *The FASEB Journal*, 9(10), 899–909.

Cope, A., Le Friec, G., Cardone, J., & Kemper, C. (2011). The Th1 life cycle: Molecular control of IFN- $\gamma$  to IL-10 switching. *Trends in Immunology*, 32(6), 278–286.

Coppack, S. W. (2001). Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 60(3), 349–356.

Cronstein, B. N., Kimmeli, S. C., Levin, R. I., Martiniuk, F., & Weissmann, G. (1992). A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(21), 9991–9995.

Dahiya, Y., Pandey, R. K., Bhatt, K. H., & Sodhi, A. (2010). Role of prostaglandin E2 in peptidoglycan mediated iNOS expression in mouse peritoneal macrophages in vitro. *FEBS Letters*, 584(19), 4227–4232.

Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(January), 1–13.

Dalrymple, S. A., Slattery, R., Aud, D. E. E. M., Krishna, M., Lucian, L. A., & Murray, R. (1996). Interleukin-6 Is Required for a Protective Immune Response to Systemic *Escherichia coli* Infection. *Infection and Immunity*, 64(8), 3231–



3235.

Dayer, J., & Choy, E. (2009). Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology*, 49(1), 15–24.

de Almeida, B. F. M., Silva, K. L. O., Chiku, V. M., Leal, A. A. C., Venturin, G. L., Narciso, L. G., ... de Lima, V. M. F. (2017). The effects of increased heme oxygenase-1 on the lymphoproliferative response in dogs with visceral leishmaniasis. *Immunobiology*, 222(5), 693–703.

Deem, T. L., & Cook-mills, J. M. (2004). Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species. *Blood*, 104(8), 2385–2394.

del Fresno, C., García-rijo, F., Gómez-Pinã, V., Soares-Schanoski, A., Fernández-Ruiz, I., Jurado, T., ... López-Collazo, E. (2009). Potent Phagocytic Activity with Impaired Antigen Presentation Identifying Lipopolysaccharide-Tolerant Human Monocytes: Demonstration in Isolated Monocytes from Cystic Fibrosis. *The Journal of Immunology*, 182(10), 6494–6507.

Devaraj, S., Mathur, S., Basu, A., Aung, H. H., Vasu, V. T., Meyers, S., & Jialal, I. (2008). A Dose-Response Study on the Effects of Purified Lycopene Supplementation on Biomarkers of Oxidative Stress. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(2), 267–273.

Devi, G. S., Prasad, M. H., Saraswathi, I., & Raghu, D. (2000). Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clinica Chimica Acta*, 293(1–2), 53–62.

Dewanto, D. K., Tanod, W. A., Finarti, & Renol. (2018). Screening of Antiradical Activity from Some Central Sulawesi Mangroves. *Pharmaciana*, 8(1), 155–168.

Dinkova-kostova, A. T., & Talalay, P. (2010). NAD(P)H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 116–123.

Druzhilovskiy, D. S., Rudik, A. V., Filimonov, D. A., Lagunin, A. A., Glorizova, T. A., & Poroikov, V. V. (2016). Online resources for the prediction of biological activity of organic compounds. *Russian Chemical Bulletin*, 65(2), 384–393.

El-Gamal, M. I., Lee, W. S., Shin, J. S., Oh, C. H., Lee, K. T., Choi, J., ... Baek, D. (2016). Synthesis of New Tricyclic and Tetracyclic Fused Coumarin Sulfonate Derivatives and Their Inhibitory Effects on LPS-Induced Nitric Oxide and PGE2 Productions in RAW 264.7 Macrophages: Part 2. *Archiv Der Pharmazie*, 349(11), 853–863.

Ellis, S. (1999). Center Tropical And Subtropical Farming Soft Corals for the Marine Aquarium Trade. *Aquaculture*, (140), 1–6.

Ellis, S., & Sharron, L. (1997). The Culture of Soft Corals (Order: Alcyonacea) for the Marine Aquarium Trade. In *Center Trop Subtrop Aquaculture*. Retrieved from [http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:The+Culture+of+Soft+Corals+\(Order:+Alcyonacea\)+for+the+Marine+Aquarium+Trade#](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:The+Culture+of+Soft+Corals+(Order:+Alcyonacea)+for+the+Marine+Aquarium+Trade#)

1



Elson, C. O., Cong, Y., McCracken, V. J., Dimmitt, R. A., Lorenz, R. G., & Weaver, C. T. (2005). Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunological Reviews*, 206, 260–276.

Fajarningsih, N. D., Nursid, M., Januar, H. I., & Wikanta, T. (2013). Bioprospecting of Sponge, Soft Coral and Ascidian from Wakatobi Marine Nasional Park: Antitumor and Antioxidant. *Journal of Postharvest and Biotechnology of Marine and Fisheries*, 8(2), 161–170.

Fattorusso, E., Luciano, P., Putra, M. Y., Tagliatalata-Scafati, O., Ianaro, A., Panza, E., ... Cerrano, C. (2011). Chloroscabrolides, chlorinated norcembranoids from the Indonesian soft coral *Sinularia* sp. *Tetrahedron*, 67(41), 7983–7988.

Fattorusso, E., Romano, A., Tagliatalata-Scafati, O., Achmad, M. J., Bavestrello, G., & Cerrano, C. (2008). Xenimanadins A–D, a family of xenicane diterpenoids from the Indonesian soft coral *Xenia* sp. *Tetrahedron*, 64(14), 3141–3146.

Fattorusso, E., Romano, A., Tagliatalata-Scafati, O., Irace, C., Maffettone, C., Bavestrello, G., & Cerrano, C. (2009). Oxygenated cembranoids of the decaryiol type from the Indonesian soft coral *Lobophytum* sp. *Tetrahedron*, 65(15), 2898–2904.

Fattorusso, E., Romano, A., Tagliatalata-Scafati, O., Janib Achmad, M., Bavestrello, G., & Cerrano, C. (2008). Loboanthamine, a new zoanthamine-type alkaloid from the Indonesian soft coral *Lobophytum* sp. *Tetrahedron Letters*, 49(14), 2189–2192.

Feldmann, M., Brennan, F. M., Elliott, M. J., Williams, R. O., & Maini, R. N. (1995). TNF $\alpha$  Is an Effective Therapeutic Target for Rheumatoid Arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 766(1), 272–278.

Feng, G., Sun, B., & Li, T. (2015). International Immunopharmacology Daidzein attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via toll-like receptor 4 / NF-kappaB pathway. *International Immunopharmacology*, 26(2), 392–400.

Feng, Y., & Tang, X. (2014). Chemico-Biological Interactions Effect of glucocorticoid-induced oxidative stress on the expression of Cbfa1. *Chemico-Biological Interactions*, 207, 26–31.

Ferluga, J., & Allison, A. . (1978). Role of Mononuclear Infiltrating Cells in Pathogenesis of Hepatitis. *The Lancet*, 312(September), 610–611.

Filimonov, D. A., Lagunin, A. A., Glorizova, T. A., Rudik, A. V., Druzhilovskii, D. S., Pogodin, P. V., & Poroikov, V. V. (2014). Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50(3), 444–457.

Firdayani, F., Agustini, T. W., & Ma'ruf, W. F. (2015). Ekstraksi Senyawa Bloaktif sebagai Antioksidan Alami Spirulina Platensis Segar dengan Pelarut yang Berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 18(1), 28–37.

Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 1–13.

Fraire, A. E., Woda, B. A., Savas, L., & Jiang, Z. (2003). and LFA-1 ) in Adenocarcinoma of Lung Technical Aspects. In B. Driscoll (Ed.), *Methods in*



- Molecular Medicine* (Vol. 74, pp. 243–249). New Jersey: Humana Press Inc.
- Frey, E. A., Miller, D. S., Jahr, T. G., Sundan, A., Bazil, V., Espevik, T., ... Wright, S. D. (1992). Soluble CD14 Participates in the Response of Cells to Lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(December), 1665–1671.
- Frossard, C. P., & Eigenmann, P. A. (2008). The role of IL-10 in preventing food-induced anaphylaxis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(9), 1309–1317.
- Fukui, H. (2005). Relation of Endotoxin, Endotoxin Binding Proteins and Macrophages to Severe Alcoholic Liver Injury and Multiple Organ Failure. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research*, 29(11), 172–179.
- Fukumura, D., & Jain, R. K. (2007). Novel function of RANKL: eNOS activator. *Blood*, 109(4), 1339–1340.
- Fukumura, D., Kashiwagi, S., & Jain, R. K. (2006). The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 6(7), 521–534.
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., & Samali, A. (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 1–23.
- Fuster, J. J., & Walsh, K. (2014). The Good, The Bad, and The Ugly of Interleukin-6 Signaling. *The EMBO Journal*, 33(13), 1425–1428.
- Gallucci, R. M., Simeonova, P. P., Matheson, J. M., Kommineni, C., Guriel, J. L., Sugawara, T., & Luster, M. I. (2000). Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6 – deficient and immunosuppressed mice. *FASEB Journal*, 14(15), 2525–2531.
- Gao, L., Cui, Y., Wang, Q., & Wang, S. (2013). Amelioration of Danhong injection on the lipopolysaccharide-stimulated systemic acute inflammatory reaction via multi-target strategy. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(3), 772–782.
- Gavino, V. C., Miller, J. S., Ikharebha, S., Milo, G. E., & Cornwell, D. G. (1981). Effect of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on lipid peroxidation in tissue cultures. *Journal of Lipid Research*, 22(5), 763–769.
- Gioannini, T. L., Teghanemt, A., Zhang, D., Coussens, N. P., Dockstader, W., Ramaswamy, S., & Weiss, J. P. (2004). Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4186–4191.
- Gioannini, Theresa L., & Weiss, J. P. (2007). Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunologic Research*, 39(1–3), 249–260.
- Gookin, J. L., Duckett, L. L., Armstrong, M. U., Stauffer, S. H., Finnegan, C. P., Murtaugh, M. P., ... Argenzio, R. A. (2004). Nitric oxide synthase stimulates prostaglandin synthesis and barrier function in *C. parvum*-infected porcine ileum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(3), 571–581.
- Görög, S., & Chafetz, L. (1980). The Analysis of Steroids. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 9(4), 333–383.
- Goto, H., Nakamura, T., Shirabe, S., Ueki, Y., Nishiura, Y., Furuya, T., ... Nagataki, S. (1997). Up-regulation of iNOS mRNA expression and increased production of NO in human monoblast cell line, U937 transfected by HTLV-I tax gene.



*Immunobiology*, 197(5), 513–521.

Guerriero, A., Amhrosio, M. D., Pietra, F., Chimica, I., & Trento, U. (1990). Novel Hydroxyicosatetraenoic and Hydroxyicosapentaenoic Acids and a 13-Oxo Analog. Isolation from a Mixture of the Calcareous Red Algae *Lithothamnion corallioides* and *Lithothamnion calcareum* of Brittany Waters. *Helvetica Chimica Acta*, 73(8), 2183–2189.

Guerriero, A., Dematté, B., D'Ambrosio, M., & Pietra, F. (1986). (+)-Coralloidin-A and (-)-Coralloidin-B, Two New Sesquiterpenoids from the Mediterranean Alcyonacean *Alcyonium coralloides*. *Journal of Natural Products*, 49(4), 608–613.

Hackel, D., Brack, A., & Rittner, H. L. (2010). *Leukocytes as Mediators of Pain and Analgesia* (Vol. 9; G. A. Barry, ed.).

Hammer, G. E., Turer, E. E., Taylor, K. E., Fang, C. J., Advincula, R., Oshima, S., ... Ma, A. (2011). Expression of A20 by dendritic cells preserves immune homeostasis and prevents colitis and spondyloarthritis. *Nature Immunology*, 12(12), 1184–1193.

Hämäläinen, M. (2008). *Inducible Nitric Oxide Synthase as a Target of Treatment Modalities*. University of Tampere.

Hämäläinen, M., Lilja, R., Kankaanranta, H., & Moilanen, E. (2008). Inhibition of iNOS expression and NO production by anti-inflammatory steroids. Reversal by histone deacetylase inhibitors. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 21(2), 331–339.

Handayani, D., Edrada, R. a., Proksch, P., Wray, V., Witte, L., Van Ofwegen, L., & Kunzmann, a. (1997). New oxygenated sesquiterpenes from the Indonesian soft coral *Nephtea chabolii*. *Journal of Natural Products*, 60(7), 716–718.

Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical Methods; A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. In *Published in the USA by Chapman and Hall in association with Methuen, Inc.* (Vol. 3).

Hardiningtyas, S. D., Purwaningsih, S., & Handharyani, E. (2014). Aktivitas Antioksidan Dan Efek Hepatoprotektif Daun Bakau Api-Api Putih. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 17(1), 80–91.

Hasegawa, S., Matsushige, T., Inoue, H., Shirabe, K., Fukano, R., & Ichiyama, T. (2011). Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy. *Cytokine*, 54(2), 167–172.

Hashimoto, A., & Kameoka, T. (2008). Applications of infrared spectroscopy to biochemical, food, and agricultural processes. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(5), 416–451.

Hatachi, S., Iwai, Y., Kawano, S., Morinobu, S., Kobayashi, M., Koshiba, M., ... Kumagai, S. (2003). CD4+ PD-1+ T cells accumulate as unique anergic cells in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Journal of Rheumatology*, 30(7), 1410–1419.

Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Review Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell*, 132(3), 344–362.

Hayes, J. D., McMahon, M., Chowdhry, S., & Dinkova-kostova, A. T. (2010). Cancer Chemoprevention Mechanisms Mediated Through the Keap1–Nrf2



Pathway. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(11), 1713–1748.

Hedl, M., & Abraham, C. (2013). Negative regulation of human mononuclear phagocyte function. *Mucosal Immunology*, 6(2), 205–223.

Heimdal, J. H., Aarstad, H. J., & Olofsson, J. (2000). Peripheral Blood T-Lymphocyte and Monocyte Function and Survival in Patients With Head and Neck Carcinoma. *The Laryngoscope*, 110(3 Pt1), 402–407.

Hernani, Y. E. (2008). Adiponectin Down Regulated Inducible Nitric Oxide (iNOS) Expression on Huvec's Culture Treated With Lipo Polysaccharide (LPS). *Journal of Medicine Brawijaya*, 24(3), 1–5.

Hibi, M., & Murakami, M. (1990). Molecular Cloning and Expression of an IL-6 Signal Transducer, gp130. *Cell*, 63(6), 1149–1157.

Hickey, M. J., Granger, D. N., & Kubes, P. (2001). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: Studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiologica Scandinavica*, 173(1), 119–126.

Higa, T., Tanaka, J., Ohtani, I. I., Musman, M., Roy, M. C., & Kuroda, I. (2001). Bioactive compounds from coral reef invertebrates. *Pure and Applied Chemistry*, 73(3), 589–593.

Hirsch, E., Irikura, V. M., Paul, S. M., & Hirsh, D. (2002). Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 11008–11013.

Hitotsumatsu, O., Ahmad, R. C., Tavares, R., Wang, M., Philpott, D., Turer, E. E., ... Ma, A. (2008). The Ubiquitin-Editing Enzyme A20 Restricts Nucleotide-Binding Oligomerization Domain Containing 2-Triggered Signals. *Immunity*, 28(3), 381–390.

Hoeksema, B. (2011). The biology of coral reefs. *Marine Biology Research*, 7(1), 106–107.

Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., & Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*, 420, 329–333.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., ... Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *The Journal of Immunology*, 162, 3749–3752.

Hoves, S., Krause, S. W., Schütz, C., Halbritter, D., Schölmerich, J., Herfarth, H., & Fleck, M. (2006). Monocyte-derived human macrophages mediate anergy in allogeneic T cells and induce regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(4), 2691–2698.

Hu, G.-P., Yuan, J., Sun, L., She, Z.-G., Wu, J.-H., Lan, X.-J., ... Chen, S.-P. (2011). Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs*, 9(4), 514–525.

Hu, L. C., Yen, W. H., Su, J. H., Chiang, M. Y. N., Wen, Z. H., Chen, W. F., ... Sung, P. J. (2013). Cembrane derivatives from the soft corals, *Sinularia gaweli* and *Sinularia flexibilis*. *Marine Drugs*, 11(6), 2154–2167.

Huang, M. ., Ghai, G., & Ho, C. . (2004). Inflammatory Process and Molecular Targets for Anti-inflammatory Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(4), 127–139.



- Huliselan, Y. M., Runtuwene, M. R. J., & Wewengkang, D. S. (2015). Antioxidant Activity of Ethanol, Ethyl Acetate and n-Hexane Extract from Seswanua Leaves (*Clerodendron squamatum* Vahl.). *Pharmacoin*, 4(3), 155–163.
- Hunt, B., & Vincent, A. C. J. (2006). Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. *Ambio*, 35(2), 57–64.
- Hwang, S.-J., & Song, J.-I. (2007). Reproductive biology and larval development of the temperate soft coral *Dendronephthya gigantea* (Alcyonacea: Nephtheidae). *Marine Biology*, 152(2), 273–284.
- Hwang, Y. P., & Jeong, H. G. (2010). Ginsenoside Rb1 protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing heme oxygenase-1 expression through an estrogen receptor-related PI3K / Akt / Nrf2-dependent pathway in human dopaminergic cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(1), 18–28.
- Hyakushima, N., Mitsuzawa, H., Nishitani, C., Sano, H., Kuronuma, K., Konishi, M., ... Kuroki, Y. (2004). Interaction of Soluble Form of Recombinant Extracellular TLR4 Domain with MD-2 Enables Lipopolysaccharide Binding and Attenuates TLR4-Mediated Signaling. *The Journal of Immunology*, 173(11), 6949–6954.
- Ianaro, a, O'Donnell, C. a, Di Rosa, M., & Liew, F. Y. (1994). A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice. *Immunology*, 82(3), 370–375.
- Ibrahim, M., Hameed, A. J., & Jalbout, A. (2008). Molecular spectroscopic study of River Nile sediment in the greater Cairo region. *Applied Spectroscopy*, 62(3), 306–311.
- Iguchi, K., Kitade, M., Yamada, Y., Ichikawa, A., Ohtani, I., Kusumi, T., & Kakisawa, H. (1991). Stereostructures of unique 13-membered carbocyclic cembranolides from the soft coral *Lobophytum pauciflorum*. *Chemistry Letters*, 20(2), 319–322.
- Iwami, K., Matsuguchi, T., Masuda, A., Kikuchi, T., Musikacharoen, T., & Yoshikai, Y. (2015). Cutting Edge: Naturally Occurring Soluble Form of Mouse Toll-Like Receptor 4 Inhibits Lipopolysaccharide Signaling. *The Journal of Immunology*, 165(12), 6682–6686.
- Iwasaki, J., Ito, H., Aoyagi, M., Sato, Y., & Iguchi, K. (2006). Briarane-Type Diterpenoids from the Okinawan Soft Coral *Pachyclavularia violacea*. *Journal of Natural Product*, 69(1), 2–6.
- Iyer, S. S., Ghaffari, A. A., & Cheng, G. (2010). Lipopolysaccharide-Mediated IL-10 Transcriptional Regulation Requires Sequential Induction of Type I IFNs and IL-27 in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 185(11), 6599–6607.
- Jacob, C., Giles, G. I., Giles, N. M., & Sies, H. (2003). Sulfur and Selenium : The Role of Oxidation State in Protein Structure and Function. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(39), 4742–4758.
- Jacoeb, A. M., Purwaningsih, S., & Rinto. (2011). Anatomi, Komponen Bioaktif dan Aktivitas Antioksidan Daun Mangrove Api Api (*Avicennia marina*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 14(2), 143–152.
- Jafarian, M., Mozhgani, S., Patrad, E., Vaziri, H., Rezaee, S. A., Aakbarin, M. M.,



& Norouzi, M. (2017). Evaluation of INOS , ICAM-1 , and VCAM-1 gene expression : A study of adult T cell leukemia malignancy associated with HTLV-1. *Archives of Virology*, 162(4), 1–7.

Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197–216.

Jang, S. Il, Kim, H. J., Kim, Y., Jeong, S., & You, Y. (2006). Tanshinone IIA inhibits LPS-induced NF- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 cells : Possible involvement of the NIK–IKK, ERK1/2, p38 and JNK pathways. *European Journal of Pharmacology*, 542(1–3), 1–7.

Janssens, S., Burns, K., Tschopp, J., & Beyaert, R. (2002). Regulation of Interleukin-1- and Lipopolysaccharide-Induced NF- $\kappa$ B Activation by Alternative Splicing of MyD88. *Current Biology*, 12(6), 467–471.

Janssen-Heininger, Y. M. W., Poynter, M. E., & Baeuerle, P. A. (2000). Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor  $\kappa$ B. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(9), 1317–1327.

Januar, H. I., Chasanah, E., Motti, C. A., Tapiolas, D. M., Liptrot, C. H., & D. Wright, A. (2010). Cytotoxic Cembranes from Indonesian Specimens of the Soft Coral *Nephtea* sp. *Marine Drugs*, 8(7), 2142–2152.

Jeong, J., Hyeon, H., Ho, M., Kim, G., Kim, W., & Hyun, Y. (2014). Chemico-Biological Interactions Anti-inflammatory effects of genistein via suppression of the toll-like receptor 4-mediated signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Chemico-Biological Interactions*, 212, 30–39.

Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Current Protocols in Plant Biology*, 1(2), 345–358.

Johnson, J. A., Johnson, D. A., Kraft, A. D., Calkins, M. J., Jakel, R. J., Vargas, M. R., & Chen, P. (2008). The Nrf2 – ARE Pathway An Indicator and Modulator of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147(1), 61–69.

Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 531–564.

Kamel, H. N., & Slattery, M. (2005). .: Chemistry and Biomedical Applications. *Pharmaceutical Biology*, 43(3), 253–269.

Kamp, D. W., Shacter, E., & Weitzman, S. a. (2011). Chronic inflammation and cancer: the role of the mitochondria. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 25(5), 400–410.

Kang, Y. E., Kim, J. M., Joung, K. H., Lee, J. H., You, B. R., Choi, M. J., ... Kim, H. J. (2016). The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. *PLoS ONE*, 11(4), 1–14.

Kao, E.-S., Hsu, J.-D., Wang, C.-J., Yang, S.-H., Cheng, S.-Y., & Lee, H.-J. (2009). Polyphenols Extracted from *Hibiscus sabdariffa* L. Inhibited Lipopolysaccharide-Induced Inflammation by Improving Antioxidative Conditions and Regulating Cyclooxygenase -2 Expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(2), 385–390.

Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A., & Farnarier, C. (2003).



IL-6: A regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in Immunology*, 24(1), 25–29.

Kapojos, M. M., Lee, J.-S., Oda, T., Nakazawa, T., Takahashi, O., Ukai, K., ... Namikoshi, M. (2010). Two unprecedented cembrene-type terpenes from an Indonesian soft coral sarcophyton sp. *Tetrahedron*, 66(3), 641–645.

Kapturczak, M. H., Wasserfall, C., Brusko, T., Campbell-thompson, M., Ellis, T. M., Atkinson, M. A., & Agarwal, A. (2004). Heme Oxygenase-1 Modulates Early Inflammatory Responses. *The American Journal of Pathology*, 165(3), 1045–1053.

Karin, M. (2006). Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature*, 441(May), 431–436.

Kasal, A., Budesinsky, M., & Griffiths, W. J. (2010). Spectroscopic Methods of Steroid Analysis. In H. L. J. Makin & D. B. Gower (Eds.), *Steroid Analysis* (pp. 27–161).

Katsuoka, F., Motohashi, H., Ishii, T., Aburatani, H., Engel, J. D., & Yamamoto, M. (2005). Genetic Evidence that Small Maf Proteins Are Essential for the Activation of Antioxidant Response Element-Dependent Genes. *Molecular and Cellular Biology*, 25(18), 8044–8051.

Kawagoe, T., Sato, S., Jung, A., Yamamoto, M., Matsui, K., Kato, H., ... Akira, S. (2007). Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune responses but not in TCR signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(5), 1013–1024.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., & Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. *Immunity*, 11, 115–122.

Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373–384.

Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*, 34(5), 637–650.

Keller, E. T., Wanagat, J., & Ershler, W. B. (1996). Molecular And Cellular Biology of Interleukin-6 And Its Receptor. *Frontiers in Bioscience*, 1, 340–357.

Khansari, N., Shakiba, Y., & Mahmoudi, M. (2009). Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 3, 73–80.

Kim, B. H., Lee, E. S., Choi, R., Nawaboot, J., Lee, M. Y., Lee, E. Y., ... Chung, C. H. (2016). Protective effects of curcumin on renal oxidative stress and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetic nephropathy. *Yonsei Medical Journal*, 57(3), 664–673.

Kim, S.-K. (2015). *Marine Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Kim, S. F. (2011). Nitric Oxide The role of nitric oxide in prostaglandin biology ; update. *Nitric Oxide*, 25(3), 255–264.

Kim, S. K., & Pak, C. S. (1991). Total Synthesis of ( $\pm$ )-Clavukerin A: A New Trinorguaiene Sesquiterpene. Biomimetic Synthesis of ( $\pm$ )-Clavularin A from ( $\pm$ )-Clavukeria A. *The Journal of Organic Chemistry*, 56(24), 6829–6832.

Kinamoni, Z., Groweiss, A., Carmely, S., Kashman, Y., & Loya, Y. (1983). Several



new cembranoid diterpenes from three soft corals of the red sea. *Tetrahedron*, 39(9), 1643–1648.

Kinjyo, I., Hanada, T., Inagaki-Ohara, K., Mori, H., Aki, D., Ohishi, M., ... Yoshimura, A. (2002). SOCS1/JAB is a Negative Regulator of LPS-Induced Macrophage Activation. *Immunity*, 17(5), 583–591.

Kirkland, T. N., Virca, G. D., Kuus-Reichel, T., Multer, F. K., Kim, S. Y., Ulevitch, R. J., & Tobias, P. S. (1990). Identification of Lipopolysaccharide-binding Proteins in 70Z/3 Cells by Photoaffinity Cross-linking. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(16, June), 9520–9525.

Kishimoto, T. (2005). Interleukin-6: From Basic Science to Medicine—40 Years in Immunology. *Interleukin-6: From Basic Science to Medicine—40 Years in Immunology*, 23(1), 1–21.

Klein, T., Neuhaus, K., Reutter, F., & Nusing, R. M. (2001). Generation of 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub>α in isolated rat kidney glomeruli by a radical-independent mechanism. *British Journal of Pharmacology*, 133(5), 643–650.

Kleinert, H., Wallerath, T., Fritz, G., Ihrig-Biedert, I., Rodriguez-Pascual, F., Geller, D. A., & Förstermann, U. (1998). Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: Roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-κB-signaling pathways. *British Journal of Pharmacology*, 125(1), 193–201.

Klemm, P., Harris, H. J., & Perretti, M. (1995). Effect of rolipram in a murine model of acute inflammation: comparison with the corticoid dexamethasone. *European Journal of Pharmacology*, 281(1), 69–74.

Knowles Richard G., & Salvador Moncada. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical Journal*, 298, 249–258.

Kobayashi, J., Ohizumi, Y., Nakamura, H., Yamakado, T., Matsuzaki, T., & Hirata, Y. (1983). Calcium-antagonistic substance from soft coral of the genus *Sarcophyton*. *Experientia*, 39(1), 67–69.

Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Janeway, C. A., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2002). IRAK-M Is a Negative Regulator of Toll-like Receptor Signaling. *Cell*, 110(July), 191–202.

Kobayashi, Masaru, & Hamaguchi, T. (1988). Marine Terpenes Precursors and Terpenoids . Isolation of Several Plausible of Marine Cembranoides , from the Soft Coral , *Sinularia mayi* Faculty of Pharmaceutical Sciences , Hokkaido University , . *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 36(10), 3780–3786.

Kobayashi, Motomasa, Son, B. W., Kyogoku, Y., & Kitagawa, I. (1984). Clavukerin C, A New Trinor-Guaiane Sesquiterpene Having a Hydroperoxy Function, From The Okinawan Soft Coral *Clavularia koellikeri*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 32(4), 1667–1670.

Kondo, T., Kawai, T., & Akira, S. (2012). Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends in Immunology*, 33(9), 449–458.

Kotake, S., Sato, K., Kim, K. J., Takahashi, N., Udagawa, N., Nakamura, I., ... Kashiwazaki, S. (1996). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 11(1), 88–95.

Kregel, K. C., & Zhang, H. J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging :



basic mechanisms , functional effects , and pathological considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292(1), 18–36.

Kriegelstein, C. F., & Granger, D. N. (2001). Adhesion molecules and their role in vascular disease. *American Journal of Hypertension*, 14(6 Pt 2), 44S-54S.

Kubistova, A., Horacek, J., & Novak, T. (2012). Increased interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in first episode schizophrenia patients versus healthy controls. *Psychiatria Danubina*, 24(Suppl1), 153–156.

Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2013). Robbins Basic Pathology Ninth Edition. In *Elsevier Saunders*.

Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology*, 30(1), 16–34.

Kumar, J. K., & Prasad, A. G. D. (2011). Identification and Comparison of Biomolecules in Medicinal Plants of Tephrosia Tinctoria. *Romanian Journal of Biophysics*, 21(1), 63–71.

Kumar, R., & Lakshmi, V. (2006). Two New Glycosides from the Soft Coral *Sinularia firma*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54(12), 1650–1652.

Kuwata, H., Watanabe, Y., Miyoshi, H., Yamamoto, M., Kaisho, T., Takeda, K., & Akira, S. (2003). IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF- $\alpha$  production in macrophages. *Blood*, 102(12), 4123–4129.

Kwiatkowska, S., Piasecka, G., Zieba, M., Piotrowski, W., & Nowak, D. (1999). Increased serum concentrations of conjugated dienes and malondialdehyde in patients with pulmonary tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 93(4), 272–276.

Lademarco, M. F., Barks, J. L., & Dean, D. C. (1995). Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF-alpha in cultured endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 95(1), 264–271.

Laing, K. J., & Secombes, C. J. (2004). Chemokines. *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 443–460.

Lancel, S., Hassoun, S. M., Favory, R., Decoster, B., Motterlini, R., & Neviere, R. (2009). Carbon Monoxide Rescues Mice from Lethal Sepsis by Supporting Mitochondrial Energetic Metabolism and Activating Mitochondrial Biogenesis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329(2), 641–648.

Lang, T., & Mansell, A. (2007). The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunology and Cell Biology*, 85(June), 425–434.

Lee, A. K., Sung, S. H., Kim, Y. C., & Kim, S. G. (2003). Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase , TNF-  $\alpha$  and COX-2 expression by saquinone effects on I-  $\kappa$ B phosphorylation , C/EBP and AP-1 activation. *British Journal of Pharmacology*, 139(1), 11–20.

Lee, S. H., Kwak, C. H., Lee, S. K., Ha, S. H., Park, J., Chung, T. W., ... Kim, C. H. (2016). Anti-Inflammatory Effect of Ascochlorin in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells is Accompanied with the Down-Regulation of iNOS, COX-2 and Proinflammatory Cytokines Through NF- $\kappa$ B, ERK1/2, and p38 Signaling Pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(4), 978–987.

Lee, Y. N., Tai, C. J., Hwang, T. L., & Sheu, J. H. (2014). Krempfielins N-P, new anti-inflammatory eunicellins from a Taiwanese soft coral *Cladiella krempfi*.



*Marine Drugs*, 12, 1148–1156.

Lewis, R. J., & Janse, M. (2008). *Advances in Coral Husbandry in Public Aquariums. Public Aquarium Husbandry Series* (Vol. 2). Arnhem: Burgers' Zoo, the Netherlands.

Lerario, D. D. G., Ferreira, S. R. G., Miranda, W. L., & Chacra, A. R. (2001). Influence of dexamethasone and weight loss on the regulation of serum leptin levels in obese individuals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(4), 479–487.

Leung, L., & Cahill, C. M. (2010). TNF- $\alpha$  and neuropathic pain - a review. *Journal of Neuroinflammation*, 7(27), 1–11.

Li, B., & Zheng, S. G. (2015). How regulatory T cells sense and adapt to inflammation. *Cellular & Molecular Immunology*, 1–2.

Li, G., Zhang, Y., Deng, Z., Van Ofwegen, L., Proksch, P., & Lin, W. (2005). Cytotoxic cembranoid diterpenes from a soft coral *Sinularia gibberosa*. *Journal of Natural Products*, 68(5), 649–652.

Liang, L. F., & Guo, Y. W. (2013). Terpenes from the soft corals of the genus *Sarcophyton*: Chemistry and biological activities. *Chemistry and Biodiversity*, 10(12), 2161–2196.

Libermann, T. A., & Baltimore, D. (1990). Activation of Interleukin-6 Gene Expression through the NF-kappa B Transcription Factor. *Molecular and Cellular Biology*, 10(5), 2327–2334.

Liechty, K. W., Kim, H. B., Adzick, N. S., & Crombleholme, T. M. (2000). Fetal Wound Repair Results in Scar Formation in Interleukin-10–Deficient Mice in a Syngeneic Murine Model of Scarless Fetal Wound Repair. *Journal of Pediatric Surgery*, 35(6), 866–873.

Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K., & O'Neill, L. A. J. (2005). Negative Regulation of Toll-Like Receptor-Mediated Immune Responses. *Nature Reviews Immunology*, 5(June), 446–458.

Lillsunde, K., Festa, C., Adel, H., De Marino, S., Lombardi, V., Tilvi, S., ... Tammela, P. (2014). Bioactive Cembrane Derivatives from the Indian Ocean Soft Coral, *Sinularia kavarattiensis*. *Marine Drugs*, 12, 4045–4068.

Lin, R., Lee, S., Tsai, Y., Lin, H. C., Lu, R., Huang, C., ... Lo, K. (1995). Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices, and hyperdynamic circulation. *Journal of Hepatology*, 22(2), 165–172.

Lin, W.-Y., Su, J.-H., Lu, Y., Wen, Z.-H., Dai, C.-F., Kuo, Y.-H., & Sheu, J.-H. (2010). Cytotoxic and anti-inflammatory cembranoids from the Dongsha Atoll soft coral *Sarcophyton crassocaule*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(5), 1936–1941.

Lin, W. Y., Chen, B. W., Huang, C. Y., Wen, Z. H., Sung, P. J., Su, J. H., ... Sheu, J. H. (2014). Bioactive cembranoids, sarcocrassocolides P-R, from the Dongsha Atoll soft coral *Sarcophyton crassocaule*. *Marine Drugs*, 12(2), 840–850.

Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 337–341.

Long, F., Yang, H., Xu, Y., Hao, H., & Li, P. (2015). A strategy for the identification



of combinatorial bioactive compounds contributing to the holistic effect of herbal medicines. *Nature Publishing Group*, (January), 1–11.

Lowes, D. A., Webster, N. R., Murphy, M. P., & Galley, H. F. (2013). Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *British Journal of Anaesthesia*, *110*(3), 472–480.

Lu, Q., & Lemke, G. (2002). Homeostatic Regulation of the Immune System by Receptor Tyrosine Kinases of the Tyro 3 Family. *Science*, *293*(5528), 306–311.

Lu, S. C. (2011). Molecular Aspects of Medicine Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(1–2), 42–59.

Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, *42*, 145–151.

Lu, Y., Huang, C.-Y., Lin, Y., Wen, Z., Kuo, Y., Chiang, M. Y., ... Su, J.-H. (2008). Anti-inflammatory cembranoids from the soft corals *Sinularia querciformis* and *Sinularia granosa*. *Journal of Natural Products*, *71*(10), 1754–1759.

Maeda, K., Mehta, H., Drevets, D. A., & Coggeshall, K. M. (2010). IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood*, *115*(23), 4699–4706.

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). *Clinical & Experimental Immunology*, *101*(2), 207–212.

Mansell, A., Smith, R., Doyle, S. L., Gray, P., Fenner, J. E., Crack, P. J., ... Hertzog, P. J. (2006). Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nature Immunology*, *7*(2), 148–155.

Marks-Konczalik, J., Chu, S. C., & Moss, J. (1998). Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor  $\kappa$ B-binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(35), 22201–22208.

Marris, E. (2006). Marine natural products: drugs from the deep. *Nature*, *443*(7114), 904–905.

Massoumi, R., Chmielarska, K., Hennecke, K., Pfeifer, A., & Fässler, R. (2006). Cyld Inhibits Tumor Cell Proliferation by Blocking Bcl-3-Dependent NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell*, *125*(4), 665–677.

Mate's, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, *153*(1–3), 83–104.

Matheny, H. E., Deem, T. L., & Cook-Mills, J. M. (2000). Lymphocyte Migration Through Monolayers of Endothelial Cell Lines Involves VCAM-1 Signaling Via Endothelial Cell NADPH Oxidase. *The Journal of Immunology*, *164*(12), 6550–6559.

Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T., & Akira, S. (1993). Transcription factors NF-IL6 and NF- $\kappa$ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(21),



10193–10197.

Mayer, A. M. S., Rodríguez, A. D., Tagliatalata-Scafati, O., & Fusetani, N. (2013). Marine pharmacology in 2009-2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of . *Marine Drugs*, Vol. 11, pp. 2510–2573.

McAleer, J. P., & Vella, A. T. (2008). Understanding How Lipopolysaccharide Impacts CD4 T-Cell Immunity. *Critical Reviews in Immunology*, 28(4), 281–299.

McCafferty, D.-M., Granger, D. N., & Wallace, J. L. (1995). Indomethacin-induced gastric injury and leukocyte adherence in arthritic versus healthy rats. *Gastroenterology*, 109(4), 1173–1180.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435.

Merzenich, G. U., Panek, D., Zeitler, H., Vetter, H., & Wagner, H. (2010). Drug development from natural products: Exploiting synergistic effects. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(March), 208–219.

Menkes, M. S., Comstock, G. W., Vuilleumier, J. P., Helsing, K. J., Rider, A. A., & Brookmeyer, R. (1986). Serum Beta-Carotene, Vitamins a and E, Selenium, and the Risk of Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 315(20), 1250–1254.

Meyer, M., Schreck, R., & Baeuerle, P. A. (1993). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *The EMBO Journal*, 12(5), 2005–2015.

Meylan, E., Tschopp, J., & Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, 442(7098), 39–44.

Miller, S. I., Ernst, R. K., & Bader, M. W. (2005). LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 36–46.

Mitsuzawa, H., Nishitani, C., Hyakushima, N., Shimizu, T., Sano, H., Matsushima, N., ... Kuroki, Y. (2006). Recombinant Soluble Forms of Extracellular TLR4 Domain and MD-2 Inhibit Lipopolysaccharide Binding on Cell Surface and Dampen Lipopolysaccharide-Induced Pulmonary Inflammation in Mice. *The Journal of Immunology*, 177, 8133–8139.

Miyake, K. (2004). Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. *Seminars in Immunology*, 16(1), 11–16.

Miyake, K. (2007). Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*, 19(1), 3–10.

Momi, S., Monopoli, A., Alberti, P. F., Falcinelli, E., Corazzi, T., Conti, V., ... Gresele, P. (2012). Nitric oxide enhances the anti-inflammatory and anti-atherogenic activity of atorvastatin in a mouse model of accelerated atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 94(3), 428–438.

Moncada, S., Palmer, R. . & Higgs, E. . (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43(2), 109–142.

Moore, A., & Ndobe, S. (2009). Reefs at risk in Central Sulawesi, Indonesia - status



and outlook. *Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium, Ft. Lauderdale, Florida, 7-11 July, 1(840-844)*, 7-11.

Mori, K., Suzuki, S., Iguchi, K., & Yamada, Y. (1983). 8,11-Epoxy bridged cembranolide diterpene from the soft coral *Sinularia flexibilis*. *Chemistry Letters*, 12(10), 1515-1516.

Morris, L. A., Christie, E. M., Jaspars, M., & Ofwegen, L. P. Van. (1998). A Bioactive Secosterol with an Unusual A- and B-Ring Oxygenation Pattern Isolated from an Indonesian Soft Coral *Lobophytum* sp. *Journal of Natural Products*, 61, 538-541.

Morse, D., Pischke, S. E., Davis, R. J., Flavell, R. A., Loop, T., Otterbein, S. L., ... Choi, A. M. K. (2003). Mechanisms of Signal Transduction: Suppression of Inflammatory Cytokine Production by Carbon Monoxide Involves the JNK Pathway and AP-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 36993-36998.

Morse, D., Lin, L., Choi, A. M. K., & Ryter, S. W. (2009). Free Radical Biology & Medicine Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(1), 1-12.

Musone, S. L., Taylor, K. E., Lu, T. T., Nititham, J., Ferreira, R. C., Ortmann, W., ... Criswell, L. A. (2008). Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics*, 40(9), 1062-1064.

Mustachich, D., & Powis, G. (2000). Thioredoxin reductase. *Biochemical Journal*, 346(Pt 1), 1-8.

Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., ... Miyake, K. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature Immunology*, 3(7), 667-672.

Nagappan, T., & Palaniveloo, K. (2018). Biological Properties And Chemical Diversity Of *Sinularia flexibilis*, An Alcyonacean Soft Coral. *Journal of Sustainability Science and Management*, 13(2), 15-34.

Naik, E., & Dixit, V. M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *Journal of Experimental Medicine*, 208(1), 417-420.

Naiki, Y., Michelsen, K. S., Zhang, W., Chen, S., Doherty, T. M., & Arditi, M. (2005). Transforming growth factor- $\beta$  differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5491-5495.

Nakahara, H., Song, J., Sugimoto, M., Hagihara, K., Kishimoto, T., Yoshizaki, K., & Nishimoto, N. (2003). Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody Therapy Reduces Vascular Endothelial Growth Factor Production in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 48(6), 1521-1529.

Nakagawa, R., Naka, T., Tsutsui, H., Fujimoto, M., Kimura, A., Abe, T., ... Kishimoto, T. (2002). SOCS-1 Participates in Negative Regulation of LPS Responses. *Immunity*, 17(5), 677-687.

Nakashima, Y., Raines, E. W., Plump, A. S., Breslow, J. L., & Ross, R. (1998). Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at Atherosclerosis-Prone Sites on the Endothelium in the ApoE-Deficient Mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis,*



and *Vascular Biology*, 18(5), 842–851.

Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(December), 846–852.

Navarro-millán, I., Singh, J. A., & Curtis, J. R. (2012). Systematic Review of Tocilizumab for Rheumatoid Arthritis: A New Biologic Agent Targeting the Interleukin-6 Receptor. *Clinical Therapeutics*, 34(4), 788-802.e3.

Neganova, M. E., Afanas'Eva, S. V., Klochkov, S. G., & Shevtsova, E. F. (2012). Mechanisms of antioxidant effect of natural sesquiterpene lactone and alkaloid derivatives. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 152(6), 720–722.

Negishi, H., Ohba, Y., Yanai, H., Takaoka, A., Honma, K., Yui, K., ... Honda, K. (2005). Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(44), 15989–15994.

Nguyen, T., Nioi, P., & Pickett, C. B. (2009). The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13291–13295.

Niessner, A., Steiner, S., Speidl, W. S., Pleiner, J., Seidinger, D., Maurer, G., ... Wojta, J. (2006). Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 in vivo. *Atherosclerosis*, 189(2), 408–413.

Nilsson, J., Wigren, M., & Shah, P. K. (2009). Regulatory T cells and the control of modified lipoprotein autoimmunity-driven atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 19(8), 272–276.

Nolan, J. P. (2010). The role of intestinal endotoxin in liver injury: A long and evolving history. *Hepatology*, 52(5), 1829–1835.

Nopiyanti, H. T., & Agustriani, F. (2016). Skrining *Nypa fruticans* Sebagai Antibakteri *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Maspri Journal*, 8(June 2014), 83–90. Retrieved from

O'Carroll, C. E. (2013). *Investigation of Toll-Like Receptor Tolerance in the Regulation of Inflammation*. National University of Ireland, Cork.

Opal, S. M., & Depalo, V. A. (2000). Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest*, 117(4), 1162–1172.

Orlando, S., Matteucci, C., Fadlon, E. J., Buurman, W. A., Bardella, M. T., Colotta, F., ... Mantovani, A. (1997). TNF-alpha, unlike other proand anti-inflammatory cytokines, induces rapid release of the IL-1 type II decoy receptor in human myelomonocytic cells. *The Journal of Immunology*, 158(8), 3861–3868.

Özkaya, M. O., & Nazrolu, M. (2010). Multivitamin and mineral supplementation modulates oxidative stress and antioxidant vitamin levels in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 94(6), 2465–2466.

Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene*, 18(49), 6853–6866.

Pane's, J., & Granger, D. N. (1998). Leukocyte-Endothelial Cell Interactions: Molecular Mechanisms and Implications in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterology*, 114(5), 1066–1090.



- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), 87–103.
- Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B.-S., Lee, H., & Lee, J.-O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature*, 458(April), 1191–1195.
- Park, E. J., Cheenpracha, S., Chang, L. C., & Pezzuto, J. M. (2011). Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by epimuqubilin A via IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Phytochemistry Letters*, 4(4), 426–431.
- Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(1), 49–62.
- Picard, C., Puel, A., Bonnet, M., Ku, C.-L., Bustamante, J., Yang, K., ... Casanova, J.-L. (2003). Pyogenic Bacterial Infections in Humans with IRAK-4 Deficiency. *Science*, 299, 2076–2079.
- Picarella, D., Hurlbut, P., Rottman, J., Shi, X., Butcher, E., & Ringler, D. J. (1997). Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. *The Journal of Immunology*, 158(5), 2099–2106.
- Podolsky, D. K., Lobb, R., King, N., Benjamin, C. D., Pepinsky, B., Sehgal, P., & DeBeaumont, M. (1993). Attenuation of Colitis in the Cotton-top Tamarin by Anti- $\alpha$ 4 integrin Monoclonal Antibody. *The Journal of Clinical Investigation*, 92(1), 372–380.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M., Huffel, C. Van, Du, X., ... Beutler, B. (1998). Defective LPS Signaling in C3H / HeJ and C57BL / 10ScCr Mice : Mutations in Tlr4 Gene. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396), 2085–2088.
- Ponnuswamy, P., Vré, E. A. Van, Mallat, Z., & Tedgui, A. (2012). Humoral and cellular immune responses in atherosclerosis : Spotlight on Current Prospects in Vascular Biology Current Prospects in Vascular Biology. *Vascular Pharmacology*, 56(5–6), 193–203.
- Popa, C., Netea, M. G., Van Riel, P. L. C. M., Van Der Meer, J. W. M., & Stalenhoef, A. F. H. (2007). The role of TNF- $\alpha$  in chronic inflammatory conditions , intermediary metabolism , and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research*, 48(4), 751–762.
- Prasad, S., Ravindran, J., & Aggarwal, B. B. (2010). NF- $\kappa$ B and cancer: How intimate is this relationship. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 336(1–2), 25–37.
- Prastiwi, D. I., Soedharma, D., & Subhan, B. (2012). Pertumbuhan karang lunak Lobophytum strictum hasil transplantasi pada sistem resirkulasi dengan kondisi cahaya berbeda. *Bonorowo Wetlands*, 2(1), 31–39.
- Putra, M. Y. (2012). Bioactive Marine Natural Products From the Indonesian Soft Coral Sinularia sp. (order Alcyonacea , family Alcyoniidae). Universitas Politenica Delle Marche.
- Putra, M. Y., Ianaro, A., Panza, E., Bavestrello, G., Cerrano, C., Fattorusso, E., & Taglialatela-Scafati, O. (2012). Sinularioside, a triacetylated glycolipid from



the Indonesian soft coral *Sinularia* sp., is an inhibitor of NO release. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(8), 2723–2725.

Putri, R. R., Hasanah, R., & Kusumaningrum, I. (2016). Uji Aktivitas Antibakteri dan Uji Fitokimia Ekstrak Daun Mangrove *Sonneratia alba*. *Aquawarman Jurnal Sains Dan Teknologi Akuakultur*, 2(1), 43–50. Retrieved from <https://fpik.unmul.ac.id/wp-content/uploads/2017/02/6.-Uji-Aktivitas-Antibakteri-dan-Uji-Fitokimia-Ekstrak-Daun-Mangrove-Sonneratia-alba.pdf>

Qin, J., Qian, Y., Yao, J., Grace, C., & Li, X. (2005). SIGIRR Inhibits Interleukin-1 Receptor- and Toll-like Receptor 4-mediated Signaling through Different Mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 25233–25241.

Radwan, M. M., Manly, S. P., El Sayed, K. A., Wali, V. B., Sylvester, P. W., Awate, B., ... Ross, S. A. (2008). Sinulodurins A and B, Antiproliferative and Anti-invasive Diterpenes from the Soft Coral *Sinularia dura*. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1468–1471.

Raetz, C. R. H., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 635–700.

Ravi, B. N., & Faulkner, D. J. (1978). Cembranoid diterpenes from a South Pacific soft coral. *The Journal of Organic Chemistry*, 43(11), 2127–2131.

Riemann, M., Endres, R., Liptay, S., Pfeffer, K., & Schmid, R. M. (2005). The I B Protein Bcl-3 Negatively Regulates Transcription of the IL-10 Gene in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 175(6), 3560–3568.

Riza Marjoni, M., Afrinaldi, & Devi Novita, A. (2015). Total Content of Fenol and Antioxidant Activity of The Aqueous Extract of Cherry Leaf (*Muntingia calabura* L.). *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 23(3), 187–196. Retrieved from <https://media.neliti.com/media/publications/103897-ID-kandungan-total-fenol-dan-aktivitas-anti.pdf>

Rola-Pleszczynski, M., & Stankova, J. (1992). Cytokine gene regulation by PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> and PAF. *Mediators of Inflammation*, 1(1), 5–8.

Ryter, S. W., Alam, J., & Choi, A. M. K. (2006). Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiological Reviews*, 86(2), 583–650.

Sabroe, I., Prince, L. R., Jones, E. C., Malcolm, J., Foster, S. J., Vogel, S. N., ... Whyte, M. K. B. (2003). Selective Roles for Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in the Regulation of Neutrophil Activation and Life Span. *The Journal of Immunology*, 170, 5268–5275.

Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M. H., Uematsu, S., Yang, B. G., Satoh, T., ... Akira, S. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature*, 456(7219), 264–268.

Saitoh, T., Yamamoto, M., Miyagishi, M., Taira, K., Nakanishi, M., Fujita, T., ... Yamaoka, S. (2014). A20 Is a Negative Regulator of IFN Regulatory Factor 3 Signaling. *The Journal of Immunology*, 174(3), 1507–1512.

Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., & Yamaguchi, T. (2009). Regulatory T cells: How do they suppress immune responses? *International Immunology*, 21(10), 1105–1111.

Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, T., Kaarniranta, K., & Huuskonen, J. (2008). Terpenoids: Natural inhibitors of NF- $\kappa$ B signaling with anti-



inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 65, pp. 2979–2999.

Sarady, J. K., Otterbein, S. L., Liu, F., Otterbein, L. E., & Choi, A. M. K. (2002). Carbon Monoxide Modulates Endotoxin-Induced Production of Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor in Macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27(6), 739–745.

Sawa, Y., Ueki, T., Hata, M., Iwasawa, K., Tsuruga, E., Kojima, H., ... Yoshida, S. (2008). LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 Expression in Human Lymphatic Endothelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(2), 97–109.

Schottelius, A. J., & Dinter, H. (2006). Cytokines, NF- $\kappa$ B, microenvironment, intestinal inflammation and cancer. *Cancer Research and Treatment*, 130, 67–87.

Schumann, R. R., Leong, S. R., Flagg, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., ... Ulevitch, R. J. (1990). Structure and Function of Lipopolysaccharide Binding Protein. *Reports*, 249, 1429–1431.

Schwartz, R. H. (2003). T Cell Anergy. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 305–334.

Sebai, H., Ben-attia, M., Sani, M., Aouani, E., & Ghanem-Boughanmi, N. (2008). Protective effect of resveratrol on acute endotoxemia-induced nephrotoxicity in rat through nitric oxide independent mechanism. *Free Radical Research*, 42(11–12), 913–920.

Sewerynek, E., Melchiorri, D., Chen, L., & Reiter, R. J. (1995). Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(6), 903–909.

Shalev, I., Schmelzle, M., Robson, S. C., & Levy, G. (2011). Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Seminars in Immunology*, 23(4), 282–292.

Sharma, J. N., Al-Omran, A., & Parvathy, S. S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15(6), 252–259.

Sheedy, F. J., Palsson-mcdermott, E., Hennessy, E. J., Martin, C., Leary, J. J. O., Ruan, Q., ... Neill, L. A. J. O. (2009). Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nature Immunology*, 11(2), 141–147.

Shen, Y.-C., Cheng, Y.-B., Lin, Y.-C., Guh, J.-H., Teng, C.-M., & Ko, C.-L. (2004). New prostanoids with cytotoxic activity from Taiwanese octocoral *Clavularia viridis*. *Journal of Natural Products*, 67(4), 542–546.

Sheu, J.-H., Ahmed, A. F., Shiue, R.-T., Dai, C.-F., & Kuo, Y.-H. (2002). Scabrolides A-D, four new norditerpenoids isolated from the soft coral *Sinularia scabra*. *J. Nat. Prod.*, 65, 1904–1908.

Shi, M., Deng, W., Bi, E., Mao, K., Ji, Y., Lin, G., ... Sun, B. (2008). TRIM30 $\alpha$  negatively regulates TLR-mediated NF- $\kappa$ B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nature Immunology*, 9(4), 369–377.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., & Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4[ $\alpha$ ]. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(11),



1777–1782.

Sly, L. M., Rauh, M. J., Kalesnikoff, J., Song, C. H., & Krystal, G. (2004). LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity*, 21(2), 227–239.

Soares, J.-B., Pimentel-Nunes, P., Roncon-Albuquerque Jr, R., & Leite-Moreira, A. (2010). The role of lipopolysaccharide / toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatology International*, 4(4), 659–672.

Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies Contents - Table and Charts* (Third). John .Wiley & Sons, Ltd.

Soliman, Y. A. A., Brahim, A. M., Moustafa, A. H., & Hamed, M. A. F. (2017). Antifouling evaluation of extracts from Red Sea soft corals against primary biofilm and biofouling. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(11), 991–997.

Soonthornsit, N., Pitaksutheepong, C., Hemstapat, W., Utaisincharoen, P., & Pitaksuteepong, T. (2017). In Vitro Anti-Inflammatory Activity of Morus alba L. Stem Extract in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells . *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–8.

Srirangan, S., & Choy, E. H. (2010). The role of Interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 2(5), 247–256.

Stefanson, A. (2018). *Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Carrot-Derived Polyacetylenes in Acute Intestinal and Systemic Inflammation and an Evaluation of Potential of Agronomic Techniques for Their Enhancement in Carrot*. University of Guelph.

Stocker, R., Yamamoto, Y., Mcdonagh, A. F., Glazer, A. N., & Ames, B. N. (1984). Bilirubin Is an Antioxidant of Possible Physiological Importance. *Science*, 235(4792), 1043–1046.

Sumagin, R., Lomakina, E., & Sarelius, I. H. (2008). Leukocyte-endothelial cell interactions are linked to vascular permeability via ICAM-1-mediated signaling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 295(3), H969–H977.

Sun, H., Gong, S., Carmody, R. J., Hilliard, A., Li, L., Sun, J., ... Chen, Y. H. (2008). TIPE2, a Negative Regulator of Innate and Adaptive Immunity that Maintains Immune Homeostasis. *Cell*, 133(3), 415–426.

Sun, S., Zhang, H., Xue, B., Wu, Y., Wang, J., Yin, Z., & Luo, L. (2006). Protective effect of glutathione against lipopolysaccharide-induced inflammation and mortality in rats. *Inflammation Research*, 55(11), 504–510.

Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G. S., Millar, D. G., Wada, T., Mirtsos, C., ... Yeh, W.-C. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Letters to Nature*, 416, 750–754.

Szabó, C., & Ohshima, H. (1997). DNA damage induced by peroxynitrite: Subsequent biological effects. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1(5), 373–385.

Takeuchi, O., & Akira, S. (2011). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820.

Taylor, A., Flower, R. J., & Perretti, M. (1997). Dexamethasone inhibits leukocyte



emigration in rat mesenteric post-capillary venules: an intravital microscopy study. *Journal of Leukocyte Biology*, 62(3), 301–308.

Takaki, H., Koganemaru, R., Iwakawa, Y., Higuchi, R., & Miyamoto, T. (2003). Inhibitory Effect of Norditerpenes on LPS-Induced TNF- $\alpha$  Production from the Okinawan Soft Coral, *Sinularia* sp. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26(3), 380–382.

Tanaka, T., & Kishimoto, T. (2012). Targeting Interleukin-6 : All the Way to Treat Autoimmune and Inflammatory Diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9), 1227–1236.

Tang-Feldman, Y. J., Lochhead, G. R., Lochhead, S. R., Yu, C., & Pomeroy, C. (2011). Interleukin-10 repletion suppresses pro-inflammatory cytokines and decreases liver pathology without altering viral replication in murine cytomegalovirus (MCMV)-infected IL-10 knockout mice. *Inflammation Research*, 60(3), 233–243.

Tanod, W. A., Aristawati, A. T., Nurhani, & Mappiratu. (2017). Antifeedants Activity of Soft Coral Extract *Sinularia* sp. With Variation of Ethanol Concentration. In W. A. Nugraha, A. Romadhon, & Insafitri (Eds.), *Proceedings of National Seminar on Marine and Fisheries III 2017* (pp. 102–112). Madura: Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo Madura.

Tanod, W. A., Aristawati, A. T., Putra, M. Y., & Muliadin. (2018). Soft Coral (*Sinularia* sp.) Extracts with Antibacterial Activity. *Omni-Akuatika*, 14(1), 108–117.

Tanod, W. A., Mangindaan, R. E. ., & Kapojos, M. (2015). Antimitotic Activity from Soft Coral Genus *Sinularia* Extracts. *Omn-Akuatika*, 11(2), 41–49.

Tapilatu, Y. H. (2015). Status of Drug Discovery Research Based on Marine Organisms from Eastern Indonesia. *Procedia Chemistry*, 14, 484–492.

Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A., & Engel, P. (1995). The selectins : vascular adhesion molecules. *The FASEB Journal*, 9(10), 866–873.

Tenhunen, R., Marver, H. S., & Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 748–755.

Thao, N. P., Luyen, B. T. T., Sun, Y. N., Song, S. B., Thanh, N. Van, Cuong, N. X., ... Minh, C. Van. (2014). NF- $\kappa$ B inhibitory activity of polyoxygenated steroids from the Vietnamese soft coral *Sarcophyton pauciplicatum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(13), 2834–2838.

Thomson, W., Barton, A., Ke, X., Eyre, S., Hinks, A., Bowes, J., ... Worthington, J. (2007). Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nature Genetics*, 39(12), 1431–1433.

Tobias, P. S., Soldau, K., & Ulevitch, R. J. (1986). Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *Journal of Experimental Medicine*, 164(3), 777–793.

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal Of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461.

Tsukamoto, K., Yokono, K., Amano, K., Nagata, M., Yagi, N., Tominaga, Y., ...



- Kasuga, M. (1995). Administration of Monoclonal Antibodies against Vascular Cell Adhesion Molecule-1/Very Late Antigen-4 Abrogates Predisposing Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Cellular Immunology*, 165(2), 193–201.
- Tucsek, Z. (2011). *Effect of a red wine compound on LPS-induced inflammatory processes in vivo and in vitro*. University of Pecs.
- Uchiyama, T., Takahashi, H., Endo, H., Sakai, E., & Hosono, K. (2012). IL-6 Plays Crucial Roles in Sporadic Colorectal Cancer through the Cytokine Networks including CXCL7. *Journal of Cancer Therapy*, 3, 874–879.
- Ueda, A., Okuda, K., Ohno, S., Shirai, A., Igarashi, T., Matsunaga, K., ... Okubo, T. (1994). NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *The Journal of Immunology*, 153(5), 2052–2063.
- Vaillancourt, F., Morquette, B., Shi, Q., Fahmi, H., Lavigne, P., Di Battista, J. A., ... Benderdour, M. (2007). Differential regulation of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase by 4-hydroxynonenal in human osteoarthritic chondrocytes through ATF-2/CREB-1 transactivation and concomitant inhibition of NF-kB signaling cascade. *Journal of Cellular Biochemistry*, 100(5), 1217–1231.
- Valen, G., Yan, Z. Q., & Hansson, G. K. (2001). Nuclear factor kappa-B and the heart. *Journal of the American College of Cardiology*, 38(2), 307–314.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- van der Veecken, J., Gonzalez, A. J., Cho, H., Arvey, A., Hemmers, S., Leslie, C. S., & Rudensky, A. Y. (2016). Memory of Inflammation in Regulatory T Cells. *Cell*, 166(August 11), 977–990.
- van Wetering, S., van den Berk, N., van Buul, J. D., Mul, F. P. J., Lommerse, I., Mous, R., ... Hordijk, P. L. (2013). VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 285(2), C343–C352.
- Vassalli, P. (1990). The Pathophysiology of Tumor Necrosis Factors. *Annual Review of Immunology*, 10(1), 411–452.
- Venturi, G. M., Conway, R. M., Steeber, D. A., & Tedder, T. F. (2007). CD25+CD4+ Regulatory T Cell Migration Requires L-Selectin Expression: L-Selectin Transcriptional Regulation Balances Constitutive Receptor Turnover. *The Journal of Immunology*, 178(1), 291–300.
- Vereecke, L., Sze, M., Mc Guire, C., Rogiers, B., Chu, Y., Schmidt-Suppran, M., ... van Loo, G. (2010). Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(7), 1513–1523.
- Viennois, E., Chen, F., & Merlin, D. (2012). NF-kB pathway in colitis-associated cancers. *Translational Gastrointestinal Cancer*, 2(1), 21–29.
- Vince, R. V., Mcnaughton, L. R., Taylor, L., Midgley, A. W., Laden, G., & Madden, L. A. (2009). Release of VCAM-1 associated endothelial microparticles following simulated SCUBA dives. *European Journal of Applied Physiology*,



105, 507–513.

Visioli, F., Riso, P., Grande, S., Galli, C., & Porrini, M. (2003). Protective activity of tomato products on in vivo markers of lipid oxidation. *European Journal of Nutrition*, 42(4), 201–206.

Wahl, S. M., Feldman, G. M., & McCarthy, J. B. (1996). Regulation of leukocyte adhesion and signaling in inflammation and disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 59(6), 789–796.

Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., ... Li, X. (2003). SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor – interleukin 1 receptor signaling. *Nature Immunology*, 4(9), 920–927.

Walker, R. D., & Hawkins, J. E. (1952). The Ultraviolet Absorption Spectra of Some Terpene Hydrocarbons. *Notes*, 74, 4209–4201.

Wallace, C. C., Paulay, G., Hoeksema, B. W., Bellwood, D. R., Hutchings, P. a, Barber, P. H., ... Wolstenholme, J. (2000). Nature and origins of unique high diversity reef faunas in the Bay of Tomini, Central Sulawesi: The ultimate “centre of diversity”? *Proceedings 9th International Coral Reef Symposium, Bali, Indonesia*, 1, 1–8.

Wallace, J. L. (2005). Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(Suppl. 1), 5–9.

Wang, B., Sun, J., Ma, Y., Wu, G., Shi, Y., & Le, G. (2014). Increased oxidative stress and the apoptosis of regulatory T cells in obese mice but not resistant mice in response to a high-fat diet. *Cellular Immunology*, 288(1–2), 39–46.

Wang, W., Lee, J.-S., Nakazawa, T., Ukai, K., Mangindaan, R. E. P., Wewengkang, D. S., ... Namikoshi, M. (2009). (25S)-Cholesten-26-oic acid derivatives from an Indonesian soft coral *Minabea* sp. *Steroids*, 74(9), 758–760.

Wang, X. M., Kim, H. P., Nakahira, K., Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2009). TLR4 Signaling by Regulating the Interaction of TLR4 with Caveolin-1. *The Journal of Immunology*, 182(6), 3809–3818.

Wang, Y., Boxel-dezaire, A. H. H. Van, Cheon, H., Yang, J., & Stark, G. R. (2013). STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 110(42), 16975–16980.

Wang, Y., Gao, L.-N., Cui, Y.-L., & Jiang, H.-L. (2014). Protective Effect of Danhong Injection on Acute Hepatic Failure Induced by Lipopolysaccharide and D-Galactosamine in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–8.

Wanzola, M., Furuta, T., Kohno, Y., Fukumitsu, S., Yasukochi, S., Watari, K., ... Miyamoto, T. (2010). Four new cembrane diterpenes isolated from an Okinawan soft coral *Lobophytum crassum* with inhibitory effects on nitric oxide production. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 58(9), 1203–1209.

Watanabe, K., Iguchi, K., & Fujimori, K. (1998). Clavulazine, A New Marine Pyrazine Congener From The Okinawan Soft Coral *Clavularia viridis*. *Heterocycles*, 49(2), 269–274.

Wei, W. C., Sung, P. J., Duh, C. Y., Chen, B. W., Sheu, J. H., & Yang, N. S. (2013). Anti-inflammatory activities of natural products isolated from soft corals of Taiwan between 2008 and 2012. *Marine Drugs*, 11(10), 4083–4126.



- Wen, T., Ding, Y., Deng, Z., van Ofwegen, L., Proksch, P., & Lin, W. (2008). Sinulaflexiolides A-K, cembrane-type diterpenoids from the chinese soft coral *Sinularia flexibilis*. *Journal of Natural Products*, *71*(7), 1133–1140.
- Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., ... Dixit, V. M. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- $\kappa$ B signalling. *Lettres of Nature*, *430*(August), 694–699.
- Westphal, M., Stubbe, H., Sielenkämper, A. W., Borgulya, R., Aken, H. Van, All, C., & Bone, H. (2003). Terlipressin dose response in healthy and endotoxemic sheep : impact on cardiopulmonary performance and global oxygen transport. *Intensive Care Medicine*, *29*(2), 301–308.
- Wijayanti, D. P., Charismawaty, A., Indrayanti, E., & Trianto, A. (2017). Pertumbuhan Karang Lunak Sarcophyton sp. yang Dibudidayakan di Teluk Awur, Jepara. *Buletin Oseanografi Marina*, *6*(1), 61–68.
- Wolf, S. I., & Lawson, C. (2012). ICAM-1 : Contribution to Vascular Inflammation and Early Atherosclerosis. In A. Squeri (Ed.), *Coronary Artery Disease - New Insights and Novel Approaches* (pp. 65–90).
- Woolf, C. J., Allchorne, A., Safieh-Garabedian, B., & Poole, S. (1997). Cytokines , nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia : the contribution of tumour necrosis factor  $\alpha$ . *Brithish Journal of Pharmacology*, *121*(3), 417–424.
- Wright, S D, Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., & Ramos, R. A. (1989). Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, *170*(4), 1231–1241.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., & Mathison, J. C. (1990). CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein. *Science*, *249*, 1431–1433.
- Xie, Q.-W., Kashiwabara, Y., & Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(7), 4705–4708.
- Xie, Q. W. (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*, *177*(6), 1779–1784.
- Yamaguchi, S., Sakurada, S., & Nagumo, M. (1994). Role of intracellular SOD in protecting human leukemic and cancer cells against superoxide and radiation. *Free Radical Biology & Medicine*, *17*(5), 389–395.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., ... Akira, S. (2003). Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science (New York, N. Y.)*, *301*(August), 640–643.
- Yang, B., Zhou, X., Huang, H., Yang, X. W., Liu, J., Lin, X., ... Liu, Y. (2012). New cembrane diterpenoids from a hainan soft coral *Sinularia* sp. *Marine Drugs*, *10*, 2023–2032.
- Yin, J., Zhao, M., Ma, M., Xu, Y., Xiang, Z., Cai, Y., ... Yan, P. (2013). New casbane diterpenoids from a South China Sea soft coral, *Sinularia* sp. *Marine Drugs*, *11*, 455–465.
- Yoshida, H., Jono, H., Kai, H., & Li, J.-D. (2005). The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2



signaling via negative cross-talk with TRAF6 and TRAF7. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(49), 41111–41121.

Yun, H. Y., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (1996). Neurobiology of Nitric Oxide. *Critical Reviews in Neurobiology*, 10(3–4), 291–316.

Yusuf-Makagiansar, H., Anderson, M. E., Yakovleva, T. V., Murray, J. S., & Siahaan, T. J. (2002). Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a Therapeutic Approach to Inflammation and Autoimmune Diseases. *Medicinal Research Reviews*, 22(2), 146–167.

Zelmanovitz, T., Gerchman, F., Balthazar, A. P. S., Thomazelli, F. C. S., Matos, J. D., & Canani, L. H. (2009). Diabetic nephropathy. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 1(10), 1–17.

Zhang, C. X., Yan, S. J., Zhang, G. W., Lu, W. G., Su, J. Y., Zeng, L. M., ... Lian, Y. J. (2005). Cytotoxic diterpenoids from the soft coral *Sinularia microclavata*. *Journal of Natural Products*, 68(7), 1087–1089.

Zhang, D. D., & Hannink, M. (2003). Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-Dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress. *Molecular and Cellular Biology*, 23(22), 8137–8151.

Zhang, G., & Ghosh, S. (2002). Mechanisms of Signal Transduction: Negative Regulation of Toll-like Receptor-mediated Signaling by Tollip. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7059–7065.

Zhang, W., Krohn, K., Ding, J., Miao, Z., Zhou, X., Chen, S., & Pescitelli, G. (2008). Structural and Stereochemical Studies of  $\alpha$ -Methylene- $\gamma$ -lactone-Bearing Cembrane Diterpenoids from a South China Sea Soft Coral *Lobophytum crassum*. *Journal of Natural Products*, 71(6), 961–966.

Zhao, W., Wang, L., Zhang, M., Yuan, C., & Gao, C. (2012). E3 Ubiquitin Ligase Tripartite Motif 38 Negatively Regulates TLR-Mediated Immune Responses by Proteasomal Degradation of TNF Receptor-Associated Factor 6 in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 188(6), 2567–2574.

Zhou, F., Zhang, X., van Dam, H., Dijke, P. ten, Huang, H., & Zhang, L. (2012). Ubiquitin-specific Protease 4 Mitigates Toll-like/Interleukin-1 Receptor Signaling and Regulates Innate Immune Activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11002–11010.

Zhou, Xin, Med, M., S, L. Y. M. B. B., S, X. Z. M. B. B., Hou, C., Med, M., ... D, R. X. M. (2014). Genistein antagonizes inflammatory damage induced by  $\beta$ -amyloid peptide in microglia through TLR4 and NF- $\kappa$ B. *Nutrition*, 30(1), 90–95.

Zhou, Xiaohui, Tang, J., Cao, H., Fan, H., & Li, B. (2015). Tissue resident regulatory T cells: Novel therapeutic targets for human disease. *Cellular and Molecular Immunology*, 12(5), 543–552.



## Lampiran 1. Sertifikat Kelaikan Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"**

No:680-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : PEMANFAATAN SUBSTANSI BIOAKTIF KARANG LUNAK SEBAGAI BAHAN ANTIINFLAMASI DENGAN MENGGUNAKAN MAKROFAG MENCIT BALB C DAN TIKUS (*Rattus norvegicus*)

PENELITI : WENDY ALEXANDER TANOD

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

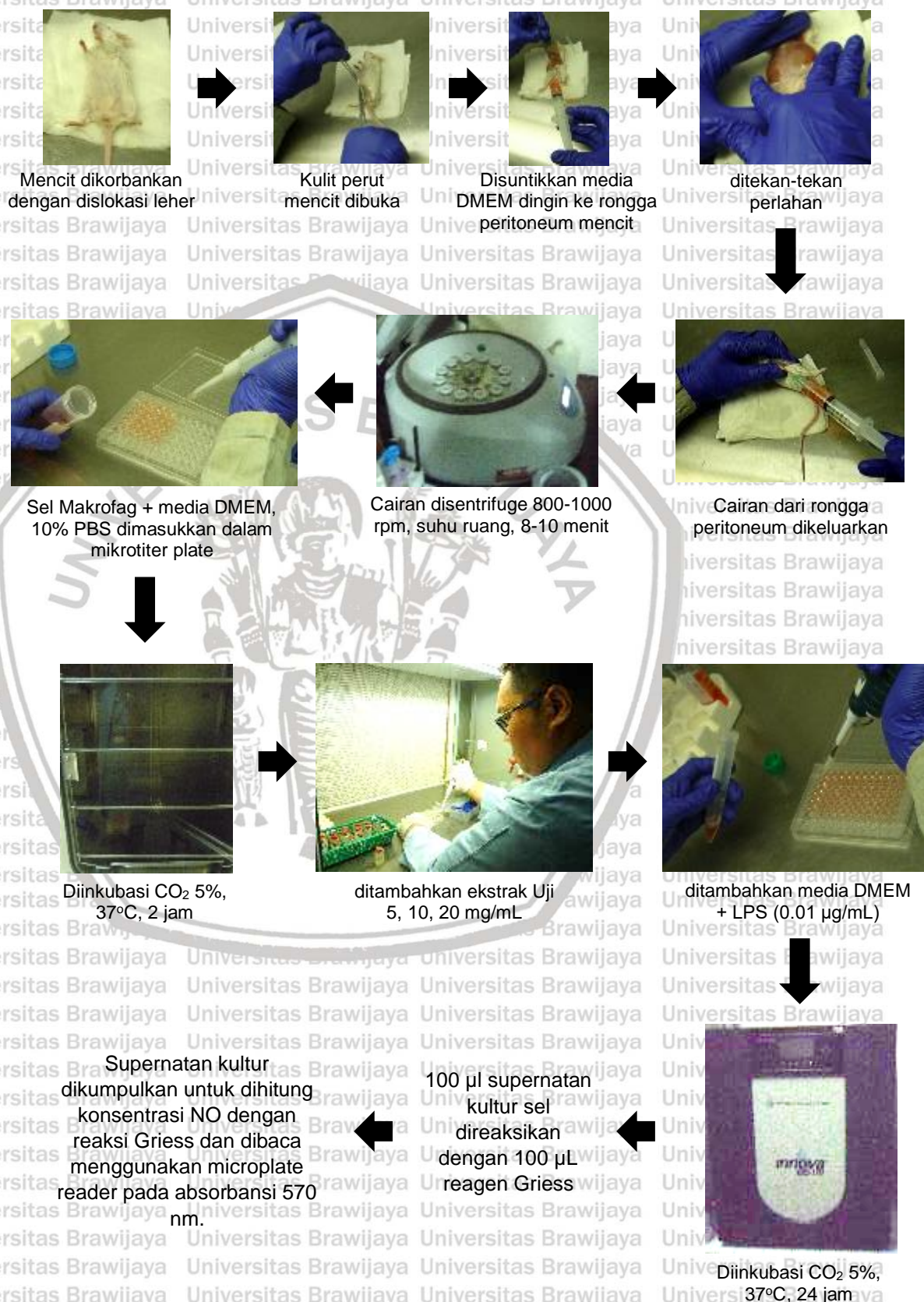
Malang, 1 Februari 2017  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



**Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.**  
NIP. 19600903 198802 2 001



## Lampiran 2. Prosedur Pengujian Aktivitas Inhibitori Pelepasan NO

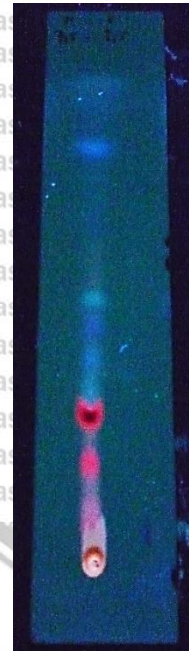




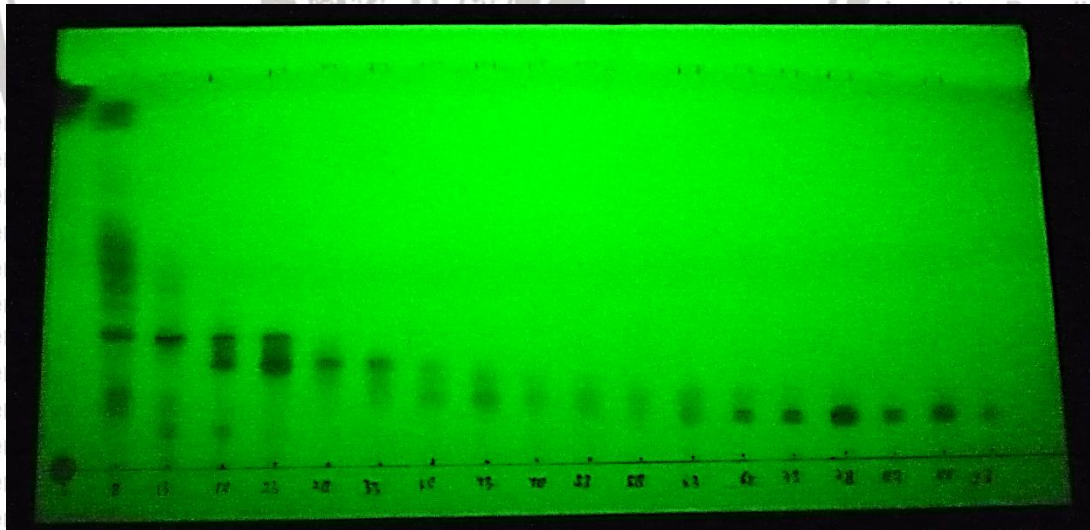
### Lampiran 3. Spot Noda Kromatografi Lapis Tipis



Kromatografi Kolom dengan Fase Gerak  
n-heksan : EtOAc (7.5 : 2.5)



KLT analitik dengan Fase Gerak  
n-heksan : EtOAc (7.5 : 2.5)



KLT preparatif untuk penentuan jumlah fraksi dari hasil kromatografi kolom



### Lampiran 4. Analisis Statistik Efek Inhibitori Ekstrak Kasar Karang Lunak *Sarcophyton* sp. Terhadap Konsentrasi NO Yang Diinduksi LPS

#### Oneway

##### Descriptives

Konsentrasi	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
5 mg/mL	3	.5700	.02646	.01528	.5043	.6357
10 mg/mL	3	.2500	.00000	.00000	.2500	.2500
20 mg/mL	3	.2067	.04041	.02333	.1063	.3071
Total	9	.3422	.17355	.05785	.2088	.4756

##### Descriptives

Konsentrasi	Minimum	Maximum
5 mg/mL	.55	.60
10 mg/mL	.25	.25
20 mg/mL	.17	.25
Total	.17	.60

##### Test of Homogeneity of Variances

Konsentrasi	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	4.092	2	6	.076

##### ANOVA

Konsentrasi	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.236	2	.118	151.900	.000
Within Groups	.005	6	.001		
Total	.241	8			

#### Post Hoc Tests

##### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Konsentrasi

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5 mg/mL	10 mg/mL	.32000*	.02277	.000	.2501	.3899
	20 mg/mL	.36333*	.02277	.000	.2935	.4332
10 mg/mL	5 mg/mL	-.32000*	.02277	.000	-.3899	-.2501
	20 mg/mL	.04333	.02277	.218	-.0265	.1132
20 mg/mL	5 mg/mL	-.36333*	.02277	.000	-.4332	-.2935
	10 mg/mL	-.04333	.02277	.218	-.1132	.0265

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Homogeneous Subsets

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
20 mg/mL	3	.2067	
10 mg/mL	3	.2500	
5 mg/mL	3		.5700
Sig.		.218	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.





## Lampiran 5. Analisis Statistik Efek Inhibitori Ekstrak Hasil Partisi *Sarcophyton* sp. (SCC) Terhadap Konsentrasi NO Yang Diinduksi LPS

### Univariate Analysis of Variance

#### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Pelarut	1	DCM	15
	2	EtOAc	15
	3	BuOH	15
Konsentrasi	1	5 mg/mL	15
	2	10 mg/mL	15
	3	20 mg/mL	15

#### Descriptive Statistics

Dependent Variable: NO

Pelarut	Konsentrasi	Mean	Std. Deviation	N
DCM	5 mg/mL	4.8540	.16994	5
	10 mg/mL	6.3080	.21005	5
	20 mg/mL	6.0820	.00000	5
	Total	5.7747	.69789	15
EtOAc	5 mg/mL	6.4760	.24582	5
	10 mg/mL	6.4640	.38119	5
	20 mg/mL	6.6180	.33964	5
	Total	6.4127	.17653	15
BuOH	5 mg/mL	8.4580	.17441	5
	10 mg/mL	5.1540	.21174	5
	20 mg/mL	4.7680	.21005	5
	Total	6.1000	1.74176	15
Total	5 mg/mL	6.5527	1.54268	15
	10 mg/mL	5.9287	.62288	15
	20 mg/mL	5.8060	.81157	15
Total	Total	6.0958	1.09524	45

#### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: NO

F	df1	df2	Sig.
.237	8	36	.981

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.<sup>a</sup>

a. Design: Intercept + Pelarut + Konsentrasi + Pelarut \* Konsentrasi

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: NO

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	51.669 <sup>a</sup>	8	6.459	209.151	.000
Intercept	1672.133	1	1672.133	54149.378	.000
Pelarut	3.053	2	1.527	49.437	.000
Konsentrasi	4.810	2	2.405	77.877	.000
Pelarut * Konsentrasi	43.806	4	10.951	354.645	.000
Error	1.112	36	.031		
Total	1724.913	45			
Corrected Total	52.780	44			

a. R Squared = .979 (Adjusted R Squared = .974)

**Estimated Marginal Means****1. Pelarut**

Dependent Variable: NO

Pelarut	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
DCM	5.775	.045	5.683	5.867
EtOAc	6.413	.045	6.321	6.505
BuOH	6.100	.045	6.008	6.192

**2. Konsentrasi**

Dependent Variable: NO

Konsentrasi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
5 mg/mL	6.553	.045	6.461	6.645
10 mg/mL	5.929	.045	5.837	6.021
20 mg/mL	5.806	.045	5.714	5.898

**3. Pelarut \* Konsentrasi**

Dependent Variable: NO

Pelarut	Konsentrasi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
DCM	5 mg/mL	4.854	.079	4.685	5.003
	10 mg/mL	6.308	.079	6.109	6.427
	20 mg/mL	6.082	.079	6.053	6.371
EtOAc	5 mg/mL	6.476	.079	6.197	6.515
	10 mg/mL	6.464	.079	6.245	6.563
	20 mg/mL	6.618	.079	6.319	6.637
BuOH	5 mg/mL	8.458	.079	8.299	8.617
	10 mg/mL	5.154	.079	4.955	5.273
	20 mg/mL	4.768	.079	4.569	4.887

**Post Hoc Tests****Pelarut****Multiple Comparisons**

Dependent Variable: NO

Tukey HSD

(I) Pelarut	(J) Pelarut	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
DCM	EtOAc	-.6380*	.06417	.000	-.7948	-.4812
	BuOH	-.3253*	.06417	.000	-.4822	-.1685
EtOAc	DCM	.6380*	.06417	.000	.4812	.7948
	BuOH	.3127*	.06417	.000	.1558	.4695
BuOH	DCM	.3253*	.06417	.000	.1685	.4822
	EtOAc	-.3127*	.06417	.000	-.4695	-.1558

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .031.

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.

**Homogeneous Subsets****NO**

Tukey HSD

Pelarut	N	Subset		
		1	2	3
DCM	15	5.7747		
BuOH	15		6.1000	
EtOAc	15			6.4127
Sig.		1.000	1.000	1.000



Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .031.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

b. Alpha = .05.

### Konsentrasi

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: NO

Tukey HSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
5 mg/mL	10 mg/mL	.6240*	.06417	.000	.4672
	20 mg/mL	.7467*	.06417	.000	.5898
10 mg/mL	5 mg/mL	-.6240*	.06417	.000	-.7808
	20 mg/mL	.1227	.06417	.150	-.0342
20 mg/mL	5 mg/mL	-.7467*	.06417	.000	-.9035
	10 mg/mL	-.1227	.06417	.150	-.2795

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: NO

Tukey HSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	95% Confidence Interval
		Upper Bound
5 mg/mL	10 mg/mL	.7808*
	20 mg/mL	.9035*
10 mg/mL	5 mg/mL	-.4672*
	20 mg/mL	.2795
20 mg/mL	5 mg/mL	-.5898*
	10 mg/mL	.0342

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .031.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

### Homogeneous Subsets

NO

Tukey HSD

Konsentrasi	N	Subset	
		1	2
20 mg/mL	15	5.8060	
10 mg/mL	15	5.9287	
5 mg/mL	15		6.5527
Sig.		.150	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

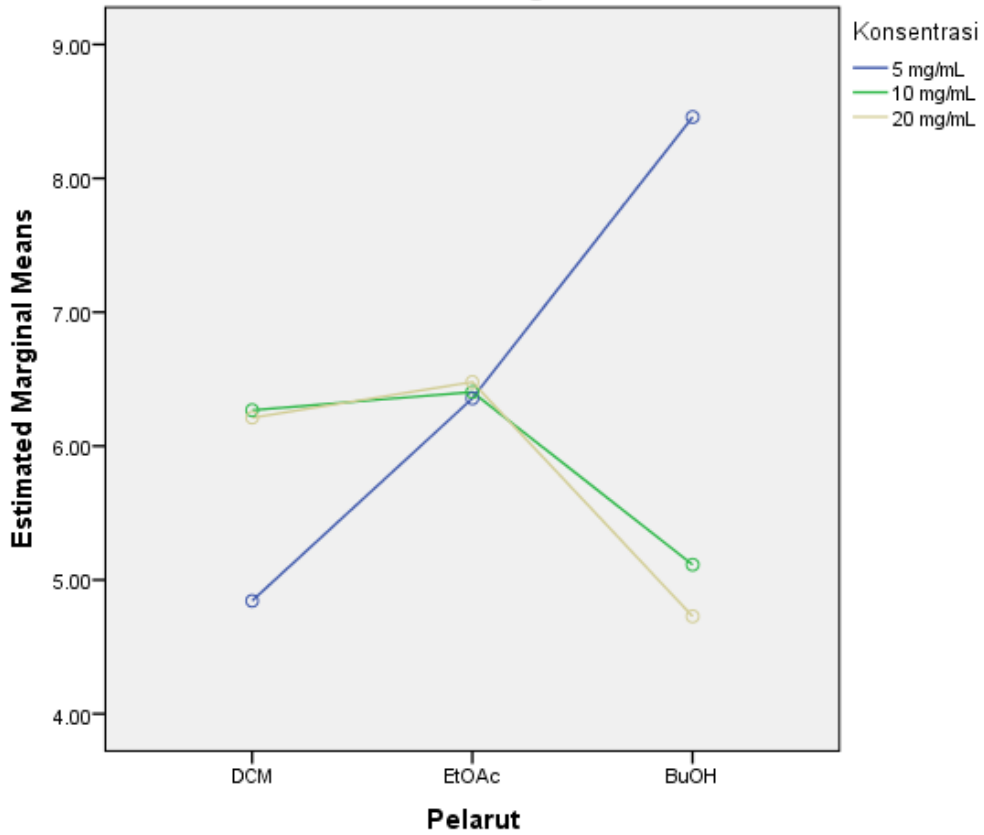
The error term is Mean Square(Error) = .031.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

b. Alpha = .05.

Profile Plots

Estimated Marginal Means of NO





## Lampiran 6. Analisis Statistik Efek Inhibitori Fraksi Hasil Kromatografi Kolom *Sarcophyton* sp. (SCC) Terhadap Konsentrasi NO Yang Diinduksi LPS

### Univariate Analysis of Variance

#### Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Fraksi	1	9
	2	9
	3	9
	4	9
	5	9
	6	9
Konsentrasi	1	18
	2	18
	3	18

#### Descriptive Statistics

Dependent Variable: NO

Fraksi	Konsentrasi	Mean	Std. Deviation	N
1	5 mg/mL	79.8667	3.05505	3
	10 mg/mL	67.2000	3.46410	3
	20 mg/mL	119.8667	1.15470	3
	Total	88.9778	23.92581	9
2	5 mg/mL	80.5333	7.02377	3
	10 mg/mL	77.8667	2.30940	3
	20 mg/mL	75.8667	1.15470	3
	Total	78.0889	4.25572	9
3	5 mg/mL	75.2000	3.46410	3
	10 mg/mL	51.8667	2.30940	3
	20 mg/mL	128.5333	1.15470	3
	Total	85.2000	34.10279	9
4	5 mg/mL	53.2000	2.00000	3
	10 mg/mL	72.5333	1.15470	3
	20 mg/mL	74.5333	4.61880	3
	Total	66.7556	10.52510	9
5	5 mg/mL	102.5333	2.30940	3
	10 mg/mL	56.5333	6.11010	3
	20 mg/mL	149.2000	6.00000	3
	Total	102.7556	40.37051	9
6	5 mg/mL	75.2000	3.46410	3
	10 mg/mL	83.8667	5.03322	3
	20 mg/mL	91.2000	3.46410	3
	Total	83.4222	7.77460	9
Total	5 mg/mL	77.7556	15.16661	18
	10 mg/mL	68.3111	12.02394	18
	20 mg/mL	106.5333	28.89331	18
Total	Total	84.2000	25.63532	54

#### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: NO

F	df1	df2	Sig.
1.642	17	36	.104

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.<sup>a</sup>

a. Design: Intercept + Fraksi + Konsentrasi + Fraksi \* Konsentrasi

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: NO

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	34326.000 <sup>a</sup>	17	2019.176	144.227	.000
Intercept	382840.560	1	382840.560	27345.754	.000
Fraksi	6393.556	5	1278.711	91.337	.000
Konsentrasi	14269.778	2	7134.889	509.635	.000
Fraksi * Konsentrasi	13662.667	10	1366.267	97.590	.000
Error	504.000	36	14.000		
Total	417670.560	54			
Corrected Total	34830.000	53			

a. R Squared = .986 (Adjusted R Squared = .979)

### Estimated Marginal Means

#### 1. Fraksi

Dependent Variable: NO

Fraksi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	88.978	1.247	86.448	91.507
2	78.089	1.247	75.559	80.618
3	85.200	1.247	82.671	87.729
4	66.756	1.247	64.226	69.285
5	102.756	1.247	100.226	105.285
6	83.422	1.247	80.893	85.952

#### 2. Konsentrasi

Dependent Variable: NO

Konsentrasi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
5 mg/mL	77.756	.882	75.967	79.544
10 mg/mL	68.311	.882	66.523	70.100
20 mg/mL	106.533	.882	104.745	108.322

#### 3. Fraksi \* Konsentrasi

Dependent Variable: NO

Fraksi	Konsentrasi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
1	5 mg/mL	79.867	2.160	75.485	84.248
	10 mg/mL	67.200	2.160	62.819	71.581
	20 mg/mL	119.867	2.160	115.485	124.248
2	5 mg/mL	80.533	2.160	76.152	84.915
	10 mg/mL	77.867	2.160	73.485	82.248
	20 mg/mL	75.867	2.160	71.485	80.248
3	5 mg/mL	75.200	2.160	70.819	79.581
	10 mg/mL	51.867	2.160	47.485	56.248
	20 mg/mL	128.533	2.160	124.152	132.915
4	5 mg/mL	53.200	2.160	48.819	57.581
	10 mg/mL	72.533	2.160	68.152	76.915
	20 mg/mL	74.533	2.160	70.152	78.915
5	5 mg/mL	102.533	2.160	98.152	106.915
	10 mg/mL	56.533	2.160	52.152	60.915
	20 mg/mL	149.200	2.160	144.819	153.581
6	5 mg/mL	75.200	2.160	70.819	79.581
	10 mg/mL	83.867	2.160	79.485	88.248
	20 mg/mL	91.200	2.160	86.819	95.581



**Post Hoc Tests**  
**Fraksi**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: NO  
Tukey HSD

(I) Fraksi	(J) Fraksi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	10.8889*	1.76383	.000	5.5823	16.1955
	3	3.7778	1.76383	.290	-1.5288	9.0844
	4	22.2222*	1.76383	.000	16.9156	27.5288
	5	-13.7778*	1.76383	.000	-19.0844	-8.4712
	6	5.5556*	1.76383	.036	.2489	10.8622
2	1	-10.8889*	1.76383	.000	-16.1955	-5.5823
	3	-7.1111*	1.76383	.003	-12.4177	-1.8045
	4	11.3333*	1.76383	.000	6.0267	16.6400
	5	-24.6667*	1.76383	.000	-29.9733	-19.3600
	6	-5.3333*	1.76383	.048	-10.6400	-.0267
3	1	-3.7778	1.76383	.290	-9.0844	1.5288
	2	7.1111*	1.76383	.003	1.8045	12.4177
	4	18.4444*	1.76383	.000	13.1378	23.7511
	5	-17.5556*	1.76383	.000	-22.8622	-12.2489
	6	1.7778	1.76383	.912	-3.5288	7.0844
4	1	-22.2222*	1.76383	.000	-27.5288	-16.9156
	2	-11.3333*	1.76383	.000	-16.6400	-6.0267
	3	-18.4444*	1.76383	.000	-23.7511	-13.1378
	5	-36.0000*	1.76383	.000	-41.3066	-30.6934
	6	-16.6667*	1.76383	.000	-21.9733	-11.3600
5	1	13.7778*	1.76383	.000	8.4712	19.0844
	2	24.6667*	1.76383	.000	19.3600	29.9733
	3	17.5556*	1.76383	.000	12.2489	22.8622
	4	36.0000*	1.76383	.000	30.6934	41.3066
	6	19.3333*	1.76383	.000	14.0267	24.6400
6	1	-5.5556*	1.76383	.036	-10.8622	-.2489
	2	5.3333*	1.76383	.048	.0267	10.6400
	3	-1.7778	1.76383	.912	-7.0844	3.5288
	4	16.6667*	1.76383	.000	11.3600	21.9733
	5	-19.3333*	1.76383	.000	-24.6400	-14.0267

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 14.000.

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.

**Homogeneous Subsets**

NO

Tukey HSD

Fraksi	N	Subset				
		1	2	3	4	5
4	9	66.7556				
2	9		78.0889			
6	9			83.4222		
3	9			85.2000	85.2000	
1	9				88.9778	
5	9					102.7556
Sig.		1.000	1.000	.912	.290	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 14.000.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = ,05.

**Konsentrasi****Multiple Comparisons**

Dependent Variable: NO

Tukey HSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
5 mg/mL	10 mg/mL	9.4444*	1.24722	.000	6.3959
	20 mg/mL	-28.7778*	1.24722	.000	-31.8264
10 mg/mL	5 mg/mL	-9.4444*	1.24722	.000	-12.4930
	20 mg/mL	-38.2222*	1.24722	.000	-41.2708
20 mg/mL	5 mg/mL	28.7778*	1.24722	.000	25.7292
	10 mg/mL	38.2222*	1.24722	.000	35.1736

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: NO

Tukey HSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	95% Confidence Interval
		Upper Bound
5 mg/mL	10 mg/mL	12.4930*
	20 mg/mL	-25.7292*
10 mg/mL	5 mg/mL	-6.3959*
	20 mg/mL	-35.1736*
20 mg/mL	5 mg/mL	31.8264*
	10 mg/mL	41.2708*

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 14.000.

\*. The mean difference is significant at the ,05 level.

**Homogeneous Subsets****NO**

Tukey HSD

Konsentrasi	N	Subset		
		1	2	3
10 mg/mL	18	68.3111		
5 mg/mL	18		77.7556	
20 mg/mL	18			106.5333
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 14.000.

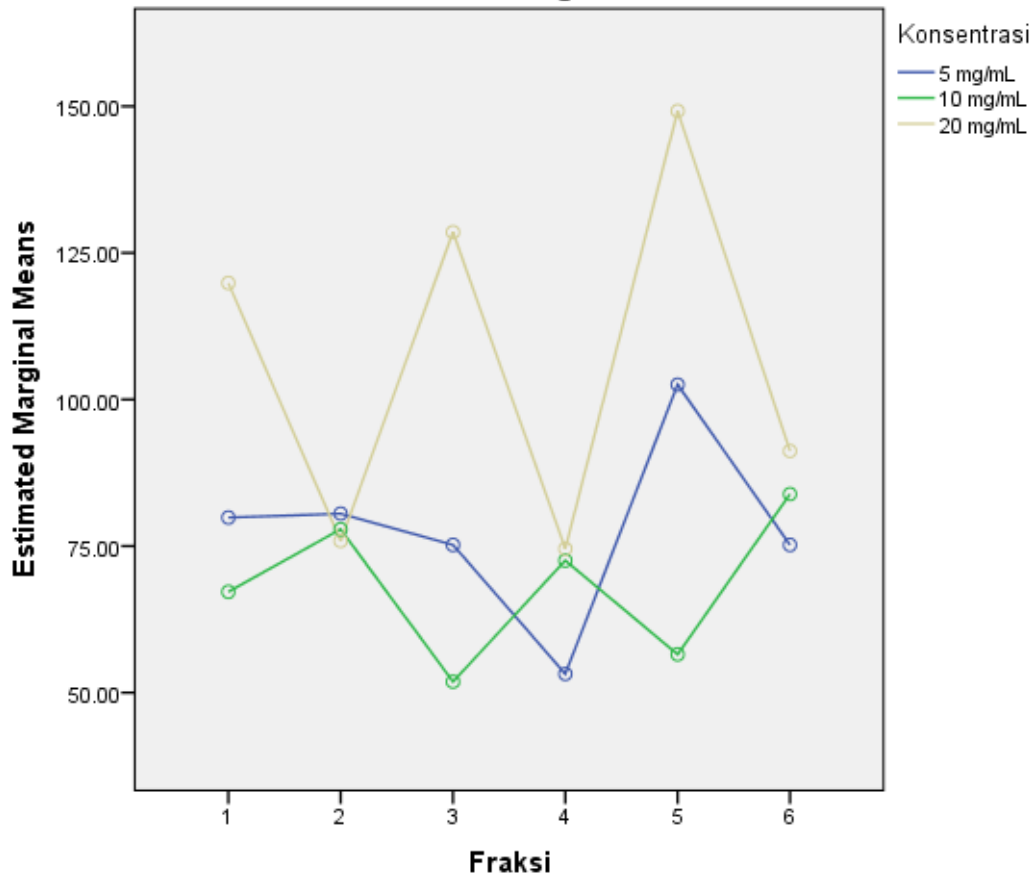
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.

b. Alpha = ,05.



Profile Plots

Estimated Marginal Means of NO



## Lampiran 7a. Hasil LC-MS Fraksi 3 Hasil Kromatografi Kolom *Sarcophyton* sp. (SCC)



LCMS REPORT

Page 1 of 64

CHROMATOGRAM RESULT, SAMPLE ID: 3

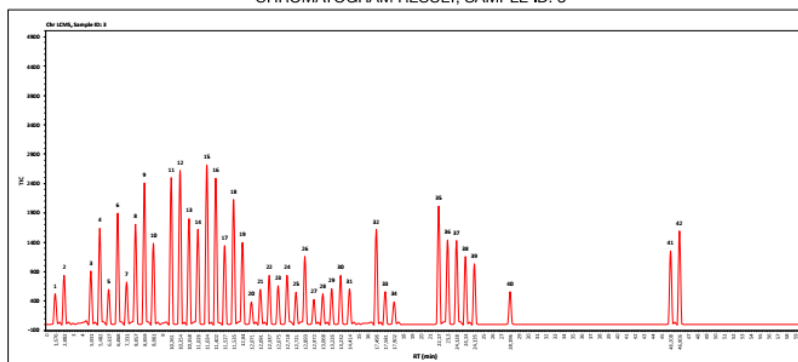


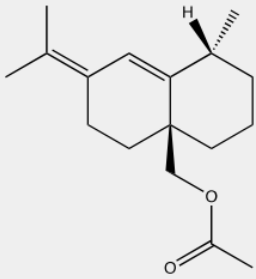
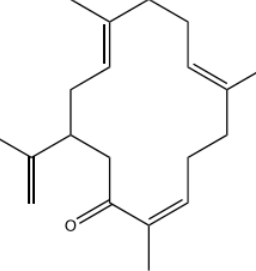
Table 1. Chromatogram Library Resume Report

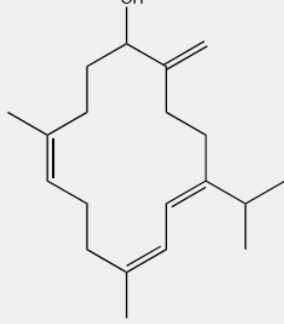
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
1	1,676	92	520,74878	0,99741	<b>Clavukerin A</b> Chemical Formula: C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Exact Mass: 162,1409 Molecular Weight: 162,2760 m/z: 162.1409 (100.0%), 163.1442 (13.0%)	
2	2,802	92	834,13975	1,59767	<b>Clavulazine</b> Chemical Formula: C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Exact Mass: 166,0742 Molecular Weight: 166,1800 m/z: 166.0742 (100.0%), 167.0776 (8.7%)	
3	5,031	92	908,04119	1,73921	<b>Clavukerin C</b> Chemical Formula: C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> Exact Mass: 194,1307 Molecular Weight: 194,2740 m/z: 194.1307 (100.0%), 195.1340 (13.0%)	
4	5,482	92	1635,09694	3,13178	<b>Sinularene</b> Chemical Formula: C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> Exact Mass: 204,1878 Molecular Weight: 204,3570 m/z: 204.1878 (100.0%), 205.1912 (16.2%), 206.1945 (1.2%)	



Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
5	6,617	92	595,01033	1,13965	<b>(E,E) 2 (2,6 Dimethyl 1,5,7 octatrienyl) 4 methylfuran</b> Chemical Formula: C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O Exact Mass: 216,1514 Molecular Weight: 216,3240 m/z: 216,1514 (100,0%), 217,1548 (16,2%), 218,1581 (1,2%)	
6	6,868	92	1893,65842	3,62701	<b>Coralloidin E</b> Chemical Formula: C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O Exact Mass: 220,1827 Molecular Weight: 220,3560 m/z: 220,1827 (100,0%), 221,1861 (16,2%), 222,1894 (1,2%)	
7	7,331	92	721,85482	1,38260	<b>(E,E) 5 (2,6 Dimethyl 1,5,7 octatrienyl) 3 furancarboxylic acid</b> Chemical Formula: C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> Exact Mass: 246,1256 Molecular Weight: 246,3060 m/z: 246,1256 (100,0%), 247,1289 (16,2%), 248,1323 (1,2%)	

Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
8	8,857	92	1704,14023	3,26402	<b>Coralloidin B</b> Chemical Formula: C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> Exact Mass: 262,1933 Molecular Weight: 262,3930 m/z: 262,1933 (100,0%), 263,1966 (18,4%), 264,2000 (1,6%)	
9	8,859	92	2408,33334	4,61279	<b>Coralloidin A</b> Chemical Formula: C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> Exact Mass: 262,1933 Molecular Weight: 262,3930 m/z: 262,1933 (100,0%), 263,1966 (18,4%), 264,2000 (1,6%)	

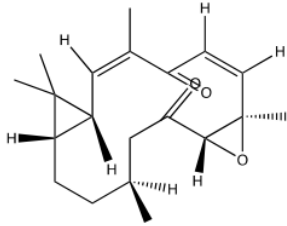
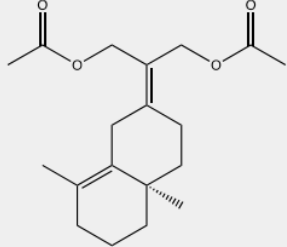
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
10	8,861	92	1380,71247	2,64454	<b>Coralloidin C</b> Chemical Formula: $C_{27}H_{36}O_2$ Exact Mass: 262,1933 Molecular Weight: 262,3930 m/z: 262,1933 (100,0%), 263,1966 (18,4%), 264,2000 (1,6%)	
11	10,261	92	2496,79713	4,78223	<b>3,7,11,15 Cembratetraen 13 one</b> Chemical Formula: $C_{20}H_{30}O$ Exact Mass: 286,2297 Molecular Weight: 286,4590 m/z: 286,2297 (100,0%), 287,2330 (21,6%), 288,2364 (2,2%)	

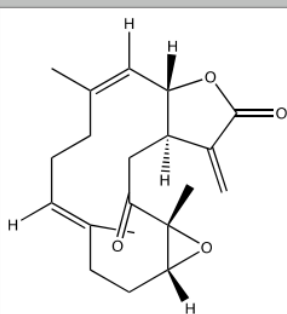
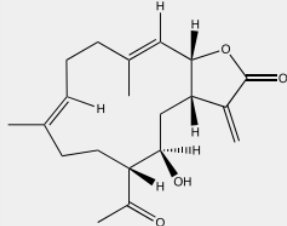
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
12	10,354	92	2620,11569	5,01843	<b>1,3,7,12(20) Cembratetraen 11 ol</b> Chemical Formula: $C_{20}H_{32}O$ Exact Mass: 288,2453 Molecular Weight: 288,4750 m/z: 288,2453 (100,0%), 289,2487 (21,6%), 290,2520 (2,2%)	



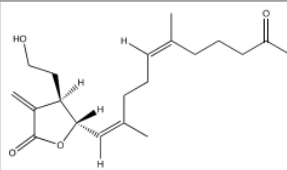
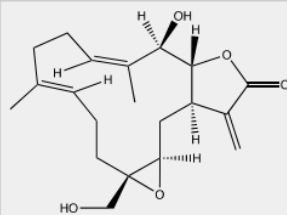
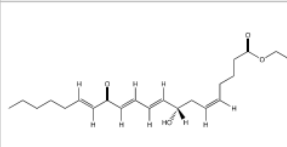
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
13	10,358	92	1799,32786	3,44634	<b>1,4,8,13 Cembratetraen 12 ol</b> Chemical Formula: $C_{20}H_{32}O$ Exact Mass: 288,2453 Molecular Weight: 288,4750 m/z: 288,2453 (100,0%), 289,2487 (21,6%), 290,2520 (2,2%)	
14	11,026	92	1618,02813	3,09908	<b>1(15),3,7,11 Cembratetraen 16,2 olide</b> Chemical Formula: $C_{20}H_{28}O_2$ Exact Mass: 300,2089 Molecular Weight: 300,4420 m/z: 300,2089 (100,0%), 301,2123 (21,6%), 302,2156 (2,2%)	

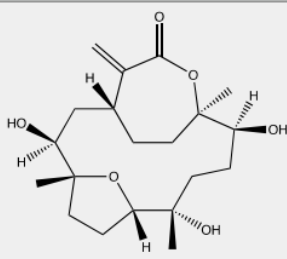
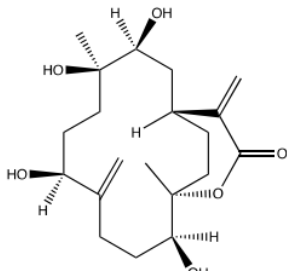
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
15	11,034	92	2712,46148	5,19530	<b>3,7,11,15(17) Cembratetraen 16,14 olide</b> Chemical Formula: $C_{20}H_{28}O_2$ Exact Mass: 300,2089 Molecular Weight: 300,4420 m/z: 300,2089 (100,0%), 301,2123 (21,6%), 302,2156 (2,2%)	
16	11,402	92	2487,37588	4,76419	<b>3,4 Epoxy 7,11,15 cembratrien 14 one</b> Chemical Formula: $C_{20}H_{30}O_2$ Exact Mass: 302,2246 Molecular Weight: 302,4580 m/z: 302,2246 (100,0%), 303,2279 (21,6%), 304,2313 (2,2%)	

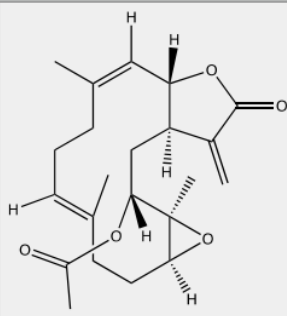
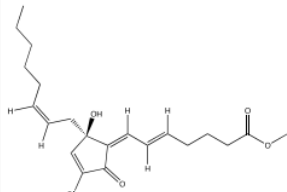
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
17	11,527	92	1339,70684	2,56600	<b>Microclavatin</b> Chemical Formula: C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub> Exact Mass: 316,2038 Molecular Weight: 316,4410 m/z: 316.2038 (100.0%), 317.2072 (21.6%), 318.2106 (2.2%)	
18	11,535	92	2126,00247	4,07203	<b>Coralloidin D</b> Chemical Formula: C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> Exact Mass: 320,1988 Molecular Weight: 320,4290 m/z: 320.1988 (100.0%), 321.2021 (20.5%), 322.2055 (2.0%)	

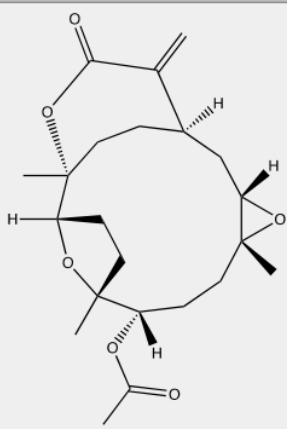
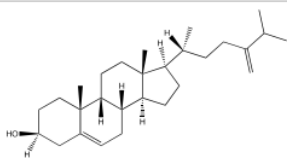
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
19	12,04	92	1391,82826	2,66583	<b>Cembranolid B</b> Chemical Formula: C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> Exact Mass: 330,1831 Molecular Weight: 330,4240 m/z: 330.1831 (100.0%), 331.1865 (21.6%), 332.1898 (2.2%)	
20	12,071	92	381,93885	0,73155	<b>Lobophytol</b> Chemical Formula: C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> Exact Mass: 332,1988 Molecular Weight: 332,4400 m/z: 332.1988 (100.0%), 333.2021 (21.6%), 334.2055 (2.2%)	



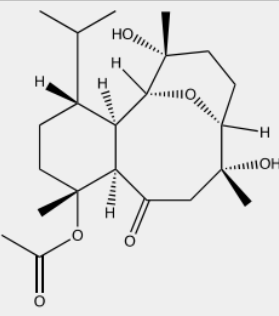
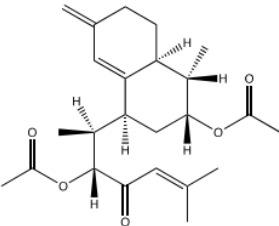
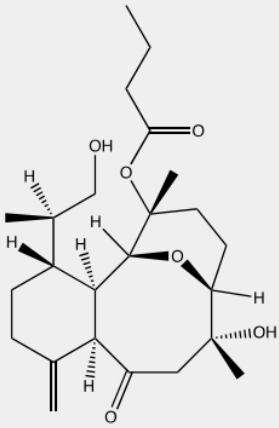
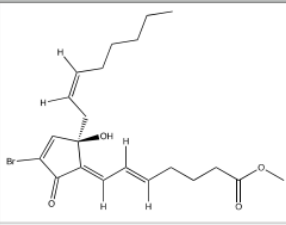
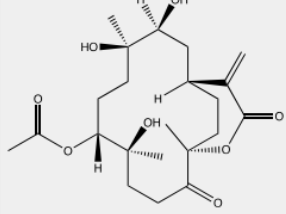
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
21	12,091	92	597,19318	1,14383	<b>Mayolide A</b> Chemical Formula: $C_{20}H_{30}O_4$ Exact Mass: 334,2144 Molecular Weight: 334,4560 m/z: 334,2144 (100,0%), 335,2178 (21,6%), 336,2211 (2,2%)	
22	12,337	92	833,88554	1,59718	<b>Sinularolide B</b> Chemical Formula: $C_{20}H_{28}O_5$ Exact Mass: 348,1937 Molecular Weight: 348,4390 m/z: 348,1937 (100,0%), 349,1970 (21,6%), 350,2004 (2,2%), 350,1979 (1,0%)	
23	12,675	92	659,82469	1,26379	<b>(5Z,9E,11E,14E) Ethyl 8 hydroxy 13 oxoicosanoate</b> Chemical Formula: $C_{22}H_{34}O_4$ Exact Mass: 362,2457 Molecular Weight: 362,5100 m/z: 362,2457 (100,0%), 363,2491 (23,8%), 364,2524 (2,7%)	

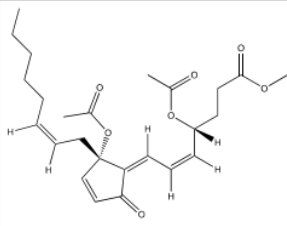
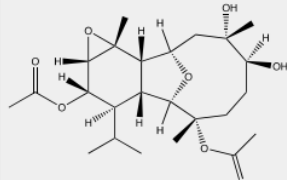
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
24	12,718	92	833,88539	1,59718	<b>Sinulaflexiolide B</b> Chemical Formula: $C_{20}H_{32}O_6$ Exact Mass: 368,2199 Molecular Weight: 368,4700 m/z: 368,2199 (100,0%), 369,2232 (21,6%), 370,2266 (2,2%), 370,2241 (1,2%)	
25	12,721	92	547,03984	1,04777	<b>Sinulaflexiolide D</b> Chemical Formula: $C_{20}H_{32}O_6$ Exact Mass: 368,2199 Molecular Weight: 368,4700 m/z: 368,2199 (100,0%), 369,2232 (21,6%), 370,2266 (2,2%), 370,2241 (1,2%)	

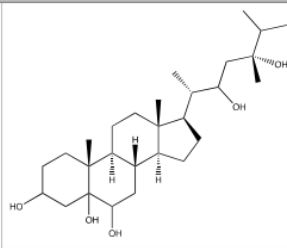
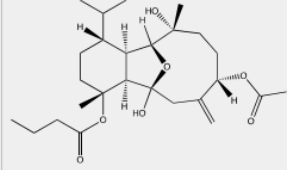
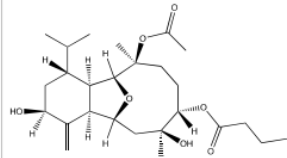
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
26	12,893	92	1157,00135	2,21606	<b>Combranolide A</b> Chemical Formula: $C_{22}H_{30}O_5$ Exact Mass: 374.2093 Molecular Weight: 374.4770 m/z: 374.2093 (100.0%), 375.2127 (23.8%), 376.2160 (2.7%), 376.2136 (1.0%)	
27	12,972	92	424,26258	0,81261	<b>Chlorovulone II</b> Chemical Formula: $C_{21}H_{29}ClO_4$ Exact Mass: 380.1754 Molecular Weight: 380.9090 m/z: 380.1754 (100.0%), 382.1725 (32.0%), 381.1788 (22.7%), 383.1758 (7.3%), 382.1821 (2.5%)	

Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
28	13,068	92	520,67033	0,99726	<b>5,8 Epoxy 9 acetoxysinulariolide</b> Chemical Formula: $C_{22}H_{32}O_6$ Exact Mass: 392.2199 Molecular Weight: 392.4920 m/z: 392.2199 (100.0%), 393.2232 (23.8%), 394.2266 (2.7%), 394.2241 (1.2%)	
29	13,226	92	605,27486	1,15931	<b>24 Methylene cholesterol</b> Chemical Formula: $C_{28}H_{48}O$ Exact Mass: 398.3549 Molecular Weight: 398.6750 m/z: 398.3549 (100.0%), 399.3582 (30.3%), 400.3616 (2.7%), 400.3616 (1.7%)	

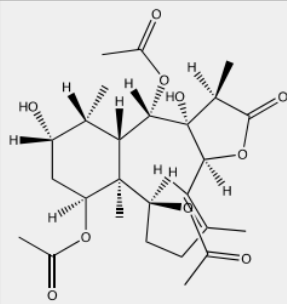
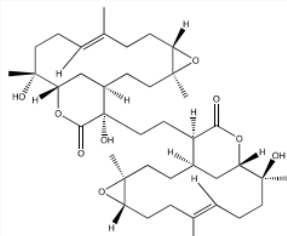


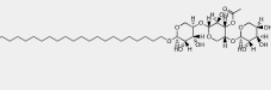
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
30	13,232	92	833,62765	1,59669	<b>Australin A</b> Chemical Formula: $C_{27}H_{38}O_6$ Exact Mass: 396,2512 Molecular Weight: 396,5240 m/z: 396,2512 (100.0%), 397,2545 (23.8%), 398,2579 (2.7%), 398,2554 (1.2%)	
31	14,414	92	602,53801	1,15407	<b>Sinulodurin A</b> Chemical Formula: $C_{23}H_{34}O_5$ Exact Mass: 402,2406 Molecular Weight: 402,5310 m/z: 402,2406 (100.0%), 403,2440 (26.0%), 404,2473 (2.7%), 404,2449 (1.0%)	
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
32	17,496	92	1618,10364	3,09923	<b>Australin D</b> Chemical Formula: $C_{24}H_{38}O_6$ Exact Mass: 422,2668 Molecular Weight: 422,5620 m/z: 422,2668 (100.0%), 423,2702 (26.0%), 424,2735 (2.7%), 424,2711 (1.2%)	
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
33	17,581	92	556,69807	1,06627	<b>Bromovulone II</b> Chemical Formula: $C_{21}H_{29}BrO_4$ Exact Mass: 424,1249 Molecular Weight: 425,3630 m/z: 424,1249 (100.0%), 426,1229 (97.3%), 427,1262 (22.1%), 425,1283 (16.2%), 425,1283 (6.5%), 426,1316 (2.3%), 428,1296 (1.2%), 428,1296 (1.2%)	
34	17,902	92	382,62742	0,73286	<b>Sinulaflexiolide C</b> Chemical Formula: $C_{22}H_{34}O_8$ Exact Mass: 426,2254 Molecular Weight: 426,5060 m/z: 426,2254 (100.0%), 427,2287 (23.8%), 428,2321 (2.7%), 428,2296 (1.6%)	

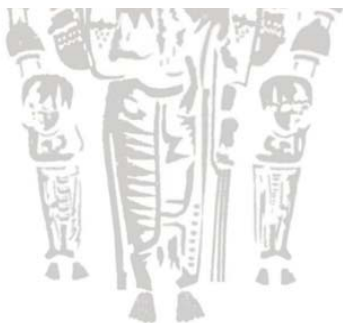
Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
35	22,17	92	2011,24148	3,85222	<b>Clavulone I</b> Chemical Formula: $C_{25}H_{34}O_7$ Exact Mass: 446,2305 Molecular Weight: 446,5400 m/z: 446,2305 (100,0%), 447,2338 (27,0%), 448,2372 (2,7%), 448,2347 (1,4%)	
36	23,3	92	1435,31062	2,74912	<b>Epoxycladine A</b> Chemical Formula: $C_{24}H_{38}O_8$ Exact Mass: 454,2567 Molecular Weight: 454,5600 m/z: 454,2567 (100,0%), 455,2600 (26,0%), 456,2634 (3,2%), 456,2609 (1,6%)	

Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
37	24,128	92	1426,56366	2,73236	<b>Ergostane 3,5,6,22,24 pentol</b> Chemical Formula: $C_{28}H_{50}O_5$ Exact Mass: 466,3658 Molecular Weight: 466,7030 m/z: 466,3658 (100,0%), 467,3692 (30,3%), 468,3725 (2,7%), 468,3725 (1,7%), 468,3701 (1,0%)	
38	24,13	92	1156,92822	2,21592	<b>Australin B</b> Chemical Formula: $C_{26}H_{42}O_7$ Exact Mass: 466,2931 Molecular Weight: 466,6150 m/z: 466,2931 (100,0%), 467,2964 (28,1%), 468,2998 (2,7%), 468,2973 (1,4%), 468,2998 (1,1%)	
39	24,135	92	1031,63576	1,97594	<b>Australin C</b> Chemical Formula: $C_{26}H_{42}O_7$ Exact Mass: 466,2931 Molecular Weight: 466,6150 m/z: 466,2931 (100,0%), 467,2964 (28,1%), 468,2998 (2,7%), 468,2973 (1,4%), 468,2998 (1,1%)	



Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
40	28,196	92	556,79218	1,06645	<b>Pachyclavulide A</b> Chemical Formula: $C_{29}H_{38}O_{10}$ Exact Mass: 510,2465 Molecular Weight: 510,5800 m/z: 510,2465 (100,0%), 511,2499 (28,1%), 512,2532 (2,7%), 512,2507 (2,1%), 512,2532 (1,1%)	
41	46,208	92	1251,63668	2,39732	<b>Sinulaflexioliide A</b> Chemical Formula: $C_{40}H_{62}O_9$ Exact Mass: 686,4394 Molecular Weight: 686,9270 m/z: 686,4394 (100,0%), 687,4427 (43,3%), 688,4461 (9,1%), 688,4436 (1,8%), 689,4494 (1,3%)	

Peak number	RT (min)	Similarity index (%)	Curve Area	Composition (%)	Compound Result	
					Analysis	Structure
42	46,906	92	1591,81449	3,04888	<b>Firmacoside B</b> Chemical Formula: $C_{39}H_{72}O_{14}$ Exact Mass: 764,4922 Molecular Weight: 764,9910 m/z: 764,4922 (100,0%), 765,4956 (42,2%), 766,4989 (8,7%), 766,4965 (2,9%), 767,4998 (1,2%)	



**Lampiran 7b. Analisis Probabilitas Senyawa dalam Fraksi 3 Hasil Kromatografi Kolom *Sarcophyton* sp. (SCC) Dengan LC-MS Beserta Spektra UV dan FTIR**

Senyawa	UV-Vis (nm)	FTIR (cm <sup>-1</sup> )	Referensi
Clavukerin A	245	2984, 1660, 1600, 1434, 1350	(S. K. Kim & Pak, 1991)
Clavulazine	310, 277, 272	3301, 1400, 1160, 1104, 1062, 1039	(Watanabe et al., 1998)
Clavukerin C	255, 247	-	(Motomasa Kobayashi et al., 1984)
Sinularene	-	1740	(Collins & Wege, 1979)
(E,E) 2 (2,6 Dimethyl 1,5,7 octatrienyl) 4 methylfuran	204, 229, 265, 273, 283	3150, 2950, 1600, 1495, 1455, 1375, 1200, 1030, 770, 710	(Bowden et al., 1983)
Coralloidin E	263	1770, 1700, 1620	(Ambrosio et al., 1989)
(E,E) 5 (2,6 Dimethyl 1,5,7 octatrienyl) 3 furancarboxylic acid	212, 231, 253, 262	3500-2400, 1680, 1600, 1550, 1440, 1300, 1200, 1150,760	(Bowden et al., 1983)
Coralloidin B	227	2917, 1739, 1447, 1364, 1240, 1030, 853	(Guerrero et al., 1986)
Coralloidin A	227	2917, 1739, 1447, 1364, 1240, 1030, 853	(Guerrero et al., 1986)
Coralloidin C	249	-	(Ambrosio et al., 1987)
1,3,7,12(20) Cembratetraen 11 ol	248	1660, 1660	(Kinamoni et al., 1983)
3,4 Epoxy 7,11,15 cembratrien 14 one	217	1706,1650, 915	(Ravi & Faulkner, 1978)
Microclavatin	282.2	3054, 3021, 1710, 1639, 1617, 1269, 1226, 1044, 983	(C. X. Zhang et al., 2005)
Coralloidin D	208	-	(Ambrosio et al., 1987)
Sinularolide B	208	3610, 3460, 2949, 2866, 1751, 1659, 1261, 1149, 1043	(Li et al., 2005)
(5Z,9E,11E,14E) Ethyl 8 hydroxy 13 oxoicosa-5,9,11,14 tetraenoate	288	-	(W. Zhang et al., 2008)
Sinulaflexiolide B	-	3421, 2929, 1711, 1626, 1454, 1377, 1254, 1152, 1049	(Guerrero et al., 1990)
			(Wen et al., 2008)

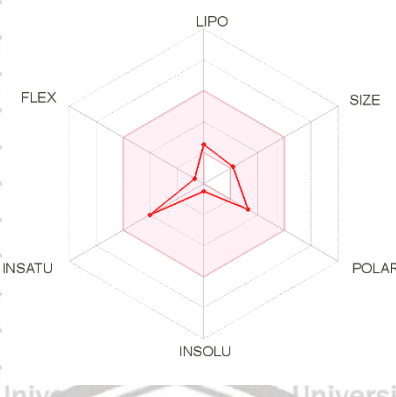
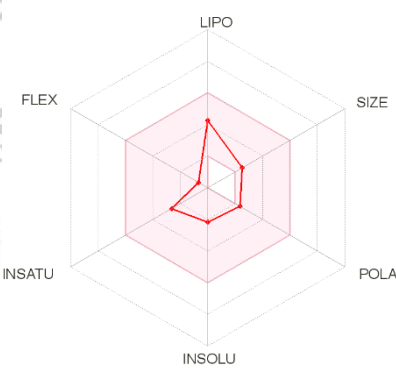
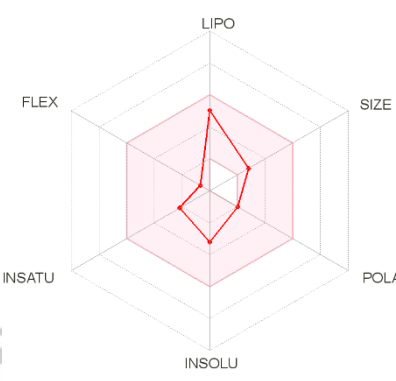
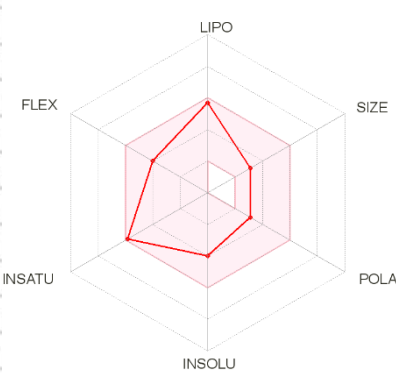


Sinulaflexioldide D	-	3397, 2936, 1705, 1629, 1459, 1379, 1257, 1145, 1025	(Wen et al., 2008)
5,8 Epoxy 9 acetoxysinularioldide	-	1720, 1622, 905	(Mori et al., 1983)
Australin A	-	3447, 2961, 2934, 2874, 1732, 1716, 1665, 1454, 1368, 1253, 1093	(Ahmed et al., 2005)
Sinulodurin A	239	1736	(Radwan et al., 2008)
Australin D	-	3445, 2960, 2930, 2890, 1734, 1669, 1456, 1539, 1457, 1377, 1262, 1099, 1059	(Ahmed et al., 2005)
Pachyclavulide A	-	3442, 1775, 1745, 1734, 1260, 1217	(Iwasaki, Ito, Aoyagi, Sato, & Iguchi, 2006)

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## Lampiran 8. Analisis SwissADME Senyawa Aktif Pada Fraksi 3

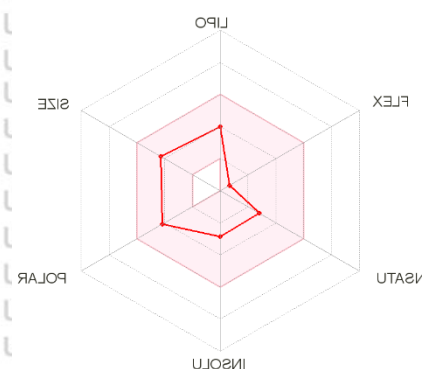
Nama Senyawa	Analisis SwissADME	
Clavulazine		<p>Lipinski <span style="color: red;">?</span> Yes; 0 violation</p> <p>Ghose <span style="color: red;">?</span> Yes</p> <p>Veber <span style="color: red;">?</span> Yes</p> <p>Egan <span style="color: red;">?</span> Yes</p> <p>Muegge <span style="color: red;">?</span> No; 1 violation: MW&lt;200</p>
Clavukerin C		<p>Lipinski <span style="color: red;">?</span> Yes; 0 violation</p> <p>Ghose <span style="color: red;">?</span> Yes</p> <p>Veber <span style="color: red;">?</span> Yes</p> <p>Egan <span style="color: red;">?</span> Yes</p> <p>Muegge <span style="color: red;">?</span> No; 1 violation: MW&lt;200</p>
Coralloidin E		<p>Lipinski <span style="color: red;">?</span> Yes; 0 violation</p> <p>Ghose <span style="color: red;">?</span> Yes</p> <p>Veber <span style="color: red;">?</span> Yes</p> <p>Egan <span style="color: red;">?</span> Yes</p> <p>Muegge <span style="color: red;">?</span> No; 1 violation: Heteroatoms&lt;2</p>
(E,E) 5 (2,6 Dimethyl 1,5,7 octatrienyl) 3 furancarboxylic acid		<p>Lipinski <span style="color: red;">?</span> Yes; 0 violation</p> <p>Ghose <span style="color: red;">?</span> Yes</p> <p>Veber <span style="color: red;">?</span> Yes</p> <p>Egan <span style="color: red;">?</span> Yes</p> <p>Muegge <span style="color: red;">?</span> Yes</p>



<p>1,3,7,12(20) Cembratetraen 11 ol</p>		<p>Lipinski <span style="color: red;">?</span> Yes; 1 violation: MLOGP&gt;4.15  Ghose <span style="color: red;">?</span> No; 1 violation: WLOGP&gt;5.6  Veber <span style="color: red;">?</span> Yes  Egan <span style="color: red;">?</span> Yes  Muegge <span style="color: red;">?</span> No; 1 violation: Heteroatoms&lt;2</p>
<p>1,4,8,13 Cembratetraen 12 ol</p>		<p>Lipinski <span style="color: red;">?</span> Yes; 1 violation: MLOGP&gt;4.15  Ghose <span style="color: red;">?</span> No; 1 violation: WLOGP&gt;5.6  Veber <span style="color: red;">?</span> Yes  Egan <span style="color: red;">?</span> Yes  Muegge <span style="color: red;">?</span> No; 1 violation: Heteroatoms&lt;2</p>
<p>Lobophytol</p>		<p>Lipinski <span style="color: red;">?</span> Yes; 0 violation  Ghose <span style="color: red;">?</span> Yes  Veber <span style="color: red;">?</span> Yes  Egan <span style="color: red;">?</span> Yes  Muegge <span style="color: red;">?</span> Yes</p>
<p>Mayolide A</p>		<p>Lipinski <span style="color: red;">?</span> Yes; 0 violation  Ghose <span style="color: red;">?</span> Yes  Veber <span style="color: red;">?</span> Yes  Egan <span style="color: red;">?</span> Yes  Muegge <span style="color: red;">?</span> Yes</p>

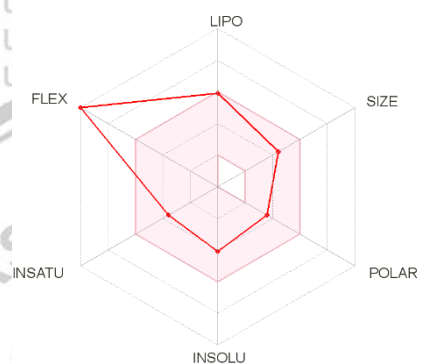


Sinularolide B



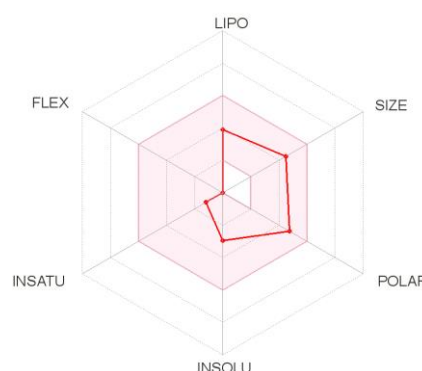
Lipinski ? Yes; 0 violation  
 Ghose ? Yes  
 Veber ? Yes  
 Egan ? Yes  
 Muegge ? Yes

(5Z,9E,11E,14E) Ethyl 8 hydroxy 13 oxoicosa-5,9,11,14 tetraenoate



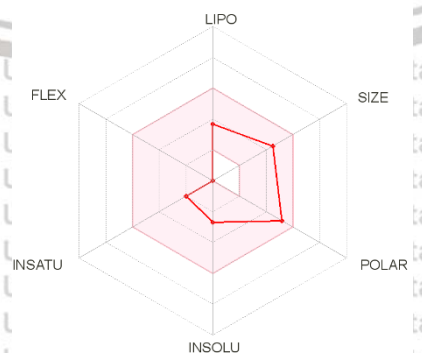
Lipinski ? Yes; 0 violation  
 Ghose ? Yes  
 Veber ? No; 1 violation: Rotors>10  
 Egan ? Yes  
 Muegge ? No; 1 violation: Rotors>15

Sinulaflexiolide B



Lipinski ? Yes; 0 violation  
 Ghose ? Yes  
 Veber ? Yes  
 Egan ? Yes  
 Muegge ? Yes

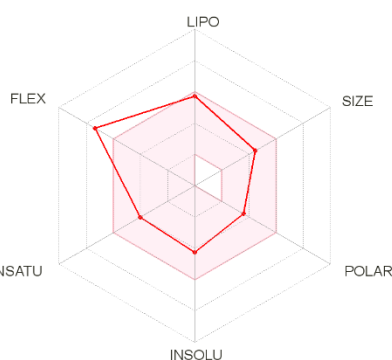
Sinulaflexiolide D



Lipinski ? Yes; 0 violation  
 Ghose ? Yes  
 Veber ? Yes  
 Egan ? Yes  
 Muegge ? Yes

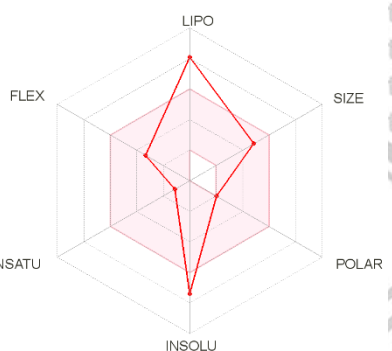


Chlorovulone II



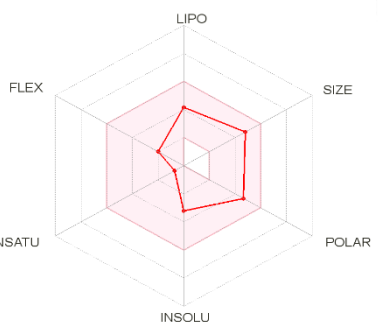
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	No; 1 violation: Rotors>10
Egan	Yes
Muegge	Yes

24 Methylene cholesterol



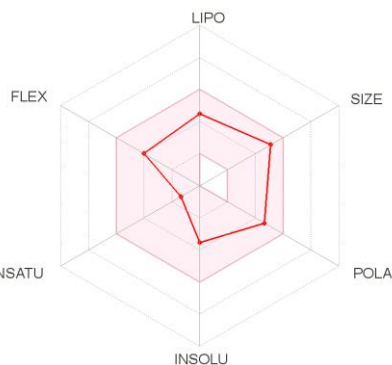
Lipinski	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15
Ghose	No; 2 violations: WLOGP>5.6, #atoms>70
Veber	Yes
Egan	No; 1 violation: WLOGP>5.88
Muegge	No; 2 violations: XLOGP3>5, Heteroatoms<2

Australin A



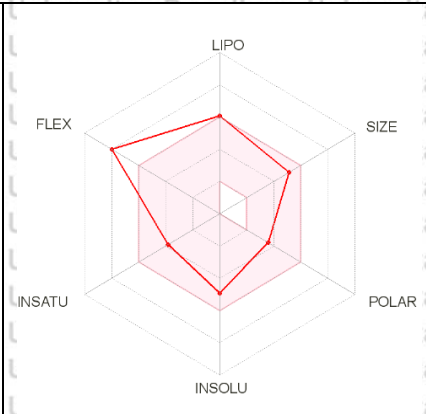
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes

Australin D



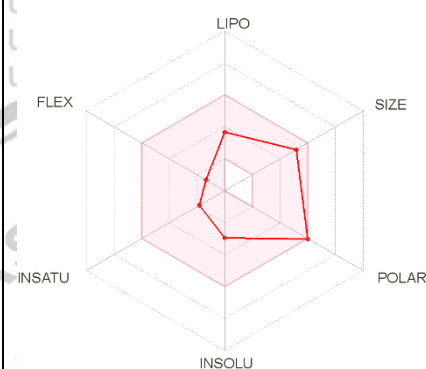
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes

Bromovulone II



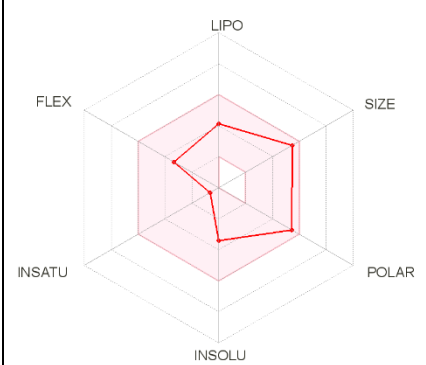
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	No; 1 violation: Rotors>10
Egan	Yes
Muegge	No; 1 violation: XLOGP3>5

Sinulaflexiolide C

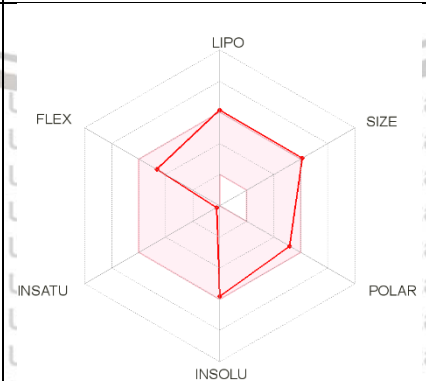


Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes

Epoxycladine A



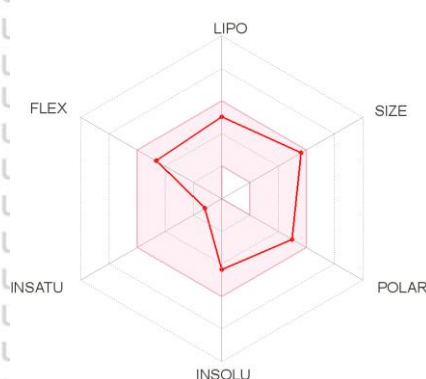
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes

Ergostane  
3,5,6,22,24  
pentol

Lipinski	Yes; 1 violation: MW>500
Ghose	No; 3 violations: MW>480, MR>130, #atoms>70
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	No; 1 violation: XLOGP3>5

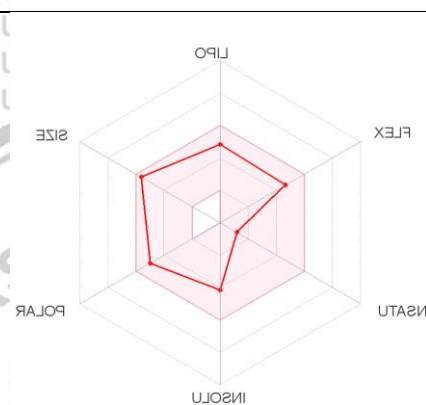


Australin B



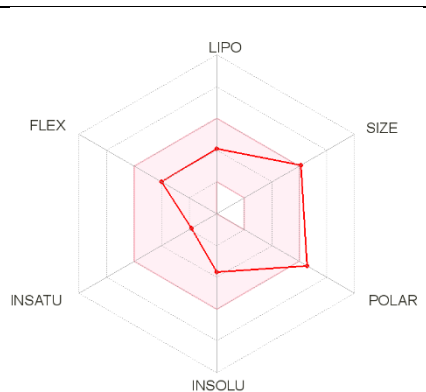
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	No; 1 violation: #atoms>70
Weber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes

Australin C



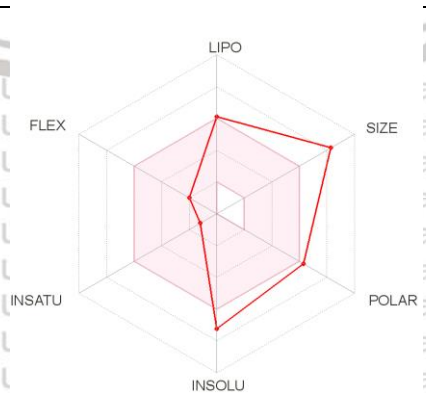
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	No; 1 violation: #atoms>70
Weber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55

Pachyclavulide A



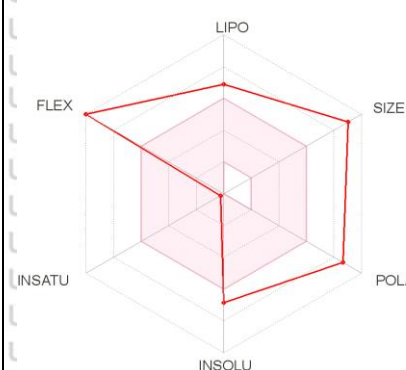
Lipinski	Yes; 1 violation: MW>500
Ghose	No; 2 violations: MW>480, #atoms>70
Weber	No; 1 violation: TPSA>140
Egan	No; 1 violation: TPSA>131.6
Muegge	Yes

Sinulaflexiolide A



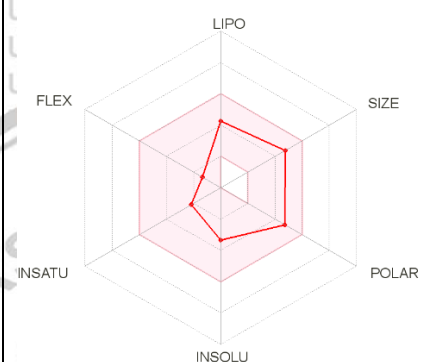
Lipinski	Yes; 1 violation: MW>500
Ghose	No; 4 violations: MW>480, WLOGP>5.6, MR>130, #atoms>70
Weber	Yes
Egan	No; 2 violations: WLOGP>5.88, TPSA>131.6
Muegge	No; 2 violations: MW>600, XLOGP3>5

Firmacoside B

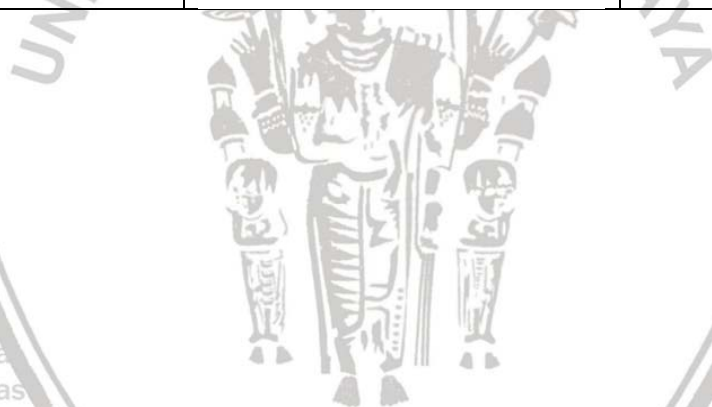


Lipinski	No; 3 violations: MW>500, NorO>10, NHorOH>5
Ghose	No; 3 violations: MW>480, MR>130, #atoms>70
Veber	No; 2 violations: Rotors>10, TPSA>140
Egan	No; 1 violation: TPSA>131.6
Muegge	No; 6 violations: MW>600, XLOGP3>5, TPSA>150, Rotors>15, H-acc>10, H-don>5
Bioavailability Score	0.17

Dexamethasone




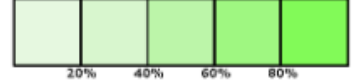

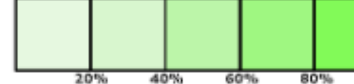


Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55





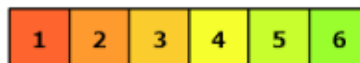
## Lampiran 9. Analisis Protox II Senyawa Aktif Pada Fraksi 3

Nama Senyawa	Prediksi LD <sub>50</sub>
Clavulazine	<p data-bbox="660 331 1209 376">Predicted LD50: 800mg/kg</p> <p data-bbox="644 405 1219 456">Predicted Toxicity Class: 4</p>  <p data-bbox="644 584 1219 636">Average similarity: 51.08%</p> <p data-bbox="644 665 1219 716">Prediction accuracy: 67.38%</p> 
Clavukerin C	<p data-bbox="660 853 1209 898">Predicted LD50: 10mg/kg</p> <p data-bbox="644 927 1219 978">Predicted Toxicity Class: 2</p>  <p data-bbox="644 1106 1219 1158">Average similarity: 46.24%</p> <p data-bbox="644 1187 1219 1238">Prediction accuracy: 54.26%</p> 
Coralloidin E	<p data-bbox="660 1368 1209 1420">Predicted LD50: 3000mg/kg</p> <p data-bbox="644 1449 1219 1500">Predicted Toxicity Class: 5</p>  <p data-bbox="644 1637 1219 1688">Average similarity: 70.52%</p> <p data-bbox="644 1718 1219 1769">Prediction accuracy: 69.26%</p> 

(E,E) 5-(2,6-Dimethyl-1,5,7-octatrienyl)-3-furancarboxylic acid

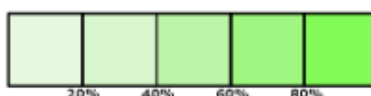
Predicted LD50: 860mg/kg

Predicted Toxicity Class: 4



Average similarity: 42.31%

Prediction accuracy: 54.26%



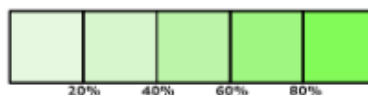
Predicted LD50: 841mg/kg

Predicted Toxicity Class: 4



Average similarity: 51.45%

Prediction accuracy: 67.38%



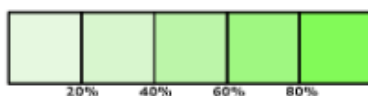
Predicted LD50: 841mg/kg

Predicted Toxicity Class: 4



Average similarity: 50.59%

Prediction accuracy: 67.38%



Lobophytol

Mayolide A



Sinularolide B

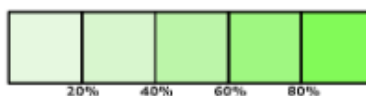
Predicted LD50: 452mg/kg

Predicted Toxicity Class: 4



Average similarity: 75.59%

Prediction accuracy: 69.26%

(5Z,9E,11E, 14E)  
Ethyl 8 hydroxy 13  
oxoicosa-5,9,11,14  
tetraenoate

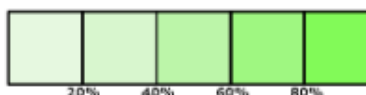
Predicted LD50: 5000mg/kg

Predicted Toxicity Class: 5



Average similarity: 66.77%

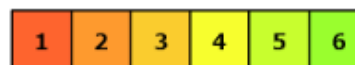
Prediction accuracy: 68.07%



Sinulaflexiolide B

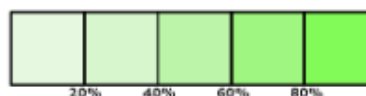
Predicted LD50: 2550mg/kg

Predicted Toxicity Class: 5



Average similarity: 72.6%

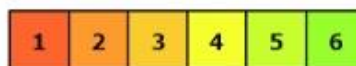
Prediction accuracy: 69.26%



Sinulaflexiolide D

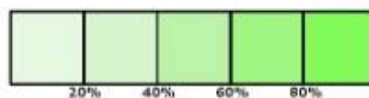
Predicted LD50: 2550mg/kg

Predicted Toxicity Class: 5



Average similarity: 74.89%

Prediction accuracy: 69.26%



Chlorovulone II

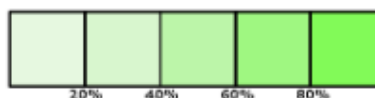
Predicted LD50: 200mg/kg

Predicted Toxicity Class: 3



Average similarity: 55.75%

Prediction accuracy: 67.38%



Australin A

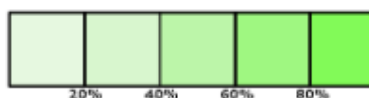
Predicted LD50: 4490mg/kg

Predicted Toxicity Class: 5



Average similarity: 75.98%

Prediction accuracy: 69.26%

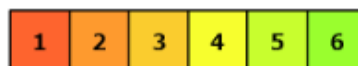




Australin D

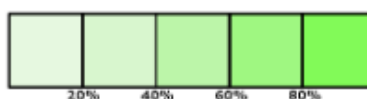
Predicted LD50: 2550mg/kg

Predicted Toxicity Class: 5



Average similarity: 71.84%

Prediction accuracy: 69.26%



Bromovulone II

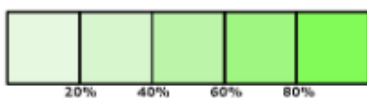
Predicted LD50: 1000mg/kg

Predicted Toxicity Class: 4



Average similarity: 54.77%

Prediction accuracy: 67.38%



Sinulaflexiolide C

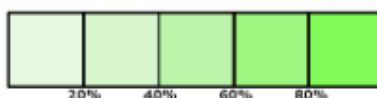
Predicted LD50: 2550mg/kg

Predicted Toxicity Class: 5



Average similarity: 67.81%

Prediction accuracy: 68.07%



Epoxycladine A

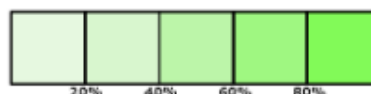
Predicted LD50: 33600mg/kg

Predicted Toxicity Class: 6



Average similarity: 79.11%

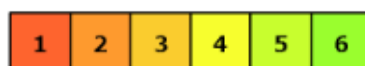
Prediction accuracy: 69.26%



Australin B

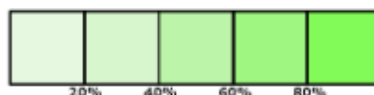
Predicted LD50: 150mg/kg

Predicted Toxicity Class: 3



Average similarity: 66.5%

Prediction accuracy: 68.07%



Australin C

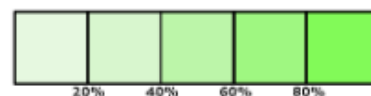
Predicted LD50: 39800mg/kg

Predicted Toxicity Class: 6



Average similarity: 71.02%

Prediction accuracy: 69.26%

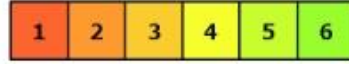




Dexamethasone

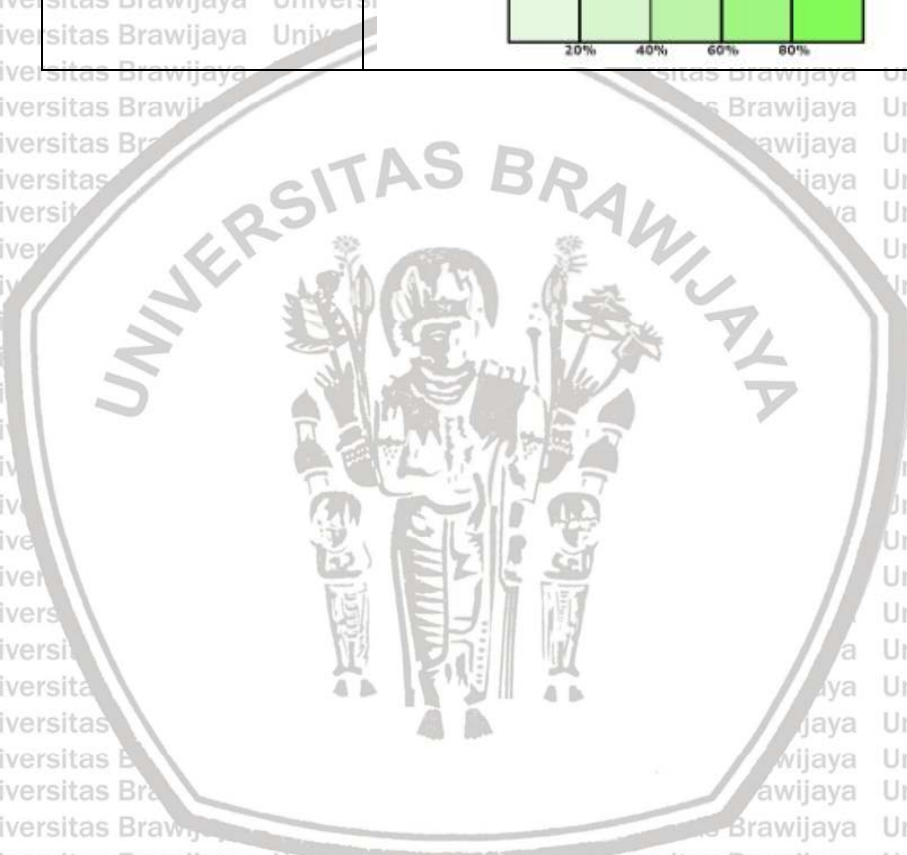
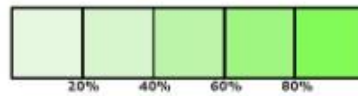
Predicted LD50: 3000mg/kg

Predicted Toxicity Class: 5

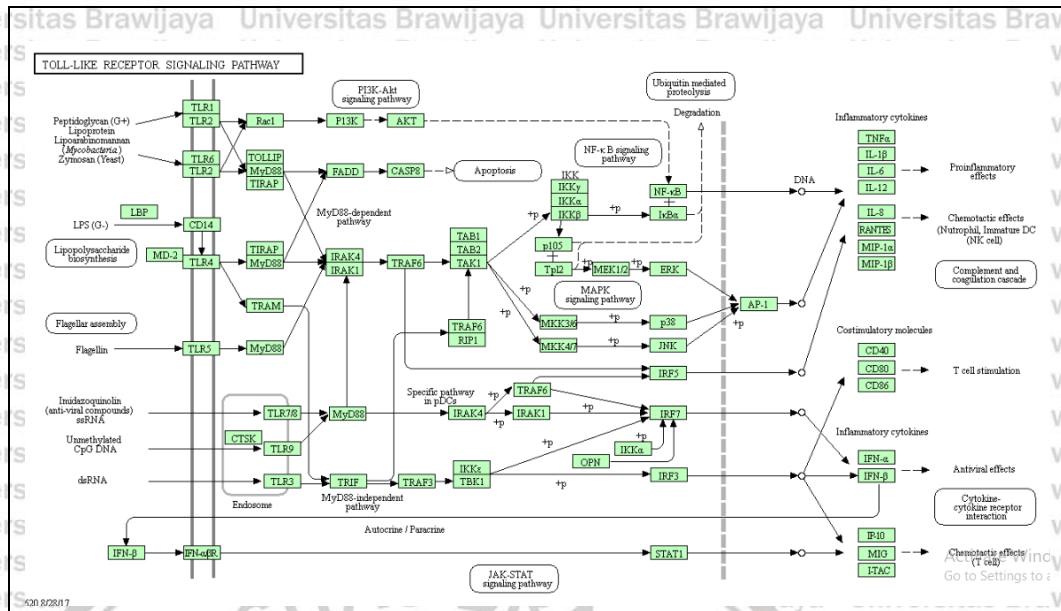


Average similarity: 100%

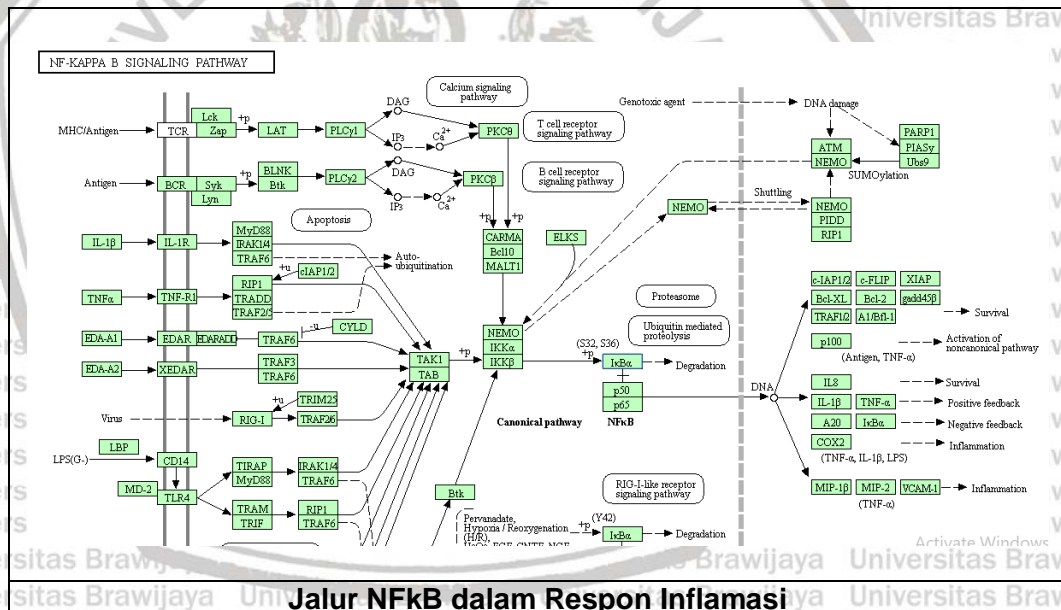
Prediction accuracy: 100%



Lampiran 10. Jalur TLR4, NFkB, dan IL-10 dalam Respon Inflamasi

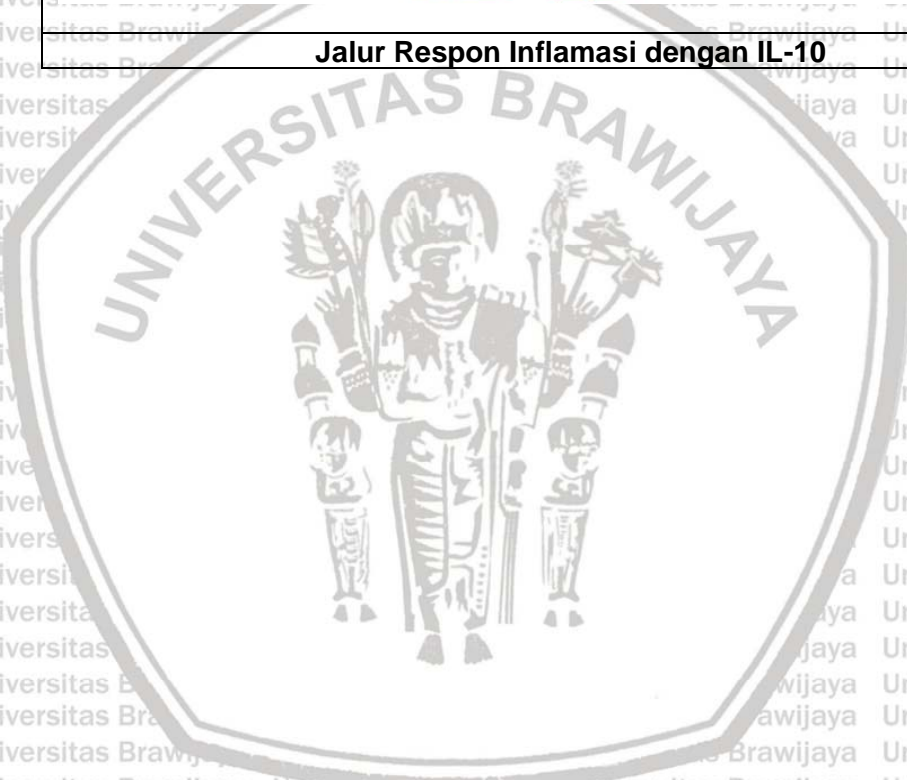
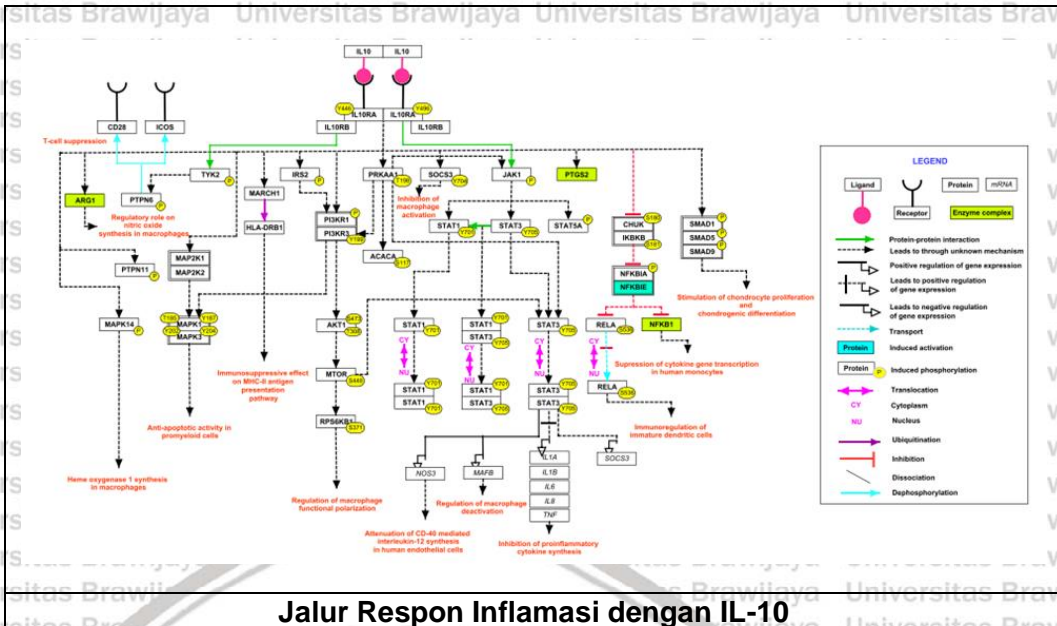


Jalur TLR4 dalam Respon Inflamasi



Jalur NFkB dalam Respon Inflamasi





Lampiran 11. Hasil Analisis Statistik Pengujian *In Vivo* Dengan Parameter Sel T Naïve, Sel T Regulator, IL-10, TLR4, NFκB, TNF-α, IL-6, MDA, SOD, HO-1 dan Nrf-2

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		CD4_CD62L	CD4_CD25_CD62 L	CD4_CD25_IL10
N		36	36	36
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	60.7119	77.0661	9.4458
	Std. Deviation	6.34716	3.04801	1.98974
Most Extreme Differences	Absolute	.074	.078	.120
	Positive	.074	.078	.120
	Negative	-.074	-.059	-.065
Kolmogorov-Smirnov Z		.447	.469	.720
Asymp. Sig. (2-tailed)		.988	.980	.678

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		CD11b_TLR4	CD11b_NFκB	CD11b_TNFα
N		36	36	36
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	16.4631	14.8628	16.4753
	Std. Deviation	3.39234	2.74306	6.34182
Most Extreme Differences	Absolute	.145	.095	.165
	Positive	.145	.095	.165
	Negative	-.084	-.086	-.115
Kolmogorov-Smirnov Z		.868	.570	.989
Asymp. Sig. (2-tailed)		.439	.902	.282

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		CD11b_IL6	Nrf2	SOD	HO1
N		36	36	36	36
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	25.9861	29.3078	24.7842	29.8314
	Std. Deviation	8.12251	5.13379	5.46829	6.58022
Most Extreme Differences	Absolute	.272	.081	.120	.131
	Positive	.272	.081	.120	.131
	Negative	-.135	-.071	-.108	-.123
Kolmogorov-Smirnov Z		1.629	.486	.719	.784
Asymp. Sig. (2-tailed)		.010	.972	.680	.571

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MDA
N		36
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	151.5736
	Std. Deviation	54.39902
Most Extreme Differences	Absolute	.094
	Positive	.081
	Negative	-.094
Kolmogorov-Smirnov Z		.565
Asymp. Sig. (2-tailed)		.907

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
CD4_CD62L	Normal	6	56.9750	1.64675	.67228
	LPS	6	50.9600	1.16480	.47553
	LPS + Dexa	6	65.7300	1.49510	.61037
	LPS + 50 mg/kg	6	61.8817	1.28439	.52435
	LPS + 125 mg/kg	6	69.9733	1.43876	.58737
	LPS + 250 mg/kg	6	58.7517	1.30579	.53309



CD4_CD25_CD62L	Total	36	60.7119	6.34716	1.05786
	Normal	6	77.4800	1.21356	.49543
	LPS	6	72.9733	1.12921	.46100
	LPS + Dexa	6	74.4800	.81139	.33125
	LPS + 50 mg/kg	6	78.4683	1.11611	.45565
	LPS + 125 mg/kg	6	81.8333	1.04546	.42681
CD4_CD25_IL10	LPS + 250 mg/kg	6	77.1617	1.14603	.46786
	Total	36	77.0661	3.04801	.50800
	Normal	6	10.3600	.91321	.37282
	LPS	6	7.5767	1.01050	.41253
	LPS + Dexa	6	12.3333	1.17340	.47904
	LPS + 50 mg/kg	6	7.7817	1.14130	.46594
CD11b_TLR4	LPS + 125 mg/kg	6	8.2733	1.07770	.43997
	LPS + 250 mg/kg	6	10.3500	.92898	.37925
	Total	36	9.4458	1.98974	.33162
	Normal	6	11.9683	1.14911	.46912
	LPS	6	22.3667	1.48189	.60498
	LPS + Dexa	6	17.0767	1.45217	.59284
CD11b_NFkB	LPS + 50 mg/kg	6	16.3367	1.11914	.45689
	LPS + 125 mg/kg	6	15.9700	1.36539	.55742
	LPS + 250 mg/kg	6	15.0600	1.61952	.66117
	Total	36	16.4631	3.39234	.56539
	Normal	6	13.2433	1.15249	.47050
	LPS	6	18.3817	1.23976	.50613
CD11b_NFkB	LPS + Dexa	6	17.4850	1.37714	.56221
	LPS + 50 mg/kg	6	14.9817	1.37612	.56180
	LPS + 125 mg/kg	6	13.9633	.84033	.34306
	LPS + 250 mg/kg	6	11.1217	1.12631	.45981

## Descriptives

		95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
		Lower Bound	Upper Bound		
CD4_CD62L	Normal	55.2468	58.7032	54.64	59.18
	LPS	49.7376	52.1824	49.84	53.18
	LPS + Dexa	64.1610	67.2990	63.96	68.17
	LPS + 50 mg/kg	60.5338	63.2296	59.76	63.45
	LPS + 125 mg/kg	68.4634	71.4832	68.53	72.29
	LPS + 250 mg/kg	57.3813	60.1220	56.95	60.64
CD4_CD25_CD62L	Total	58.5644	62.8595	49.84	72.29
	Normal	76.2065	78.7535	75.61	78.83
	LPS	71.7883	74.1584	71.17	74.28
	LPS + Dexa	73.6285	75.3315	73.39	75.32
	LPS + 50 mg/kg	77.2971	79.6396	76.68	79.94
	LPS + 125 mg/kg	80.7362	82.9305	80.85	83.81
CD4_CD25_IL10	LPS + 250 mg/kg	75.9590	78.3643	76.15	78.98
	Total	76.0348	78.0974	71.17	83.81
	Normal	9.4016	11.3184	9.20	11.40
	LPS	6.5162	8.6371	6.12	8.87
	LPS + Dexa	11.1019	13.5647	11.00	13.83
	LPS + 50 mg/kg	6.5839	8.9794	6.41	9.79
CD11b_TLR4	LPS + 125 mg/kg	7.1424	9.4043	7.26	9.98
	LPS + 250 mg/kg	9.3751	11.3249	9.25	11.46
	Total	8.7726	10.1191	6.12	13.83
	Normal	10.7624	13.1743	10.75	13.57
	LPS	20.8115	23.9218	20.63	24.14
	LPS + Dexa	15.5527	18.6006	15.97	19.36
CD11b_NFkB	LPS + 50 mg/kg	15.1622	17.5111	14.65	17.82
	LPS + 125 mg/kg	14.5371	17.4029	13.69	17.37
	LPS + 250 mg/kg	13.3604	16.7596	12.12	16.92
	Total	15.3153	17.6109	10.75	24.14
	Normal	12.0339	14.4528	11.69	14.65
	LPS	17.0806	19.6827	17.25	20.19
CD11b_NFkB	LPS + Dexa	16.0398	18.9302	15.44	19.28
	LPS + 50 mg/kg	13.5375	16.4258	12.61	16.31
	LPS + 125 mg/kg	13.0815	14.8452	13.01	14.97
	LPS + 250 mg/kg	9.9397	12.3037	9.66	12.20

## Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
CD11b_NFkB	Total	36	14.8628	2.74306	.45718
	Normal	6	13.4650	1.27673	.52122
	LPS	6	17.8550	1.31476	.53675
	LPS + Dexa	6	28.0917	1.30835	.53413
CD11b_TNFa	LPS + 50 mg/kg	6	17.5200	1.14011	.46545
	LPS + 125 mg/kg	6	13.9500	1.76026	.71862
	LPS + 250 mg/kg	6	7.9700	1.09771	.44814
	Total	36	16.4753	6.34182	1.05697
	Normal	6	22.5750	1.11615	.45567
	LPS	6	25.2150	1.28510	.52464
CD11b_IL6	LPS + Dexa	6	42.9733	1.07379	.43837
	LPS + 50 mg/kg	6	25.3133	1.08896	.44456
	LPS + 125 mg/kg	6	21.2667	1.09513	.44708
	LPS + 250 mg/kg	6	18.5733	1.10721	.45202
	Total	36	25.9861	8.12251	1.35375
	Normal	6	32.9683	1.12661	.45994
Nrf2	LPS	6	27.8017	1.14847	.46886
	LPS + Dexa	6	25.8267	1.09848	.44845
	LPS + 50 mg/kg	6	21.9517	1.27940	.52231
	LPS + 125 mg/kg	6	37.3383	1.13897	.46498
	LPS + 250 mg/kg	6	29.9600	1.25897	.51397
	Total	36	29.3078	5.13379	.85563
SOD	Normal	6	26.0217	1.07734	.43982
	LPS	6	17.0450	1.07273	.43794
	LPS + Dexa	6	25.0250	.99552	.40642
	LPS + 50 mg/kg	6	19.2983	.91642	.37412
	LPS + 125 mg/kg	6	28.5800	.79196	.32332
	LPS + 250 mg/kg	6	32.7350	1.22577	.50042
HO1	Total	36	24.7842	5.46829	.91138
	Normal	6	33.4083	1.50190	.61315
	LPS	6	28.6917	1.04448	.42641
	LPS + Dexa	6	22.3883	1.82151	.74363
	LPS + 50 mg/kg	6	21.3567	1.18814	.48505
	LPS + 125 mg/kg	6	38.9617	1.14265	.46649

## Descriptives

		95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
		Lower Bound	Upper Bound		
CD11b_NFkB	Total	13.9347	15.7909	9.66	20.19
	Normal	12.1252	14.8048	11.98	15.55
	LPS	16.4752	19.2348	16.66	20.39
	LPS + Dexa	26.7186	29.4647	26.81	30.52
CD11b_TNFa	LPS + 50 mg/kg	16.3235	18.7165	16.03	18.98
	LPS + 125 mg/kg	12.1027	15.7973	11.21	15.92
	LPS + 250 mg/kg	6.8180	9.1220	6.16	8.88
	Total	14.3295	18.6210	6.16	30.52
	Normal	21.4037	23.7463	20.39	23.43
	LPS	23.8664	26.5636	23.80	27.25
CD11b_IL6	LPS + Dexa	41.8465	44.1002	41.04	44.04
	LPS + 50 mg/kg	24.1705	26.4561	24.26	27.04
	LPS + 125 mg/kg	20.1174	22.4159	20.23	22.93
	LPS + 250 mg/kg	17.4114	19.7353	16.96	19.85
	Total	23.2378	28.7344	16.96	44.04
	Normal	31.7860	34.1506	31.95	34.48
Nrf2	LPS	26.5964	29.0069	26.51	29.89
	LPS + Dexa	24.6739	26.9795	24.26	27.66
	LPS + 50 mg/kg	20.6090	23.2943	20.50	24.02
	LPS + 125 mg/kg	36.1431	38.5336	36.02	39.32
	LPS + 250 mg/kg	28.6388	31.2812	28.41	31.56
	Total	27.5708	31.0448	20.50	39.32
SOD	Normal	24.8911	27.1523	24.72	27.69
	LPS	15.9192	18.1708	15.50	18.56
	LPS + Dexa	23.9803	26.0697	23.97	26.36
	LPS + 50 mg/kg	18.3366	20.2601	18.00	20.59
	LPS + 125 mg/kg	27.7489	29.4111	27.46	29.70
	LPS + 250 mg/kg	31.4486	34.0214	31.62	34.85
Total	22.9340	26.6344	15.50	34.85	



HO1	Normal	31.8322	34.9845	31.28	35.53
	LPS	27.5956	29.7878	27.27	30.22
	LPS + Dexa	20.4768	24.2999	19.81	24.96
	LPS + 50 mg/kg	20.1098	22.6035	20.19	23.44
	LPS + 125 mg/kg	37.7625	40.1608	37.16	40.29

## Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
HO1	LPS + 250 mg/kg	6	34.1817	1.18030	.48185
	Total	36	29.8314	6.58022	1.09670
	Normal	6	140.2767	10.62823	4.33896
MDA	LPS	6	188.0550	15.15334	6.18633
	LPS + Dexa	6	222.5000	25.92819	10.58514
	LPS + 50 mg/kg	6	66.9450	13.40312	5.47180
	LPS + 125 mg/kg	6	114.7217	18.30863	7.47447
	LPS + 250 mg/kg	6	176.9433	20.04393	8.18290
Total	36	151.5736	54.39902	9.06650	

## Descriptives

		95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
		Lower Bound	Upper Bound		
HO1	LPS + 250 mg/kg	32.9430	35.4203	32.01	35.11
	Total	27.6050	32.0578	19.81	40.29
	Normal	129.1230	151.4303	125.83	155.83
MDA	LPS	172.1525	203.9575	172.50	212.50
	LPS + Dexa	195.2900	249.7100	185.83	259.17
	LPS + 50 mg/kg	52.8793	81.0107	45.83	82.50
	LPS + 125 mg/kg	95.5079	133.9354	85.83	135.83
	LPS + 250 mg/kg	155.9085	197.9782	149.17	205.83
Total	133.1676	169.9796	45.83	259.17	

## Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CD4_CD62L	.284	5	30	.918
CD4_CD25_CD62L	.281	5	30	.920
CD4_CD25_IL10	.154	5	30	.977
CD11b_TLR4	.199	5	30	.960
CD11b_NFKB	.295	5	30	.912
CD11b_TNFa	.431	5	30	.824
CD11b_IL6	.191	5	30	.964
Nrf2	.163	5	30	.974
SOD	.476	5	30	.791
HO1	.318	5	30	.898
MDA	.746	5	30	.596

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F
CD4_CD62L	Between Groups	1351.382	5	270.276	138.265
	Within Groups	58.643	30	1.955	
	Total	1410.025	35		
CD4_CD25_CD62L	Between Groups	289.871	5	57.974	49.282
	Within Groups	35.291	30	1.176	
	Total	325.162	35		
CD4_CD25_IL10	Between Groups	105.773	5	21.155	19.352
	Within Groups	32.795	30	1.093	
	Total	138.568	35		
CD11b_TLR4	Between Groups	345.956	5	69.191	36.529
	Within Groups	56.824	30	1.894	
	Total	402.780	35		
CD11b_NFKB	Between Groups	220.202	5	44.040	30.618
	Within Groups	43.151	30	1.438	
	Total	263.353	35		

CD11b_TNFa	Between Groups	1354.285	5	270.857	152.256
	Within Groups	53.369	30	1.779	
	Total	1407.653	35		
CD11b_IL6	Between Groups	2270.826	5	454.165	355.681
	Within Groups	38.307	30	1.277	
	Total	2309.133	35		
Nrf2	Between Groups	880.883	5	176.177	127.142
	Within Groups	41.570	30	1.386	
	Total	922.453	35		
SOD	Between Groups	1015.215	5	203.043	194.238
	Within Groups	31.360	30	1.045	
	Total	1046.575	35		
HO1	Between Groups	1461.602	5	292.320	162.778
	Within Groups	53.875	30	1.796	
	Total	1515.477	35		
MDA	Between Groups	93916.535	5	18783.307	58.349
	Within Groups	9657.315	30	321.911	
	Total	103573.850	35		

ANOVA

		Sig.
CD4_CD62L	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
CD4_CD25_CD62L	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
CD4_CD25_IL10	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
CD11b_TLR4	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
CD11b_NFkB	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
CD11b_TNFa	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
CD11b_IL6	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
Nrf2	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
SOD	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
HO1	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
MDA	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	





## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Tukey HSD					
Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
CD4_CD62L	Normal	LPS	6.01500 <sup>a</sup>	.80721	.000
		LPS + Dexa	-8.75500 <sup>c</sup>	.80721	.000
		LPS + 50 mg/kg	-4.90667 <sup>b</sup>	.80721	.000
		LPS + 125 mg/kg	-12.99833 <sup>d</sup>	.80721	.000
		LPS + 250 mg/kg	-1.77667	.80721	.267
	LPS	Normal	-6.01500 <sup>c</sup>	.80721	.000
		LPS + Dexa	-14.77000 <sup>e</sup>	.80721	.000
		LPS + 50 mg/kg	-10.92167 <sup>d</sup>	.80721	.000
		LPS + 125 mg/kg	-19.01333 <sup>f</sup>	.80721	.000
		LPS + 250 mg/kg	-7.79167 <sup>b</sup>	.80721	.000
	LPS + Dexa	Normal	8.75500 <sup>a</sup>	.80721	.000
		LPS	14.77000 <sup>e</sup>	.80721	.000
		LPS + 50 mg/kg	3.84833 <sup>b</sup>	.80721	.001
		LPS + 125 mg/kg	-4.24333 <sup>c</sup>	.80721	.000
		LPS + 250 mg/kg	6.97833 <sup>d</sup>	.80721	.000
	LPS + 50 mg/kg	Normal	4.90667 <sup>b</sup>	.80721	.000
		LPS	10.92167 <sup>d</sup>	.80721	.000
		LPS + Dexa	-3.84833 <sup>c</sup>	.80721	.001
		LPS + 125 mg/kg	-8.09167 <sup>e</sup>	.80721	.000
		LPS + 250 mg/kg	3.13000 <sup>a</sup>	.80721	.006
	LPS + 125 mg/kg	Normal	12.99833 <sup>d</sup>	.80721	.000
		LPS	19.01333 <sup>f</sup>	.80721	.000
		LPS + Dexa	4.24333 <sup>c</sup>	.80721	.000
		LPS + 50 mg/kg	8.09167 <sup>e</sup>	.80721	.000
LPS + 250 mg/kg		11.22167 <sup>e</sup>	.80721	.000	
LPS + 250 mg/kg	Normal	1.77667	.80721	.267	
	LPS	7.79167 <sup>b</sup>	.80721	.000	
	LPS + Dexa	-6.97833 <sup>c</sup>	.80721	.000	
	LPS + 50 mg/kg	-3.13000 <sup>a</sup>	.80721	.006	
	LPS + 125 mg/kg	-11.22167 <sup>e</sup>	.80721	.000	
CD4_CD25_CD62L	Normal	LPS	4.50667 <sup>a</sup>	.62620	.000
		LPS + Dexa	3.00000 <sup>a</sup>	.62620	.001
		LPS + 50 mg/kg	-.98833	.62620	.618

## Multiple Comparisons

Tukey HSD				
Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
CD4_CD62L	Normal	LPS	3.5598 <sup>a</sup>	8.4702
		LPS + Dexa	-11.2102 <sup>c</sup>	-6.2998
		LPS + 50 mg/kg	-7.3619 <sup>b</sup>	-2.4515
		LPS + 125 mg/kg	-15.4535 <sup>d</sup>	-10.5431
		LPS + 250 mg/kg	-4.2319	.6785
	LPS	Normal	-8.4702 <sup>c</sup>	-3.5598
		LPS + Dexa	-17.2252 <sup>e</sup>	-12.3148
		LPS + 50 mg/kg	-13.3769 <sup>d</sup>	-8.4665
		LPS + 125 mg/kg	-21.4685 <sup>f</sup>	-16.5581
		LPS + 250 mg/kg	-10.2469 <sup>b</sup>	-5.3365
	LPS + Dexa	Normal	6.2998 <sup>a</sup>	11.2102
		LPS	12.3148 <sup>e</sup>	17.2252
		LPS + 50 mg/kg	1.3931 <sup>b</sup>	6.3035
		LPS + 125 mg/kg	-6.6985 <sup>d</sup>	-1.7881
		LPS + 250 mg/kg	4.5231 <sup>c</sup>	9.4335
LPS + 50 mg/kg	Normal	2.4515 <sup>a</sup>	7.3619	

		LPS	8.4665 <sup>*</sup>	13.3769
		LPS + Dexa	-6.3035 <sup>*</sup>	-1.3931
		LPS + 125 mg/kg	-10.5469 <sup>*</sup>	-5.6365
		LPS + 250 mg/kg	.6748 <sup>*</sup>	5.5852
		Normal	10.5431 <sup>*</sup>	15.4535
	LPS + 125 mg/kg	LPS	16.5581 <sup>*</sup>	21.4685
		LPS + Dexa	1.7881 <sup>*</sup>	6.6985
		LPS + 50 mg/kg	5.6365 <sup>*</sup>	10.5469
		LPS + 250 mg/kg	8.7665 <sup>*</sup>	13.6769
		Normal	-.6785	4.2319
	LPS + 250 mg/kg	LPS	5.3365 <sup>*</sup>	10.2469
		LPS + Dexa	-9.4335 <sup>*</sup>	-4.5231
		LPS + 50 mg/kg	-5.5852 <sup>*</sup>	-.6748
		LPS + 125 mg/kg	-13.6769 <sup>*</sup>	-8.7665
CD4_CD25_CD62L	Normal	LPS	2.6020 <sup>*</sup>	6.4113
		LPS + Dexa	1.0954 <sup>*</sup>	4.9046
		LPS + 50 mg/kg	-2.8930	.9163

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	
CD4_CD25_CD62L	Normal	LPS + 125 mg/kg	-4.35333 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		LPS + 250 mg/kg	.31833 <sup>*</sup>	.62620	.995	
		Normal	-4.50667 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		LPS + Dexa	-1.50667 <sup>*</sup>	.62620	.186	
		LPS	-5.49500	.62620	.000	
		LPS + 50 mg/kg	-8.86000 <sup>*</sup>	.62620	.000	
	LPS	LPS + 125 mg/kg	-4.18833 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		LPS + 250 mg/kg	-4.18833 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		Normal	-3.00000 <sup>*</sup>	.62620	.001	
		LPS	1.50667 <sup>*</sup>	.62620	.186	
		LPS + Dexa	-3.98833 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		LPS + 50 mg/kg	-7.35333 <sup>*</sup>	.62620	.000	
	LPS + Dexa	LPS + 250 mg/kg	-2.68167 <sup>*</sup>	.62620	.002	
		Normal	.98833 <sup>*</sup>	.62620	.618	
		LPS	5.49500 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		LPS + Dexa	3.98833 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		LPS + 125 mg/kg	-3.36500 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		LPS + 250 mg/kg	1.30667 <sup>*</sup>	.62620	.321	
	LPS + 50 mg/kg	Normal	4.35333 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		LPS	8.86000 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		LPS + Dexa	7.35333 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		LPS + 50 mg/kg	3.36500 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		LPS + 250 mg/kg	4.67167 <sup>*</sup>	.62620	.000	
		Normal	-.31833 <sup>*</sup>	.62620	.995	
LPS + 125 mg/kg	LPS	4.18833 <sup>*</sup>	.62620	.000		
	LPS + Dexa	2.68167 <sup>*</sup>	.62620	.002		
	LPS + 50 mg/kg	-1.30667	.62620	.321		
	LPS + 125 mg/kg	-4.67167 <sup>*</sup>	.62620	.000		
	LPS	2.78333 <sup>*</sup>	.60364	.001		
	LPS + Dexa	-1.97333 <sup>*</sup>	.60364	.029		
LPS + 250 mg/kg	LPS + 50 mg/kg	2.57833 <sup>*</sup>	.60364	.002		
	LPS + 125 mg/kg	2.08667 <sup>*</sup>	.60364	.019		
	LPS + 250 mg/kg	.01000 <sup>*</sup>	.60364	1.000		
	Normal	-2.78333	.60364	.001		
	CD4_CD25_IL10	Normal	LPS	2.57833 <sup>*</sup>	.60364	.002
			LPS + 125 mg/kg	2.08667 <sup>*</sup>	.60364	.019
		LPS + 250 mg/kg	.01000 <sup>*</sup>	.60364	1.000	
	LPS	Normal	-2.78333	.60364	.001	



## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
CD4_CD25_CD62L	Normal	LPS + 125 mg/kg	-6.2580*	-2.4487
		LPS + 250 mg/kg	-1.5863*	2.2230
		Normal	-6.4113*	-2.6020
		LPS + Dexa	-3.4113*	.3980
		LPS	-7.3996	-3.5904
		LPS + 50 mg/kg	-10.7646*	-6.9554
	LPS	LPS + 125 mg/kg	-6.0930*	-2.2837
		LPS + 250 mg/kg	-4.9046*	-1.0954
		Normal	-.3980*	3.4113
		LPS	-5.8930*	-2.0837
		LPS + 50 mg/kg	-9.2580*	-5.4487
		LPS + 125 mg/kg	-4.5863*	-.7770
	LPS + Dexa	Normal	-.9163*	2.8930
		LPS	3.5904*	7.3996
		LPS + Dexa	2.0837*	5.8930
		LPS + 125 mg/kg	-5.2696*	-1.4604
		LPS + 250 mg/kg	-.5980*	3.2113
		Normal	2.4487*	6.2580
	LPS + 50 mg/kg	LPS	6.9554*	10.7646
		LPS + Dexa	5.4487*	9.2580
		LPS + 50 mg/kg	1.4604*	5.2696
		LPS + 250 mg/kg	2.7670*	6.5763
		Normal	-2.2230*	1.5863
		LPS	2.2837*	6.0930
LPS + 125 mg/kg	LPS + Dexa	.7770*	4.5863	
	LPS + 50 mg/kg	-3.2113	.5980	
	LPS + 125 mg/kg	-6.5763*	-2.7670	
	LPS	.9473*	4.6194	
	LPS + Dexa	-3.8094*	-.1373	
	Normal	.7423*	4.4144	
LPS + 250 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	.2506*	3.9227	
	LPS + 250 mg/kg	-1.8260*	1.8460	
	Normal	-4.6194	-.9473	
	LPS			
	LPS + Dexa			
	LPS + 50 mg/kg			
CD4_CD25_IL10	Normal	LPS + 50 mg/kg	.7423*	4.4144
		LPS + 125 mg/kg	.2506*	3.9227
		LPS + 250 mg/kg	-1.8260*	1.8460
		Normal	-4.6194	-.9473
		LPS		
		LPS + Dexa		

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
CD4_CD25_IL10	LPS	LPS + Dexa	-4.75667*	.60364	.000
		LPS + 50 mg/kg	-.20500*	.60364	.999
		LPS + 125 mg/kg	-.69667*	.60364	.854
		LPS + 250 mg/kg	-2.77333*	.60364	.001
		Normal	1.97333	.60364	.029
		LPS	4.75667*	.60364	.000
	LPS + Dexa	LPS + 50 mg/kg	4.55167*	.60364	.000
		LPS + 125 mg/kg	4.06000*	.60364	.000
		LPS + 250 mg/kg	1.98333*	.60364	.028
		Normal	-2.57833*	.60364	.002
		LPS	.20500*	.60364	.999
		LPS + Dexa	-4.55167*	.60364	.000
	LPS + 50 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	-.49167*	.60364	.963
		LPS + 250 mg/kg	-2.56833*	.60364	.002
		Normal	-2.08667*	.60364	.019
		LPS	.69667*	.60364	.854
		LPS + Dexa	-4.06000*	.60364	.000
		LPS + 50 mg/kg	.49167*	.60364	.963

CD11b_TLR4	LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	-2.07667 <sup>*</sup>	.60364	.019
		Normal	-.01000 <sup>*</sup>	.60364	1.000
		LPS	2.77333 <sup>*</sup>	.60364	.001
	LPS + 50 mg/kg	LPS + Dexta	-1.98333 <sup>*</sup>	.60364	.028
		LPS + 50 mg/kg	2.56833 <sup>*</sup>	.60364	.002
		LPS + 125 mg/kg	2.07667 <sup>*</sup>	.60364	.019
	Normal	LPS	-10.39833 <sup>*</sup>	.79459	.000
		LPS + Dexta	-5.10833 <sup>*</sup>	.79459	.000
		LPS + 50 mg/kg	-4.36833 <sup>*</sup>	.79459	.000
	LPS	LPS + 125 mg/kg	-4.00167 <sup>*</sup>	.79459	.000
		LPS + 250 mg/kg	-3.09167 <sup>*</sup>	.79459	.006
		Normal	10.39833 <sup>*</sup>	.79459	.000
		LPS + Dexta	5.29000 <sup>*</sup>	.79459	.000
		LPS + 50 mg/kg	6.03000 <sup>*</sup>	.79459	.000
		LPS + 125 mg/kg	6.39667 <sup>*</sup>	.79459	.000

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
CD4_CD25_IL10	LPS	LPS + Dexta	-6.5927 <sup>*</sup>	-2.9206
		LPS + 50 mg/kg	-2.0410 <sup>*</sup>	1.6310
		LPS + 125 mg/kg	-2.5327 <sup>*</sup>	1.1394
		LPS + 250 mg/kg	-4.6094 <sup>*</sup>	-.9373
		Normal	.1373	3.8094
	LPS + Dexta	LPS	2.9206 <sup>*</sup>	6.5927
		LPS + 50 mg/kg	2.7156 <sup>*</sup>	6.3877
		LPS + 125 mg/kg	2.2240 <sup>*</sup>	5.8960
		LPS + 250 mg/kg	.1473 <sup>*</sup>	3.8194
		Normal	-4.4144 <sup>*</sup>	-.7423
	LPS + 50 mg/kg	LPS	-1.6310 <sup>*</sup>	2.0410
		LPS + Dexta	-6.3877 <sup>*</sup>	-2.7156
		LPS + 125 mg/kg	-2.3277 <sup>*</sup>	1.3444
		LPS + 250 mg/kg	-4.4044 <sup>*</sup>	-.7323
		Normal	-3.9227 <sup>*</sup>	-.2506
	LPS + 125 mg/kg	LPS	-1.1394 <sup>*</sup>	2.5327
		LPS + Dexta	-5.8960 <sup>*</sup>	-2.2240
		LPS + 50 mg/kg	-1.3444 <sup>*</sup>	2.3277
		LPS + 250 mg/kg	-3.9127 <sup>*</sup>	-.2406
		Normal	-1.8460 <sup>*</sup>	1.8260
	LPS + 250 mg/kg	LPS	.9373 <sup>*</sup>	4.6094
		LPS + Dexta	-3.8194 <sup>*</sup>	-.1473
		LPS + 50 mg/kg	.7323 <sup>*</sup>	4.4044
		LPS + 125 mg/kg	.2406 <sup>*</sup>	3.9127
LPS		-12.8152 <sup>*</sup>	-7.9815	
Normal	LPS + Dexta	-7.5252 <sup>*</sup>	-2.6915	
	LPS + 50 mg/kg	-6.7852 <sup>*</sup>	-1.9515	
	LPS + 125 mg/kg	-6.4185 <sup>*</sup>	-1.5848	
	LPS + 250 mg/kg	-5.5085 <sup>*</sup>	-.6748	
	Normal	7.9815 <sup>*</sup>	12.8152	
CD11b_TLR4	LPS	LPS + Dexta	2.8732 <sup>*</sup>	7.7068
		LPS + 50 mg/kg	3.6132 <sup>*</sup>	8.4468
	LPS + Dexta	LPS + 50 mg/kg	3.9798 <sup>*</sup>	8.8135
		LPS + 125 mg/kg		

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
CD11b_TLR4	LPS	LPS + 250 mg/kg	7.30667 <sup>*</sup>	.79459	.000
		Normal	5.10833 <sup>*</sup>	.79459	.000
	LPS + Dexta	LPS	-5.29000 <sup>*</sup>	.79459	.000
		LPS + 50 mg/kg	.74000 <sup>*</sup>	.79459	.935
		LPS + 125 mg/kg	1.10667 <sup>*</sup>	.79459	.731



CD11b_NFKB	LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	2.01667 <sup>*</sup>	.79459	.145
		Normal	4.36833 <sup>*</sup>	.79459	.000
	LPS + 50 mg/kg	LPS	-6.03000 <sup>*</sup>	.79459	.000
		LPS + Dexa	-.74000 <sup>*</sup>	.79459	.935
		LPS + 125 mg/kg	.36667 <sup>*</sup>	.79459	.997
	LPS + 125 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	1.27667 <sup>*</sup>	.79459	.601
		Normal	4.00167 <sup>*</sup>	.79459	.000
		LPS	-6.39667 <sup>*</sup>	.79459	.000
	LPS + 250 mg/kg	LPS + Dexa	-1.10667 <sup>*</sup>	.79459	.731
		LPS + 50 mg/kg	-.36667 <sup>*</sup>	.79459	.997
		LPS + 250 mg/kg	.91000 <sup>*</sup>	.79459	.858
	LPS + 250 mg/kg	Normal	3.09167 <sup>*</sup>	.79459	.006
		LPS	-7.30667 <sup>*</sup>	.79459	.000
		LPS + Dexa	-2.01667 <sup>*</sup>	.79459	.145
	Normal	LPS + 50 mg/kg	-1.27667 <sup>*</sup>	.79459	.601
		LPS + 125 mg/kg	-.91000 <sup>*</sup>	.79459	.858
		LPS	-5.13833 <sup>*</sup>	.69243	.000
	LPS	LPS + Dexa	-4.24167 <sup>*</sup>	.69243	.000
		LPS + 50 mg/kg	-1.73833 <sup>*</sup>	.69243	.153
		LPS + 125 mg/kg	-.72000 <sup>*</sup>	.69243	.901
	LPS + Dexa	LPS + 250 mg/kg	2.12167	.69243	.048
		Normal	5.13833 <sup>*</sup>	.69243	.000
		LPS + Dexa	.89667 <sup>*</sup>	.69243	.785
	LPS	LPS + 50 mg/kg	3.40000 <sup>*</sup>	.69243	.000
LPS + 125 mg/kg		4.41833 <sup>*</sup>	.69243	.000	
LPS + 250 mg/kg		7.26000 <sup>*</sup>	.69243	.000	
LPS + Dexa	Normal	4.24167 <sup>*</sup>	.69243	.000	
	LPS	-.89667 <sup>*</sup>	.69243	.785	

Multiple Comparisons

Tukey HSD				
Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
CD11b_TLR4	LPS	LPS + 250 mg/kg	4.8898 <sup>*</sup>	9.7235
		Normal	2.6915 <sup>*</sup>	7.5252
		LPS	-7.7068 <sup>*</sup>	-2.8732
	LPS + Dexa	LPS + 50 mg/kg	-1.6768 <sup>*</sup>	3.1568
		LPS + 125 mg/kg	-1.3102	3.5235
		LPS + 250 mg/kg	-.4002 <sup>*</sup>	4.4335
	LPS + 50 mg/kg	Normal	1.9515 <sup>*</sup>	6.7852
		LPS	-8.4468 <sup>*</sup>	-3.6132
		LPS + Dexa	-3.1568 <sup>*</sup>	1.6768
	LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	-2.0502 <sup>*</sup>	2.7835
		LPS + 250 mg/kg	-1.1402 <sup>*</sup>	3.6935
		Normal	1.5848 <sup>*</sup>	6.4185
	LPS + 250 mg/kg	LPS	-8.8135 <sup>*</sup>	-3.9798
		LPS + Dexa	-3.5235 <sup>*</sup>	1.3102
		LPS + 50 mg/kg	-2.7835 <sup>*</sup>	2.0502
	Normal	LPS + 250 mg/kg	-1.5068 <sup>*</sup>	3.3268
		Normal	.6748 <sup>*</sup>	5.5085
		LPS	-9.7235 <sup>*</sup>	-4.8898
	LPS	LPS + Dexa	-4.4335 <sup>*</sup>	.4002
		LPS + 50 mg/kg	-3.6935 <sup>*</sup>	1.1402
		LPS + 125 mg/kg	-3.3268 <sup>*</sup>	1.5068
	LPS + Dexa	LPS	-7.2444 <sup>*</sup>	-3.0323
		LPS + Dexa	-6.3477 <sup>*</sup>	-2.1356
		LPS + 50 mg/kg	-3.8444 <sup>*</sup>	.3677
LPS	LPS + 125 mg/kg	-2.8261 <sup>*</sup>	1.3861	
	LPS + 250 mg/kg	.0156	4.2277	
	Normal	3.0323 <sup>*</sup>	7.2444	
LPS	LPS + Dexa	-1.2094 <sup>*</sup>	3.0027	
	LPS + 50 mg/kg	1.2939 <sup>*</sup>	5.5061	
	LPS + 125 mg/kg	2.3123 <sup>*</sup>	6.5244	
LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	5.1539 <sup>*</sup>	9.3661	



LPS + Dexa	Normal LPS	2.1356 <sup>*</sup> -3.0027	6.3477 <sup>*</sup> 1.2094
------------	---------------	--------------------------------	-------------------------------

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
CD11b_NFkB	LPS + Dexa	LPS + 50 mg/kg	2.50333 <sup>*</sup>	.69243	.013
		LPS + 125 mg/kg	3.52167 <sup>*</sup>	.69243	.000
		LPS + 250 mg/kg	6.36333 <sup>*</sup>	.69243	.000
		Normal	1.73833 <sup>*</sup>	.69243	.153
		LPS	-3.40000	.69243	.000
	LPS + 50 mg/kg	LPS + Dexa	-2.50333 <sup>*</sup>	.69243	.013
		LPS + 125 mg/kg	1.01833 <sup>*</sup>	.69243	.685
		LPS + 250 mg/kg	3.86000 <sup>*</sup>	.69243	.000
		Normal	.72000 <sup>*</sup>	.69243	.901
		LPS	-4.41833 <sup>*</sup>	.69243	.000
	LPS + 125 mg/kg	LPS + Dexa	-3.52167 <sup>*</sup>	.69243	.000
		LPS + 50 mg/kg	-1.01833 <sup>*</sup>	.69243	.685
		LPS + 250 mg/kg	2.84167 <sup>*</sup>	.69243	.004
		Normal	-2.12167 <sup>*</sup>	.69243	.048
		LPS	-7.26000 <sup>*</sup>	.69243	.000
	LPS + 250 mg/kg	LPS + Dexa	-6.36333 <sup>*</sup>	.69243	.000
		LPS + 50 mg/kg	-3.86000 <sup>*</sup>	.69243	.000
		LPS + 125 mg/kg	-2.84167 <sup>*</sup>	.69243	.004
		LPS	-4.39000 <sup>*</sup>	.77005	.000
		LPS + Dexa	-14.62667 <sup>*</sup>	.77005	.000
	Normal	LPS + 50 mg/kg	-4.05500 <sup>*</sup>	.77005	.000
		LPS + 125 mg/kg	-.48500 <sup>*</sup>	.77005	.988
		LPS + 250 mg/kg	5.49500 <sup>*</sup>	.77005	.000
		Normal	4.39000 <sup>*</sup>	.77005	.000
LPS + Dexa		-10.23667 <sup>*</sup>	.77005	.000	
CD11b_TNFa	LPS	LPS + 50 mg/kg	.33500	.77005	.998
		LPS + 125 mg/kg	3.90500 <sup>*</sup>	.77005	.000
		LPS + 250 mg/kg	9.88500 <sup>*</sup>	.77005	.000
		Normal	14.62667 <sup>*</sup>	.77005	.000
		LPS	10.23667 <sup>*</sup>	.77005	.000
	LPS + Dexa	LPS + 50 mg/kg	10.57167 <sup>*</sup>	.77005	.000
		LPS + 125 mg/kg	14.14167 <sup>*</sup>	.77005	.000
		LPS + 250 mg/kg	20.12167 <sup>*</sup>	.77005	.000

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
CD11b_NFkB	LPS + Dexa	LPS + 50 mg/kg	.3973 <sup>*</sup>	4.6094
		LPS + 125 mg/kg	1.4156 <sup>*</sup>	5.6277
		LPS + 250 mg/kg	4.2573 <sup>*</sup>	8.4694
		Normal	-.3677 <sup>*</sup>	3.8444
		LPS	-5.5061	-1.2939
	LPS + 50 mg/kg	LPS + Dexa	-4.6094 <sup>*</sup>	-.3973
		LPS + 125 mg/kg	-1.0877 <sup>*</sup>	3.1244
		LPS + 250 mg/kg	1.7539 <sup>*</sup>	5.9661
		Normal	-1.3861 <sup>*</sup>	2.8261
		LPS	-6.5244 <sup>*</sup>	-2.3123
	LPS + 125 mg/kg	LPS + Dexa	-5.6277 <sup>*</sup>	-1.4156
		LPS + 50 mg/kg	-3.1244 <sup>*</sup>	1.0877
		LPS + 250 mg/kg	.7356 <sup>*</sup>	4.9477
		Normal	-4.2277 <sup>*</sup>	-.0156
		LPS	-9.3661 <sup>*</sup>	-5.1539
	LPS + 250 mg/kg	LPS + Dexa	-8.4694 <sup>*</sup>	-4.2573
		LPS + 50 mg/kg	-5.9661 <sup>*</sup>	-1.7539



CD11b_TNFa	Normal	LPS + 125 mg/kg	-4.9477*	-7.356
		LPS	-6.7322*	-2.0478
		LPS + Dexa	-16.9689*	-12.2845
		LPS + 50 mg/kg	-6.3972*	-1.7128
		LPS + 125 mg/kg	-2.8272*	1.8572
	LPS	LPS + 250 mg/kg	3.1528*	7.8372
		Normal	2.0478*	6.7322
		LPS + Dexa	-12.5789*	-7.8945
		LPS + 50 mg/kg	-2.0072*	2.6772
		LPS + 125 mg/kg	1.5628*	6.2472
	LPS + Dexa	LPS + 250 mg/kg	7.5428*	12.2272
		Normal	12.2845*	16.9689
		LPS	7.8945*	12.5789
		LPS + 50 mg/kg	8.2295*	12.9139
		LPS + 125 mg/kg	11.7995*	16.4839
		LPS + 250 mg/kg	17.7795*	22.4639

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	
CD11b_TNFa	Normal	Normal	4.05500*	.77005	.000	
		LPS	-.33500*	.77005	.998	
		LPS + 50 mg/kg	LPS + Dexa	-10.57167*	.77005	.000
		LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	3.57000*	.77005	.001
		LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	9.55000	.77005	.000
	LPS + 125 mg/kg	Normal	.48500*	.77005	.988	
		LPS	-3.90500*	.77005	.000	
		LPS + Dexa	-14.14167*	.77005	.000	
		LPS + 50 mg/kg	LPS + 50 mg/kg	-3.57000*	.77005	.001
		LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	5.98000*	.77005	.000
	LPS + 250 mg/kg	Normal	-5.49500*	.77005	.000	
		LPS	-9.88500*	.77005	.000	
		LPS + Dexa	-20.12167*	.77005	.000	
		LPS + 50 mg/kg	LPS + 50 mg/kg	-9.55000*	.77005	.000
		LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	-5.98000*	.77005	.000
	Normal	LPS	-2.64000*	.65240	.004	
		LPS + Dexa	-20.39833*	.65240	.000	
		LPS + 50 mg/kg	LPS + 50 mg/kg	-2.73833*	.65240	.003
		LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	1.30833*	.65240	.363
		LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	4.00167*	.65240	.000
LPS	Normal	2.64000*	.65240	.004		
	LPS + Dexa	-17.75833*	.65240	.000		
	LPS + 50 mg/kg	LPS + 50 mg/kg	-.09833*	.65240	1.000	
	LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	3.94833*	.65240	.000	
	LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	6.64167*	.65240	.000	
CD11b_IL6	Normal	Normal	20.39833	.65240	.000	
		LPS	17.75833*	.65240	.000	
		LPS + 50 mg/kg	LPS + 50 mg/kg	17.66000*	.65240	.000
		LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	21.70667*	.65240	.000
		LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	24.40000*	.65240	.000
LPS + Dexa	Normal	2.73833*	.65240	.003		
	LPS	.09833*	.65240	1.000		
	LPS + 50 mg/kg	LPS + 50 mg/kg	-17.66000*	.65240	.000	
	LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	21.70667*	.65240	.000	
	LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	24.40000*	.65240	.000	
LPS + 50 mg/kg	Normal	2.73833*	.65240	.003		
	LPS	.09833*	.65240	1.000		
	LPS + 50 mg/kg	LPS + 50 mg/kg	-17.66000*	.65240	.000	
	LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	21.70667*	.65240	.000	
	LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	24.40000*	.65240	.000	

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
CD11b_TNFa	LPS + 50 mg/kg	Normal	1.7128*	6.3972
		LPS	-2.6772*	2.0072
		LPS + Dexa	-12.9139*	-8.2295
		LPS + 125 mg/kg	1.2278*	5.9122
		LPS + 250 mg/kg	7.2078*	11.8922
	LPS + 125 mg/kg	Normal	-1.8572*	2.8272

CD11b_IL6	LPS + 250 mg/kg	LPS	-6.2472	-1.5628
		LPS + Dexa	-16.4839	-11.7995
		LPS + 50 mg/kg	-5.9122	-1.2278
		LPS + 250 mg/kg	3.6378	8.3222
	Normal	Normal	-7.8372	-3.1528
		LPS	-12.2272	-7.5428
		LPS + Dexa	-22.4639	-17.7795
		LPS + 50 mg/kg	-11.8922	-7.2078
	LPS	LPS + 125 mg/kg	-8.3222	-3.6378
		LPS	-4.6243	-.6557
		LPS + Dexa	-22.3827	-18.4140
		LPS + 50 mg/kg	-4.7227	-.7540
	LPS + Dexa	LPS + 125 mg/kg	-.6760	3.2927
		LPS + 250 mg/kg	2.0173	5.9860
		Normal	.6557	4.6243
		LPS + Dexa	-19.7427	-15.7740
	LPS + 50 mg/kg	LPS + 50 mg/kg	-2.0827	1.8860
		LPS + 125 mg/kg	1.9640	5.9327
		LPS + 250 mg/kg	4.6573	8.6260
		Normal	18.4140	22.3827
	LPS + 250 mg/kg	LPS	15.7740	19.7427
		LPS + 50 mg/kg	15.6757	19.6443
		LPS + 125 mg/kg	19.7223	23.6910
		LPS + 250 mg/kg	22.4157	26.3843
LPS + 50 mg/kg	Normal	.7540	4.7227	
	LPS	-1.8860	2.0827	
		LPS + Dexa	-19.6443	-15.6757

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
CD11b_IL6	LPS + 50 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	4.04667	.65240	.000
		LPS + 250 mg/kg	6.74000	.65240	.000
		Normal	-1.30833	.65240	.363
		LPS	-3.94833	.65240	.000
	LPS + 125 mg/kg	LPS + Dexa	-21.70667	.65240	.000
		LPS + 50 mg/kg	-4.04667	.65240	.000
		LPS + 250 mg/kg	2.69333	.65240	.003
		Normal	-4.00167	.65240	.000
	LPS + 250 mg/kg	LPS	-6.64167	.65240	.000
		LPS + Dexa	-24.40000	.65240	.000
		LPS + 50 mg/kg	-6.74000	.65240	.000
		LPS + 125 mg/kg	-2.69333	.65240	.003
	Normal	LPS	5.16667	.67962	.000
		LPS + Dexa	7.14167	.67962	.000
		LPS + 50 mg/kg	11.01667	.67962	.000
		LPS + 125 mg/kg	-4.37000	.67962	.000
	LPS	LPS + 250 mg/kg	3.00833	.67962	.001
		Normal	-5.16667	.67962	.000
		LPS + Dexa	1.97500	.67962	.068
		LPS + 50 mg/kg	5.85000	.67962	.000
	LPS + Dexa	LPS + 125 mg/kg	-9.53667	.67962	.000
		LPS + 250 mg/kg	-2.15833	.67962	.037
		Normal	-7.14167	.67962	.000
		LPS	-1.97500	.67962	.068
LPS + 50 mg/kg	LPS + 50 mg/kg	3.87500	.67962	.000	
	LPS + 125 mg/kg	-11.51167	.67962	.000	
	LPS + 250 mg/kg	-4.13333	.67962	.000	
	Normal	-11.01667	.67962	.000	
LPS + 125 mg/kg	LPS	-5.85000	.67962	.000	
	LPS + Dexa	-3.87500	.67962	.000	
	LPS + 125 mg/kg	-15.38667	.67962	.000	
	LPS + 250 mg/kg	-8.00833	.67962	.000	
		Normal	4.37000	.67962	.000





## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
CD11b_IL6	LPS + 50 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	2.0623 <sup>*</sup>	6.0310
		LPS + 250 mg/kg	4.7557 <sup>*</sup>	8.7243
		Normal	-3.2927 <sup>*</sup>	.6760
	LPS + 125 mg/kg	LPS	-5.9327 <sup>*</sup>	-1.9640
		LPS + DEXA	-23.6910	-19.7223
		LPS + 50 mg/kg	-6.0310 <sup>*</sup>	-2.0623
	LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	.7090 <sup>*</sup>	4.6777
		Normal	-5.9860 <sup>*</sup>	-2.0173
		LPS	-8.6260 <sup>*</sup>	-4.6573
	LPS + 250 mg/kg	LPS + DEXA	-26.3843 <sup>*</sup>	-22.4157
		LPS + 50 mg/kg	-8.7243 <sup>*</sup>	-4.7557
		LPS + 125 mg/kg	-4.6777 <sup>*</sup>	-.7090
	Normal	LPS	3.0995 <sup>*</sup>	7.2338
		LPS + DEXA	5.0745 <sup>*</sup>	9.2088
		LPS + 50 mg/kg	8.9495 <sup>*</sup>	13.0838
	LPS	LPS + 125 mg/kg	-6.4371 <sup>*</sup>	-2.3029
		LPS + 250 mg/kg	.9412 <sup>*</sup>	5.0755
		Normal	-7.2338 <sup>*</sup>	-3.0995
	LPS	LPS + DEXA	-.0921 <sup>*</sup>	4.0421
		LPS + 50 mg/kg	3.7829 <sup>*</sup>	7.9171
		LPS + 125 mg/kg	-11.6038 <sup>*</sup>	-7.4695
Nrf2	LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	-4.2255 <sup>*</sup>	-.0912
	Normal	Normal	-9.2088 <sup>*</sup>	-5.0745
	LPS	LPS	-4.0421 <sup>*</sup>	.0921
LPS + DEXA	LPS + 50 mg/kg	LPS + 50 mg/kg	1.8079 <sup>*</sup>	5.9421
	LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	-13.5788 <sup>*</sup>	-9.4445
	LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	-6.2005 <sup>*</sup>	-2.0662
LPS + 50 mg/kg	Normal	Normal	-13.0838 <sup>*</sup>	-8.9495
	LPS	LPS	-7.9171 <sup>*</sup>	-3.7829
	LPS + DEXA	LPS + DEXA	-5.9421 <sup>*</sup>	-1.8079
LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	-17.4538 <sup>*</sup>	-13.3195
	LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	-10.0755 <sup>*</sup>	-5.9412
	Normal	Normal	2.3029	6.4371

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Nrf2	LPS + 125 mg/kg	LPS	9.53667 <sup>*</sup>	.67962	.000
		LPS + DEXA	11.51167 <sup>*</sup>	.67962	.000
		LPS + 50 mg/kg	15.38667 <sup>*</sup>	.67962	.000
		LPS + 250 mg/kg	7.37833 <sup>*</sup>	.67962	.000
		Normal	-3.00833	.67962	.001
	LPS + 250 mg/kg	LPS	2.15833 <sup>*</sup>	.67962	.037
		LPS + DEXA	4.13333 <sup>*</sup>	.67962	.000
		LPS + 50 mg/kg	8.00833 <sup>*</sup>	.67962	.000
		LPS + 125 mg/kg	-7.37833 <sup>*</sup>	.67962	.000
		LPS	8.97667 <sup>*</sup>	.59029	.000
	Normal	LPS + DEXA	.99667 <sup>*</sup>	.59029	.550
		LPS + 50 mg/kg	6.72333 <sup>*</sup>	.59029	.000
		LPS + 125 mg/kg	-2.55833 <sup>*</sup>	.59029	.002
		LPS + 250 mg/kg	-6.71333 <sup>*</sup>	.59029	.000
		Normal	-8.97667 <sup>*</sup>	.59029	.000
SOD	LPS	LPS + DEXA	-7.98000 <sup>*</sup>	.59029	.000
		LPS + 50 mg/kg	-2.25333 <sup>*</sup>	.59029	.008
		LPS + 125 mg/kg	-11.53500 <sup>*</sup>	.59029	.000
	LPS + DEXA	LPS + 250 mg/kg	-15.69000 <sup>*</sup>	.59029	.000
		Normal	-.99667 <sup>*</sup>	.59029	.550
		LPS	7.98000 <sup>*</sup>	.59029	.000
LPS + 50 mg/kg	LPS + 50 mg/kg	5.72667 <sup>*</sup>	.59029	.000	
	LPS + 125 mg/kg	-3.55500 <sup>*</sup>	.59029	.000	
	LPS + 250 mg/kg	-7.71000 <sup>*</sup>	.59029	.000	

	Normal	-6.72333 <sup>*</sup>	.59029	.000
	LPS	2.25333	.59029	.008
LPS + 50 mg/kg	LPS + Dexa	-5.72667 <sup>*</sup>	.59029	.000
	LPS + 125 mg/kg	-9.28167 <sup>*</sup>	.59029	.000
	LPS + 250 mg/kg	-13.43667 <sup>*</sup>	.59029	.000
LPS + 125 mg/kg	Normal	2.55833 <sup>*</sup>	.59029	.002
	LPS	11.53500 <sup>*</sup>	.59029	.000
	LPS + Dexa	3.55500 <sup>*</sup>	.59029	.000
	LPS + 50 mg/kg	9.28167	.59029	.000

## Multiple Comparisons

Tukey HSD				
Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Nrf2	LPS + 125 mg/kg	LPS	7.4695 <sup>*</sup>	11.6038
		LPS + Dexa	9.4445 <sup>*</sup>	13.5788
		LPS + 50 mg/kg	13.3195 <sup>*</sup>	17.4538
		LPS + 250 mg/kg	5.3112 <sup>*</sup>	9.4455
		Normal	-5.0755	-.9412
		LPS	.0912 <sup>*</sup>	4.2255
	LPS + 250 mg/kg	LPS + Dexa	2.0662 <sup>*</sup>	6.2005
		LPS + 50 mg/kg	5.9412 <sup>*</sup>	10.0755
		LPS + 125 mg/kg	-9.4455 <sup>*</sup>	-5.3112
		LPS	7.1812 <sup>*</sup>	10.7721
	Normal	LPS + Dexa	-7.988 <sup>*</sup>	2.7921
		LPS + 50 mg/kg	4.9279 <sup>*</sup>	8.5188
		LPS + 125 mg/kg	-4.3538 <sup>*</sup>	-.7629
		LPS + 250 mg/kg	-8.5088 <sup>*</sup>	-4.9179
	LPS	Normal	-10.7721 <sup>*</sup>	-7.1812
		LPS + Dexa	-9.7754 <sup>*</sup>	-6.1846
LPS + 50 mg/kg		-4.0488 <sup>*</sup>	-.4579	
LPS + 125 mg/kg		-13.3304 <sup>*</sup>	-9.7396	
SOD	LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	-17.4854 <sup>*</sup>	-13.8946
		Normal	-2.7921 <sup>*</sup>	.7988
		LPS	6.1846 <sup>*</sup>	9.7754
		LPS + Dexa	3.9312 <sup>*</sup>	7.5221
	LPS + 50 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	-5.3504 <sup>*</sup>	-1.7596
		LPS + 250 mg/kg	-9.5054 <sup>*</sup>	-5.9146
		Normal	-8.5188 <sup>*</sup>	-4.9279
	LPS + 125 mg/kg	LPS	.4579	4.0488
		LPS + Dexa	-7.5221 <sup>*</sup>	-3.9312
		LPS + 125 mg/kg	-11.0771 <sup>*</sup>	-7.4862
LPS + 125 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	-15.2321 <sup>*</sup>	-11.6412	
	Normal	.7629 <sup>*</sup>	4.3538	
	LPS	9.7396 <sup>*</sup>	13.3304	
LPS + 125 mg/kg	LPS + Dexa	1.7596 <sup>*</sup>	5.3504	
	LPS + 50 mg/kg	7.4862	11.0771	

## Multiple Comparisons

Tukey HSD					
Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
SOD	LPS + 125 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	-4.15500 <sup>*</sup>	.59029	.000
		Normal	6.71333 <sup>*</sup>	.59029	.000
		LPS	15.69000 <sup>*</sup>	.59029	.000
	LPS + 250 mg/kg	LPS + Dexa	7.71000 <sup>*</sup>	.59029	.000
		LPS + 50 mg/kg	13.43667	.59029	.000
		LPS + 125 mg/kg	4.15500 <sup>*</sup>	.59029	.000
		LPS	4.71667 <sup>*</sup>	.77370	.000
	Normal	LPS + Dexa	11.02000 <sup>*</sup>	.77370	.000
		LPS + 50 mg/kg	12.05167 <sup>*</sup>	.77370	.000
		LPS + 125 mg/kg	-5.55333 <sup>*</sup>	.77370	.000
HO1	LPS	LPS + 250 mg/kg	-.77333 <sup>*</sup>	.77370	.914
		Normal	-4.71667 <sup>*</sup>	.77370	.000
	LPS + 125 mg/kg	LPS + Dexa	6.30333 <sup>*</sup>	.77370	.000
		LPS + 50 mg/kg	7.33500 <sup>*</sup>	.77370	.000
LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	-10.27000 <sup>*</sup>	.77370	.000	



	LPS + 250 mg/kg	-5.49000 <sup>*</sup>	.77370	.000
	Normal	-11.02000 <sup>*</sup>	.77370	.000
	LPS	-6.30333 <sup>*</sup>	.77370	.000
LPS + Dexa	LPS + 50 mg/kg	1.03167 <sup>*</sup>	.77370	.764
	LPS + 125 mg/kg	-16.57333 <sup>*</sup>	.77370	.000
	LPS + 250 mg/kg	-11.79333 <sup>*</sup>	.77370	.000
	Normal	-12.05167 <sup>*</sup>	.77370	.000
	LPS	-7.33500 <sup>*</sup>	.77370	.000
LPS + 50 mg/kg	LPS + Dexa	-1.03167 <sup>*</sup>	.77370	.764
	LPS + 125 mg/kg	-17.60500 <sup>*</sup>	.77370	.000
	LPS + 250 mg/kg	-12.82500 <sup>*</sup>	.77370	.000
	Normal	5.55333 <sup>*</sup>	.77370	.000
	LPS	10.27000 <sup>*</sup>	.77370	.000
LPS + 125 mg/kg	LPS + Dexa	16.57333 <sup>*</sup>	.77370	.000
	LPS + 50 mg/kg	17.60500 <sup>*</sup>	.77370	.000
	LPS + 250 mg/kg	4.78000 <sup>*</sup>	.77370	.000
	Normal	.77333 <sup>*</sup>	.77370	.914
LPS + 250 mg/kg	LPS	5.49000 <sup>*</sup>	.77370	.000

## Multiple Comparisons

Tukey HSD				
Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
SOD	LPS + 125 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	-5.9504 <sup>*</sup>	-2.3596
		Normal	4.9179 <sup>*</sup>	8.5088
		LPS	13.8946 <sup>*</sup>	17.4854
	LPS + 250 mg/kg	LPS + Dexa	5.9146 <sup>*</sup>	9.5054
		LPS + 50 mg/kg	11.6412	15.2321
		LPS + 125 mg/kg	2.3596 <sup>*</sup>	5.9504
	Normal	LPS	2.3634 <sup>*</sup>	7.0699
		LPS + Dexa	8.6667 <sup>*</sup>	13.3733
		LPS + 50 mg/kg	9.6984 <sup>*</sup>	14.4049
		LPS + 125 mg/kg	-7.9066 <sup>*</sup>	-3.2001
		LPS + 250 mg/kg	-3.1266 <sup>*</sup>	1.5799
		Normal	-7.0699 <sup>*</sup>	-2.3634
	LPS	LPS + Dexa	3.9501 <sup>*</sup>	8.6566
		LPS + 50 mg/kg	4.9817 <sup>*</sup>	9.6883
		LPS + 125 mg/kg	-12.6233 <sup>*</sup>	-7.9167
		LPS + 250 mg/kg	-7.8433 <sup>*</sup>	-3.1367
		Normal	-13.3733 <sup>*</sup>	-8.6667
		LPS	-8.6566 <sup>*</sup>	-3.9501
HO1	LPS + Dexa	LPS + 50 mg/kg	-1.3216 <sup>*</sup>	3.3849
		LPS + 125 mg/kg	-18.9266 <sup>*</sup>	-14.2201
		LPS + 250 mg/kg	-14.1466 <sup>*</sup>	-9.4401
	Normal	LPS	-14.4049 <sup>*</sup>	-9.6984
		LPS	-9.6883 <sup>*</sup>	-4.9817
		LPS + Dexa	-3.3849 <sup>*</sup>	1.3216
	LPS + 50 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	-19.9583 <sup>*</sup>	-15.2517
		LPS + 250 mg/kg	-15.1783 <sup>*</sup>	-10.4717
		Normal	3.2001 <sup>*</sup>	7.9066
	LPS + 125 mg/kg	LPS	7.9167 <sup>*</sup>	12.6233
		LPS + Dexa	14.2201 <sup>*</sup>	18.9266
		LPS + 50 mg/kg	15.2517 <sup>*</sup>	19.9583
LPS + 250 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	2.4267 <sup>*</sup>	7.1333	
	Normal	-1.5799 <sup>*</sup>	3.1266	
	LPS	3.1367 <sup>*</sup>	7.8433	

## Multiple Comparisons

Tukey HSD					
Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
HO1	LPS + 250 mg/kg	LPS + Dexa	11.79333 <sup>*</sup>	.77370	.000
		LPS + 50 mg/kg	12.82500 <sup>*</sup>	.77370	.000
		LPS + 125 mg/kg	-4.78000 <sup>*</sup>	.77370	.000
MDA	Normal	LPS	-47.77833 <sup>*</sup>	10.35874	.001
		LPS + Dexa	-82.22333 <sup>*</sup>	10.35874	.000
		LPS + 50 mg/kg	73.33167 <sup>*</sup>	10.35874	.000
		LPS + 125 mg/kg	25.55500 <sup>*</sup>	10.35874	.166

	LPS + 250 mg/kg	-36.66667 <sup>*</sup>	10.35874	.015
	Normal	47.77833 <sup>*</sup>	10.35874	.001
	LPS + Dexa	-34.44500 <sup>*</sup>	10.35874	.026
LPS	LPS + 50 mg/kg	121.11000 <sup>*</sup>	10.35874	.000
	LPS + 125 mg/kg	73.33333 <sup>*</sup>	10.35874	.000
	LPS + 250 mg/kg	11.11167 <sup>*</sup>	10.35874	.888
	Normal	82.22333 <sup>*</sup>	10.35874	.000
	LPS	34.44500 <sup>*</sup>	10.35874	.026
LPS + Dexa	LPS + 50 mg/kg	155.55500 <sup>*</sup>	10.35874	.000
	LPS + 125 mg/kg	107.77833 <sup>*</sup>	10.35874	.000
	LPS + 250 mg/kg	45.55667 <sup>*</sup>	10.35874	.002
	Normal	-73.33167 <sup>*</sup>	10.35874	.000
	LPS	-121.11000 <sup>*</sup>	10.35874	.000
LPS + 50 mg/kg	LPS + Dexa	-155.55500 <sup>*</sup>	10.35874	.000
	LPS + 125 mg/kg	-47.77667 <sup>*</sup>	10.35874	.001
	LPS + 250 mg/kg	-109.99833 <sup>*</sup>	10.35874	.000
	Normal	-25.55500 <sup>*</sup>	10.35874	.166
	LPS	-73.33333 <sup>*</sup>	10.35874	.000
LPS + 125 mg/kg	LPS + Dexa	-107.77833 <sup>*</sup>	10.35874	.000
	LPS + 50 mg/kg	47.77667 <sup>*</sup>	10.35874	.001
	LPS + 250 mg/kg	-62.22167 <sup>*</sup>	10.35874	.000
	Normal	36.66667 <sup>*</sup>	10.35874	.015
	LPS	-11.11167 <sup>*</sup>	10.35874	.888
LPS + 250 mg/kg	LPS + Dexa	-45.55667 <sup>*</sup>	10.35874	.002
	LPS + 50 mg/kg	109.99833 <sup>*</sup>	10.35874	.000
	LPS + 125 mg/kg	62.22167	10.35874	.000

Multiple Comparisons

Tukey HSD				
Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
HO1	LPS + 250 mg/kg	LPS + Dexa	9.4401 <sup>*</sup>	14.1466
		LPS + 50 mg/kg	10.4717 <sup>*</sup>	15.1783
		LPS + 125 mg/kg	-7.1333 <sup>*</sup>	-2.4267
	Normal	LPS	-79.2854 <sup>*</sup>	-16.2712
		LPS + Dexa	-113.7304 <sup>*</sup>	-50.7162
		LPS + 50 mg/kg	41.8246 <sup>*</sup>	104.8388
	LPS	LPS + 125 mg/kg	-5.9521 <sup>*</sup>	57.0621
		LPS + 250 mg/kg	-68.1738 <sup>*</sup>	-5.1596
		Normal	16.2712 <sup>*</sup>	79.2854
	LPS + Dexa	LPS + Dexa	-65.9521 <sup>*</sup>	-2.9379
		LPS + 50 mg/kg	89.6029 <sup>*</sup>	152.6171
		LPS + 125 mg/kg	41.8262 <sup>*</sup>	104.8404
LPS + 50 mg/kg	LPS + 250 mg/kg	-20.3954 <sup>*</sup>	42.6188	
	Normal	50.7162 <sup>*</sup>	113.7304	
	LPS	2.9379 <sup>*</sup>	65.9521	
MDA	LPS + Dexa	LPS + 50 mg/kg	124.0479 <sup>*</sup>	187.0621
		LPS + 125 mg/kg	76.2712 <sup>*</sup>	139.2854
		LPS + 250 mg/kg	14.0496 <sup>*</sup>	77.0638
	LPS + 50 mg/kg	Normal	-104.8388 <sup>*</sup>	-41.8246
		LPS	-152.6171 <sup>*</sup>	-89.6029
		LPS + Dexa	-187.0621 <sup>*</sup>	-124.0479
	LPS + 125 mg/kg	LPS + 125 mg/kg	-79.2838 <sup>*</sup>	-16.2696
		LPS + 250 mg/kg	-141.5054 <sup>*</sup>	-78.4912
		Normal	-57.0621 <sup>*</sup>	5.9521
	LPS + 250 mg/kg	LPS	-104.8404 <sup>*</sup>	-41.8262
		LPS + Dexa	-139.2854 <sup>*</sup>	-76.2712
		LPS + 50 mg/kg	16.2696 <sup>*</sup>	79.2838
	LPS + 250 mg/kg	-93.7288 <sup>*</sup>	-30.7146	
	Normal	5.1596 <sup>*</sup>	68.1738	
	LPS	-42.6188 <sup>*</sup>	20.3954	
	LPS + Dexa	-77.0638 <sup>*</sup>	-14.0496	
	LPS + 50 mg/kg	78.4912 <sup>*</sup>	141.5054	
	LPS + 125 mg/kg	30.7146	93.7288	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.





## Homogeneous Subsets

### CD4\_CD62L

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
LPS	6	50.9600				
Normal	6		56.9750			
LPS + 250 mg/kg	6		58.7517			
LPS + 50 mg/kg	6			61.8817		
LPS + Dexa	6				65.7300	
LPS + 125 mg/kg	6					69.9733
Sig.		1.000	.267	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

### CD4\_CD25\_CD62L

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
LPS	6	72.9733		
LPS + Dexa	6	74.4800		
LPS + 250 mg/kg	6		77.1617	
Normal	6		77.4800	
LPS + 50 mg/kg	6		78.4683	
LPS + 125 mg/kg	6			81.8333
Sig.		.186	.321	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

### CD4\_CD25\_IL10

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
LPS	6	7.5767		
LPS + 50 mg/kg	6	7.7817		
LPS + 125 mg/kg	6	8.2733		
LPS + 250 mg/kg	6		10.3500	
Normal	6		10.3600	
LPS + Dexa	6			12.3333
Sig.		.854	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

### CD11b\_TLR4

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Normal	6	11.9683		
LPS + 250 mg/kg	6		15.0600	
LPS + 125 mg/kg	6		15.9700	
LPS + 50 mg/kg	6		16.3367	
LPS + Dexa	6		17.0767	
LPS	6			22.3667

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Sig.		1.000	.145	1.000
------	--	-------	------	-------

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

#### CD11b\_NFKB

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
LPS + 250 mg/kg	6	11.1217		
Normal	6		13.2433	
LPS + 125 mg/kg	6		13.9633	
LPS + 50 mg/kg	6		14.9817	
LPS + Dexa	6			17.4850
LPS	6			18.3817
Sig.		1.000	.153	.785

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

#### CD11b\_TNFa

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
LPS + 250 mg/kg	6	7.9700			
Normal	6		13.4650		
LPS + 125 mg/kg	6		13.9500		
LPS + 50 mg/kg	6			17.5200	
LPS	6			17.8550	
LPS + Dexa	6				28.0917
Sig.		1.000	.988	.998	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

#### CD11b\_IL6

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
LPS + 250 mg/kg	6	18.5733			
LPS + 125 mg/kg	6		21.2667		
Normal	6		22.5750		
LPS	6			25.2150	
LPS + 50 mg/kg	6			25.3133	
LPS + Dexa	6				42.9733
Sig.		1.000	.363	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

#### Nrf2

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
LPS + 50 mg/kg	6	21.9517				
LPS + Dexa	6		25.8267			
LPS	6		27.8017			
LPS + 250 mg/kg	6			29.9600		



Normal	6				32.9683	
LPS + 125 mg/kg	6					37.3383
Sig.		1.000	.068	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

#### SOD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
LPS	6	17.0450				
LPS + 50 mg/kg	6		19.2983			
LPS + Dexa	6			25.0250		
Normal	6			26.0217		
LPS + 125 mg/kg	6				28.5800	
LPS + 250 mg/kg	6					32.7350
Sig.		1.000	1.000	.550	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

#### HO1

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
LPS + 50 mg/kg	6	21.3567			
LPS + Dexa	6	22.3883			
LPS	6		28.6917		
Normal	6			33.4083	
LPS + 250 mg/kg	6			34.1817	
LPS + 125 mg/kg	6				38.9617
Sig.		.764	1.000	.914	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

#### MDA

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
LPS + 50 mg/kg	6	66.9450			
LPS + 125 mg/kg	6		114.7217		
Normal	6		140.2767		
LPS + 250 mg/kg	6			176.9433	
LPS	6			188.0550	
LPS + Dexa	6				222.5000
Sig.		1.000	.166	.888	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Lampiran 12. Hasil Analisis Statistik Pengujian *In Vitro* Dengan Parameter Sel T Regulator, IL-10, TLR4, NFkB, TNF- $\alpha$ , IL-6

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		CD4_CD25_CD62	CD4_CD25_IL10	CD11b_TLR4
		L		
N		18	18	18
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	40.2411	40.7878	41.5289
	Std. Deviation	13.43957	22.17698	4.79801
Most Extreme Differences	Absolute	.194	.168	.092
	Positive	.194	.168	.090
	Negative	-.132	-.113	-.092
Kolmogorov-Smirnov Z		.821	.711	.392
Asymp. Sig. (2-tailed)		.510	.693	.998

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		CD11b_NFkB	CD11b_TNFa	CD11b_IL6
N		18	18	18
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	20.5283	30.9228	36.0806
	Std. Deviation	2.45735	3.17294	4.17791
Most Extreme Differences	Absolute	.151	.134	.257
	Positive	.112	.103	.165
	Negative	-.151	-.134	-.257
Kolmogorov-Smirnov Z		.639	.568	1.092
Asymp. Sig. (2-tailed)		.810	.903	.184

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
CD4_CD25_CD62L	Normal	3	65.4300	.83000	.47920
	LPS	3	25.6367	.93179	.53797
	LPS + Dexa 5 mg/mL	3	38.3967	.42501	.24538
	LPS + 0.5 mg/mL	3	27.7833	.48748	.28144
	LPS + 1.25 mg/mL	3	44.1300	.80728	.46608
	LPS + 2.50 mg/mL	3	40.0700	.61539	.35529
	Total	18	40.2411	13.43957	3.16774
CD4_CD25_IL10	Normal	3	24.0400	.96000	.55426
	LPS	3	11.6767	.82501	.47632
	LPS + Dexa 5 mg/mL	3	33.5533	.38682	.22333
	LPS + 0.5 mg/mL	3	40.3700	.37000	.21362
	LPS + 1.25 mg/mL	3	58.2433	.75501	.43590
	LPS + 2.50 mg/mL	3	76.8433	.51248	.29588
	Total	18	40.7878	22.17698	5.22716
CD11b_TLR4	Normal	3	40.6700	.55245	.31896
	LPS	3	49.1867	.70600	.40761
	LPS + Dexa 5 mg/mL	3	34.4933	.44298	.25576
	LPS + 0.5 mg/mL	3	44.5200	.74719	.43139
	LPS + 1.25 mg/mL	3	42.0633	.81292	.46934
	LPS + 2.50 mg/mL	3	38.2400	.25942	.14978
	Total	18	41.5289	4.79801	1.13090
CD11b_NFkB	Normal	3	16.4400	.15100	.08718
	LPS	3	22.4533	.18824	.10868
	LPS + Dexa 5 mg/mL	3	18.6133	.44881	.25912
	LPS + 0.5 mg/mL	3	23.3967	.29366	.16954
	LPS + 1.25 mg/mL	3	21.7767	.39171	.22615
	LPS + 2.50 mg/mL	3	20.4900	.13000	.07506
	Total	18	20.5283	2.45735	.57920
CD11b_TNFa	Normal	3	28.5333	.78258	.45182
	LPS	3	34.1867	.44636	.25770
	LPS + Dexa 5 mg/mL	3	25.7500	.55435	.32005
	LPS + 0.5 mg/mL	3	34.2900	.66641	.38475



LPS + 1.25 mg/mL	3	31.9900	.69505	.40129
LPS + 2.50 mg/mL	3	30.7867	.32316	.18658

**Descriptives**

		95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
		Lower Bound	Upper Bound		
CD4_CD25_CD62L	Normal	63.3682	67.4918	64.60	66.26
	LPS	23.3220	27.9514	24.92	26.69
	LPS + Dexa 5 mg/mL	37.3409	39.4524	37.97	38.82
	LPS + 0.5 mg/mL	26.5724	28.9943	27.27	28.24
	LPS + 1.25 mg/mL	42.1246	46.1354	43.54	45.05
	LPS + 2.50 mg/mL	38.5413	41.5987	39.69	40.78
CD4_CD25_IL10	Total	33.5578	46.9245	24.92	66.26
	Normal	21.6552	26.4248	23.08	25.00
	LPS	9.6272	13.7261	10.85	12.50
	LPS + Dexa 5 mg/mL	32.5924	34.5143	33.33	34.00
	LPS + 0.5 mg/mL	39.4509	41.2891	40.00	40.74
	LPS + 1.25 mg/mL	56.3678	60.1189	57.64	59.09
CD11b_TLR4	LPS + 2.50 mg/mL	75.5703	78.1164	76.44	77.42
	Total	29.7594	51.8161	10.85	77.42
	Normal	39.2976	42.0424	40.05	41.11
	LPS	47.4329	50.9405	48.46	49.87
	LPS + Dexa 5 mg/mL	33.3929	35.5938	34.01	34.88
	LPS + 0.5 mg/mL	42.6639	46.3761	43.66	45.01
CD11b_NFkB	LPS + 1.25 mg/mL	40.0439	44.0827	41.43	42.98
	LPS + 2.50 mg/mL	37.5956	38.8844	38.03	38.53
	Total	39.1429	43.9149	34.01	49.87
	Normal	16.0649	16.8151	16.30	16.60
	LPS	21.9857	22.9209	22.33	22.67
	LPS + Dexa 5 mg/mL	17.4984	19.7282	18.32	19.13
CD11b_TNFa	LPS + 0.5 mg/mL	22.6672	24.1261	23.06	23.60
	LPS + 1.25 mg/mL	20.8036	22.7497	21.35	22.12
	LPS + 2.50 mg/mL	20.1671	20.8129	20.36	20.62
	Total	19.3063	21.7503	16.30	23.60
	Normal	26.5893	30.4774	27.79	29.35
	LPS	33.0779	35.2955	33.89	34.70
CD11b_TNFa	LPS + Dexa 5 mg/mL	24.3729	27.1271	25.16	26.26
	LPS + 0.5 mg/mL	32.6346	35.9454	33.60	34.93
	LPS + 1.25 mg/mL	30.2634	33.7166	31.29	32.68
	LPS + 2.50 mg/mL	29.9839	31.5894	30.43	31.06

**Descriptives**

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
CD11b_TNFa	Total	18	30.9228	3.17294	.74787
	Normal	3	33.7200	.80889	.46701
	LPS	3	38.8967	.44602	.25751
CD11b_IL6	LPS + Dexa 5 mg/mL	3	28.1667	.87580	.50565
	LPS + 0.5 mg/mL	3	39.8567	.25403	.14667
	LPS + 1.25 mg/mL	3	38.4033	.33081	.19099
	LPS + 2.50 mg/mL	3	37.4400	.34699	.20033
Total	18	36.0806	4.17791	.98474	

**Descriptives**

		95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
		Lower Bound	Upper Bound		
CD11b_TNFa	Total	29.3449	32.5006	25.16	34.93
	Normal	31.7106	35.7294	33.18	34.65
	LPS	37.7887	40.0046	38.39	39.23
CD11b_IL6	LPS + Dexa 5 mg/mL	25.9910	30.3423	27.27	29.02
	LPS + 0.5 mg/mL	39.2256	40.4877	39.71	40.15
	LPS + 1.25 mg/mL	37.5816	39.2251	38.03	38.66
	LPS + 2.50 mg/mL	36.5780	38.3020	37.04	37.66
Total	34.0029	38.1582	27.27	40.15	



## Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CD4_CD25_CD62L	.759	5	12	.596
CD4_CD25_IL10	.634	5	12	.678
CD11b_TLR4	1.082	5	12	.418
CD11b_NFkB	2.345	5	12	.105
CD11b_TNFa	.368	5	12	.861
CD11b_IL6	1.645	5	12	.222

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F
CD4_CD25_CD62L	Between Groups	3064.563	5	612.913	1223.460
	Within Groups	6.012	12	.501	
	Total	3070.574	17		
CD4_CD25_IL10	Between Groups	8355.468	5	1671.094	3684.295
	Within Groups	5.443	12	.454	
	Total	8360.911	17		
CD11b_TLR4	Between Groups	386.782	5	77.356	203.009
	Within Groups	4.573	12	.381	
	Total	391.355	17		
CD11b_NFkB	Between Groups	101.623	5	20.325	236.227
	Within Groups	1.032	12	.086	
	Total	102.656	17		
CD11b_TNFa	Between Groups	166.847	5	33.369	93.098
	Within Groups	4.301	12	.358	
	Total	171.148	17		
CD11b_IL6	Between Groups	292.904	5	58.581	183.578
	Within Groups	3.829	12	.319	
	Total	296.733	17		

## ANOVA

		Sig.
CD4_CD25_CD62L	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
CD4_CD25_IL10	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
CD11b_TLR4	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
CD11b_NFkB	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
CD11b_TNFa	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	
CD11b_IL6	Between Groups	.000
	Within Groups	
	Total	



## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error
CD4_CD25_CD62L	Normal	LPS	39.79333 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + Dexa 5 mg/mL	27.03333 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + 0.5 mg/mL	37.64667 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + 1.25 mg/mL	21.30000 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + 2.50 mg/mL	25.36000 <sup>*</sup>	.57791
		Normal	-39.79333 <sup>*</sup>	.57791
	LPS	LPS + Dexa 5 mg/mL	-12.76000 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + 0.5 mg/mL	-2.14667 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + 1.25 mg/mL	-18.49333 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + 2.50 mg/mL	-14.43333 <sup>*</sup>	.57791
		Normal	-27.03333 <sup>*</sup>	.57791
		LPS	12.76000 <sup>*</sup>	.57791
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	10.61333 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + 1.25 mg/mL	-5.73333 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + 2.50 mg/mL	-1.67333	.57791
		Normal	-37.64667 <sup>*</sup>	.57791
		LPS	2.14667 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + Dexa 5 mg/mL	-10.61333 <sup>*</sup>	.57791
	LPS + 0.5 mg/mL	LPS + 1.25 mg/mL	-16.34667 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + 2.50 mg/mL	-12.28667 <sup>*</sup>	.57791
		Normal	-21.30000 <sup>*</sup>	.57791
		LPS	18.49333 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + Dexa 5 mg/mL	5.73333 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + 0.5 mg/mL	16.34667 <sup>*</sup>	.57791
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS + 2.50 mg/mL	4.06000 <sup>*</sup>	.57791
		Normal	-25.36000 <sup>*</sup>	.57791
		LPS	14.43333 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + Dexa 5 mg/mL	1.67333	.57791
		LPS + 0.5 mg/mL	12.28667 <sup>*</sup>	.57791
		LPS + 1.25 mg/mL	-4.06000 <sup>*</sup>	.57791
	LPS + 2.50 mg/mL	LPS	12.36333 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + Dexa 5 mg/mL	-9.51333 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + 0.5 mg/mL	-16.33000 <sup>*</sup>	.54989
		Normal		
		LPS		
		LPS + Dexa 5 mg/mL		
CD4_CD25_IL10	Normal	LPS	12.36333 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + Dexa 5 mg/mL	-9.51333 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + 0.5 mg/mL	-16.33000 <sup>*</sup>	.54989
		Normal		
		LPS		
		LPS + Dexa 5 mg/mL		

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Sig.	95% Confidence Interval
				Lower Bound
CD4_CD25_CD62L	Normal	LPS	.000 <sup>*</sup>	37.8522
		LPS + Dexa 5 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	25.0922
		LPS + 0.5 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	35.7055
		LPS + 1.25 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	19.3589
		LPS + 2.50 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	23.4189
		Normal	.000 <sup>*</sup>	-41.7345
	LPS	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-14.7011
		LPS + 0.5 mg/mL	.027 <sup>*</sup>	-4.0878
		LPS + 1.25 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-20.4345
		LPS + 2.50 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-16.3745
		Normal	.000 <sup>*</sup>	-28.9745
		LPS	.000 <sup>*</sup>	10.8189
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	8.6722
		LPS + 1.25 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-7.6745
		Normal		
		LPS		
		LPS + Dexa 5 mg/mL		
		LPS + 0.5 mg/mL		

CD4_CD25_IL10	LPS + 0.5 mg/mL	LPS + 2.50 mg/mL	.107	-3.6145
		Normal	.000*	-39.5878
		LPS	.027*	.2055
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	-12.5545
		LPS + 1.25 mg/mL	.000*	-18.2878
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	-14.2278
	LPS + 2.50 mg/mL	Normal	.000*	-23.2411
		LPS	.000*	16.5522
		LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	3.7922
	LPS + 2.50 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	.000*	14.4055
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	2.1189
		Normal	.000*	-27.3011
LPS + 2.50 mg/mL	LPS	.000*	12.4922	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	.107	-.2678	
	LPS + 0.5 mg/mL	.000*	10.3455	
LPS + 2.50 mg/mL	LPS + 1.25 mg/mL	.000*	-6.0011	
	LPS	.000*	10.5163	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	-11.3604	
LPS + 2.50 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	.000*	-18.1770	
	LPS + 1.25 mg/mL	.000*	-18.1770	
	LPS + 2.50 mg/mL	.000*	-18.1770	

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval
			Upper Bound
CD4_CD25_CD62L	Normal	LPS	41.7345*
		LPS + Dexa 5 mg/mL	28.9745*
		LPS + 0.5 mg/mL	39.5878*
		LPS + 1.25 mg/mL	23.2411*
		LPS + 2.50 mg/mL	27.3011*
	LPS	Normal	-37.8522*
		LPS + Dexa 5 mg/mL	-10.8189*
		LPS + 0.5 mg/mL	-.2055*
		LPS + 1.25 mg/mL	-16.5522*
		LPS + 2.50 mg/mL	-12.4922*
	LPS + Dexa 5 mg/mL	Normal	-25.0922*
		LPS	14.7011*
LPS + 0.5 mg/mL		12.5545*	
LPS + 1.25 mg/mL		-3.7922*	
LPS + 2.50 mg/mL		.2678	
LPS + 0.5 mg/mL	Normal	-35.7055*	
	LPS	4.0878*	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	-8.6722*	
	LPS + 1.25 mg/mL	-14.4055*	
	LPS + 2.50 mg/mL	-10.3455*	
LPS + 1.25 mg/mL	Normal	-19.3589*	
	LPS	20.4345*	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	7.6745*	
	LPS + 0.5 mg/mL	18.2878*	
	LPS + 2.50 mg/mL	6.0011*	
LPS + 2.50 mg/mL	Normal	-23.4189*	
	LPS	16.3745*	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	3.6145*	
	LPS + 0.5 mg/mL	14.2278*	
	LPS + 1.25 mg/mL	-2.1189*	
CD4_CD25_IL10	Normal	LPS	14.2104*
		LPS + Dexa 5 mg/mL	-7.6663*
		LPS + 0.5 mg/mL	-14.4830*





## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error
CD4_CD25_IL10	Normal	LPS + 1.25 mg/mL	-34.20333 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + 2.50 mg/mL	-52.80333 <sup>*</sup>	.54989
		Normal	-12.36333 <sup>*</sup>	.54989
	LPS	LPS + Dexa 5 mg/mL	-21.87667 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + 0.5 mg/mL	-28.69333 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + 1.25 mg/mL	-46.56667 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + 2.50 mg/mL	-65.16667 <sup>*</sup>	.54989
		Normal	9.51333 <sup>*</sup>	.54989
		LPS	21.87667 <sup>*</sup>	.54989
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	-6.81667 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + 1.25 mg/mL	-24.69000 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + 2.50 mg/mL	-43.29000 <sup>*</sup>	.54989
		Normal	16.33000 <sup>*</sup>	.54989
		LPS	28.69333 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + Dexa 5 mg/mL	6.81667 <sup>*</sup>	.54989
	LPS + 0.5 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	6.81667 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + 1.25 mg/mL	-17.87333 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + 2.50 mg/mL	-36.47333 <sup>*</sup>	.54989
		Normal	34.20333 <sup>*</sup>	.54989
		LPS	46.56667 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + Dexa 5 mg/mL	24.69000 <sup>*</sup>	.54989
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	17.87333 <sup>*</sup>	.54989
		LPS + 2.50 mg/mL	-18.60000 <sup>*</sup>	.54989
		Normal	52.80333 <sup>*</sup>	.54989
LPS		65.16667 <sup>*</sup>	.54989	
LPS + Dexa 5 mg/mL		43.29000 <sup>*</sup>	.54989	
LPS + 0.5 mg/mL		36.47333 <sup>*</sup>	.54989	
LPS + 2.50 mg/mL	LPS + 1.25 mg/mL	18.60000 <sup>*</sup>	.54989	
	LPS	-8.51667 <sup>*</sup>	.50402	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	6.17667 <sup>*</sup>	.50402	
	LPS + 0.5 mg/mL	-3.85000 <sup>*</sup>	.50402	
	LPS + 1.25 mg/mL	-1.39333 <sup>*</sup>	.50402	
	LPS + 2.50 mg/mL	2.43000 <sup>*</sup>	.50402	
CD11b_TLR4	Normal	LPS + 1.25 mg/mL	-1.39333 <sup>*</sup>	.50402
		LPS + 2.50 mg/mL	2.43000 <sup>*</sup>	.50402
LPS	Normal	LPS + 1.25 mg/mL	8.51667 <sup>*</sup>	.50402
		LPS + 2.50 mg/mL	8.51667 <sup>*</sup>	.50402

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Sig.	95% Confidence Interval
				Lower Bound
CD4_CD25_IL10	Normal	LPS + 1.25 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-36.0504
		LPS + 2.50 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-54.6504
		Normal	.000 <sup>*</sup>	-14.2104
	LPS	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-23.7237
		LPS + 0.5 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-30.5404
		LPS + 1.25 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-48.4137
		LPS + 2.50 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-67.0137
		Normal	.000 <sup>*</sup>	7.6663
		LPS	.000 <sup>*</sup>	20.0296
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-8.6637
		LPS + 1.25 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-26.5370
		LPS + 2.50 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-45.1370
		Normal	.000 <sup>*</sup>	14.4830
		LPS	.000 <sup>*</sup>	26.8463
		LPS + Dexa 5 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	4.9696
	LPS + 0.5 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	4.9696
		LPS + 1.25 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-19.7204
		LPS + 2.50 mg/mL	.000 <sup>*</sup>	-38.3204

		Normal	.000*	32.3563
		LPS	.000*	44.7196
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	22.8430
		LPS + 0.5 mg/mL	.000*	16.0263
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	-20.4470
		Normal	.000*	50.9563
		LPS	.000*	63.3196
	LPS + 2.50 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	41.4430
		LPS + 0.5 mg/mL	.000*	34.6263
		LPS + 1.25 mg/mL	.000*	16.7530
		LPS	.000	-10.2096
		LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	4.4837
CD11b_TLR4	Normal	LPS + 0.5 mg/mL	.000*	-5.5430
		LPS + 1.25 mg/mL	.132*	-3.0863
		LPS + 2.50 mg/mL	.004*	.7370
	LPS	Normal	.000*	6.8237

Multiple Comparisons

Tukey HSD			
Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval
			Upper Bound
CD4_CD25_IL10	Normal	LPS + 1.25 mg/mL	-32.3563*
		LPS + 2.50 mg/mL	-50.9563*
		Normal	-10.5163*
	LPS	LPS + Dexa 5 mg/mL	-20.0296*
		LPS + 0.5 mg/mL	-26.8463*
		LPS + 1.25 mg/mL	-44.7196*
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 2.50 mg/mL	-63.3196*
		Normal	11.3604*
		LPS	23.7237*
	LPS + 0.5 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	-4.9696*
		LPS + 1.25 mg/mL	-22.8430*
		LPS + 2.50 mg/mL	-41.4430*
	LPS + 1.25 mg/mL	Normal	18.1770*
		LPS	30.5404*
		LPS + Dexa 5 mg/mL	8.6637
	LPS + 2.50 mg/mL	LPS + 1.25 mg/mL	-16.0263*
		LPS + 2.50 mg/mL	-34.6263*
		Normal	36.0504*
LPS	LPS	48.4137*	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	26.5370*	
	LPS + 0.5 mg/mL	19.7204*	
Normal	LPS + 2.50 mg/mL	-16.7530*	
	Normal	54.6504*	
	LPS	67.0137*	
CD11b_TLR4	Normal	LPS + Dexa 5 mg/mL	45.1370*
		LPS + 0.5 mg/mL	38.3204*
		LPS + 1.25 mg/mL	20.4470*
LPS	LPS	-6.8237	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	7.8696*	
	LPS + 0.5 mg/mL	-2.1570*	
LPS	LPS + 1.25 mg/mL	.2996*	
	LPS + 2.50 mg/mL	4.1230*	
	Normal	10.2096*	





## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error
CD11b_TLR4	LPS	LPS + Dexa 5 mg/mL	14.69333*	.50402
		LPS + 0.5 mg/mL	4.66667*	.50402
		LPS + 1.25 mg/mL	7.12333*	.50402
		LPS + 2.50 mg/mL	10.94667*	.50402
		Normal	-6.17667*	.50402
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS	-14.69333*	.50402
		LPS + 0.5 mg/mL	-10.02667*	.50402
		LPS + 1.25 mg/mL	-7.57000*	.50402
		LPS + 2.50 mg/mL	-3.74667*	.50402
		Normal	3.85000*	.50402
	LPS + 0.5 mg/mL	LPS	-4.66667*	.50402
		LPS + Dexa 5 mg/mL	10.02667*	.50402
		LPS + 1.25 mg/mL	2.45667*	.50402
		LPS + 2.50 mg/mL	6.28000*	.50402
		Normal	1.39333	.50402
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS	-7.12333*	.50402
		LPS + Dexa 5 mg/mL	7.57000*	.50402
		LPS + 0.5 mg/mL	-2.45667*	.50402
		LPS + 2.50 mg/mL	3.82333*	.50402
		Normal	-2.43000*	.50402
	LPS + 2.50 mg/mL	LPS	-10.94667*	.50402
		LPS + Dexa 5 mg/mL	3.74667*	.50402
		LPS + 0.5 mg/mL	-6.28000*	.50402
		LPS + 1.25 mg/mL	-3.82333*	.50402
LPS		-6.01333*	.23950	
Normal	LPS + Dexa 5 mg/mL	-2.17333*	.23950	
	LPS + 0.5 mg/mL	-6.95667*	.23950	
	LPS + 1.25 mg/mL	-5.33667*	.23950	
	LPS + 2.50 mg/mL	-4.05000*	.23950	
	Normal	6.01333*	.23950	
CD11b_NFKB	LPS	LPS + Dexa 5 mg/mL	3.84000*	.23950
		LPS + 0.5 mg/mL	-.94333*	.23950
		LPS + 1.25 mg/mL	.67667*	.23950

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Sig.	95% Confidence Interval
				Lower Bound
CD11b_TLR4	LPS	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	13.0004
		LPS + 0.5 mg/mL	.000*	2.9737
		LPS + 1.25 mg/mL	.000*	5.4304
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	9.2537
		Normal	.000*	-7.8696
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS	.000*	-16.3863
		LPS + 0.5 mg/mL	.000*	-11.7196
		LPS + 1.25 mg/mL	.000*	-9.2630
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	-5.4396
		Normal	.000*	2.1570
	LPS + 0.5 mg/mL	LPS	.000*	-6.3596
		LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	8.3337
		LPS + 1.25 mg/mL	.004*	.7637
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	4.5870
		Normal	.132	-.2996
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS	.000*	-8.8163
		LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	5.8770

CD11b_NFkB	LPS + 2.50 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	.004*	-4.1496
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	2.1304
		Normal	.004*	-4.1230
	LPS	LPS	.000*	-12.6396
		LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	2.0537
		LPS + 0.5 mg/mL	.000*	-7.9730
	Normal	LPS + 1.25 mg/mL	.000*	-5.5163
		LPS	.000*	-6.8178
		LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	-2.9778
	LPS	LPS + 0.5 mg/mL	.000*	-7.7611
		LPS + 1.25 mg/mL	.000	-6.1411
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	-4.8545
LPS	Normal	.000*	5.2089	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	3.0355	
	LPS + 0.5 mg/mL	.019*	-1.7478	
		LPS + 1.25 mg/mL	.120*	-.1278

Multiple Comparisons

Tukey HSD			
Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval
			Upper Bound
CD11b_TLR4	LPS	LPS + Dexa 5 mg/mL	16.3863*
		LPS + 0.5 mg/mL	6.3596*
		LPS + 1.25 mg/mL	8.8163*
		LPS + 2.50 mg/mL	12.6396*
		Normal	-4.4837*
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS	-13.0004*
		LPS + 0.5 mg/mL	-8.3337*
		LPS + 1.25 mg/mL	-5.8770*
		LPS + 2.50 mg/mL	-2.0537*
		Normal	5.5430*
	LPS + 0.5 mg/mL	LPS	-2.9737*
		LPS + Dexa 5 mg/mL	11.7196*
		LPS + 1.25 mg/mL	4.1496*
		LPS + 2.50 mg/mL	7.9730*
		Normal	3.0863
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS	-5.4304*
		LPS + Dexa 5 mg/mL	9.2630*
		LPS + 0.5 mg/mL	-.7637*
		LPS + 2.50 mg/mL	5.5163*
		Normal	-.7370*
	LPS + 2.50 mg/mL	LPS	-9.2537*
		LPS + Dexa 5 mg/mL	5.4396*
		LPS + 0.5 mg/mL	-4.5870*
		LPS + 1.25 mg/mL	-2.1304*
LPS		-5.2089*	
Normal	LPS + Dexa 5 mg/mL	-1.3689*	
	LPS + 0.5 mg/mL	-6.1522*	
	LPS + 1.25 mg/mL	-4.5322*	
	LPS + 2.50 mg/mL	-3.2455*	
	Normal	6.8178*	
CD11b_NFkB	LPS	LPS + Dexa 5 mg/mL	4.6445*
		LPS + 0.5 mg/mL	-.1389*
	LPS	LPS + 1.25 mg/mL	1.4811*

Multiple Comparisons

Tukey HSD				
Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error
CD11b_NFkB	LPS	LPS + 2.50 mg/mL	1.96333*	.23950
	LPS + Dexa 5 mg/mL	Normal	2.17333*	.23950



		LPS	-3.84000*	.23950
		LPS + 0.5 mg/mL	-4.78333*	.23950
		LPS + 1.25 mg/mL	-3.16333*	.23950
		LPS + 2.50 mg/mL	-1.87667*	.23950
		Normal	6.95667*	.23950
	LPS + 0.5 mg/mL	LPS	.94333*	.23950
		LPS + Dexa 5 mg/mL	4.78333*	.23950
		LPS + 1.25 mg/mL	1.62000*	.23950
		LPS + 2.50 mg/mL	2.90667*	.23950
		Normal	5.33667*	.23950
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS	-.67667*	.23950
		LPS + Dexa 5 mg/mL	3.16333*	.23950
		LPS + 0.5 mg/mL	-1.62000	.23950
		LPS + 2.50 mg/mL	1.28667*	.23950
		Normal	4.05000*	.23950
	LPS + 2.50 mg/mL	LPS	-1.96333*	.23950
		LPS + Dexa 5 mg/mL	1.87667*	.23950
		LPS + 0.5 mg/mL	-2.90667*	.23950
		LPS + 1.25 mg/mL	-1.28667*	.23950
		LPS	-5.65333*	.48883
		LPS + Dexa 5 mg/mL	2.78333*	.48883
	Normal	LPS + 0.5 mg/mL	-5.75667*	.48883
		LPS + 1.25 mg/mL	-3.45667*	.48883
		LPS + 2.50 mg/mL	-2.25333*	.48883
		Normal	5.65333*	.48883
CD11b_TNFa		LPS + Dexa 5 mg/mL	8.43667	.48883
	LPS	LPS + 0.5 mg/mL	-.10333*	.48883
		LPS + 1.25 mg/mL	2.19667*	.48883
		LPS + 2.50 mg/mL	3.40000*	.48883
		Normal	-2.78333*	.48883
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS	-8.43667*	.48883

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	
CD11b_NFkB	LPS	LPS + 2.50 mg/mL	.000*	1.1589	
		Normal	.000*	1.3689	
		LPS	.000*	-4.6445	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	.000*	-5.5878	
		LPS + 1.25 mg/mL	.000*	-3.9678	
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	-2.6811	
		Normal	.000*	6.1522	
		LPS	.019*	.1389	
	LPS + 0.5 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	3.9789	
		LPS + 1.25 mg/mL	.000*	.8155	
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	2.1022	
		Normal	.000*	4.5322	
		LPS	.120*	-1.4811	
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	2.3589	
		LPS + 0.5 mg/mL	.000	-2.4245	
		LPS + 2.50 mg/mL	.002*	.4822	
		Normal	.000*	3.2455	
		LPS	.000*	-2.7678	
LPS + 2.50 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	1.0722		
	LPS + 0.5 mg/mL	.000*	-3.7111		
	LPS + 1.25 mg/mL	.002*	-2.0911		
	LPS	.000*	-7.2953		
	LPS + Dexa 5 mg/mL	.001*	1.1414		
	LPS + 0.5 mg/mL	.000*	-7.3986		
CD11b_TNFa	Normal	LPS + 1.25 mg/mL	.000*	-5.0986	
		LPS + 2.50 mg/mL	.006*	-3.8953	
		LPS	.006*	-3.8953	

	Normal	.000*	4.0114
LPS	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000	6.7947
	LPS + 0.5 mg/mL	1.000*	-1.7453
	LPS + 1.25 mg/mL	.007*	.5547
LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 2.50 mg/mL	.000*	1.7581
	Normal	.001*	-4.4253
	LPS	.000*	-10.0786

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval
			Upper Bound
CD11b_NFkB	LPS	LPS + 2.50 mg/mL	2.7678*
		Normal	2.9778*
		LPS	-3.0355*
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	-3.9789*
		LPS + 1.25 mg/mL	-2.3589*
		LPS + 2.50 mg/mL	-1.0722*
	LPS + 0.5 mg/mL	Normal	7.7611*
		LPS	1.7478*
		LPS + Dexa 5 mg/mL	5.5878*
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS + 1.25 mg/mL	2.4245*
		LPS + 2.50 mg/mL	3.7111*
		Normal	6.1411*
	LPS + 2.50 mg/mL	LPS	.1278*
		LPS + Dexa 5 mg/mL	3.9678*
		LPS + 0.5 mg/mL	-.8155
	LPS + 2.50 mg/mL	LPS + 2.50 mg/mL	2.0911*
		Normal	4.8545*
		LPS	-1.1589*
LPS + 2.50 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	2.6811*	
	LPS + 0.5 mg/mL	-2.1022*	
	LPS + 1.25 mg/mL	-.4822*	
Normal	LPS	-4.0114*	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	4.4253*	
	LPS + 0.5 mg/mL	-4.1147*	
CD11b_TNFa	LPS	LPS + 1.25 mg/mL	-1.8147*
		LPS + 2.50 mg/mL	-.6114*
		Normal	7.2953*
LPS	LPS + Dexa 5 mg/mL	10.0786	
	LPS + 0.5 mg/mL	1.5386*	
	LPS + 1.25 mg/mL	3.8386*	
LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 2.50 mg/mL	5.0419*	
	Normal	-1.1414*	
	LPS	-6.7947*	

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error
CD11b_TNFa	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	-8.54000*	.48883
		LPS + 1.25 mg/mL	-6.24000*	.48883
		LPS + 2.50 mg/mL	-5.03667*	.48883
		Normal	5.75667*	.48883
	LPS + 0.5 mg/mL	LPS	.10333*	.48883
		LPS + Dexa 5 mg/mL	8.54000*	.48883
		LPS + 1.25 mg/mL	2.30000*	.48883
		LPS + 2.50 mg/mL	3.50333*	.48883
	LPS + 1.25 mg/mL	Normal	3.45667*	.48883
		LPS	-2.19667*	.48883
		LPS + Dexa 5 mg/mL	6.24000*	.48883





CD11b_IL6	LPS + 2.50 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	-2.30000*	.48883
		LPS + 2.50 mg/mL	1.20333*	.48883
		Normal	2.25333*	.48883
		LPS	-3.40000	.48883
		LPS + Dexa 5 mg/mL	5.03667*	.48883
	Normal	LPS + 0.5 mg/mL	-3.50333*	.48883
		LPS + 1.25 mg/mL	-1.20333*	.48883
		LPS	-5.17667*	.46123
		LPS + Dexa 5 mg/mL	5.55333*	.46123
		LPS + 0.5 mg/mL	-6.13667*	.46123
	LPS	LPS + 1.25 mg/mL	-4.68333*	.46123
		LPS + 2.50 mg/mL	-3.72000*	.46123
		Normal	5.17667*	.46123
		LPS + Dexa 5 mg/mL	10.73000*	.46123
		LPS + 0.5 mg/mL	-.96000*	.46123
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 1.25 mg/mL	.49333*	.46123
		LPS + 2.50 mg/mL	1.45667	.46123
		Normal	-5.55333*	.46123
		LPS	-10.73000*	.46123
		LPS + 0.5 mg/mL	-11.69000*	.46123
		LPS + 1.25 mg/mL	-10.23667*	.46123
		LPS + 2.50 mg/mL	-9.27333*	.46123

Multiple Comparisons

Tukey HSD				
Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Sig.	95% Confidence Interval
				Lower Bound
CD11b_TNFa	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	.000*	-10.1819
		LPS + 1.25 mg/mL	.000*	-7.8819
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	-6.6786
		Normal	.000*	4.1147
		LPS	1.000*	-1.5386
	LPS + 0.5 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	6.8981
		LPS + 1.25 mg/mL	.005*	.6581
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	1.8614
		Normal	.000*	1.8147
		LPS	.007*	-3.8386
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	4.5981
		LPS + 0.5 mg/mL	.005*	-3.9419
		LPS + 2.50 mg/mL	.210*	-.4386
		Normal	.006*	.6114
		LPS	.000	-5.0419
	LPS + 2.50 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	3.3947
		LPS + 0.5 mg/mL	.000*	-5.1453
		LPS + 1.25 mg/mL	.210*	-2.8453
		LPS	.000*	-6.7259
		LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	4.0041
Normal	LPS + 0.5 mg/mL	.000*	-7.6859	
	LPS + 1.25 mg/mL	.000*	-6.2326	
	LPS + 2.50 mg/mL	.000*	-5.2692	
	Normal	.000*	3.6274	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	9.1808	
CD11b_IL6	LPS	LPS + 0.5 mg/mL	.357	-2.5092
		LPS + 1.25 mg/mL	.884*	-1.0559
		LPS + 2.50 mg/mL	.070	-.0926
		Normal	.000*	-7.1026
		LPS	.000*	-12.2792
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	.000*	-13.2392
		LPS + 1.25 mg/mL	.000*	-11.7859
		LPS + 2.50 mg/mL	.000*	-10.8226



## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval
			Upper Bound
CD11b_TNFa	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	-6.8981*
		LPS + 1.25 mg/mL	-4.5981*
		LPS + 2.50 mg/mL	-3.3947*
		Normal	7.3986*
		LPS	1.7453*
	LPS + 0.5 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	10.1819*
		LPS + 1.25 mg/mL	3.9419*
		LPS + 2.50 mg/mL	5.1453*
		Normal	5.0986*
		LPS	-.5547*
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	7.8819*
		LPS + 0.5 mg/mL	-.6581*
		LPS + 2.50 mg/mL	2.8453*
		Normal	3.8953*
		LPS	-1.7581*
	LPS + 2.50 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	6.6786*
		LPS + 0.5 mg/mL	-1.8614*
		LPS + 1.25 mg/mL	.4386*
		LPS	-3.6274*
		LPS + Dexa 5 mg/mL	7.1026*
Normal	LPS + 0.5 mg/mL	-4.5874*	
	LPS + 1.25 mg/mL	-3.1341*	
	LPS + 2.50 mg/mL	-2.1708*	
	Normal	6.7259*	
	LPS + Dexa 5 mg/mL	12.2792*	
CD11b_IL6	LPS	LPS + 0.5 mg/mL	.5892*
		LPS + 1.25 mg/mL	2.0426*
		LPS + 2.50 mg/mL	3.0059*
		Normal	-4.0041*
		LPS	-9.1808*
	LPS + Dexa 5 mg/mL	LPS + 0.5 mg/mL	-10.1408*
		LPS + 1.25 mg/mL	-8.6874*
		LPS + 2.50 mg/mL	-7.7241*

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error
CD11b_IL6	LPS + 0.5 mg/mL	Normal	6.13667*	.46123
		LPS	.96000*	.46123
		LPS + Dexa 5 mg/mL	11.69000*	.46123
		LPS + 1.25 mg/mL	1.45333*	.46123
		LPS + 2.50 mg/mL	2.41667*	.46123
	LPS + 1.25 mg/mL	Normal	4.68333*	.46123
		LPS	-.49333*	.46123
		LPS + Dexa 5 mg/mL	10.23667*	.46123
		LPS + 0.5 mg/mL	-1.45333*	.46123
		LPS + 2.50 mg/mL	.96333*	.46123
	LPS + 2.50 mg/mL	Normal	3.72000*	.46123
		LPS	-1.45667*	.46123
		LPS + Dexa 5 mg/mL	9.27333*	.46123
		LPS + 0.5 mg/mL	-2.41667*	.46123
		LPS + 1.25 mg/mL	-.96333*	.46123



## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Sig.	95% Confidence Interval
				Lower Bound
CD11b_IL6	LPS + 0.5 mg/mL	Normal	.000*	4.5874
		LPS	.357*	-.5892
		LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	10.1408
		LPS + 1.25 mg/mL	.071*	-.0959
		LPS + 2.50 mg/mL	.002*	.8674
		Normal	.000*	3.1341
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS	.884*	-2.0426
		LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	8.6874
		LPS + 0.5 mg/mL	.071*	-3.0026
		LPS + 2.50 mg/mL	.353*	-.5859
		Normal	.000*	2.1708
		LPS	.070*	-3.0059
LPS + 2.50 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	.000*	7.7241	
	LPS + 0.5 mg/mL	.002*	-3.9659	
	LPS + 1.25 mg/mL	.353*	-2.5126	
	Normal	.000*	2.1708	

## Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval
			Upper Bound
CD11b_IL6	LPS + 0.5 mg/mL	Normal	7.6859*
		LPS	2.5092*
		LPS + Dexa 5 mg/mL	13.2392*
		LPS + 1.25 mg/mL	3.0026*
		LPS + 2.50 mg/mL	3.9659*
		Normal	6.2326*
	LPS + 1.25 mg/mL	LPS	1.0559*
		LPS + Dexa 5 mg/mL	11.7859*
		LPS + 0.5 mg/mL	.0959*
		LPS + 2.50 mg/mL	2.5126*
		Normal	5.2692*
		LPS	.0926*
LPS + 2.50 mg/mL	LPS + Dexa 5 mg/mL	10.8226*	
	LPS + 0.5 mg/mL	-.8674*	
	LPS + 1.25 mg/mL	.5859*	
	Normal	2.1708*	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Homogeneous Subsets

## CD4\_CD25\_CD62L

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
LPS	3	25.6367				
LPS + 0.5 mg/mL	3		27.7833			
LPS + Dexa 5 mg/mL	3			38.3967		
LPS + 2.50 mg/mL	3			40.0700		
LPS + 1.25 mg/mL	3				44.1300	
Normal	3					65.4300
Sig.		1.000	1.000	.107	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

## CD4\_CD25\_IL10

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
LPS	3	11.6767					
Normal	3		24.0400				
LPS + Dexa 5 mg/mL	3			33.5533			
LPS + 0.5 mg/mL	3				40.3700		
LPS + 1.25 mg/mL	3					58.2433	
LPS + 2.50 mg/mL	3						76.8433
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

## CD11b\_TLR4

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
LPS + Dexa 5 mg/mL	3	34.4933				
LPS + 2.50 mg/mL	3		38.2400			
Normal	3			40.6700		
LPS + 1.25 mg/mL	3			42.0633		
LPS + 0.5 mg/mL	3				44.5200	
LPS	3					49.1867
Sig.		1.000	1.000	.132	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

## CD11b\_NFkB

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Normal	3	16.4400				
LPS + Dexa 5 mg/mL	3		18.6133			
LPS + 2.50 mg/mL	3			20.4900		
LPS + 1.25 mg/mL	3				21.7767	
LPS	3				22.4533	
LPS + 0.5 mg/mL	3					23.3967
Sig.		1.000	1.000	1.000	.120	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

## CD11b\_TNFa

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
LPS + Dexa 5 mg/mL	3	25.7500			
Normal	3		28.5333		
LPS + 2.50 mg/mL	3			30.7867	
LPS + 1.25 mg/mL	3			31.9900	
LPS	3				34.1867
LPS + 0.5 mg/mL	3				34.2900
Sig.		1.000	1.000	.210	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

## CD11b\_IL6

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
LPS + Dexa 5 mg/mL	3	28.1667			
Normal	3		33.7200		
LPS + 2.50 mg/mL	3			37.4400	
LPS + 1.25 mg/mL	3			38.4033	38.4033
LPS	3			38.8967	38.8967
LPS + 0.5 mg/mL	3				39.8567
Sig.		1.000	1.000	.070	.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



## Lampiran 13. Publikasi Hasil Penelitian

126

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

Anti-Inflammatory &amp; Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry, 2019, 18, 126-141

## RESEARCH ARTICLE



### Screening of NO Inhibitor Release Activity from Soft Coral Extracts Origin Palu Bay, Central Sulawesi, Indonesia



Wendy Alexander Tanod<sup>1a,b,\*</sup>, Uun Yanuhar<sup>a</sup>, Maftuch<sup>a</sup>, Masteria Yunovilsa Putra<sup>c</sup> and Yenny Risjani<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Fisheries and Marine Science, Postgraduate Program, Brawijaya University, Malang, East Java, 65145, Indonesia; <sup>b</sup>Institute of Fisheries and Marine (Sekolah Tinggi Perikanan dan Kelautan), Palu, Central Sulawesi, 94118, Indonesia; <sup>c</sup>Research Center for Oceanography, Indonesian Institute of Sciences, Jakarta, 14430, Indonesia; <sup>d</sup>Central Laboratory of Life Science (LSIH), Brawijaya University, Malang, East Java, 65145, Indonesia

**Abstract: Background:** As a marine organism, soft corals can be utilized to be various bioactive substances, especially terpenoids and steroids. The soft corals family which produces bioactive generally come from clavulariidae, alcyoniidae, nephtheidae and xeniidae family.

**Objective:** To investigate the bioactivity of Nitric Oxide (NO) inhibitor release from soft coral crude extracts of *Simularia* sp. (SCA), *Nephthea* sp. (SCB), *Sarcophyton* sp. (SCC), *Sarcophyton* sp. (SCD), *Simularia* sp. (SCE) and *Simularia* sp. (SCF).

**Materials and Methods:** Soft coral is collected from Palu Bay (Central Sulawesi). NO inhibitory release activity measured according to the Griess reaction. Soft corals sample macerated with 1:2 (w/v). Then, Soft coral extracts with the best NO Inhibitor activity partitioned with Dichloromethane, Ethyl acetate, and n-butanol. The bioactive of all crude extracts were identified by GC-MS to find compounds with anti-inflammatory potential.

**Results:** *Sarcophyton* sp. (SCC) and *Simularia* sp. (SCF) are able to inhibit NO concentrations of  $0.22 \pm 0.04$  and  $0.20 \pm 0.04$   $\mu$ M at 20 mg/mL, respectively. The chemical constituents determined and showed the potential as anti-inflammatory in the crude of *Simularia* sp. (SCA) were Octacosane (3.25%). In *Nephthea* sp., (SCB) were Cyclohexene, 6-ethenyl-6-methyl-1-(1-methylethyl)-3-(1-methylethylidene)-, (S)- (0.55%); Azulene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethylidene)-, (1S-cis)- (0.53%); and 1,7,7-Trimethyl-2-vinylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene (4.72%). In *Sarcophyton* sp. (SCC) were Eicosane (0.12%); Nonacosane (10.7%); 14( $\beta$ )-Pregnane (0.87%); Octacosane 6.39%; and Tricosane (1.53%). In *Sarcophyton* sp. (SCD) were 14( $\beta$ )-Pregnane (2.69%); and Octadecane (27.43%). In crude of *Simularia* sp. (SCE) were Oleic Acid (0.63%); 7,10-Hexadecadienoic acid, methyl ester (0.54%); 14( $\beta$ )-Pregnane (1.07%); 5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, ethyl ester, (all-Z)- (4.60%); Octacosane (7.75%); and 1,2-Benzisothiazole, 3-(hexahydro-1H-azepin-1-yl)-, 1,1-dioxide (1.23%). In the crude of *Simularia* sp., (SCF) were Oxirane, decyl- (1.38%); Nonacosane (0.57%); Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethenyl)- (0.61%); 14B-Pregnane (0.76%); and Tetratriacontane (1.02%).

**Conclusion:** The extract of *Sarcophyton* sp. (SCC) and *Simularia* sp. (SCF) showed the best NO inhibitory release activity. This study is making soft corals from Central Sulawesi, Indonesia can become a potential organism in the discovery and development of bioactive substances anti-inflammatory.

**Keywords:** Central Sulawesi, natural product, *Nephthea*, nitric oxide, *Sarcophyton*, *Simularia*.

\*Address correspondence to these authors at the Faculty of Fisheries and Marine Science, Postgraduate Program, Brawijaya University, Malang, East Java, 65145, Indonesia; Tel/Fax: +62 341 559 054; E-mails: [risjani@ub.ac.id](mailto:risjani@ub.ac.id); [wendytanod@stplpalu.ac.id](mailto:wendytanod@stplpalu.ac.id)

1875-614X/19 \$58.00+00 © 2019 Bentham Science Publishers

<http://www.antiinflammatoryantiallergyagentsinmedicinalchemistry.com/articles/170150/screening-of-no-inhibitor-release-activity-from-soft-coral-extracts-origin-palu-bay-central-sulawesi-indonesia>





## DPPH scavenging property of bioactives from soft corals origin palu bay, Central Sulawesi, Indonesia

W A Tanod<sup>1,2</sup>, U Yanuhar<sup>1</sup>, Maftuch<sup>1</sup>, D Wahyudi<sup>2</sup> and Y Risjani<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Brawijaya University, Malang, East Java 65165, Indonesia

<sup>2</sup>Institute of Fisheries and Marine (Sekolah Tinggi Perikanan dan Kelautan), Palu, Central Sulawesi 94118, Indonesia

\*Corresponding author: risjani@ub.ac.id


**Abstract.** Antioxidants is a substance widely explored and sought after, due to the increase of free radicals in the human body, is very closely linked to the human degenerative disease. Soft corals are also reported to produce compounds that show antioxidant activity. This research aimed to examine the antioxidant and profile bioactive of six soft corals species from three genera *Simularia*, *Sarcophyton* and *Nephthea* origin Palu Bay, Central Sulawesi. The antioxidant activity was measured by the DPPH radical scavenging method. Profile bioactive were identified using GC-MS spectra analysis. The results of IC<sub>50</sub> analysis showed the crudes of soft corals belonging to the very strong antioxidant activity. *Simularia* sp. (SCA) has the highest (IC<sub>50</sub> = 10.708 ± 0.374 µg/mL). The GC-MS analysis showed 2-Dodecen-1-yl (-) succinic anhydrid; Hexadecanoic acid, methyl ester; Bacchotricuneatin c; L - (+) - Ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate; 14 (β) -Pregnane; Octacosane; Heptacosane; and Tetrapentacotane, 1,54-dibromoare common compounds that have the potential as antioxidants. This study provides on the potential soft corals origin Palu Bay, Central Sulawesi as a source of antioxidant. This study also shows the compounds in soft coral according to GC-MS. This is a new report of antioxidant substances from *Nephthea* sp. origin of Indonesian oceans.

### 1. Introduction

The oceans are a source of natural products and new active components with a variety of biological activity, which may be useful as a raw material drug with efficacy and function in the treatment of human disease. There are many benefits from various marine organisms for medicinal sources, such as algae [1] and marine bacterias[2]. Soft coral, although it has benefit for ecological function, also has important medicinal sources. Soft corals are invertebrate organisms inhabitants of the coral reef ecosystem, which utilizes chemical compounds or substances in life[3]. Soft corals are known rich sources of natural products that have unique and diverse structures and unusual biological activity[4].

Soft corals are included in cnidarians phylum, class of Anthozoa, Octocoralliasubclass is a soft-bodied animal and live with environmental stresses, such as competition of space, light, and other sources that cause soft corals produce a variety of chemical compounds as a defense [5]. The Octocorallia subclass contained 3200 soft coral species (Alcyonacea) and found 94% of new compounds from the cnidarian phylum[6].

The literature study shows a biological potential of bioactive compounds soft coral genus *Simularia*, *Sarcophyton*, and *Nephthea*, among other anti-cancer [7], cytotoxic [8], antimetabolic [9], anti-inflammatory [10], antibacterial [11] and antioxidants [12]. Bioactive antioxidants are substances that

 Content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/). Any further distribution of this work must maintain attribution to the author(s) and the title of the work, journal citation and DOI.

Published under licence by IOP Publishing Ltd

1

<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/236/1/012121>