

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK SELEDRI TERHADAP
KADAR TNF- α DAN EKSPRESI CASPASE-3 OTAK PADA
KERACUNAN TIMBAL**

(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Terpapar Timbal Asetat 14 Hari)

TESIS

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S2



Disusun Oleh:
Sona Sulistyio
MBK. 2016010217

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2022**

HALAMAN PENGESAHAN

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK SELEDRI TERHADAP
KADAR TNF- α DAN EKSPRESI CASPASE-3 OTAK PADA
KERACUNAN TIMBAL
(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Terpapar Timbal Asetat
14 Hari)**

Diajukan oleh :

Sona Sulistyo

MBK. 2016010217

Telah disetujui oleh :

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Dr. dr.Hadi Sarosa, M.Kes

Dr.Ir.Titiiek Sumarawati, M.Kes

NIK. 210101059

NIK. 220198045

Mengetahui,

Ketua Program Studi magister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Unissula

Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med

NIK. 210199050

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar Pustaka.

Semarang, 13 September 2022



(Sona Sulistyoy)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Sona Sulistyو
Tempat / tanggal lahir : Bekasi / 29 Oktober 1988
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Islam Bani Saleh 2 Bekasi
2. SD Islam Bani Saleh 2 Bekasi
3. SMP Islam Al-Azhar 8 Kemang Pratama Bekasi
4. SMA Islam Al-Azhar 4 Kemang Pratama Bekasi

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : Ir. H Bambang Sulistyو, MM, MBA
Ibu : Alm Hj Maskinah, SE
2. Nama Suami : dr Rizky Satriawan Pikulun
3. Nama Anak : a. Muhammad Reynard Pikulun,
b. Benjamin Jusuf Pikulun

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, sehingga tesis berjudul, **“PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK SELEDRI TERHADAP KADAR TNF- α DAN EKSPRESI CASPASE-3 OTAK PADA KERACUNAN TIMBAL (Studi Eksperimental *In Vivo* pada Tikus Terpapar Timbal Asetat 14 Hari)”** ini dapat terselesaikan.

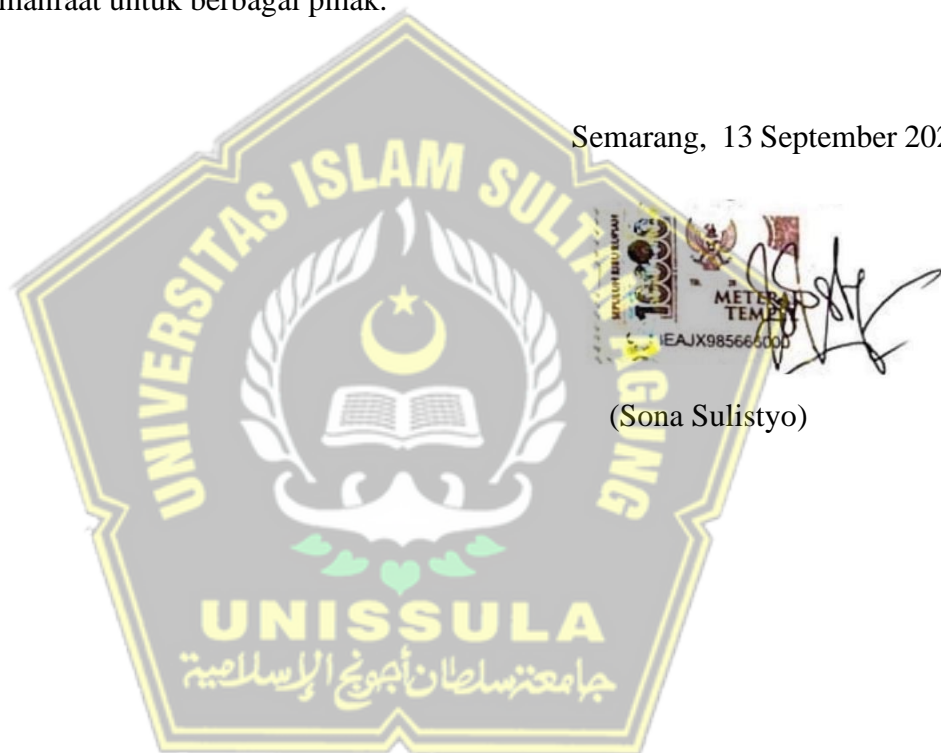
Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto., SH., M. Hum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rector yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc.Prof.Dr.dr.Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
4. Dr.dr.Hadi Sarosa, M.Kes selaku dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.
5. Dr.Ir.Titiek Sumarawati, M.Kes selaku dosen pembimbing II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.
6. Seluruh tenaga pendidik di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan tesis.

7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak.

Semarang, 13 September 2022



ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK SELEDRI TERHADAP KADAR TNF- α DAN EKSPRESI CASPASE-3 OTAK PADA KERACUNAN TIMBAL

Latar belakang: Paparan timbal secara kronis menyebabkan keracunan timbal yang menginduksi inflamasi dan kematian sel, seperti jaringan otak. Seledri (*Apium graveolens L*) mengandung senyawa antioksidan yang terbukti dapat menurunkan kadar ROS yang dapat menekan produksi sitokin proinflamasi serta penghambatan apoptosis sel otak. Namun demikian, belum ada penelitian yang mengkaji pengaruh pemberian ekstrak seledri dalam mencegah kerusakan otak yang disebabkan paparan timbal. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh seledri dalam menurunkan kadar TNF- α serta menghambat apoptosis sel-sel otak yang ditandai dari penurunan ekspresi Caspase-3 otak pada tikus yang dipapar timbal.

Metode: Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design*. Penelitian ini terdiri dari empat kelompok yaitu kelompok sehat, kelompok kontrol negatif (Pb asetat 200mg/kgBB), kelompok kontrol positif (Vitamin E 50IU/kgBB) dan kelompok perlakuan (ekstrak seledri 300mg/kgBB) yang diberikan bersama-sama secara peroral selama 14 hari. Pada hari ke 15 dilakukan terminasi dan dianalisis kadar TNF- α dengan ELISA dan ekspresi caspase-3 dengan IHC. Data yang diperoleh dianalisis dengan statistik non parametrik *Kruskal Wallis* dan uji beda *mann whitney*.

Hasil: Pada Penelitian ini diperoleh hasil ekspresi Caspase-3 pada kelompok perlakuan lebih rendah ($18,69 \pm 2,26$) dari pada kontrol negatif ($29,97 \pm 1,95$), namun kadar TNF- α pada kelompok kontrol positif ($14,69 \pm 0,16$) memilih tren lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan.

Kesimpulan: Pemberian ekstrak seledri berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan kadar TNF- α dan ekspresi caspase-3 pada tikus model yang diinduksi Timbal asetat.

Kata Kunci: Caspase-3, Ekstrak Seledri, Vitamin E, TNF- α , Timbal Asetat

ABSTRACT

THE EFFECT OF CELERY EXTRACT ON TNF- α LEVELS AND CASPASE-3 EXPRESSION IN LEAD POISONING RAT MODELS

Background: Chronic exposure to lead causes lead poisoning that induces inflammation and cell death, such as brain tissue. Celery (*Apium graveolens* L) contains antioxidant compounds that have been shown to reduce ROS levels which can suppress the production of pro-inflammatory cytokines and inhibit brain cell apoptosis. However, there have been no studies that have examined the effect of celery extract in preventing brain damage caused by lead exposure. Therefore, this study aims to examine the influence of celery in reducing TNF- α levels and inhibiting apoptosis of brain cells characterized by a decrease in brain Caspase-3 expression in lead-exposed mice.

Method: The design of this study is an experimental study with a post test only control group design. This study consisted of four groups, namely the healthy group, the negative control group (Pb asetat 200mg /kgBB), the positive control group (Vitamin E 50IU / kgBB) and the treatment group (300mg / kgBB celery extract) which was given together perorally for 14 days. On the 15th day, termination was carried out and TNF- α levels were analyzed with ELISA and caspase-3 expression with IHC. The data obtained were analyzed with kruskal Wallis non-parametric statistics and mann whitney difference test.

Results: In this study, the results of Caspase-3 expression in the treatment group were lower (18.69 ± 2.26) than negative controls (29.97 ± 1.95), but TNF- α levels in the positive control group (14.69 ± 0.16) chose a lower trend compared to the treatment group.

Conclusion: The administration of celery extracts significantly affected the decrease in TNF- α levels and caspase-3 expression in lead acetate-induced rat models.

Keywords: Caspase-3, Celery Extract, Vitamin E, TNF- α , Lead Acetate

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	3
1.4. Originalitas Penelitian.....	3
1.5. Manfaat penelitian.....	6
1.5.1. Manfaat Teoritis.....	6
1.5.2. Manfaat Praktis.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Inflamasi.....	7
2.1.1. Definisi.....	7
2.1.2. Hubungan Faktor Inflamasi dan Apoptosis.....	8
2.2. Caspase-3.....	9
2.2.1. Definisi Caspase-3.....	9
2.2.2. Peran Caspase dalam Apoptosis.....	10
2.2.3. Aktivasi dan Mekanisme Seluler Caspase-3 dalam Apoptosis..	11
2.3. TNF- α	12
2.3.1. Definisi TNF- α	12
2.3.2. Aktivitas TNF- α	12
2.4. Logam Berat Timbal.....	13
2.4.1. Definisi dan Karakteristik Timbal.....	13
2.4.2. Sumber Paparan Timbal.....	14
2.4.3 Toksikokinetika Timbal Pada Tubuh.....	14

2.5.	Otak	13
2.5.1	Definisi Otak	16
2.5.2	Pengaruh Timbal pada Otak.....	17
2.5.3	Prevalensi Keracunan Timbal pada Otak	18
2.6.	Seledri.....	20
2.6.1.	Morfologi dan Habitat Tanaman Seledri.....	20
2.6.2.	Klasifikasi Tanaman Seledri	21
2.6.3.	Kandungan Senyawa Fitokimia Tanaman Seledri	21
2.6.4.	Pengaruh Tanaman Seledri terhadap Tnf- α dan Caspase-3	23
2.7.	Vitamin E	25
2.7.1.	Definisi dan Struktur	25
2.7.2.	Sumber	25
2.7.3.	Fungsi Vitamin E	26
2.7.4.	Pengaruh Vitamin E Terhadap Otak	27
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS ...		29
3.1.	Kerangka Teori.....	29
3.2.	Kerangka Konsep	31
3.3.	Hipotesis.....	31
BAB IV METODE PENELITIAN.....		32
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	32
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	33
4.2.1.	Variabel Penelitian	33
4.2.2.	Defenisi Operasional	33
4.3.	Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian	34
4.3.1.	Subyek Penelitian.....	34
4.3.2.	Sampel Penelitian.....	34
4.3.3.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	35
4.3.4.	Besar Sampel.....	35
4.4.	Alat dan Bahan	36
4.4.1.	Alat.....	36
4.4.2.	Bahan.....	36
4.5.	Cara Penelitian	36
4.5.1.	Perolehan Ethical Clearance	36
4.5.2.	Cara Pembuatan Ekstrak Seledri.....	36
4.5.3.	Penetapan Dosis	37
4.5.4.	Pembuatan Paparan Timbal dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	37
4.5.5.	Pengambilan Sampel Plasma Darah.....	38
4.5.6.	Perhitungan Kadar TNF- α	38
4.5.7.	Pengambilan Sampel Jaringan	39

4.5.8. Pembuatan Blok Parafin.....	39
4.5.9. Pengecatan Caspase-3	40
4.6. Tempat dan Waktu Penelitian	42
4.7. Analisa Data	42
4.8. Alur Penelitian.....	43
BAB V Hasil Pembahasan	43
5.1. Hasil Penelitian.....	44
5.1.1. Efek Pemberian Ekstrak Seledri Terhadap Kadar TNF- α pada Otak Tikus yang Diinduksi Timbal.....	40
5.1.2. Efek Pemberian Ekstraksi Seledri Terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Otak Tikus yang Diinduksi Timbal	49
5.2. Pembahasan	52
5.3. Kelemahan Penelitian.....	54
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....	55
6.1. Simpulan.....	55
6.2. Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	69



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kerangka Teori.....	30
Gambar 2. Kerangka Konsep	31
Gambar 3. Alur Rancangan Renelitian	32
Gambar 4. Alur penelitian.....	43



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Originalitas Penelitian..... 3

Tabel 2. Definisi Operasional**Error! Bookmark not defined.**



DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: <i>Adrenocorticotrophic Hormone</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-presenting Cell</i>
APAF1	: <i>apoptotic protease activating factor 1</i>
BAX	: <i>Bcl-2-associated X</i>
BBB	: <i>blood-brain barrier</i>
BBL	: <i>blood lead level</i>
BCB	: <i>blood-cerebrospinal fluid barrier</i>
Bcl-2	: <i>B-cell lymphoma-2</i>
bFGF	: <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
bHLH-LZ	: <i>Basic Helix-loop-helix-leucine Zipper</i>
BSC	: <i>Biosafety Cabinet</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CREB	: <i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
(Cyt-C)	: <i>cytochrome c</i>
DISC	: <i>death-inducing signaling complex</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EGFR	: <i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FADD	: <i>Fas-associated death domain</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
MAPK	: <i>mitogen-actives protein kinases.</i>
NF-kB	: <i>Nuclear factor kappa beta</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
PAF	: <i>Platelet activating factor</i>
PKC	: <i>protein kinase C</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SOD	: <i>superoxide dismutase</i>
TH	: <i>tyrosine hydroxylase</i>
TNF- α	: <i>Tumor necrotic factor alpha</i>
TRAIL	: <i>TNF-α Receptor Apoptosis Inducing Ligand</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Timbal (Pb) merupakan salah satu polutan berbahaya di dunia dan paparannya bersifat *multi-target toxicant* yang memicu timbulnya berbagai gangguan neurologis, seperti kurangnya koordinasi otot, kejang, dan koma.¹⁻
² Timbal yang masuk kedalam tubuh melalui oral akan diserap oleh usus halus dan beredar ke seluruh organ termasuk otak.² Penumpukan Timbal dalam otak meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang memicu produksi sitokin proinflamasi termasuk *tumor necrotic factor alpha* (TNF- α) melalui aktivasi jalur faktor transkripsi *nuclear factor kappa beta* (NF-kB).² Aktivasi jalur NF-kB juga menyebabkan pelepasan protein proapoptosis seperti Caspase-3.³ Akibat paparan timbal dapat dihambat dengan penggunaan senyawa antioksidan alami seperti yang banyak ditemukan pada tanaman seledri (Sitasi).⁴ Seledri (*Apium graveolens L*) mengandung beberapa jenis senyawa golongan flavonoid dan fenolik yang bersifat antioksidan.⁵ Senyawa antioksidan terbukti dapat menurunkan kadar ROS yang dapat menekan produksi sitokin proinflamasi serta penghambatan apoptosis sel otak.⁶ Namun demikian, belum ada penelitian yang mengkaji pengaruh pemberian ekstrak seledri dalam mencegah kerusakan otak yang disebabkan paparan timbal.

Keracunan akibat timbal dapat menyebabkan kerusakan saraf sebesar 4-8% dari total insiden keracunan timbal.⁷ Timbal secara luas terbukti sebagai neurotoksikan kuat hingga dapat menyebabkan ensefalopati timbal.^{8,9,10} Keracunan timbal pada kadar 38 $\mu\text{g/dL}$ darah dapat menyebabkan

ensefalopati kronis.¹¹ Beberapa penelitian terdahulu telah melaporkan mengenai efek toksisitas timbal pada tindakan kognitif dan telah ditetapkan bahwa paparan timbal pada tingkat rendah dapat menyebabkan perubahan neuropatologis berkelanjutan, masalah perilaku, dan gejala gangguan *attention-deficit hyper active*, seperti *inattention* dan *impulsivity*.^{12,13,14} Paparan timbal juga meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti TNF- α di jaringan saraf yang dapat mengakibatkan kematian sel-sel saraf yang berhubungan dengan pembelajaran dan memori pada otak melalui aktivasi Caspase-3.¹⁵

Sumber antikoksidan kuat seperti tanaman seledri, karena kandungan berbagai senyawa metabolit sekunder seperti apigenin, tanin, L-3-n-butylphthalide, sedanolide, asam linoleat, flavonoid, senyawa fenolik dan minyak atsiri yang terdapat hampir di semua bagian tanaman termasuk akar, daun dan biji.¹⁶ Penelitian Chonpathompikunlert di tahun 2018 melaporkan bahwa ekstrak seledri dapat memperbaiki *behavioral performance* dengan mediasi neuroproteksi melalui efek antioksidan, jalur neurotransmitter terkait dan peningkatan jumlah neuron dopaminergic.¹⁷ Saat ini, pengaruh Seledri dalam menghambat kerusakan otak akibat paparan timbal belum diteliti. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh seledri dalam menurunkan kadar TNF- α serta menghambat apoptosis sel-sel otak yang ditandai dari penurunan ekspresi Caspase-3 otak pada tikus yang dipapar timbal.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah tersebut, Rumusan Masalah pada penelitian ini adalah “Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak seledri terhadap kadar TNF- α dan ekspresi Caspase-3 pada otak tikus model terpapar timbal?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak seledri terhadap kadar TNF- α dan ekspresi Caspase-3 otak pada tikus yang keracunan timbal.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak seledri dosis 300 mg/kgBB terhadap kadar TNF- α pada otak tikus yang terpapar timbal dibandingkan kontrol.
2. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak seledri dosis 300 mg/kgBB terhadap ekspresi caspase-3 pada otak tikus yang terpapar timbal dibandingkan kontrol.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Variabel Bebas	Variabel Tergantung	Hasil
1.	Abu-Taweel et al, 2020 ¹⁸	<i>Celery ameliorating against neurobehavioral and neurochemical disorders of perinatal</i>	Ekstrak Seledri	Kemampuan kognitif	Terjadi peningkatan kemampuan kognitif tikus perlakuan

		<i>lipopolysaccharides exposure in mice offspring</i>				
2.	Qiao et al., 2020	<i>Antiliver Fibrosis Screening of Active Ingredients from Apium graveolens L. Seeds via GC-TOF-MS and UHPLC-MS/MS</i>	Ekstrak biji seledri	Tingkat proliferasi hepar		Terdapat kemampuan antifibrotik pada biji seledri
3	Fu et al., 2021 ²⁰	<i>Neuroprotective effect of apigenin against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats via activation of the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway</i>	Apigenin	PI3K, Nrf2	Akt,	Apigenin mampu melindungi system saraf otak dengan mengaktivasi PI3K, Akt dan Nrf2
4	Masoud et al., 2020 ²¹	<i>The neuroprotective effects of natural antioxidant against brain injury induced by paracetamol in a rat model of protein malnutrition</i>	Apigenin	serotonin, catecholamines, gamma-aminobutyric acid, dan cholinesterase		Terjadi perbaikan kadar serotonin, catecholamines, gamma-aminobutyric acid, dan cholinesterase
5	Wu et al., 2010 ²²	<i>Vitamin E protects against oxidative damage and learning disability after mild traumatic brain injury in rats</i>	Vitamin E dan turunan Vitamin E	BDNF, SOD		Terjadi peningkatan kadar SOD dan BDNF yang mengindikasikan adanya perbaikan otak
6	Al-attar, 2011 ²³	<i>Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to</i>	Vitamin E	ALT, GGT	AST,	Dosis vitamin E 50 IU/kgBB mencegah

lead, mercury, cadmium and copper in albino mice	efek timbal dalam menyebabkan <i>liver injury</i>
--	---

Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa penelitian yang mengkaji pengaruh pemberian ekstrak seledri serta senyawa apigenin yang terkandung di dalam seledri terhadap perlindungan sistem syaraf telah beberapa kali dilakukan. Penelitian sebelumnya menemukan adanya pengaruh ekstrak seledri dalam memperbaiki kemampuan kognitif tikus yang memiliki kerusakan syaraf pada mencit.¹⁸ Selain itu penelitian yang mengkaji kandungan apigenin merupakan salah satu senyawa yang banyak ditemukan di seledri dengan adanya peran dalam perlindungan sistem syaraf pada tikus yang mengalami kerusakan otak.^{24,25} Penelitian lain juga menemukan adanya peran vitamin E dalam melindungi fungsi otak.²⁶ Penelitian sebelumnya menggunakan vitamin E dengan dosis 50 IU/kgBB sebagai kontrol positif untuk mencegah kerusakan hepar akibat paparan timbal.²³ Berdasarkan data tersebut, penelitian untuk mengkaji pengaruh ekstrak Seledri terhadap kadar TNF- α dan Ekspresi Caspase-3 otak pada tikus yang terpapar timbal belum dilakukan, sehingga penelitian dengan “Pengaruh Pemberian Ekstrak Seledri terhadap Kadar TNF- α dan Ekspresi Caspase-3 Otak pada Keracunan Timbal : Studi ekspreimental *in vivo* Tikus Terpapar Timbal Asetat 14 Hari” yang akan dilakukan masih layak untuk diteliti karena memiliki keterbaruan.

1.5. Manfaat penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Manfaat teoritis yang terdapat dari penelitian ini adalah adanya informasi pengaruh ekstrak Seledri terhadap kadar TNF- α dan Ekspresi Caspase-3 otak tikus yang terpapar timbal bagi masyarakat.

1.5.2. Manfaat Praktis

Manfaat praktis penelitian ini adalah digunakannya ekstrak seledri menjadi bahan adjuvant pada terapi kerusakan otak akibat paparan timbal.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Inflamasi

2.1.1. Definisi

Peradangan adalah respons sistem kekebalan terhadap rangsangan berbahaya seperti patogen, sel rusak, senyawa beracun atau radiasi dan bertindak dengan menghilangkan rangsangan yang merugikan serta memulai proses penyembuhan.^{27, 28} Selama respons inflamasi akut, peristiwa interaksi seluler dan molekuler secara efisien meminimalkan cedera atau infeksi yang akan datang. Proses mitigasi ini berkontribusi pada pemulihan homeostasis jaringan dan resolusi peradangan akut. Namun, peradangan akut yang tidak terkontrol dapat menjadi kronis dan berkontribusi pada berbagai penyakit inflamasi kronis.

Pada tingkat jaringan, inflamasi ditandai dengan kemerahan, pembengkakan, panas, nyeri, dan hilangnya fungsi jaringan yang diakibatkan oleh respon imun lokal, vaskular dan sel inflamasi terhadap infeksi atau cedera. Peristiwa mikrosirkulasi penting yang terjadi selama proses inflamasi termasuk perubahan permeabilitas vaskular, rekrutmen dan akumulasi leukosit, dan pelepasan mediator inflamasi. Berbagai faktor patogen seperti infeksi, cedera jaringan, atau infark jantung dapat menyebabkan peradangan yang menyebabkan kerusakan jaringan. Etiologi peradangan dapat menular atau tidak menular. Menanggapi cedera jaringan, tubuh memulai kaskade sinyal kimia yang merangsang respons yang ditujukan untuk menyembuhkan jaringan yang terkena. Sinyal ini mengaktifkan kemotaksis leukosit dari sirkulasi umum

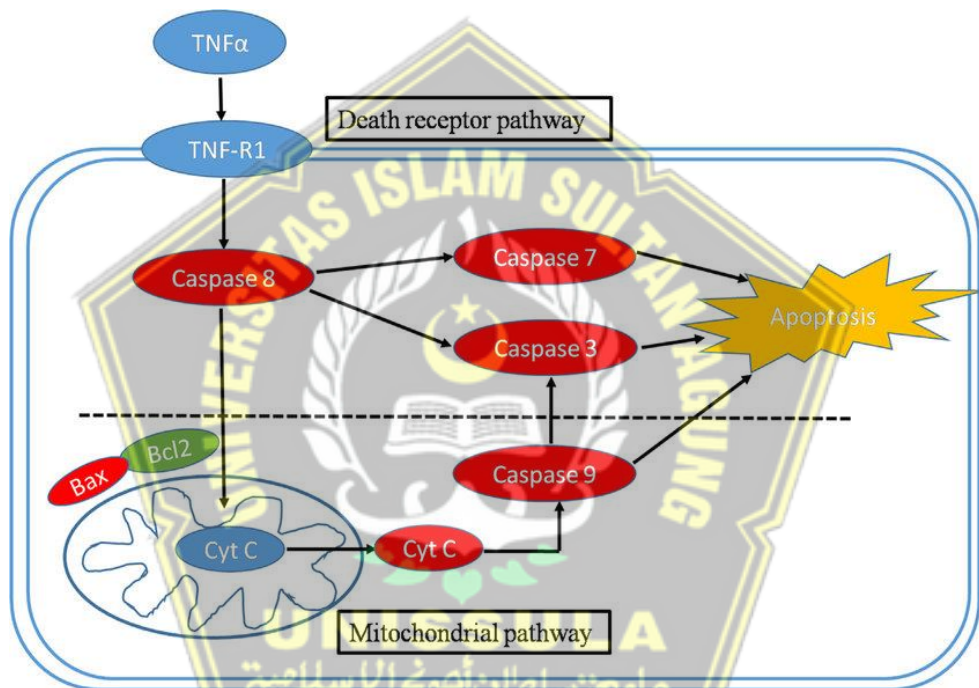
ke tempat kerusakan. Leukosit yang teraktivasi ini menghasilkan sitokin yang menurunkan respon inflamasi.

2.1.2. Hubungan Faktor Inflamasi dan Apoptosis

Faktor inflamasi utama pada tubuh adalah monosit/makrofag, limfosit B dan T, sel natural killer (NK), dan granulosit.²⁹ Reaksi inflamasi juga sangat bergantung pada faktor humoral, yang meliputi koagulasi plasma; kinin dan sistem komplemen; induksi bahan kimia intraseluler (histamin, serotonin, dan enzim lisosom); dan mediator inflamasi spesifik, seperti prostaglandin, leukotrien, *platelet activating factor* (PAF), dan berbagai sitokin seperti TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-15, dan IFN γ . Mediator yang bertanggung jawab untuk proses inflamasi dapat dibagi lagi menjadi mediator awal yaitu TNF- α , IL-1, IL-6, dan IL-8 yang dikenal sebagai aktivator, dan mediator sekunder seperti metabolit asam arakidonat, protease, spesies oksigen reaktif—ROS, nitric oxide—NO), yang dikenal sebagai mediator efektor. Mediator sekunder secara langsung bertanggung jawab atas kerusakan fungsional dan struktural sel.³⁰

Kondisi stress oksidatif menginduksi aktivasi TNF- α melalui aktivasi faktor transkripsi NF-kB. TNF- α yang aktif dimediasi melalui dua reseptor sel yang berbeda yaitu TNFR1 dan TNFR2. TNFR1 dapat menginisiasi sinyal ekstraseluler melalui ligasi dengan “reseptor kematian”, yang merupakan subset dari superfamili reseptor TNF. TNFR1 kemudian mengaktifkan caspase-8 untuk memulai kaskade caspase termasuk pembelahan procaspase-3 atau procaspase-7 yang akhirnya menghasilkan apoptosis (Gambar 2.1.). Tingkat transkripsi caspase-8, caspase-3 dan caspase-7 mRNA meningkat dan

mengaktifkan caspase-3 untuk menginduksi apoptosis. TNF- α juga regulasi jalur mitokondria, dengan menyebabkan penurunan ekspresi Bcl-2 dan peningkatan Bax mengakibatkan pelepasan Sitokrom C ke dalam sitoplasma, dimana Sitokrom C mengikat Apaf-1 untuk membentuk badan apoptosis kecil dan aksi silangnya dengan procaspase-9 menyebabkan aktivasi procaspase-9 oleh pembelahan proteolitik.³¹ Caspase-9 sebaliknya membelah dan mengaktifkan procaspase-3.³² Akhirnya, caspase-3 mengeksekusi apoptosis.³³



Gambar 2.1. Mekanisme TNF- α dalam menginduksi pensinyalan apoptosis

2.2. Caspase-3

2.2.1. Definisi Caspase-3

Caspase-3 adalah protein yang relatif kecil yang terdiri dari 2 subunit, subunit 12- dan 17-kDa yang masing-masing mengandung 3 dan 5 fungsi tiol. Aktivasi caspase-3 tergantung pada dimerisasinya menjadi heterotetramer, di mana Cys-285 yang diaktifkan histidin di situs aktif subunit p17 conserved

dalam superfamili caspase dan diperlukan untuk aktivitas enzimatik. Peran caspase-3 dalam apoptosis adalah untuk membelah dan mengaktifkan caspases-6, caspase-7, dan caspase-9 untuk memecah sel-sel apoptosis sebelum dikeluarkan. Setelah proses ini, protein caspase-3 dibelah dan dipecah sendiri oleh caspase-8 dan caspase-10. Pembelahan berurutan dan aktivasi protein ini sangat penting untuk tahap eksekusi apoptosis.³⁴

2.2.2. Peran Caspase dalam Apoptosis

Caspases adalah keluarga protease sistein yang berfungsi sebagai efektor utama selama apoptosis untuk pembongkaran sebagian besar struktur seluler secara proteolitik, termasuk sitoskeleton, *cell junctions*, mitokondria, retikulum endoplasma, golgi, dan nukleus.³⁵ Apoptosis adalah bentuk kematian sel terprogram yang menghilangkan sel-sel individu dalam suatu organisme dalam mempertahankan struktur keseluruhan jaringan di sekitarnya.³⁶ Di antara keseluruhan protein yang terlibat dalam aktivasi dan eksekusi apoptosis, protease atau caspases adalah pendorong utama kematian sel apoptosis, membelah protein seluler yang sangat penting untuk membongkar sel yang mati.³⁷

Caspases disintesis di dalam sel sebagai zimogen tidak aktif yang tidak memiliki aktivitas protease yang signifikan, sehingga caspases diregulasi ketika sintesis protein di mana caspases tidak diaktifkan hingga menerima rangsangan kematian tertentu.³⁸ Struktur utama caspases adalah prodomain amino-terminal dan domain protease carboxy-terminal yang mengandung *key catalytic cysteine residue*.³⁷ Caspases dikategorikan sebagai caspases inisiator atau efektor, berdasarkan posisinya dalam kaskade pensinyalan apoptosis.

Caspases inisiator (caspase-2, caspase-8, caspase-9, dan caspase-10) bekerja secara apikal dalam jalur kematian sel dan semuanya memiliki prodomain yang panjang dan serupa secara structural^{37,39} Sebaliknya, caspases efektor (caspase-3, caspase-6, dan caspase-7) memiliki prodomain yang lebih pendek dan ada di dalam sel sebagai homodimer yang terbentuk sebelumnya tetapi tidak aktif.⁴⁰

2.2.3. Aktivasi dan Mekanisme Seluler Caspase-3 dalam Apoptosis

Aktivasi Caspase-3 dapat melalui dua jalur apoptosis, yaitu jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik.⁴¹ Apoptosis intrinsik diinduksi oleh stres seluler, yang menyebabkan aktivasi protein B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family. Oligomer Bcl-2 homologous antagonist killer (BAK) dan Bcl-2-associated X (BAX) kemudian menurunkan pembentukan pore di membran luar mitokondria yang menyebabkan pelepasan berbagai intermembrane space proteins terjadi.^{42,43} Sitokrom C (Cyt-C) berikatan dengan *apoptotic protease activating factor 1* (APAF1), Menurunkan oligomerisasi APAF1 untuk membentuk apoptosom.^{44,45} Apoptosom merekrut procaspase-9, yang mengarah ke dimerisasi dan aktivasi Caspase-9. Aktivasi Caspase-9 merangsang kaskade caspase yang berpuncak pada aktivasi Caspase-3 dan Caspase-7. Jalur apoptosis ekstrinsik dirangsang melalui pengikatan ligan ke reseptor kematian yang sesuai dan recruitment *Fas-associated death domain* (FADD) ke death receptor terjadi.⁴⁶ FADD berasosiasi dengan procaspase-8/ procaspase-10 melalui domain efektor kematiannya untuk membentuk multiprotein *death-inducing signaling complex* (DISC) yang memfasilitasi pembelahan dan aktivasi Caspase-8.^{47,48} Jalur ekstrinsik kemudian dapat dilanjutkan melalui jalur

pensinyalan tipe I atau jalur pensinyalan tipe II. Dalam pensinyalan tipe I, Caspase-8 secara langsung memotong dan mengaktifkan Caspase-3 yang menyebabkan kematian sel. Dalam pensinyalan tipe II, Caspase-8 memotong Caspase-8-cleaved (BID) untuk mengaktifkan BAK dan BAX. Protein ini kemudian menurunkan pembentukan pore di mitokondria yang mengarah ke aktivasi kaskade caspase dan berpuncak pada aktivasi Caspase-3/ Caspase-7.⁴⁹

2.3. TNF- α

2.3.1. Definisi TNF- α

TNF- α merupakan salah satu faktor penanda inflamasi yang sebagian besar diproduksi oleh monosit, makrofag dan sel T. Molekul TNF- α memiliki berat molekul 51 kDa dan dibentuk oleh 212 asam amino homotrimers yang stabil.⁵⁰ Ekspresi dan pembentukan TNF- α tidak hanya dihasilkan oleh sel-sel hematopoetik saja, namun juga dapat diproduksi oleh sel mesangial, glomerulus, endotel, dendrit, sel tubulus otak yang merupakan sel intrinsic otak. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa TNF- α dapat disimpan di dalam sel dengan bentuk proaktif.

2.3.2. Aktivitas TNF- α

Peran TNF- α pada system imunologik adalah mengaktifasi sel limfosit T, serta meningkatkan ekspresi antigen MHC kelas I pada sel endotel dan fibroblast. Selain itu, TNF- α merupakan mediator utama yang berperan dalam proses peradangan dan juga sitotoksik bagi sel yang mengalami hambatan sintesis protein.⁵¹ Secara fisiologis TNF- α memiliki berbagai efek selain sebagai pro-inflamatory pada luka, TNF- α juga dapat memicu apoptosis sel dan

sebagai inhibited apoptosis.⁵² Hal tersebut dikarenakan kadar TNF- α yang dapat berpengaruh langsung pada sistem sel. Kadar TNF- α rendah (0,1 – 10 ng/ml) dapat menghambat apoptosis sel dengan menurunkan fragmentasi DNA sel. Sedangkan kadar TNF- α yang tinggi (100 ng/ml) dapat memicu apoptosis sel melalui jalur NF- κ B.⁵³ Apoptosis melalui jalur ini melibatkan protein reseptor CD95 atau reseptor Fas yang tergabung dalam TNF- α receptor family beserta TNF- α Receptor Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL). Keduanya membentuk jalur yang disebut extrinsic pathway atau *death receptor pathway*.⁵⁴ Jalur apoptosis melalui TNF- α ini selanjutnya akan mengaktifasi caspase dengan dimediasi oleh caspase-8 sampai mengaktifasi caspase-3. Caspase-3 merupakan caspase efektor yang meningkatkan sinyal apoptosis dengan mendisosiasi protein dan menginisiasi jalur caspase menjadi program kematian sel.⁵⁵

2.4. Logam Berat Timbal

2.4.1. Definisi dan Karakteristik Timbal

Timbal atau Plumbum (Pb) termasuk logam golongan IV A dalam tabel periodik unsur kimia dengan nomor atom 82, berat atom 207,2, berwarna kelabu kebiruan serta dapat menguap dan bereaksi dengan oksigen dalam udara membentuk timbal oksida pada suhu 550-600°C.⁵⁶ Timbal memiliki sifat fisiko-kimia seperti *softness*, *malleability*, *ductility*, konduktivitas rendah dan tahan terhadap korosi sehingga membuat penggunaan timbal pada berbagai produk industri yang semakin meningkat.⁵⁷ Karena sifatnya yang tidak dapat

terurai secara hayati dan penggunaan secara terus menerus, hal ini menyebabkan konsentrasinya terakumulasi di lingkungan.⁵⁸

Timbal dilaporkan menyebabkan stres oksidatif dengan menghasilkan pelepasan *reactive oxygen species* (ROS) seperti radikal superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil dan peroksida lipid.⁵⁹ Mekanisme stres oksidatif yang diinduksi timbal melibatkan ketidakseimbangan antara pembentukan dan penghilangan ROS dalam jaringan serta komponen seluler yang menyebabkan kerusakan pada membran, DNA, dan protein.⁶⁰ Timbal asetat meningkatkan peroksidasi lipid dan produksi oksida nitrat dengan pengurangan bersamaan dalam enzim antioksidan sebagai katalase dan superoksida dismutase.⁶¹ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa timbal Menurunkan peningkatan signifikan dalam ekspresi caspase-3 yang menunjukkan bahwa timbal Menurunkan terjadinya apoptosis.⁶²⁻⁶⁴

2.4.2. Sumber Paparan Timbal

Sumber paparan timbal berasal dari proses kegiatan industri tambang, peleburan logam, produksi baterai, radiator dan kabel. Kontaminasi timbal pada air minum dapat terjadi pada penggunaan pipa air yang terbuat dari logam^{65,66} Paparan timbal melalui sentuhan, konsumsi atau pun inhalasi dapat menyebabkan keracunan apabila terjadi secara terus menerus.⁶⁷

2.4.3. Toksikokinetika Timbal pada Tubuh

Timbal dapat diserap ke dalam tubuh melalui mulut (oral), saluran pernapasan, lambung dan bahkan beberapa senyawa. Timbal dapat menembus kulit, seperti timbal tetraetil, yang digunakan dalam bahan bakar sebagai zat anti-knock.^{68,69} Sekitar sepertiga dari asap timbal yang terhirup diserap dan

sepersepuluh dari timbal yang tertelan diserap.⁶⁸ Hal ini disebabkan karena Timbal merupakan suatu unsur yang ditemukan di udara sebagai partikel, sehingga Timbal tidak mengalami penguraian atau terdegradasi dan tidak dapat dihancurkan.⁷⁰

Paparan timbal tingkat tinggi dapat mengakibatkan gangguan kesehatan yang merugikan. Termasuk kerusakan pada sistem saraf, hati dan otak diantaranya anemia, hipertensi, penyakit kardiovaskular, defisiensi imun, infertilitas, masalah perkembangan termasuk defisit kognitif, ketidakmampuan belajar dan kehilangan memori.⁷¹ Paparan timbal dalam waktu lama telah dilaporkan menyebabkan anemia yang bersamaan dengan peningkatan tekanan darah terutama pada orang tua dan paruh baya. Kerusakan parah pada otak, baik pada orang dewasa maupun anak-anak ditemukan dengan paparan kadar timbal berat yang mengakibatkan kematian.⁵⁸

Paparan timbal yang berlebihan dapat menyebabkan berbagai gangguan neurologis seperti kurangnya koordinasi otot, kejang, dan koma.² Beberapa penelitian terdahulu telah melaporkan mengenai efek toksisitas timbal pada tindakan kognitif dan telah menetapkan bahwa paparan timbal bahkan pada tingkat rendah dapat menyebabkan perubahan neuropatologis yang berkelanjutan.^{11,13,72,73} yang dikaitkan dengan kecerdasan yang lebih rendah, masalah perilaku, dan gejala gangguan *attention-deficit hyper active*, seperti *inattention* dan *impulsivity*.^{12,13,14} Penelitian terdahulu melaporkan bahwa paparan timbal dapat meningkatkan sitokin proinflamasi seperti produksi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) di jaringan saraf yang dapat

mengakibatkan kerusakan saraf dalam keadaan neuropatologis yang berhubungan dengan pembelajaran dan memori pada otak.³

2.5 Otak

2.5.1 Definisi Otak

Otak adalah organ jaringan saraf yang memerintahkan respons yang ditimbulkan oleh tugas, indera, gerakan, emosi, bahasa, komunikasi, pemikiran, dan memori.^{74,75} Otak mewakili 2% dari berat badan dan mengonsumsi 15% dari cardiac output serta 20% dari total oksigen tubuh. The resting brain mengonsumsi 20% dari body's energy supply. Jika otak melakukan tugas, konsumsi energi meningkat 5% yang menunjukkan bahwa sebagian besar konsumsi energi otak digunakan untuk fungsi intrinsik dengan menggunakan glukosa sebagai sumber energi utama.⁷⁵

Otak merupakan organ dengan kompleksitas tinggi dan fungsi yang vital bagi kehidupan individu yang dilindungi oleh barriers yaitu *blood-brain barrier* (BBB), metabolisme dan transportasi khusus yang dibentuk oleh sel-sel endotel yang bergabung dengan *tight junctions* yang membentuk dinding kapiler disertai dengan astroglia, perisit, makrofag perivaskular, dan lamina basal.⁷⁶ Selain *blood-brain barrier* (BBB), otak juga dilindungi oleh *blood-cerebrospinal fluid barrier* (BCB) yang dibentuk oleh sel-sel *choroid plexus facing the cerebrospinal*, dan *barrier arachnoid* yang dibentuk oleh epitel arachnoid avascular.⁷⁷ Di antara fungsinya, BBB menyediakan lingkungan mikro yang stabil untuk fungsi saraf fisiologis untuk memastikan homeostasis otak. Dengan demikian, BBB melindungi jaringan otak untuk beregenerasi dari gangguan kimia serta kerusakan racun endogen dan eksogen.⁷⁸ *Blood-brain*

barrier (BBB) juga memungkinkan beberapa jalur permeasi untuk pemasukan atau pengeluaran zat ke dalam dan keluar dari sistem saraf pusat (SSP), yaitu difusi pasif untuk molekul lipofilik dan non-polar, pengangkut penghabisan yang termasuk pengangkut kaset pengikat adenosin trifosfat (ATP), pembawa zat terlarut untuk penggabungan nutrisi penting seperti transcytosis makromolekul dan pergerakan monocyte-lineage-cell dalam kondisi patologis.⁷⁹ Sejumlah racun termasuk logam, pestisida, mikotoksin, penyalahgunaan obat, dan obat terapeutik diketahui mengganggu morfologi atau fungsi BBB / BCB.⁸⁰

2.5.2 Pengaruh Timbal terhadap Otak

Beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa keracunan timbal dapat menyebabkan kerusakan pada sistem saraf melalui beberapa mekanisme.^{81,82} Efek neurotoksik timbal meliputi apoptosis dan eksitotoksisitas yang mempengaruhi penyimpanan neurotransmitter, pelepasan dan modifikasi reseptor neurotransmitter, mitokondria, second messenger, sel endotel serebrovaskular, astroglia dan oligodendroglia.

Efek morfologis timbal pada sistem saraf adalah mengubah perkembangan sistem saraf, terutama pada periode prenatal hingga masa kanak-kanak yang termasuk ke dalam gangguan *key molecules* selama migrasi dan diferensiasi neuronal, gangguan dengan pembentukan sinaps yang dimediasi oleh pengurangan produksi asam sialat neuronal, dan diferensiasi prematur sel glial.⁸³⁻⁸⁵ Sedangkan efek farmakologis timbal pada sistem saraf dihasilkan dari aksi timbal sebagai agen farmakologis di sistem sarap pusat (SSP). Timbal membatasi pelepasan neurotransmitter, mengganggu fungsi

sistem GABAergik, dopaminergik dan kolinergik serta menghambat saluran ion NMDA selama periode neonatal. Studi in vitro telah menunjukkan bahwa timbal mengaktifkan protein kinase C dalam sel kapiler dan menghambat Na^+/K^+ -ATPase sehingga mengganggu metabolisme energi. Timbal mengganggu pelepasan kalsium dari mitokondria yang mengakibatkan pembentukan pori transisi permeabilitas dan bilangan prima untuk proses kematian sel terprogram yang mengarah pada penghancuran diri mitokondria di dalam sel.

2.5.3 Prevalensi Keracunan Timbal pada Otak

Paparan timbal (Pb) yang merupakan salah satu polutan logam beracun, hingga saat ini masih menjadi perhatian global. Namun, dalam beberapa penelitian telah dilaporkan bahwa prevalensi keracunan timbal diremehkan di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah.⁵⁸ Berdasarkan Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), sekitar 63,2% dari perkembangan idiopatik, cacat intelektual, 10,3% penyakit jantung hipertensi, 5,6% penyakit jantung iskemik, dan 6,2% stroke terkait dengan paparan timbal.⁸⁶

Paparan timbal merupakan masalah kesehatan masyarakat terutama pada anak usia dini. Anak-anak lebih berisiko karena peningkatan aktivitas tangan ke mulut dan menyerap sekitar setengah dari dosis oral timbal yang larut dalam air.⁸⁷ Paparan timbal pada masa kanak-kanak diperkirakan berkontribusi pada 600.000 kasus baru anak dengan disabilitas intelektual setiap tahun dengan 99% yang di antaranya tinggal di negara berkembang.^{86,87} National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) juga memperkirakan prevalensi kadar timbal darah tinggi ($>10 \mu\text{g}/\text{dL}$) di antara anak-anak Amerika

Serikat menjadi 8,6% pada periode 1988-1991 dan 1,4% pada periode 1999-2004.⁷ Studi sebelumnya melaporkan bahwa kerusakan saraf akibat paparan timbal menyumbang sebanyak 4-8% dari total insiden keracunan timbal.⁸⁸

Insiden keracunan timbal dikaitkan dengan banyak faktor, termasuk status sosial ekonomi, ras, usia, dan tempat tinggal seseorang. Studi sebelumnya memperkirakan bahwa 16,4% anak-anak di kota-kota besar memiliki kadar timbal dalam darah yang tinggi.⁸⁸⁻⁹⁰ Meskipun timbal mempengaruhi orang-orang dari semua ras dan latar belakang sosial ekonomi, namun terdapat *lead burden* yang tidak proporsional pada kelompok minoritas dan rumah tangga berpenghasilan rendah.⁹¹ Dianalisis menurut latar belakang ras, persentase tertinggi anak-anak dengan kadar timbal darah lebih besar dari 5 g/dL adalah anak-anak Afrika-Amerika non-Hispanik (46,8%), diikuti oleh anak-anak Meksiko-Amerika (27,9%), dan anak-anak Kaukasia non-Hispanik (18,7%).^{7,92,93} Anak-anak berusia 1-5 tahun juga tampaknya berada pada risiko tambahan sekitar 9%.^{90,94}

Timbal secara luas diakui sebagai neurotoksikan yang kuat, yang dapat berlanjut pada ensefalopati timbal.⁹ Ensefalopati timbal umumnya digambarkan dengan munculnya manifestasi yang tiba-tiba termasuk sakit kepala parah, muntah, kejang, mental aberration dan kegembiraan. Meskipun kadar *blood lead level* (BLL) yang lebih tinggi dari 100 µg/dL umumnya menyertai ensefalopati timbal, bahkan pada kadar yang jauh lebih rendah yaitu 38 µg/dL juga dapat menyebabkan ensefalopati pada toksisitas kronis.⁹

2.5 Seledri

2.5.1. Morfologi dan Habitat Tanaman Seledri

Seledri atau *Apium graveolens* Linn. merupakan sayuran yang termasuk ke dalam famili Apiaceae. Seledri berasal dari daerah Mediterania di Eropa Selatan atau Mesir dan Swedia di mana habitat alaminya asin dan basah, atau tanah berawa di dekat pantai. Seledri dikenal sebagai Celeri dalam bahasa Prancis, Sellerie dalam bahasa Jerman, Apio dalam bahasa Spanyol, Salleri dalam bahasa Swedia, Karafs dalam bahasa Arab, Selderiji dalam bahasa Belanda, Sedano dalam bahasa Italia, Aipo dalam bahasa Portugis, Syelderey dalam bahasa Rusia, Serorjini dalam bahasa Jepang, Chin dalam bahasa Cina, Karnaulior Ajmod di India. Seledri mencakup tiga varietas taksonomi yang dibudidayakan, yaitu Celery (var. dulee), celeriac (var. rapaceum), dan smallage (var. secalinum).⁹⁵

Seledri memiliki tangkai berserat panjang yang meruncing menjadi daun. Tergantung pada lokasi dan kultivarnya, baik batang, daun atau hipokotilnya dapat dimakan dan digunakan sebagai sayuran, sedangkan bijinya digunakan untuk bumbu dan sebagai obat.^{95,96} Minyak atsiri yang diekstraksi dari biji seledri merupakan bahan penyedap utama dalam industri makanan yang digunakan untuk meningkatkan rasa dan aroma makanan jadi, sup, daging, saus, acar, dan jus sayuran.^{97,98}

Daun dan batang (petioles) seledri dikonsumsi terutama dalam keadaan mentah untuk salad atau dimasak dalam sup. Seledri terdiri dari berbagai konstituen yang baik untuk kesehatan. Ekstrak seledri dan konstituennya telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, antihipertensi, dan

antikanker serta kemampuan sebagai neuroprotektif.⁹⁹ Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak seledri dapat memperbaiki behavioral performance dengan memediasi neuroproteksi melalui efek antioksidan, jalur neurotransmitter terkait dan peningkatan jumlah neuron dopaminergic.^{17,100}

2.5.2. Klasifikasi Tanaman Seledri

Klasifikasi taksonomi tanaman seledri adalah sebagai berikut ¹⁰¹:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Magnoliospida (Dicotyledoneae)
Sub kelas	: Rosidae
Ordo	: Apiales
Famili	: Apiaceae
Genus	: Apium
Spesies	: Apium graveolens Linn.

2.5.3. Kandungan Senyawa Fitokimia Tanaman Seledri

Apium graveolens Linn. merupakan herba semusim yang termasuk dalam famili *Apiaceae*. Konstituen aktif utamanya adalah L-3-n-butylphthalide, sedanolide, asam linoleat, flavonoid, senyawa fenolik dan minyak atsiri, yang diekstraksi dari berbagai bagiannya termasuk akar, daun dan biji.^{97,98} Dari hasil penelitian Desty, Kusnadi dan Purgiyanti di tahun 2020 terbukti kandungan senyawa flavonoid total pada daun seledri sebanyak 50,39% sebanding dengan 50,39 mgQE/1000ppm/100 gram ekstrak seledri. Hal ini berarti bahwa senyawa flavonoid total pada ekstrak daun seledri

memiliki korelasi yang kuat terhadap aktivitas antioksidan.¹⁰² Beberapa penelitian terdahulu telah melaporkan aktivitas farmakologinya pada antimikroba, anti-inflamasi, anti-arthritis, antiulcerogenic, antihiperlipidemia, antioksidan dan antihipertensi.^{97,98,103} Penelitian Jittiwat di tahun 2021 melaporkan bahwa ekstrak seledri dapat mengurangi keparahan kerusakan kognitif dan memiliki efek neuroprotektif karena aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, dan anti-apoptosis akibat adanya senyawa polifenol, flavonoid (luteolin dan apigenin), tannin, terpenoid, steroid dan saponin yang dikandungnya.^{16,104,105}

Adanya senyawa-senyawa seperti limonene, selinen, glikosida furocoumarin, flavonoid, serta vitamin A dan C menjadi alasan bahwa seledri merupakan tumbuhan yang paling banyak digunakan dalam pengobatan tradisional.¹⁰⁶ Beberapa kandungan utama seledri yaitu selenine, limonene, apigenin, kaempferol, coumarin, luteolin, asam caffeic, asam p-coumaric, asam ferulic, tanin, saponin, dan kaempferol yang memiliki karakteristik antioksidan kuat untuk menghilangkan radikal bebas.¹⁰⁶ Berbagai senyawa fitokimia, terutama polifenol (seperti flavonoid, asam fenolik, dan tansipropanoid) bertanggungjawab untuk mengumpulkan radikal bebas dan aktivitas antioksidan tanaman.¹⁰⁷ Polifenol memiliki efek biologis, terutama aktivitas antioksidan yang merupakan induktor untuk menahan radikal bebas dan peroksidasi. Menurut penelitian terdahulu, akar seledri dan daunnya memiliki khasiat untuk menghilangkan radikal OH dan 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) dan juga mengurangi intensitas peroksidasi liposom yang mewakili perlindungan tanaman.^{91,92}

2.5.4. Pengaruh Tanaman Seledri terhadap Tnf- α dan Caspase-3

Ekstrak daun seledri dapat menurunkan apoptosis seluler dengan cara yang bergantung pada konsentrasi dan waktu melalui jalur yang dimediasi oleh caspase dan mitokondria.¹⁰⁸ Jalur kematian yang diprakarsai oleh mitokondria memainkan peran penting dalam memicu apoptosis sebagai respons terhadap rangsangan tersebut. Pada jalur kematian yang diprakarsai mitokondria, mitokondria yang mengalami transisi permeabilitas melepaskan protein apoptogenik atau faktor pemicu apoptosis dari ruang antar membran mitokondria ke dalam sitosol untuk mengaktifkan caspase-9, dan mengaktifkan caspase-9 pada gilirannya membelah serta mengaktifkan aljojo caspase-3. Aktivitas caspase-3, -8, dan -9 diregulasi, menunjukkan bahwa caspase berpartisipasi dalam proses apoptosis ini.^{108,96}

Tanaman seledri merupakan tanaman yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi karena adanya senyawa flavonoid dan fenolik didalamnya. Ekstrak batang, akar, dan daunnya dapat mendorong diferensiasi stem cell neuronal menjadi neuron dan sel pendukung seperti astrosit dan oligodendrosit.^{17,17} Salah satu senyawa yang terkandung dalam ekstrak seledri yang dapat mempromosikan mature neurons secara in vitro maupun in vivo adalah senyawa Apigenin. Selain itu, senyawa luteolin pada ekstrak seledri juga dapat menghambat lipopolysaccharide (LPS), yang mengurangi daur ulang dopamine (DA) dan mengganggu fungsi enzim tyrosine hydroxylase (TH) dalam jalur sintesis DA sel saraf dan glial secara in vitro serta dapat mengaktifkan sel-sel pendukung dan ekspresi faktor nekrosis tumor- α , oksida nitrat dan superoksida.^{17,25}

Penelitian terdahulu di tahun 2016 melaporkan bahwa 3-n-Butylphthalide (NBP) adalah salah satu senyawa fitokimia pada minyak seledri yang digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit seperti sistem saraf pusat, termasuk penyakit Parkinson, penyakit Alzheimer dan iskemia serebral. NBP menunjukkan efek neuroprotektif yang kuat dengan mengurangi kerusakan oksidatif, menghambat respons inflamasi, meningkatkan fungsi mitokondria, dan mengurangi apoptosis neuron.¹⁰⁹ Berbeda dengan yang dilaporkan oleh di tahun 2011, mekanisme NBP sebagai neuroprotektif adalah dengan memainkan peran anti-apoptosis melalui jalur apoptosis yang bergantung pada caspase atau tidak bergantung pada mitokondria. Pretreatment dengan NBP dapat secara signifikan meningkatkan viabilitas sel dari sel yang rusak dan mengurangi apoptosis neuron dengan men-downregulation Bcl-2, Bcl-w, dan PKC α serta melemahkan ekspresi berlebih dari Bax. Penelitian lain melaporkan bahwa NBP memiliki efek perlindungan pada kerusakan otak diabetes melalui peningkatan ekspresi faktor pertumbuhan endotel vaskular untuk menghambat apoptosis yang dimediasi caspase-3.¹¹⁰ Penelitian lain juga menunjukkan adanya peningkatan kadar Bcl-2 dan hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) ditambah dengan penurunan ekspresi caspase-3 setelah pemberian NBP. Penelitian Li dan Sun di tahun 2012 juga menyarankan pendekatan antiapoptosis baru dari NBP melalui aktivasi jalur pensinyalan phosphatidylinositide-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) dan kemungkinan regulasi c-Jun N-terminal kinase (JNK) dan p38 mitogen-actives protein kinases (MAPK). Selain itu, NBP juga dapat meningkatkan regulasi kadar HGF akibatnya menghambat jalur pensinyalan TLR4/NF-kB.¹¹¹

2.6. Vitamin E

2.6.1. Definisi dan Struktur

Vitamin E adalah istilah kolektif untuk empat tokoferol dan empat tokotrienol yang ditemukan dalam makanan. Bentuk-bentuk ini memiliki aktivitas antioksidan, tetapi tidak dapat diubah, dan hanya α -tokoferol yang memenuhi kebutuhan vitamin E manusia. Tokoferol memiliki cincin kromanol dan ekor fitil, sedangkan tokotrienol memiliki cincin kromanol dan ekor tak jenuh. Tokoferol alami hanya memiliki stereokimia RRR, tetapi tokoferol sintesis adalah campuran dari delapan stereoisomer (RRR-, RSR-, RRS-, RSS-, SRR-, SSR-, SRS-, SSS-), karena ada tiga atom karbon asimetris (2R, 4'R, 8'R) hadir di ekor phytyl.⁹⁹

2.6.2. Sumber

Sumber makanan utama vitamin E adalah minyak nabati. Kacang-kacangan juga merupakan sumber vitamin E yang baik.¹⁰⁰ Minyak kedelai, bunga matahari, jagung, kenari, biji kapas, kelapa sawit, dan gandum mengandung jumlah vitamin E yang relatif lebih tinggi (lebih dari sekitar 50 mg vitamin E/100 g minyak) daripada minyak lainnya. Minyak safflower dan bunga matahari mengandung α -tokoferol yang tinggi, minyak kedelai dan minyak jagung terutama mengandung γ -tokoferol, dan minyak biji kapas mengandung proporsi α - dan γ -tokoferol yang serupa. Oleh karena itu, jenis minyak yang dikonsumsi melalui diet mempengaruhi tingkat asupan diet α -tokoferol. Suplemen vitamin E cukup populer dan berkontribusi besar

terhadap asupan vitamin E di antara beberapa populasi. Baik bentuk α -tokoferol alami atau sintesis digunakan sebagai suplemen.

Meskipun asupan α -tokoferol dari makanan relatif lebih tinggi daripada β -tokoferol, α -tokoferol adalah bentuk utama vitamin E dalam sirkulasi karena α -tokoferol transfer protein (α -TTP) memiliki afinitas pengikatan preferensial untuk α -tokoferol. α -TTP terlibat dalam transfer α -tokoferol ke membran plasma⁹⁹.

2.6.3. Fungsi Vitamin E

Vitamin E adalah antioksidan larut lemak utama yang mengais radikal peroksil dan menghentikan oksidasi asam lemak tak jenuh ganda (PUFA). Dengan adanya vitamin E, radikal peroksil bereaksi dengan α -tokoferol sebagai pengganti lipid hidroperoksida, reaksi berantai produksi radikal peroksil dihentikan, dan oksidasi lebih lanjut PUFA dalam membran dicegah⁹⁹. Radikal tokoferoksil—dihasilkan dari α -tokoferol dan radikal peroksil—direduksi oleh vitamin C atau glutathione, membentuk dimer tokoferol, mengalami oksidasi lebih lanjut, atau bertindak sebagai prooksidan. Aktivitas antioksidan vitamin E mungkin bertanggung jawab untuk regulasi beberapa enzim yang terlibat dalam transduksi sinyal karena aktivitas enzim pensinyalan diatur oleh keadaan redoks.

Vitamin E menghambat aktivitas protein kinase C (PKC) dengan meningkatkan defosforilasi PKC- α melalui aktivasi protein fosfatase 2A. Penghambatan PKC oleh vitamin E telah dilaporkan di berbagai sel, dan akibatnya, penghambatan agregasi trombosit; berkurangnya proliferasi

monosit, makrofag, neutrofil, dan sel otot polos pembuluh darah; dan penurunan produksi superoksida dalam neutrofil dan makrofag telah diamati 100-101 .

Vitamin E dapat secara langsung berikatan dengan enzim yang terlibat dalam pembentukan mediator lipid atau protein transpor yang terlibat dalam transduksi sinyal. Vitamin E dapat mempengaruhi interaksi protein membran dan translokasi enzim ke membran plasma sehingga mengubah aktivitas enzim transduksi sinyal.¹⁰¹

2.6.4. Pengaruh Vitamin E Terhadap Otak

Vitamin E berperan dalam mengikat radikal bebas dan memiliki kemampuan untuk menghentikan lipid peroksida dengan cara menyumbangkan satu atom hidrogennya dari gugus OH kepada lipid peroksida yang bersifat radikal sehingga menjadi radikal tocopheryl yang kurang reaktif dan tidak merusak, ikatan O-H dalam tokoferol 10% lebih lemah dibandingkan dengan kebanyakan fenol lainnya. Ikatan yang lemah memungkinkan vitamin E untuk menyumbangkan atom hidrogen ke radikal peroksil dan radikal bebas lainnya, Radikal tocopheryl yang dihasilkan akan kembali ke dalam bentuk tokoferol oleh reaksi redoks dengan donor hidrogen seperti vitamin C¹⁰² . Radikal bebas bermula dari bentuk carbon-centered free radical, kemudian berikatan dengan oksigen bebas sehingga membentuk ROS. ROS dapat dinetralisir oleh lipid (polyunsaturated fat) menjadi hydroperoxide.

Reduksi molekul oksigen dan aktivitas oksidatif enzim menghasilkan radikal bebas, radikal bebas tersebut selanjutnya dapat diikat oleh vitamin E yang merupakan antioksidan larut lemak dalam membran sel. Vitamin E berperan dalam menghambat peroksidasi lipid, menurunkan kadar malondialdehyde pada spermatozoa, meningkatkan motilitas spermatozoa, mengurangi fragmentasi DNA spermatozoa dan meningkatkan aktivitas berbagai antioksidan lain yang juga berfungsi untuk mengikat radikal bebas. Sebagian kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas terjadi pada membran sel dan lipoprotein dengan kepadatan rendah yang tersusun oleh molekul lemak, hal ini menjadikan vitamin E antioksidan yang paling efektif dikarenakan vitamin E larut dalam lemak. Vitamin C juga merupakan antioksidan kuat, namun vitamin C tidak larut dalam lemak, namun larut dalam air.¹⁰³

Kelebihan vitamin E dalam tubuh akan disimpan dalam beberapa organ, antara lain hati, jaringan adiposa, otak dan lipoprotein. Vitamin E diekskresikan dari tubuh bersama dengan empedu melalui feses, sebagian lagi melalui urin setelah diubah lebih dahulu menjadi asam tokoferonat dan tokoferonalakton yang dapat berkonjugasi dengan glukoronat. Vitamin E memiliki kemampuan untuk menghentikan lipid peroksida dengan cara menyumbangkan satu atom hidrogennya dari gugus OH kepada lipid peroksida yang bersifat radikal sehingga kurang reaktif dan tidak merusak.¹⁰⁴

BAB III

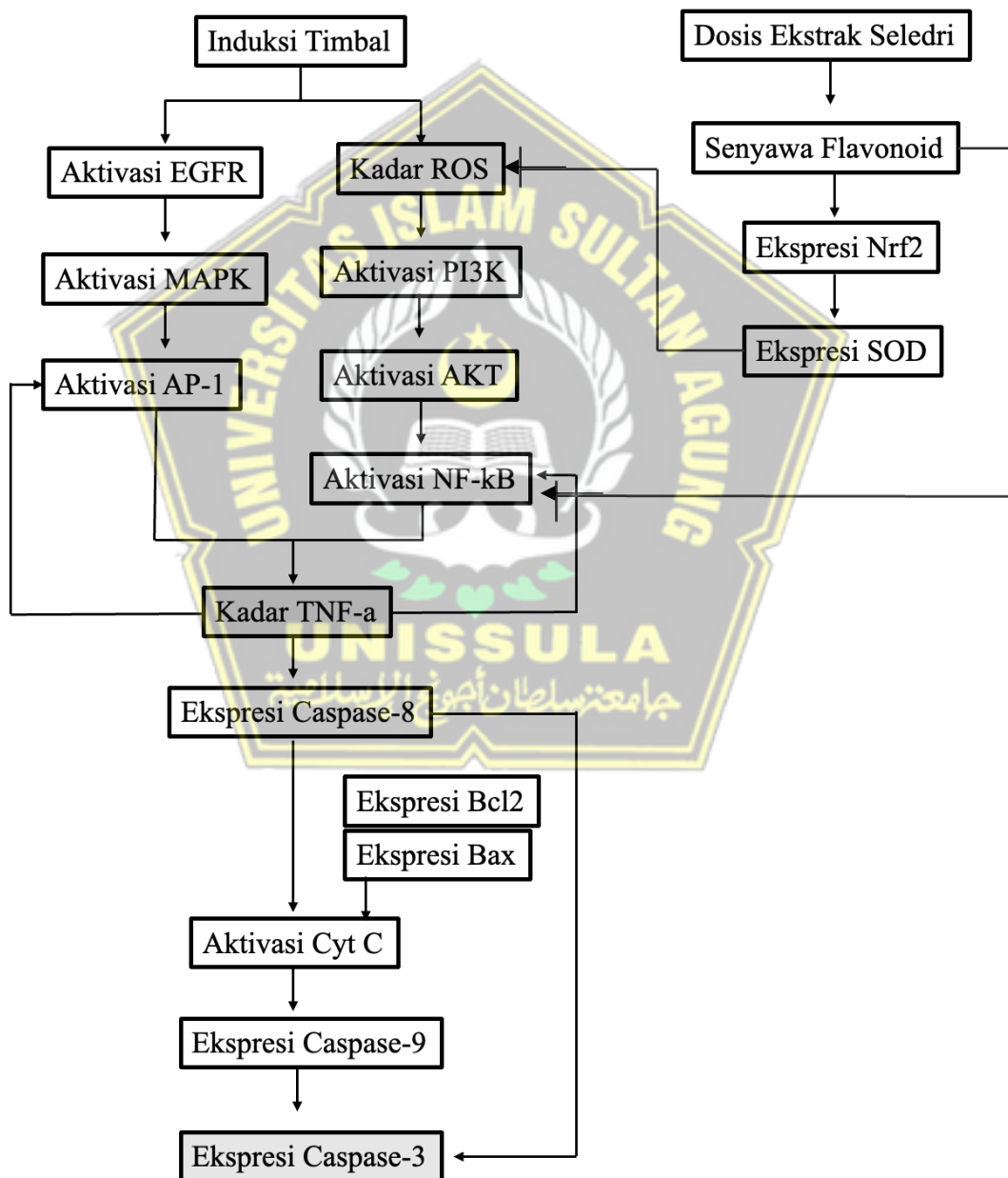
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Paparan Timbal menyebabkan pembentuk ROS pada jaringan otak sehingga mengaktifkan jalur PI3K dan AKT yang menyebabkan aktivasi faktor transkripsi NF- κ B yang berperan dalam stimulasi pelepasan protein proinflammasi termasuk TNF- α .¹¹² Induksi timbal juga terbukti mengaktifkan *epidermal growth factor receptor* (EGFR) dan *mitogen activated protein kinase* (MAPK) fosforilasi. Hal tersebut akan menyebabkan aktivasi faktor transkripsi protein heterodimeric (AP-1) yang mengandung c-jun protein, sehingga menyebabkan aktivasi gen TNF- α .²⁹ TNF- α yang teraktivasi menyebabkan aktivasi balik faktor transkripsi NF- κ B dan AP-1.¹¹³ Pada kondisi kadar TNF- α yang meningkat, menginduksi kematian sel melalui peningkatan ekspresi caspase-8 yang selanjutnya mengaktifkan pelepasan cytotokrom C yang diperkuat dengan peningkatan ekspresi Bcl2 dan penurunan ekspresi Bax.¹¹⁴ Cytokrom C yg terlepas dari mitokondria, menyebabkan peningkatan ekspresi caspase-9 dan berujung dengan peningkatan ekspresi caspase-3 sehingga menginduksi kematian sel.³⁸

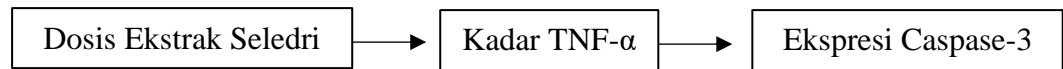
Seledri diketahui mengandung beberapa zat aktif seperti apigenin dan antosianin yang termasuk senyawa golongan flavonoid dan memiliki efek antioksidan dan anti-peradangan. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa Antosianin dapat menghambat produksi ROS melalui aktivasi *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) yang akan menginduksi produksi enzim

antioksidan seperti SOD sehingga dapat menekan kadar ROS. Senyawa flavonoid juga terbukti menghambat aktivasi NF-kB secara langsung.¹¹⁵ Kemampuan tersebut akhirnya dapat memblokir ekspresi sitokin proinflamasi seperti TNF- α . Pemblokiran TNF- α dapat menghambat ekspresi caspase-3 sel pada jaringan otak sehingga fungsi otak terjaga. Ringkasan kerangka teori dijelaskan pada Gambar 3.1



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah Terdapat pengaruh pemberian ekstrak seledri terhadap kadar TNF- α dan ekspresi Caspase-3 pada otak tikus wistar yang diinduksi timbal asetat.



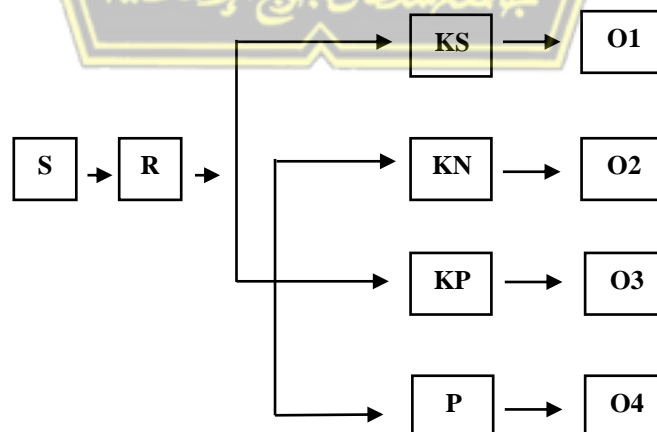
BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design* terhadap hewan coba tikus jantan galur wistar.

Perlakuan pada penelitian ini terdiri dari:

1. Kontrol Sehat (Tikus sehat tanpa paparan Timbal dan diberi pakan standar),
2. Kontrol negatif (Tikus diberi paparan Timbal 200mg/kgBB/hari dan diberi pakan standar),
3. Kontrol Positif (Tikus diberi paparan Timbal 200mg/kgBB/hari dan diberikan vitamin E 50IU/kgBB serta pakan standar).
4. Perlakuan (Tikus diberi paparan Timbal 200mg/kgBB/hari dan ekstrak seledri 300mg/kgBB/hari serta pakan standar)



Gambar 4.1. Alur Rancangan Penelitian

Keterangan :

- S : Sampel
R : Randomisasi
KS : Kontrol Sehat
KN : Kontrol Negatif
KP : Kontrol Positif
P : Perlakuan
O : Observasi Parameter

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian ekstrak

Seledri dengan dosis 300 mg/kg BB

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah Kadar TNF- α dan

Ekspresi Caspase-3 otak

4.2.2. Defenisi Operasional

a. Ekstrak Seledri

Ekstrak seledri dalam penelitian ini adalah cairan kental yang disari dari daun seledri yang berasal dari area Jawa Tengah dan berusia antara 1-3 bulan dengan menggunakan pelarut etanol dan dikentakan dengan votary vacuum evaporator. Ekstrak kental seledri dibuat sediaan oral dengan diencerkan menggunakan CMC Na 0,5% dalam aquabidest dengan dosis 300 mg/kgBB. Satuan ekstrak seledri menggunakan satuan milligram (mg) dan skala ordinal.

b. Vitamin E

Adalah vitamin larut lemak yang tersusun atas α -tocopherol dengan dosis 50IU/kgBB. Vitamin E dalam penelitian ini menggunakan satuan *International Units* (IU) dan skala ordinal.

c. Kadar TNF- α

Adalah kadar sitokin TNF- α yang berasal dari sampel serum darah yang membentuk reaksi berwarna biru dengan intensitas ekspresinya di baca menggunakan *ELISA reader*. TNF- α dalam penelitian ini menggunakan satuan pg/mL dan skala rasio.

d. Ekspresi Caspase-3

Adalah ekspresi protein caspase-3 yang ditandai warna coklat pada inti sel jaringan otak yang di ukur diukur menggunakan metode imunohistokimia. Ekspresi caspase-3 dalam penelitian ini dihitung dengan menyampling 100 lapang pandangan yang dibaca dengan 2 orang analis, dan disajikan dalam satuan persen (%) dan skala rasio.

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*).

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

- Jantan
- Aktif

- Berat Badan Tikus 200-250 gram
- Usia Tikus 2-3 bulan
- Dinyatakan sehat dan layak dijadikan subyek penelitian oleh dokter hewan, tidak ada penyakit dan kecacatan.

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

Tikus menjadi sakit selama perlakuan.

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

Tikus mati atau infeksi selama penelitian.

4.3.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan secara acak dengan metode *random sampling alocation*. Tikus putih jantan galur Wistar dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok Kontrol Sehat (tikus kondisi sehat tanpa dipapar timbal), Kontrol Negatif (tikus diinduksi timbal asetat), Kontrol Positif (tikus diinduksi timbal dan diberi vitamin E secara oral), Perlakuan (tikus diinduksi timbal yang diberi ekstrak seledri dosis 300 mg/kgBB secara oral).

4.3.4. Besar Sampel

Sampel minimal mengikuti ketentuan WHO yaitu sebanyak 5 ekor per jenis perlakuan dikali dengan jumlah waktu pengambilan sampel. Pengambilan sampel dilakukan satu kali pada hari ke 15 setelah pemberian pertama perlakuan, sehingga jumlah sampel minimal pada penelitian ini adalah 20 ekor tikus wistar.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan hewan model keracunan timbal antara lain kandang pemeliharaan, spuit sonde, spuit 1 mL, botol air minum tikus, dan botol kaca gelap. Alat yang digunakan untuk pengambilan data antara lain vacutainer edta, tabung hematokrit, mikropipet 1000 uL, dan mikropipet tip 1000 uL. Alat yang digunakan untuk analisis data terdiri dari microplate reader, mikroskop binokular, *staining jar*, *coated desk glass*, *cover glass*, dan laptop dengan RAM 2GB.

4.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri asam asetat, antibodi Caspase-3, IHC staining kit, alkohol 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, xilen, buffer sitrat, aquades, etanol, pakan tikus, dan chloroform, ROS Floctometer analisis kit.

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan Ethical Clearance

Penelitian diawali dengan pengajuan *ethical clearance* penelitian yang diajukan kepada komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Cara Pembuatan Ekstrak Seledri

Seledri sebanyak ± 600 gram dipotong hingga halus, dikeringkan pada suhu 50 – 60° C dan diblender menjadi bubuk kering. Bubuk

kering dimaserasi menggunakan etanol 95%, kemudian disaring menggunakan kertas saring dan filtrat yang dihasilkan ditampung, sedangkan residu yang tertinggal di kertas saring kemudian dimaserasi kembali dengan metode yang sama. Kandungan etanol dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga tersisa ekstrak kental. Ekstrak kental yang terbentuk kemudian disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 2-8°C hingga pemberian perlakuan diberikan.

4.5.3. Penetapan Dosis

Dosis ekstrak Seledri ditentukan dengan studi literature sebelum proses penelitian. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa pemberian 300 mg/kgBB/hari ekstrak Seledri secara oral melindungi fungsi Otak¹¹⁶. Oleh karena itu penelitian ini menggunakan dosis 300 mg/kgBB/hari. Tikus dalam penelitian ini memiliki bobot badan berkisar antara 200-250 gram, sehingga dosis ekstrak Seledri yang diberikan secara oral adalah 60 mg/tikus/hari.

4.5.4. Pembuatan Paparan Timbal dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus diadaptasi selama 1 minggu.
2. Tikus sehat tidak diberi paparan timbal asetat dan tetap diberi pakan standar hingga 14 hari.
3. Tikus Kontrol Negatif, tikus dipapar timbal asetat secara oral dengan dosis 200 mg/kg BB yang dilarutkan dalam aquadestilata sebanyak 2ml selama 14 hari dan tetap diberi pakan standar.

4. Tikus Kontrol Positif, tikus dipapar timbal asetat secara oral dengan dosis 200 mg/kg BB yang dilarutkan dalam aquadestilata sebanyak 2ml dan bersamaan diberi Vitamin E secara oral dengan dosis 50 IU dan tetap diberi pakan standar selama 14 hari.
5. Tikus Perlakuan, tikus dipapar timbal asetat secara oral dengan dosis 200 mg/kg BB yang dilarutkan dalam aquadestilata sebanyak 2ml dan bersamaan diberi ekstrak seledri dengan dosis 300 mg/kg dan tetap diberi pakan standar hingga 14 hari.

4.5.5. Pengambilan Sampel Plasma Darah

Pengambilan sampel darah diambil dari tikus melalui vena orbital menggunakan tabung hematokrit sebanyak 3 mL tanpa pembiusan darah dilakukan pada hari ke 15 setelah hari pertama pemberian perlakuan. Sampel darah dimasukkan ke dalam vacutainer EDTA dan kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Plasma yang terbentuk secara hati-hati diambil menggunakan micropipet, kemudian dimasukkan ke dalam tabung vial 1,5 mL dan disimpan pada suhu -80 hingga proses analisis dilakukan.

4.5.6. Perhitungan Kadar TNF- α

Sampel plasma darah yang telah diperoleh kemudian dianalisis kadar TNF- α menggunakan metode Enzyme Linked Immunoabsorbance Assay (ELISA). Sebelum proses analisis, plasma darah dicairkan dalam suhu ruang dan diresuspensi untuk agar serum tercampur secara merata. Analisis ELISA TNF- α dilakukan dengan

metode kit dari Finetest ® (Wuhan, China). Langkah-langkah analisis kadar TNF- α mengikuti protocol yang sesuai dengan petunjuk ada. Pembacaan dilakukan dengan menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 450 nm.

4.5.7. Pengambilan Sampel Jaringan

Tikus setelah 24 jam pasca pemberian perlakuan terakhir dimatikan dengan cara servikal dislokasi untuk proses pengambilan organ otak. Bagian cranial tikus dibedah kemudian sampel otak diambil dan difiksasi menggunakan formalin 10% selama 24 jam dan setelah itu formalin diganti dengan alkohol 70% dan disimpan di suhu ruang sampai proses pembuatan preparat parafin.

4.5.8. Pembuatan Blok Parafin.

Pembuatan blok paraffin dilakukan dengan beberapa tahap antara lain sebagai berikut :

1. Dehidrasi

Potongan jaringan dimasukkan dalam alkohol bertingkat dari 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% agar cairan keluar dari dalam jaringan. Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam larutan alcohol-xylol selama 1 jam dan jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.

2. Parafinisasi dan Embedding

Jaringan yang telah melalui proses dehidrasi dimasukkan ke dalam parafin cair selama 2 x 2 jam dan tunggu hingga parafin memadat. Jaringan yang telah terparafin dipotong dengan

ketebalan 4 mikron menggunakan mikrotom. Hasil potongan jaringan ditempelkan pada object glass yang sudah dilapisi polilisin sebagai perekat. Masukkan jaringan pada kaca obyek deparafinasi dalam inkubator dan dipanaskan dengan suhu 56-58°C hingga parafin mencair.

4.5.9. Pengecatan Caspase-3

Jaringan otak yang telah di tempelkan ke slide Poly-L-Lysine Coated (Biogear) kemudian dipanaskan pada slide warmer dengan suhu 60°C selama 5 menit, kemudian dilakukan proses deparafinisasi dengan merendam sampel dalam xylene (Merck-Millipore, Australia) 1 dan 2 masing masing selama 5 menit. Kemudian dilakukan proses rehidrasi dengan merendam slide kedalam etanol absolut 1, absolut 2, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70%, etanol 70% (Merck-Millipore, Australia) masing masing selama 3 menit, kemudian dicuci pada air mengalir selama 5 menit, selanjutnya direndam akuades selama 5 menit.

Proses selanjutnya yaitu Antigen retrieval dengan merendam slide dalam citrate buffer 1x pH 6,5 dan masukkan dalam Decloaking Chamber (Biogear) selama 30 menit pada suhu 90°C slide dikeluarkan dan didiamkan hingga mencapai suhu ruang (± 30 menit). Selanjutnya slide dicuci dengan PBS 1x selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian dilakukan blocking peroksidase endogen dengan 3% H₂O₂ selama 5 menit, kemudian slide dicuci dengan PBS 1x selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian dilakukan blocking background

dengan meneteskan larutan Background Sniper (Starr Trek Universal-HRP Detection Kit) pada jaringan per slide dan diinkubasi selama 20 menit, selanjutnya slide dikeringkan dengan menggunakan tisu pada permukaan bawahnya dan sekitar jaringan tanpa merusak jaringan dan ditambahkan antibodi primer sebanyak 70-100 μL antibodi Caspase-3 (LSBio, Seattle, WA, USA), kemudian tutup humidity chamber dan disimpan dalam kulkas 4°C overnight.

Ambil slide sampel dari kulkas 4°C dan diamkan pada suhu ruang selama ± 30 menit hingga mencapai suhu ruang, kemudian cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, bersihkan jaringan dan tetesi secondary antibody Trekkie Universal Link (Starr Trek Universal-HRP Detection Kit) kemudian inkubasi selama 60 menit pada suhu ruang, cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, kemudian tetesi Trekkie Avidin-HRP Label (Starr Trek Universal-HRP Detection Kit) inkubasi selama 45 menit pada suhu ruang, cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, kemudian tetesi DAB 1:400 (1 μL Betazoid DAB Chromogen ditambahkan 400 μL Betazoid DAB Substrat) inkubasi 3 menit dalam ruangan gelap, cuci slide menggunakan PBS 1x sebanyak 3 kali selama 5 menit, kemudian lakukan counterstaining dengan mencelupkan dalam Mayer Hematoksilin (Bio-Optica Milano S.p.A) selama 3 menit, cuci slide menggunakan air mengalir selama selama 5 menit. Selanjutnya lakukan dehidrasi dengan mencelupkan slide sampel pada rak staining logam kedalam etanol 70%, etanol 80%,

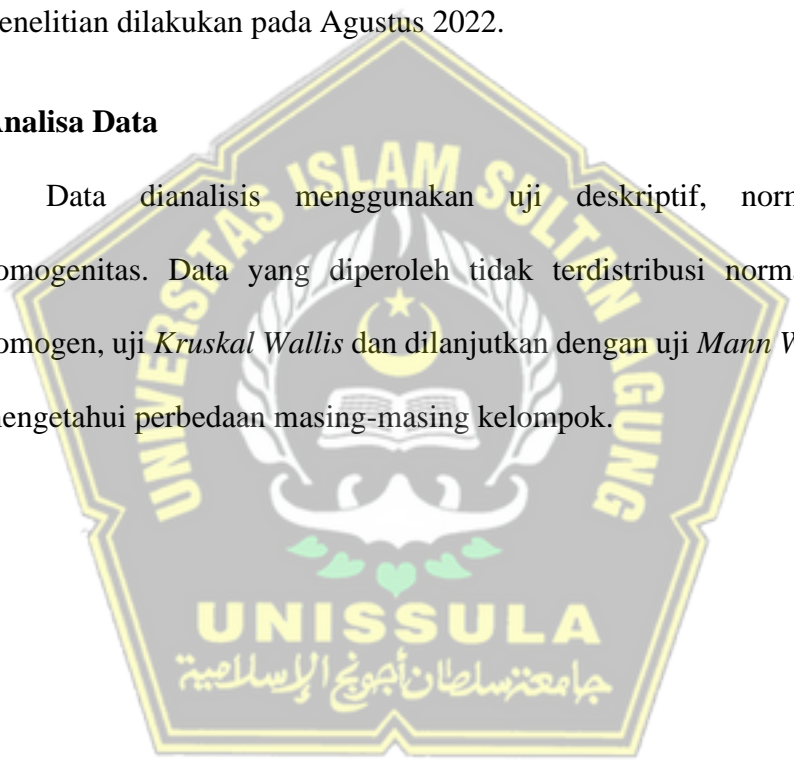
etanol 96%, etanol absolut 1, absolut 2, masing masing selama 3 menit, selanjutnya proses clearing dengan mencelupkan slide pada xylene 1, 2 dan 3 masing masing selama 5 menit, kemudian mounting jaringan dengan entellan

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

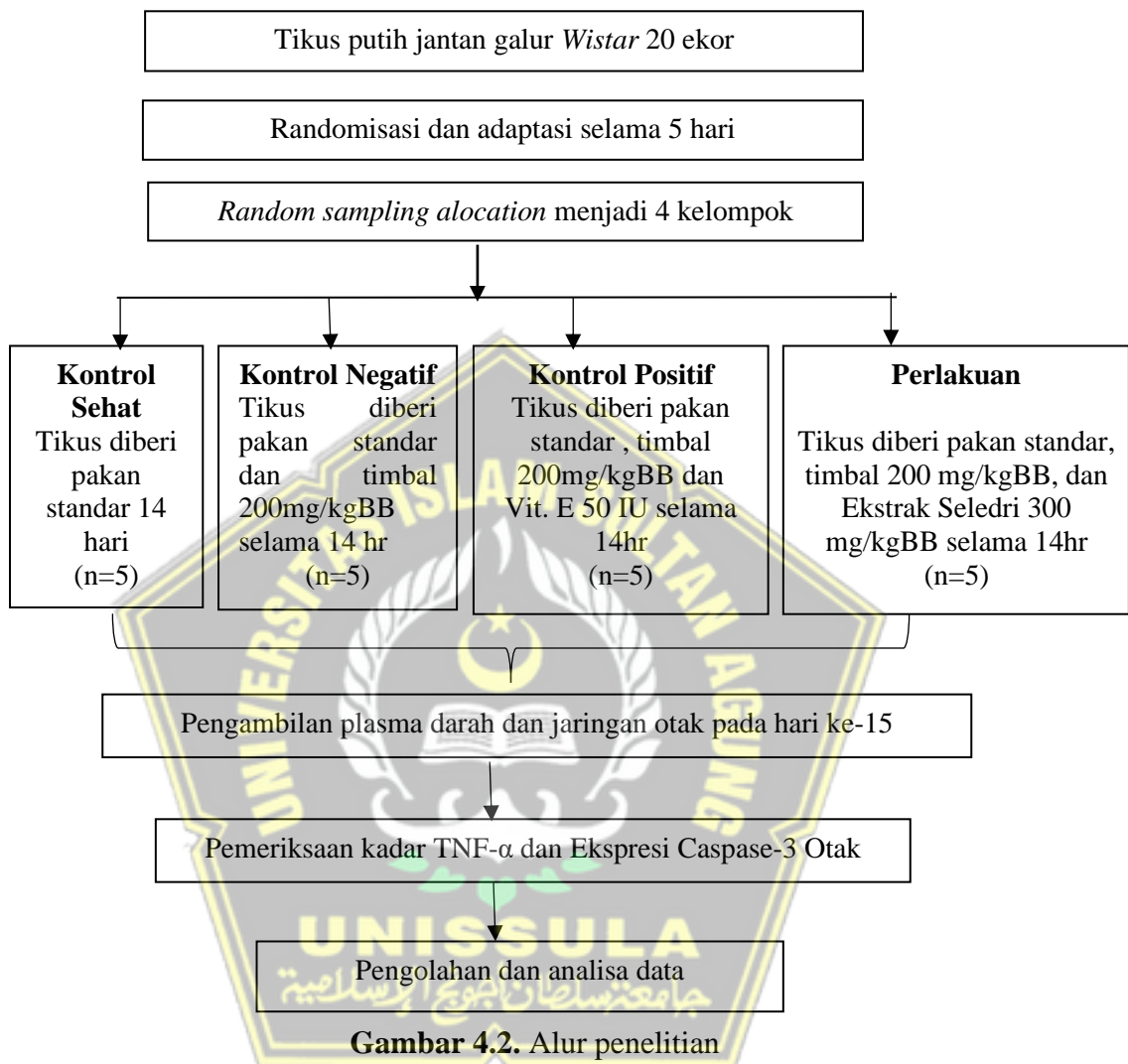
Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Penelitian dilakukan pada Agustus 2022.

4.7. Analisa Data

Data dianalisis menggunakan uji deskriptif, normalitas, dan homogenitas. Data yang diperoleh tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok.



4.8. Alur Penelitian



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Agustus 2022 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Subjek penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar dengan berat 200-250 gram dan berumur 2-3 bulan yang di induksi Timbal dengan dosis 200 mg/kgBB selama 14 hari. Dalam penelitian ini dikumpulkan sampel sebanyak 20 ekor dan tidak ada yang eksklusi selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok yaitu kelompok tikus sehat yang tidak di beri paparan Timbal maupun intervensi, kelompok kontrol negatif yaitu kelompok tikus yang diberi paparan Timbal 200mg/kgBB/hari selama 14 hari tanpa pengobatan, kelompok kontrol positif adalah kelompok yang diberi diberi paparan Timbal 200mg/kgBB/hari dan bersamaan diterapi dengan Vitamin E 50IU/kgBB selama 14 hari, dan kelompok perlakuan adalah kelompok yang diberi diberi paparan Timbal 200mg/kgBB/hari dan bersamaan diterapi dengan ekstrak seledri dosis 300mg/kgBB selama 14 hari.

5.1. Hasil Penelitian

Ekstrak seledri yang digunakan pada penelitian ini adalah species *Apium graveolens* L. yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol dan menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 1,32%. Hasil skrining fitokimia (Lampiran 3). Senyawa golongan flavonoid yang terkandung dalam tanaman seledri seperti antosianin, quecetin, dan apigenin⁹¹ terbukti berperan terhadap aktivitas antioksidan. Pada penelitian ini juga di lakukan penentuan total flavonoid dalam ekstrak seledri dengan menggunakan metode spektrofotometri. Dalam 1

gram ekstrak selederi mengandung flavonoid sebesar $14,3036 \text{ mg} \pm 0,55$. Hasil ini membuktikan bahwa dalam setiap 1 gram ekstrak mengandung senyawa flavonoid setara quersetin sebanyak $14,3036 \text{ mg}$. Senyawa flavonoid memiliki aktivitas antioksidan dengan mekanisme auto-oksidasi secara enzimatik dan kimiawi menghasilkan radikal semikuinon flavonoid, yang dapat ditangkap oleh glutathione tereduksi (GSH), sehingga menghasilkan radikal thiyglutathione. Radikal *thiyglutathione* ini dapat bereaksi dengan GSH untuk menghasilkan anion radikal disulfida yang secara cepat mereduksi molekul *oxygen superoxide anion radical* yang dapat didetoksifikasi lebih lanjut oleh enzim antioksidan seperti superoxide dismutase (SOD), katalase, dan glutathione peroxidase (GPx).⁹²

Tabel 5.1. Data hasil Penelitian Kadar TNF- α dan Ekspresi Caspase-3

Variabel	Kelompok				Pvalue
	Sehat n=5 Mean \pm SD	Kontrol negatif n=5 Mean \pm SD	Kontrol positif n=5 Mean \pm SD	Perlakuan n=5 Mean \pm SD	
Kadar TNF- α	8,52 \pm 0,87	19,39 \pm 2,25	14,69 \pm 0,16	16,86 \pm 0,32	
<i>Saphiro wilk</i>	0,047	0,122	0,319	0,419	
<i>Levene test</i>					0,000
<i>Kruskal-Wallis</i>					0,002
Ekspresi Caspase-3	10,92 \pm 0,58	27,97 \pm 1,95	14,57 \pm 0,55	18,69 \pm 2,26	
<i>Saphiro wilk</i>	0,278	0,474	0,325	0,011	
<i>Levene test</i>					0,129
<i>Kruskal-Wallis</i>					0,002

Pada penelitian ini diperoleh hasil kadar TNF- α dan ekspresi caspase-3 pada model tikus yang di induksi Timbal asetat dan terapi dengan ekstrak seledri. Pada kelompok sehat kadar TNF- α sebesar $8,52 \pm 0,87 \text{ pg/ml}$, kelompok kontrol negatif sebesar $19,39 \pm 2,25 \text{ pg/ml}$, kelompok kontrol positif sebesar $14,69 \pm 0,16 \text{ pg/ml}$ dan kelompok perlakuan sebesar $16,86 \pm 0,32 \text{ pg/ml}$. Berdasarkan uji statistik

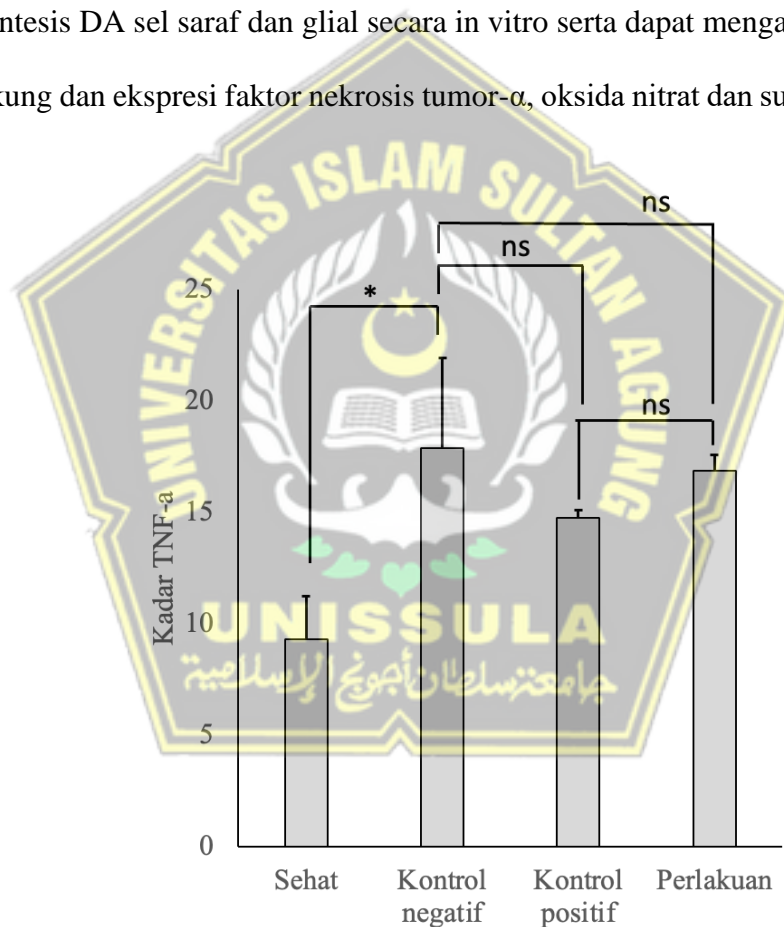
data ekspresi setiap kelompok terdistribusi normal (nilai signifikansi uji *Shapiro wilk* >0.05), kecuali kelompok sehat (nilai signifikansi uji *Shapiro wilk* >0.05) dan tidak homogen setiap kelompok dengan *Levene test* sebesar 0.000. Hasil analisis non parametrik dengan *Kruskal-Wallis* nilai *p value* 0.002 ($p<0.05$) yang menyatakan terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan.

Pada penelitian ini juga dianalisis ekspresi caspase-3 , pada kelompok sehat ekspresi caspase-3 sebesar $10,92\pm 0,58\%$, terdapat peningkatan ekspresi pada kelompok kontrol negatif sebesar $27,97\pm 1,95\%$, kelompok kontrol positif mengalami penurunan ekspresi caspase-3 sebesar $14,57\pm 0,55\%$ dan kelompok perlakuan mengalami penurunan ekspresi caspase-3 sebesar $18,69\pm 2,26\%$ dibandingkan kelompok kontrol. Berdasarkan uji statistik data ekspresi setiap kelompok terdistribusi normal ($p>0.05$), kecuali kelompok perlakuan ($p<0.05$) dan homogen dengan nilai signifikansi *Levene test* sebesar $p>0.05$. Hasil analisis non parametrik dengan *Kruskal-Wallis* nilai *p value* $p<0.05$ yang menyatakan terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Perbedaan kelompok ini dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok.

5.1.1. Efek Pemberian Ekstrak Seledri Terhadap Kadar TNF- α pada Otak Tikus yang Diinduksi Timbal

Ekstrak daun seledri (*Apium graveolens* Linn.) dapat Menurunkan apoptosis seluler dengan cara yang bergantung pada konsentrasi dan waktu melalui jalur yang dimediasi oleh caspase dan mitokondria.¹⁰⁸ Pada jalur kematian yang diprakarsai mitokondria, mitokondria yang mengalami transisi permeabilitas melepaskan

protein apoptogenik atau faktor pemicu apoptosis dari ruang antar membran mitokondria ke dalam sitosol untuk mengaktifkan caspase-9, dan mengaktifkan caspase-9 pada gilirannya membelah serta mengaktifkan caspase-3. Aktivitas caspase-3, -8, dan -9 diregulasi, menunjukkan bahwa caspase berpartisipasi dalam proses apoptosis ini.^{108,96} Selain itu, senyawa luteolin pada ekstrak seledri juga dapat menghambat lipopolysaccharide (LPS), yang mengurangi daur ulang dopamine (DA) dan mengganggu fungsi enzim tyrosine hydroxylase (TH) dalam jalur sintesis DA sel saraf dan glial secara in vitro serta dapat mengaktifkan sel-sel pendukung dan ekspresi faktor nekrosis tumor- α , oksida nitrat dan superoksida.^{17,25}



Gambar 5.1. Kadar TNF- α setiap kelompok perlakuan dari darah vena orbita tikus model yang diinduksi Timbal asetat. * Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan ($p < 0.05$) dan ns menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0.05$).

Berdasarkan data diatas terlihat bahwa pemberian ekstrak seledri secara berturut-turut meningkatkan kadar TNF- α lebih tinggi dibandingkan kelompok sehat ($8,52 \pm 0,87$). Pemberian ekstrak seledri pada kelompok perlakuan ($16,86 \pm 0,32$) menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dalam meningkatkan kadar TNF- α dibandingkan kelompok kontrol negatif ($19,39 \pm 2,25$). Kadar TNF- α pada kelompok kontrol positif ($14,69 \pm 0,16$) tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa tanpa adanya perlakuan kadar TNF- α secara normal terjadi peningkatan untuk menstabilkan stress oksidatif yang terbentuk. Namun pemberian ekstrak seledri terbukti lebih optimal dalam menekan ekspresi Kadar TNF- α berlebih. Hal ini bisa di lihat dari kadar TNF- α perlakuan jika di bandingkan dengan kelompok kontrol negative menunjukkan terdapat tren penurunan.

Tabel 5.2. Uji Mann-Whitney Kadar TNF- α antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi
Sehat	Kontrol negatif	0,010*
	Kontrol positif	0,687
	Perlakuan	0,006*
Kontrol negatif	Kontrol positif	0,687
	Perlakuan	1,000
Kontrol positif	Perlakuan	0,521

Uji *Post Hoc*:

* mean difference significant $P < 0.05$

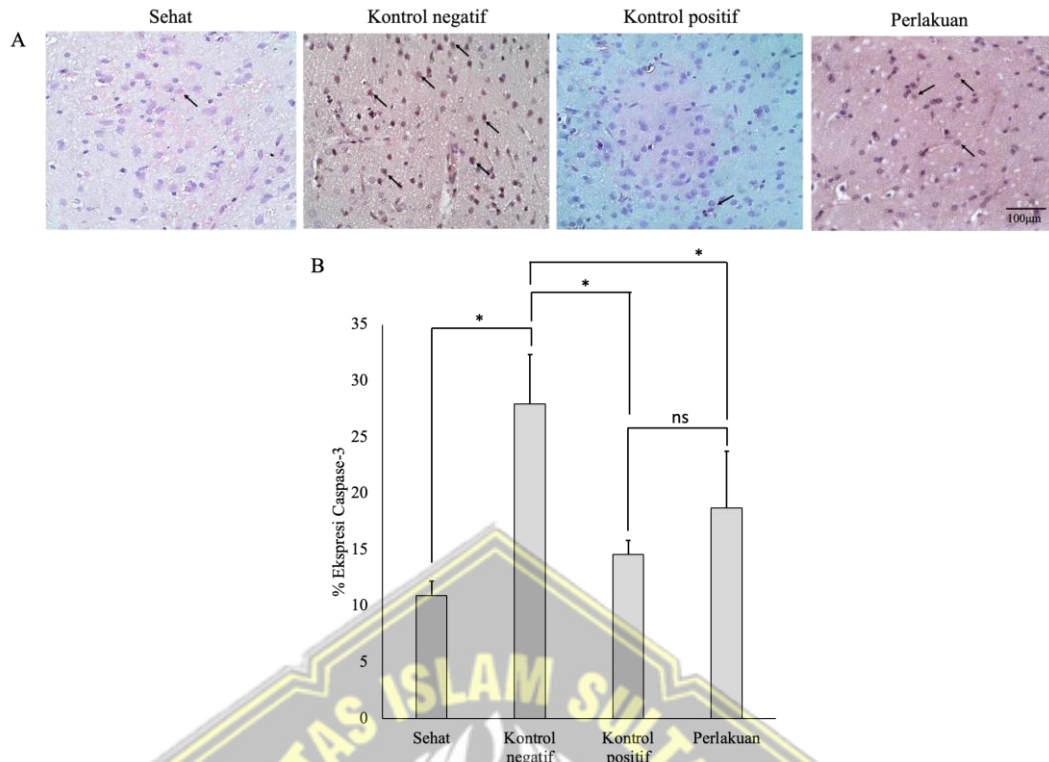
^{ns} mean not difference significant $P > 0.05$

Pada data deskriptif kadar TNF- α masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikasi kelompok kontrol negative, kelompok kontrol positif, dan perlakuan memiliki nilai $p > 0.05$, namun kelompok sehat memiliki nilai $p < 0.05$. Pada uji homogenitas didapatkan nilai $p < 0.05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi

normal dan tidak homogen sehingga dilakukan uji non-parametrik Kruskal-Wallis dan dilanjutkan uji beda dengan *Mann-Whitney*. Uji beda *Kruskal-Wallis* didapatkan $p < 0.05$. Hasil uji *Mann-Whitney* disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.1 dan tabel 5.2. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok sehat terhadap kelompok kontrol negatif dan perlakuan.

5.1.2. Efek Pemberian Ekstrak Selederi Terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Otak Tikus yang Diinduksi Timbal

Caspase-3 adalah protein pro apoptosis yang dapat diinduksi melalui jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik.^{117,118} Peningkatan caspase-3 menunjukkan adanya keaktifan sel melalui mekanisme apoptosis.¹¹⁹ Penelitian terdahulu melaporkan bahwa paparan timbal asetat meningkatkan kematian sel otak.¹²⁰ Penekanan ekspresi caspase-3 dapat dicegah dengan senyawa yang memiliki potensi antiapoptosis dan mencengah radikal bebas seperti senyawa flavonoid.^{121,122} Pada penelitian ini dilakukan analisis pengaruh pemberian ekstrak selederi terhadap ekspresi caspase-3.



Gambar 5.2. Ekspresi caspase-3 setiap kelompok perlakuan dari jaringan otak tikus model yang diinduksi Timbal asetat. (A) Gambaran IHC protein caspase-3 dengan perbesaran 100x, tanda panah menunjukan positif ekspresi caspase-3. (B) Kuantifikasi ekspresi caspase-3 setiap kelompok perlakuan. * Menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok control dan perlakuan ($p < 0.05$) dan ns menunjukan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0.05$).

Berdasarkan data tabel terlihat bahwa pemberian ekstrak seledri secara berturut-turut menurunkan ekspresi caspase-3 lebih tinggi dibandingkan kelompok sehat ($10,92 \pm 0,58$). Pemberian ekstrak seledri menunjukan perbedaan yang signifikan dalam meningkatkan ekspresi caspase-3 pada kelompok kontrol negatif ($27,97 \pm 1,95$). Ekspresi caspase-3 pada kelompok kontrol positif ($14,57 \pm 0,55$) berbeda tidak signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Pada kelompok perlakuan dengan ekstrak seledri juga menurunkan ekspresi caspase-3 secara signifikan ($18,69 \pm 2,26$). Hal ini menunjukan bahwa adanya perlakuan ekstrak seledri dapat mencegah apoptosis sel otak akibat paparan timbal asetat dengan menghambat ekspresi caspase-3.

Tabel 5.3. Uji *Post-hoc Mann-Whitney* Ekspresi Caspase-3 antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Pebandingan	Signifikansi
Sehat	Kontrol negatif	0,000*
	Kontrol positif	1,000
	Perlakuan	0,054
Kontrol negatif	Kontrol positif	0,016*
	Perlakuan	0,045*
Kontrol positif	Perlakuan	0,574
Uji <i>Post Hoc</i> :		* mean difference significant $P < 0.05$ ^{ns} mean not difference significant $P > 0.05$

Pada data deskriptif ekspresi Caspase-3 masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene*. Hasil uji normalitas kecuali kelompok perlakuan ($p < 0.05$) memiliki data yang terdistribusi normal dan uji homogenitas dengan *Levene* test menunjukkan data terdistribusi homogen dengan nilai $p > 0.05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data tidak seluruhnya berdistribusi normal sehingga dapat dilakukan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan uji beda dengan *Mann-Whitney*. Uji beda *Mann-Whitney* didapatkan $p < 0.05$ yang menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Hasil uji *Mann-Whitney* disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.2 dan tabel 5.3 Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan ekstrak seledri dengan kelompok kontrol.

5.2. Pembahasan

Penelitian mengenai Ekstrak Seledri terhadap kadar TNF- α dan ekspresi caspase-3 otak ini menggunakan 20 ekor tikus jantan galur wistar yang dibagi 4 (empat) kelompok: K1 (kelompok tikus normal) dan K2-K4 tikus yang dibuat model keracunan timbal. Pembuatan keracunan timbal dilakukan melalui pemberian paparan timbal 200mg/kgBB/hari selama 14 hari kemudian. Selanjutnya, pada K3 diberikan vitamin E 50IU/kgBB dan K4 diberikan ekstrak seledri 300mg/kgBB dengan lama perlakuan selama 14 hari. Penelitian ini menggunakan tikus jantan wistar karena secara karakteristik gen, biologi dan perilaku mempunyai kemiripan dengan manusia serta tidak dipengaruhi hormone dan tidak mempengaruhi hasil penelitian. Penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh seledri dalam menurunkan kadar TNF- α serta menghambat apoptosis sel-sel otak yang ditandai dari penurunan ekspresi Caspase-3 otak pada tikus yang dipapar timbal.

Penelitian ini melakukan pemaparan Timbal yang menyebabkan pembentukan ROS pada jaringan otak sehingga mengaktifkan jalur PI3K dan AKT yang menyebabkan aktivasi faktor transkripsi NF-kB yang berperan dalam stimulasi pelepasan protein proinflammasi termasuk TNF- α .¹¹² Induksi timbal juga terbukti mengaktifkan *epidermal growth factor receptor* (EGFR) dan *mitogen activated protein kinase* (MAPK) fosforilasi. Hal tersebut akan menyebabkan aktivasi faktor transkripsi protein heterodimeric (AP-1) yang mengandung c-jun protein, sehingga menyebabkan aktivasi gen TNF- α .²⁹ pada penelitian ini TNF- α yang teraktivasi menyebabkan aktivasi balik faktor transkripsi NF-kB dan AP-1.¹¹³ Pada kondisi kadar TNF- α yang meningkat, menginduksi kematian sel melalui

peningkatan ekspresi caspase-8 yang selanjutnya mengaktifkan pelepasan cytotkrom C yang diperkuat dengan peningkatan ekspresi Bcl2 dan penurunan ekspresi Bax.¹¹⁴ Cytokrom C yg terlepas dari mitokondria, menyebabkan peningkatan ekspresi caspase-9 dan berujung dengan penurunan ekspresi caspase-3 sehingga menginduksi kematian sel.³⁸

Pada penelitian ini menggunakan ekstrak Seledri yang mengandung beberapa zat aktif seperti apigenin dan antosianin yang termasuk senyawa golongan flavonoid dan memiliki efek antioksidan dan anti-peradangan. Antosianin dapat menghambat produksi ROS melalui aktivasi *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) yang akan menginduksi produksi enzim antioksidan seperti SOD sehingga dapat menekan kadar ROS. Senyawa flavonoid juga dapat menghambat aktivasi NF-kB secara langsung.¹¹⁵ Kemampuan tersebut akhirnya dapat memblok ekspresi sitokin proinflamasi seperti TNF- α . Pemblokakkan TNF- α dapat menghambat ekspresi caspase-3 sel pada jaringan otak sehingga fungsi otak terjaga.

Berdasarkan data deskriptif kadar TNF- α pada model tikus yang di induksi Timbal asetat dan terapi dengan ekstrak seledri. Pada kelompok sehat kadar TNF- α sebesar 8,52 \pm 0,87 pg/ml, kelompok kontrol negatif sebesar 19,39 \pm 2,25 pg/ml, kelompok kontrol positif sebesar 14,69 \pm 0,16 pg/ml dan kelompok perlakuan sebesar 16,86 \pm 0,32 pg/ml. Berdasarkan uji statistik data ekspresi setiap kelompok terdistribusi normal (nilai signifikasi uji *Shapiro wilk* >0.05), kecuali kelompok sehat (nilai signifikasi uji *Shapiro wilk* >0.05) dan tidak homogen setiap kelompok dengan *Levene test* sebesar 0.000. Hasil analisis non parametik dengan Kruskal-Wallis nilai *p value* 0.002 ($p < 0.05$) yang menyatakan terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan.

Berdasarkan kuantifikasi ekspresi caspase-3 setiap kelompok perlakuan Pemberian ekstrak seledri secara berturut-turut menurunkan ekspresi caspase-3 lebih tinggi dibandingkan kelompok sehat ($10,92 \pm 0,58$). Pemberian ekstrak seledri menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam meningkatkan ekspresi caspase-3 pada kelompok kontrol negatif ($27,97 \pm 1,95$). Ekspresi caspase-3 pada kelompok kontrol positif ($14,57 \pm 0,55$) berbeda tidak signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Pada kelompok perlakuan dengan ekstrak seledri juga menurunkan ekspresi caspase-3 secara signifikan ($18,69 \pm 2,26$). Hal ini menunjukkan bahwa adanya perlakuan ekstrak seledri dapat mencegah apoptosis sel otak akibat paparan timbal asetat dengan menghambat ekspresi caspase-3.

Secara keseluruhan penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak seledri memiliki aktivitas antiinflamasi dengan menghambat ekspresi TNF- α dan mencegah kematian sel otak melalui penekanan ekspresi caspase-3 pada tikus model yang terpapar timbal asetat.

5.3. Kelemahan Penelitian

Pada penelitian ini tidak dilakukan pengamatan dengan berbagai rentang dosis ekstrak seledri dan tidak di amati dengan berbagai variasi waktu terminasi untuk menentukan waktu dan dosis optimal. Pada penelitian ini tidak mengamati kadar ROS yang merupakan penanda utama keracunan timbal asetat. Pada penelitian ini juga tidak diamati pengamatan mekanisme molekuler pemberian ekstrak seledri secara *in vivo* terhadap ekspresi caspase-8, Cyt-c, caspase-9 dan aktivasi jalur NF- κ B.

BAB VI SIMPULAN DAN SARAN

6.1. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan:

1. Pemberian ekstrak selederi 300 mg/kgBB berpengaruh secara signifikan terhadap kadar TNF- α pada otak tikus yang diinduksi timbal dengan dosis 200 mg/kgBB selama 14 hari.
2. Pemberian ekstrak selederi 300 mg/kgBB berpengaruh secara signifikan terhadap ekspresi Caspase-3 pada otak tikus yang diinduksi timbal dengan dosis 200 mg/kgBB selama 14 hari.

6.2. Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah:

1. Perlu pengukuran kadar ROS setelah dilakukan ekstrak selederi pada tikus yang diinduksi Timbal.
2. Perlu pengamatan mekanisme molekuler pemberian ekstrak selederi secara *in vivo* terhadap ekspresi caspase-8, Cyt-c, caspase-9 dan aktivasi jalur NF-kB.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dobrakowski M, Pawlas N, Kasperczyk A, Kozłowska A, Olewińska E, Machoń-Grecka A, et al. Oxidative DNA damage and oxidative stress in lead-exposed workers. *Hum Exp Toxicol*. 2017;
2. Sanders T, Liu Y, Buchner V, Tchounwou PB. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: A review. *Reviews on Environmental Health*. 2009.
3. Kuhad A, Chopra K. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: Behavioral and biochemical evidences. *Eur J Pharmacol*. 2007;
4. George VC, Dellaire G, Rupasinghe HPV. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2017.
5. Kooti W, Daraei N. A Review of the Antioxidant Activity of Celery (*Apium graveolens L*). *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017.
6. Li X, Fang P, Sun Y, Shao Y, Yang WY, Jiang X, et al. Anti-inflammatory cytokines IL-35 and IL-10 block atherogenic lysophosphatidylcholine-induced, mitochondrial ROS-mediated innate immune activation, but spare innate immune memory signature in endothelial cells. *Redox Biol*. 2020;
7. Jones RL, Homa DM, Meyer PA, Brody DJ, Caldwell KL, Pirkle JL, et al. Trends in blood lead levels and blood lead testing among US children aged 1 to 5 years, 1988 2004. *Pediatrics*. 2009;
8. Cecil KM, Brubaker CJ, Adler CM, Dietrich KN, Altaye M, Egelhoff JC, et al. Decreased brain volume in adults with childhood lead exposure. *PLoS Med*. 2008;
9. Rao JVB, Vengamma B, Naveen T, Naveen V. Lead encephalopathy in adults. *J Neurosci Rural Pract*. 2014;

10. Haghghi-Morad M, Zamani N, Hassanian-Moghaddam H, Shojaei M. Encephalopathy following ingestion of Lead-contaminated opium; Magnetic resonance imaging findings. *BMC Neurol.* 2020;
11. Vorvolakos T, Arseniou S, Samakouri M. There is no safe threshold for lead exposure: A literature review. *Psychiatrike = Psychiatriki.* 2016.
12. Marcus DK, Fulton JJ, Clarke EJ. Lead and conduct problems: A meta-analysis. *Journal of Clinical Child and Adolescent Psychology.* 2010;
13. Schwartz J. Low-Level Lead Exposure and Children's IQ: A Metaanalysis and Search for a Threshold. *Environ Res.* 1994;
14. Goodlad JK, Marcus DK, Fulton JJ. Lead and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) symptoms: A meta-analysis. *Clinical Psychology Review.* 2013.
15. Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2007.
16. Din ZU, Shad AA, Bakht J, Ullah I, Jan S. In vitro antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical screening of *Apium graveolens*. *Pak J Pharm Sci.* 2015;
17. Jittiwat J, Chonpathompikunlert P, Sukketsiri W. Neuroprotective effects of *Apium graveolens* against focal cerebral ischemia occur partly via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic pathways. *J Sci Food Agric.* 2021;
18. Abu-Taweel GM. Celery ameliorating against neurobehavioral and neurochemical disorders of perinatal lipopolysaccharides exposure in mice offspring. *J King Saud Univ Sci.* 2020;
19. Qiao M, Yang J, Zhao Y, Zhu Y, Wang X, Wang X, et al. Antiliver Fibrosis Screening of Active Ingredients from *Apium graveolens* L. Seeds via GC-

- TOF-MS and UHPLC-MS/MS. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2020;
20. Fu C, Zheng Y, Lin K, Wang H, Chen T, Li L, et al. Neuroprotective effect of apigenin against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats via activation of the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway. *Food Funct.* 2021;
 21. Masoud M, Kotb A, Abd El-Raouf O, Fikry E. The neuroprotective effects of natural antioxidant against brain injury induced by paracetamol in a rat model of protein malnutrition. *Egyptian Pharmaceutical Journal.* 2020;
 22. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Vitamin e protects against oxidative damage and learning disability after mild traumatic brain injury in rats. *Neurorehabil Neural Repair.* 2010;
 23. Al-Attar AM. Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to lead, mercury, cadmium and copper in albino mice. *Saudi J Biol Sci.* 2011 Oct;18(4):395–401.
 24. Masoud M, Kotb A, Abd El-Raouf O, Fikry E. The neuroprotective effects of natural antioxidant against brain injury induced by paracetamol in a rat model of protein malnutrition. *Egyptian Pharmaceutical Journal.* 2020;
 25. Fu C, Zheng Y, Lin K, Wang H, Chen T, Li L, et al. Neuroprotective effect of apigenin against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats via activation of the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway. *Food Funct.* 2021;
 26. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Vitamin e protects against oxidative damage and learning disability after mild traumatic brain injury in rats. *Neurorehabil Neural Repair.* 2010;
 27. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell.* 2010.
 28. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clinical and Experimental Immunology.* 2007.

29. Metryka E, Chibowska K, Gutowska I, Falkowska A, Kupnicka P, Barczak K, et al. Lead (Pb) exposure enhances expression of factors associated with inflammation. Vol. 19, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2018.
30. Ueha S, Shand FHW, Matsushima K. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. *Front Immunol.* 2012;3(APR):1–6.
31. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med.* 2005;258(6):479–517.
32. D. Amaral J, M. Xavier J, J. Steer C, M.P. Rodrigues C. Targeting the p53 Pathway of Apoptosis. *Curr Pharm Des.* 2010;16(22):2493–503.
33. Hadi SM, Asad SF, Singh S, Ahmad A. Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life.* 2000;50(3):167–71.
34. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology.* 2007.
35. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2008.
36. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation.* 1999.
37. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;
38. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry.* 1999.
39. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2007.

40. Van Damme P, Martens L, Van Damme J, Hugelier K, Staes A, Vandekerckhove J, et al. Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis. *Nat Methods*. 2005;
41. Porter AG, Ja RU. Emerging roles of Caspase-3 in apoptosis Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 2015;
42. Chauhan D, Bartok E, Gaidt MM, Bock FJ, Herrmann J, Seeger JM, et al. BAX/BAK-Induced Apoptosis Results in Caspase-8-Dependent IL-1 β Maturation in Macrophages. *Cell Rep*. 2018;
43. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006.
44. Van Aken O. Mitochondria and Cell Death. In: *Annual Plant Reviews online*. 2018.
45. Flanagan L, Lucantoni F, Prehn JHM. Mislocalization of Mitochondrial Intermembrane Space Proteins. In: *Mitochondria and Cell Death*. 2016.
46. Verbrugge I, Johnstone RW, Smyth MJ. SnapShot: Extrinsic apoptosis pathways. *Cell*. 2010.
47. Hillert LK, Ivanisenko N V., Busse D, Espe J, König C, Peltek SE, et al. Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIPL heterodimer. *Cell Death Differ*. 2020;
48. Bellail AC, Tse MCL, Song JH, Phuphanich S, Olson JJ, Sun SY, et al. DR5-mediated DISC controls caspase-8 cleavage and initiation of apoptosis in human glioblastomas. *J Cell Mol Med*. 2010;
49. Kim EJY, Anko ML, Flensberg C, Majewski IJ, Geng FS, Firas J, et al. BAK/BAK-Mediated Apoptosis Is a Myc-Induced Roadblock to Reprogramming. *Stem Cell Reports*. 2018;
50. Mehta AK, Gracias DT, Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine*. 2018;

51. Ghandadi M, Behravan J, Abnous K, Ehtesham Gharaee M, Mosaffa F. TNF- α exerts cytotoxic effects on multidrug resistant breast cancer MCF-7/MX cells via a non-apoptotic death pathway. *Cytokine*. 2017;
52. Wang Z, Liang X, Xiong A, Ding L, Li W, Yang L, et al. Helichrysetin and TNF- α synergistically promote apoptosis by inhibiting overactivation of the NF- κ B and EGFR signaling pathways in HeLa and T98G cells. *Int J Mol Med*. 2021;
53. Santos ACA, Correia CA, de Oliveira DC, Nogueira-Pedro A, Borelli P, Fock RA. Intravenous Glutamine Administration Modulates TNF- α /IL-10 Ratio and Attenuates NF κ B Phosphorylation in a Protein Malnutrition Model. *Inflammation*. 2016;
54. Wang Y, Shnyra A, Africa C, Warholic C, McArthur C. Activation of the extrinsic apoptotic pathway by TNF- α in Human Salivary Gland (HSG) cells in vitro, suggests a role for the TNF receptor (TNF-R) and Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Sjögren's Syndrome-associated autoimmune sialadenitis. *Arch Oral Biol*. 2009;
55. Wang Y, Shnyra A, Africa C, Warholic C, McArthur C. Activation of the extrinsic apoptotic pathway by TNF- α in Human Salivary Gland (HSG) cells in vitro, suggests a role for the TNF receptor (TNF-R) and Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Sjögren's Syndrome-associated autoimmune sialadenitis. *Arch Oral Biol*. 2009;
56. Bratovcic A. Synthesis, Characterization, Applications, and Toxicity of Lead Oxide Nanoparticles. In: *Lead Chemistry*. 2020.
57. Mehrpour O, Karrari P, Abdollahi M. Chronic lead poisoning in Iran; A silent disease. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012.
58. Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: A review. *Interdisciplinary Toxicology*. 2015.

59. Abdal Dayem A, Hossain MK, Lee S Bin, Kim K, Saha SK, Yang G-M, et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1):120.
60. ROS-Induced DNA Damage as an Underlying Cause of Aging. *Adv Geriatr Med Res.* 2020;
61. Moniem AEA, Dkhil MA, Al-Quraishy S. Protective role of flaxseed oil against lead acetate induced oxidative stress in testes of adult rats. *Afr J Biotechnol.* 2010;
62. Frety EE, Soehato S, Sujuti H, Dewi ER. Effect of Oral Applied Lead Acetate on the Expression of Caspase-3 on Antral Granulosa Cells and Histopathology of Ovary in Female Wistar Rat (*Rattus Norvegicus*) Ovaries. *Res J Pharm Technol.* 2021;
63. Elgawish RAR, Abdelrazek HMA. Effects of lead acetate on testicular function and caspase-3 expression with respect to the protective effect of cinnamon in albino rats. *Toxicol Rep.* 2014;
64. Sudjarwo S, Anwar C, Wardani G, Eraiko K, Koerniasari. Antioxidant and anti-caspase 3 effect of chitosan-Pinus merkusii extract nanoparticle against lead acetate-induced testicular toxicity in rat. *Asian Pacific Journal of Reproduction.* 2019;
65. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology.* 2014.
66. Wilson V, Hou A, Zhang R, Wilson VL, Meng G. HIV-1 RT inhibitor design View project Source of lead pollution, its influence on public health and the countermeasures. *Animal science and Food safety.* 2015;
67. Fathabadi B, Dehghanifiroozabadi M, Aaseth J, Sharifzadeh G, Nakhaee S, Rajabpour-Sanati A, et al. Comparison of Blood Lead Levels in Patients

- With Alzheimer's Disease and Healthy People. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2018;
68. Morais S, e Costa FG, de Lourdes Pereir M. Heavy Metals and Human Health. In: *Environmental Health - Emerging Issues and Practice.* 2012.
 69. Abdel Moneim AE. Indigofera oblongifolia prevents lead acetate-induced hepatotoxicity, oxidative stress, fibrosis and apoptosis in rats. *PLoS One.* 2016;
 70. Abadin H, Ashizawa A, Stevens YWW, Et A. 3 . Health Effects of Lead. In: *Toxicological profile for lead.* 2007.
 71. Nigra AE, Ruiz-Hernandez A, Redon J, Navas-Acien A, Tellez-Plaza M. Environmental Metals and Cardiovascular Disease in Adults: A Systematic Review Beyond Lead and Cadmium. *Current environmental health reports.* 2016.
 72. Jakubowski M. Low-level environmental lead exposure and intellectual impairment in children - The current concepts of risk assessment. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health.* 2011.
 73. Arnold OM, Liu J. Blood lead levels ≤ 10 micrograms/deciliter and executive functioning across childhood development: A systematic review. *Neurotoxicology and Teratology.* 2020.
 74. Nutt D, Hayes A, Fonville L, Zafar R, Palmer EOC, Paterson L, et al. Alcohol and the brain. *Nutrients.* 2021;
 75. Maldonado KA, Alsayouri K. Physiology, Brain. *StatPearls.* 2020.
 76. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, Deli MA, et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2015.

77. Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids and Barriers of the CNS*. 2020.
78. Dingezweni S. The blood–brain barrier. *Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia*. 2020;
79. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*. 2010.
80. Virgolini MB, Aschner M. Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. In: *Advances in Neurotoxicology*. 2021.
81. Jaafarzadeh MM, Mahjoob Khaligh R, Mohsenifar Z, Shabani A, Rezvani Gilkalaei MM, Rajabi Keleshteri S, et al. Protecting Effects of N-acetyl Cysteine Supplementation Against Lead and Cadmium-Induced Brain Toxicity in Rat Models. *Biol Trace Elem Res*. 2021;
82. Verstraeten S V., Aimo L, Oteiza PI. Aluminium and lead: Molecular mechanisms of brain toxicity. *Archives of Toxicology*. 2008.
83. Fruh V, Rifas-Shiman SL, Amarasiriwardena C, Cardenas A, Bellinger DC, Wise LA, et al. Prenatal lead exposure and childhood executive function and behavioral difficulties in project viva. *Neurotoxicology*. 2019;
84. Kponee-Shovein KZ, Weisskopf MG, Grashow R, Rotem RS, Coull BA, Schnaas L, et al. Estimating the causal effect of prenatal lead exposure on prepulse inhibition deficits in children and adolescents. *Neurotoxicology*. 2020;
85. Jedrychowski W, Perera FP, Jankowski J, Mrozek-Budzyn D, Mroz E, Flak E, et al. Very low prenatal exposure to lead and mental development of children in infancy and early childhood. *Neuroepidemiology*. 2009;
86. WHO. WHO | Lead poisoning and health. factsheet. 2017.

87. Sharma P, Chambial S, Shukla KK. Lead and Neurotoxicity. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2015.
88. Needleman HL, Gatsonis CA. Low-Level Lead Exposure and the IQ of Children: A Meta-analysis of Modern Studies. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1990;
89. Needleman H. Lead poisoning. *Annual Review of Medicine*. 2004.
90. Mason LH, Harp JP, Han DY. Pb neurotoxicity: Neuropsychological effects of lead toxicity. *BioMed Research International*. 2014.
91. Glass TA, Bandeen-Roche K, McAtee M, Bolla K, Todd AC, Schwartz BS. Neighborhood psychosocial hazards and the association of cumulative lead dose with cognitive function in older adults. *Am J Epidemiol*. 2009;
92. Bernard SM, McGeehin MA. Prevalence of Blood Lead Levels $\geq 5 \mu\text{g/dL}$ among US Children 1 to 5 Years of Age and Socioeconomic and Demographic Factors Associated with Blood Lead Levels 5 to 10 $\mu\text{g/dL}$, Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Pediatrics*. 2003;
93. Rocha A, Trujillo KA. Neurotoxicity of low-level lead exposure: History, mechanisms of action, and behavioral effects in humans and preclinical models. *NeuroToxicology*. 2019.
94. Norman EH, Bordley WC, Hertz-Picciotto I, Newton DA. Rural-urban blood lead differences in North Carolina children. *Pediatrics*. 1994;
95. Domblides A, Domblides H, Kharchenko V. Discrimination Between Celery Cultivars with the Use of Rapid Markers. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences*. 2008;
96. Helaly AA-D, El-Refy A, Mady E, Mosa KA, Craker L. Morphological and molecular analysis of three celery accessions. *Journal of medicinally active plants*. 2014;2(3):27–32.

97. Sowbhagya HB, Srinivas P, Krishnamurthy N. Effect of enzymes on extraction of volatiles from celery seeds. *Food Chem.* 2010;
98. Sowbhagya HB. Chemistry, Technology, and Nutraceutical Functions of Celery (*Apium graveolens* L.): An Overview. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014;
99. Shin JY, Che DN, Cho BO, Kang HJ, su Kim J, Jang S Il. Anti-inflammatory effect of hydrolyzed celery leaves extract in murine primary splenocyte. *J Food Biochem.* 2019;
100. Chonpathompikunlert P, Boonruamkaew P, Sukketsiri W, Hutamekalin P, Sroyraya M. The antioxidant and neurochemical activity of *Apium graveolens* L. and its ameliorative effect on MPTP-induced Parkinson-like symptoms in mice. *BMC Complement Altern Med.* 2018;
101. Malhotra SK. Celery. In: *Handbook of herbs and spices.* Elsevier; 2006. p. 317–36.
102. Desty. kandungan seledri ppm.pdf.
103. Powanda MC, Whitehouse MW, Rainsford KD. Celery seed and related extracts with antiarthritic, antiulcer, and antimicrobial activities. *Progress in Drug Research.* 2015;
104. Al-Asmari AK, Athar MT, Kadasah SG. An updated phytopharmacological review on medicinal plant of arab region: *Apium graveolens* Linn. *Pharmacognosy Reviews.* 2017.
105. Liu DK, Xu CC, Zhang L, Ma H, Chen XJ, Sui YC, et al. Evaluation of bioactive components and antioxidant capacity of four celery (*Apium graveolens* L.) leaves and petioles. *Int J Food Prop.* 2020;
106. Kooti W, Daraei N. A Review of the Antioxidant Activity of Celery (*Apium graveolens* L). *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2017.

107. Nickavar B, Kamalinejad M, Izadpanah H. In vitro free radical scavenging activity of five Salvia species. Pak J Pharm Sci. 2007;
108. Gao LL, Feng L, Yao ST, Jiao P, Qin SC, Zhang W, et al. Molecular mechanisms of celery seed extract induced apoptosis via S phase cell cycle arrest in the BGC-823 human stomach cancer cell line. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2011;
109. Chong Z, Feng Y. Protective effects of dl-3-n-butylphthalide on changes of regional cerebral blood flow and blood-brain barrier damage following experimental subarachnoid hemorrhage. Chin Med J (Engl). 1998;
110. Zhang P, fang Guo Z, ming Xu Y, sheng Li Y, gui Song J. N-Butylphthalide (NBP) ameliorated cerebral ischemia reperfusion-induced brain injury via HGF-regulated TLR4/NF- κ B signaling pathway. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2016;
111. Liang W, Cheung DWS, Tang HC, Lam WP, Zhang L, Leung PC, et al. Effects of 3-n-Butylphthalide from Celery on Vascular Dementia. In: Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline. 2015.
112. Liyanagamage DSNK, Martinus RD. Role of Mitochondrial Stress Protein HSP60 in Diabetes-Induced Neuroinflammation. Mediators Inflamm. 2020;2020.
113. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;
114. Mabrouk A, Cheikh H Ben. Thymoquinone supplementation reverses lead-induced oxidative stress in adult rat testes. Gen Physiol Biophys. 2015;
115. Farhadi F, Khameneh B, Iranshahi M, Iranshahy M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. Phytotherapy Research. 2019.

116. Nainggolan M, Sinaga KR, Sinaga SM, Nugraha SE. Effect of Ethanol Extract of Celery (*Apium graveolens* L) against Urea and Creatinine Level in Male Wistar Rats on Ethylene Glycol Induced Nephrolithiasis. In 2020.
117. Pu X, Storr SJ, Zhang Y, Rakha EA, Green AR, Ellis IO, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis*. 2017;22(3):357–68.
118. Liu X, Jiang S, Tian X, Jiang Y. Expression of cleaved caspase-3 predicts good chemotherapy response but poor survival for patients with advanced primary triple-negative breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2018;11(9):4363–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31949833> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6962992>
119. Taparia SS, Khanna A. Procyanidin-rich extract of natural cocoa powder causes ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis and reduction of pro-MMP-2 in epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Biomedicine and Pharmacotherapy* [Internet]. 2016;83:130–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.06.019>
120. LaBreche HG, Meadows SK, Nevins JR, Chute JP. Peripheral blood signatures of lead exposure. *PLoS One*. 2011;6(8).
121. Boskabady M, Marefati N, Farkhondeh T, Shakeri F, Farshbaf A, Boskabady MH. The effect of environmental lead exposure on human health and the contribution of inflammatory mechanisms, a review. *Environ Int* [Internet]. 2018;120(July):404–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.013>
122. Marianti A, Mahatmanti FW. Synergetic effect of chitosan and vitamin C on the oxidative enzyme status in rat exposed to lead acetate. *Acta Sci Biol Sci*. 2018;40(1):1–8.

