

**PENGARUH EKSTRAK *EUCHEUMA COTTONII*
TERHADAP KADAR INTERLEUKIN 1 DAN
EKSPRESI CASPASE 3 PADA SEL HEPATOSIT
TIKUS YANG DIINDUKSI BORAKS**

Tesis

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Magister (S2)**



Magister Ilmu Biomedik

**Ahmad Muhyi
MBK. 20.15.01.0168**

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

TESIS

PENGARUH EKSTRAK *EUCHEUMA COTTONII* TERHADAP KADAR INTERLEUKIN 1 DAN EKSPRESI CASPASE 3 PADA SEL HEPATOSIT TIKUS YANG DIINDUKSI BORAKS

disusun oleh

Ahmad Muhyi
MBK. 20.15.01.0168

telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 19 Agustus 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I



Dr.dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes
NIP. 210198046

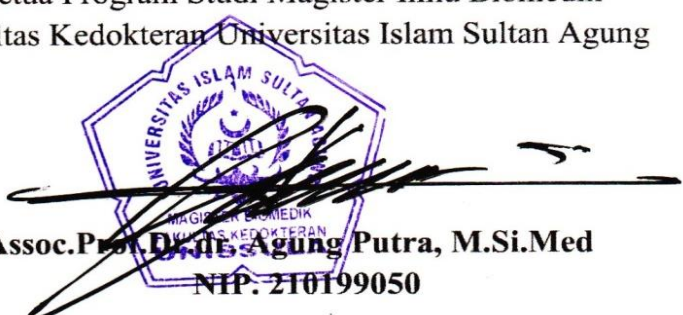
Pembimbing II



Dr.dr. Sri Priyantini, SpA
NIP. 210105097

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med
NIP. 210199050

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil karya 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/ tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 27 Agustus 2022



(Ahmad Muhyi)



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr. Ahmad Muhyi
Tempat / tanggal lahir : Jepara, 25 Desember 1989
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN 01 Clering Jepara : Lulus tahun 2002
2. MTs Nurul Huda Clering Jepara : Lulus tahun 2005
3. MA Raudlatul Ulum Guyangan Pati : Lulus tahun 2008
4. S1 Fakultas Kedokteran UIN Jakarta : Lulus tahun 2011
5. Profesi Dokter Fakultas Kedokteran UIN Jakarta : Lulus tahun 2014
6. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA Semarang : 2020 – sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : Sukarno
Ibu : Sungatmi
2. Nama Istri : Mariyatul Husna, Lc
3. Nama Anak : Ahna Syifa Az-Zahra

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah Swt yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penyusunan Tesis dengan judul **“PENGARUH EKSTRAK *EUCHEUMA COTTONII* TERHADAP KADAR INTERLEUKIN 1 DAN EKSPRESI CASPASE 3 PADA SEL HEPATOSIT TIKUS YANG DIINDUKSI BORAKS”**

Dalam menempuh gelar sarjana S2 Program Studi Magister Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, penyusun dalam penelitian ini memiliki banyak kekurangan dan keterbatasan selama proses pembuatan tesis. Berkat bantuan, bimbingan, motivasi, petunjuk dari banyak pihak. Penyusun mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya pada :

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH, M.H selaku Rektor UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Biomedik.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H, Sp.F selaku Dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program Magister Biomedik.
3. Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si.Med dan Dr. Hj. Ir. Titiek Sumarawati, M. Kes selaku Ketua dan Sekertaris Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang telah memberikan dorongan, semangat, bimbingan dan masukan pada penyusun selama mengikuti program magister khususnya pada saat penyusunan Tesis ini.
4. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku pembimbing I yang telah memberikan dorongan, semangat, bimbingan dan masukan pada penyusun selama penyusunan Tesis ini.
5. Dr. dr. Sri Priyantini, SpA selaku pembimbing II yang telah sabar meluangkan waktu, pikiran, semangat, bimbingan dan masukan pada penyusun selama penyusunan Tesis ini.

6. Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si.Med selaku penguji I yang telah memberikan masukan dan arahan dalam perbaikan Tesis.
7. Dr. Hj. Ir. Titiek Sumarawati, M. Kes selaku penguji II yang telah memberikan masukan dan arahan dalam perbaikan Tesis.
8. Dr. dr. Hj. Chodidjah, M.Kes.PA selaku penguji III yang telah memberikan masukan dan arahan dalam perbaikan Tesis.
9. Para dosen pengajar dan rekan- rekan staf Magister Biomedik yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah memberikan doa dan dorongan kepada penyusun.
10. Para Staf Laboratorium Kimia dan SCCR yang telah membantu penyusun selama melakukan penelitian.
11. Kedua orang tua, istri dan anak yang telah memberikan doa dan dukungan, sehingga Tesis ini dapat terselesaikan.
12. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan Tesis yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Karya tulis ilmiah ini masih sangat terbatas dan jauh dari kata sempurna, tetapi penyusun berharap dapat memberikan manfaat bagi diri sendiri, bagi program pendidikan Magister Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, serta bagi pihak-pihak lain yang berkepentingan.

Akhir kata, semoga Allah Swt senantiasa melimpahkan rahmat dan inayah-Nya kepada kita semua, Aamiin, dan penelitian ini menjadi bahan informasi yang bermanfaat bagi pengembangan ilmu kedokteran terutama dalam bidang ilmu biomedik.

Semarang, 27 Agustus 2022

Ahmad Muhyi

ABSTRAK

PENGARUH EKSTRAK *EUCHEUMA COTTONII* TERHADAP KADAR INTERLEUKIN 1 DAN EKSPRESI CASPASE 3 PADA SEL HEPATOSIT TIKUS YANG DIINDUKSI BORAKS

Latar belakang : Boraks banyak dijadikan bahan tambahan pada makanan. Boraks menyebabkan stres oksidatif pada sel hepatosit. Kondisi ini menyebabkan aktivasi sitokin proinflamasi yang ditandai peningkatan interleukin 1 dan aktivasi signal apoptosis yang ditandai peningkatan ekspresi caspase 3. Ekstrak *Eucheuma cottonii* berperan sebagai antioksidan yang mampu menghambat stres oksidatif pada sel hepatosit.

Metode : Penelitian eksperimental dengan *design post test control group*. 20 tikus wistar dibagi 4 kelompok. K1 tanpa perlakuan, pada K2 diberikan Na CMC 0,5 % per oral per hari selama 17 hari dan pada hari ke 4 selang 1 jam diberikan boraks 40 mg/kgBB per oral per hari selama 14 hari. P1 dan P2 diberikan ekstrak *Eucheuma cottonii* 600 mg/kgBB dan 1200 mg/kgBB dalam Na CMC 0,5 % per oral per hari selama 17 hari dan pada hari ke 4 selang 1 jam diberikan boraks 40 mg/kgBB per oral per hari selama 14 hari.

Hasil : Analisa konsentrasi interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Hasil uji beda kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 menunjukkan hasil bermakna ($p < 0,05$), selanjutnya di uji beda antar kelompok dengan *Mann Whitney*.

Kesimpulan : Pemberian ekstrak *Eucheuma cottonii* berpengaruh terhadap kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit.

Kata kunci : boraks, sel hepatosit, interleukin 1, caspase 3, *Eucheuma cottonii*.

ABSTRACT

THE EFFECT OF *EUCHEUMA COTTONII* EXTRACT IN INTERLEUKIN 1 LEVEL AND CASPASE 3 EXPRESSION ON HEPATOCYTE CELL OF RATS INDUCED BY BORAX

Background : Borax many used as additive in various food, which is considered to induce oxidative stress in hepatocyte cell. In this condition, it may cause the activation of pro-inflammatory cytokines, marked by the high Interleukin-1 and the activation of apoptotic signal, which is also marked by the high Caspase-3 expression. The research finds that *Eucheuma cottonii* extract has a significant role for antioxidant to suppress oxidative stress in hepatocyte cell.

Methods : Experimental research with *posttest control group design*. Using the sample of 20 Wistar rats randomly divided into four groups. Group K1 without any intervention. Group K2 given NaCMC 0,5% orally once a day for 17 days, on the fourth day given Borax 40 mg/kg body-weight (BW) with one hour interval for 14 days. Groups (P1 and P2) were given *Eucheuma cottonii* extracts at the dose of 600 mg/kgBW and 1200 mg/kgBW in NaCMC 0,5% orally once a day for 17 days, on the fourth day given Borax 40 mg/kgBW with one hour interval for 14 days.

Results : Using *Kruskal Wallis* test to analyze the Interleukin-1 level and Caspase-3 expression. It finds that the test of difference on interleukin 1 level and caspase 3 expression showed a significant difference ($p < 0.05$), then the test of difference was continued using *Mann Whitney* test.

Conclusion : *Eucheuma cottonii* extract has an effect on the Interleukin-1 level and caspase- 3 expression of hepatocyte cell that was induced by Borax.

Keyword : borax, hepatocyte cell, interleukin 1, caspase 3, *Eucheuma cottonii*.

The logo of Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA) is a shield-shaped emblem. It features a central figure of a person with arms raised, set against a background of a sun and a crescent moon. The name 'UNISSULA' is written in bold, yellow capital letters across the middle of the shield. Below it, the name is written in Arabic script: 'جامعة سلطان أبجوج الإسلامية'. The entire logo is rendered in a light yellow color with a subtle watermark effect.

UNISSULA
جامعة سلطان أبجوج الإسلامية

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR.....	V
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR SINGKATAN.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.4. Originalitas Penelitian.....	6
1.5. Manfaat Penelitian.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Sifat Kimia dan Fisik pada Boraks.....	9
2.2. Fungsi Boraks.....	10
2.3. Interleukin-1.....	10
2.4. Produksi Interleukin-1 Akibat Paparan Boraks.....	10
2.5. Unit Fungsional Sel Hepatosit.....	14
2.6. Pengaruh Paparan Boraks pada Sel Hepatosit.....	15
2.7. Apoptosis Sel Hepatosit.....	17
2.8. Caspase 3.....	19
2.9. Rumput Laut <i>Eucheuma Cottoni</i>	20

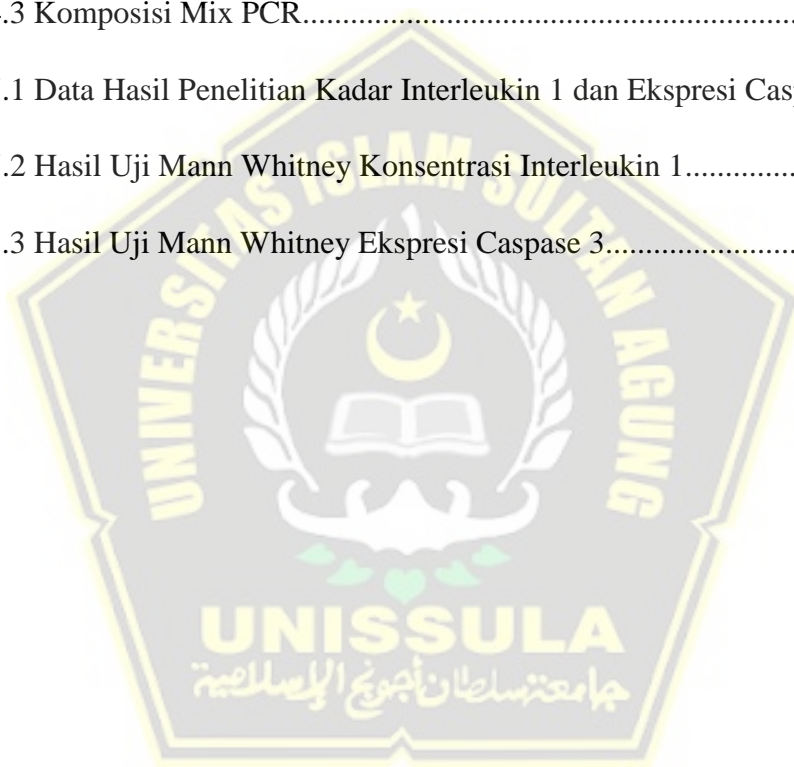
2.10. Morfologi <i>Eucheuma Cottonii</i>	21
2.11. Taksonomi <i>Eucheuma Cottonii</i>	22
2.12. Kandungan Senyawa Bioaktif <i>Eucheuma Cottonii</i>	23
2.13. Peran <i>Eucheuma Cottonii</i> sebagai Antioksidan.....	24
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS....	28
3.1. Kerangka Teori.....	28
3.2. Kerangka Konsep.....	31
3.3. Hipotesis	31
BAB VI METODOLOGI PENELITIAN.....	32
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	32
4.2. Variabel Penelitian.....	32
4.3. Definisi Operasional Penelitian.....	32
4.4. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian.....	33
4.5. Alat dan Bahan Penelitian.....	36
4.6. Cara Penelitian.....	36
4.7. Tempat dan Waktu Penelitian.....	44
4.8. Analisa Hasil Penelitian.....	44
4.9. Alur Penelitian.....	46
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	47
5.1. Hasil Penelitian.....	47
5.2. Pembahasan.....	51
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	56
6.1. Kesimpulan.....	56
6.2. Saran.....	57
Daftar Pustaka.....	58
Lampiran.....	63

DAFTAR SINGKATAN

AIF-1	: <i>Apoptotic inducing factor 1</i>
CARD	: <i>Caspase Recruitment Domain</i>
CT	: <i>Cycle Threshold</i>
DAMPs	: <i>Damage associated molecular patterns</i>
DISC	: <i>Death Inducing Signaling Complex</i>
E-Selectin	: <i>Endotelial-selectin</i>
FADD	: <i>Fas Associated Death Domain</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IC50	: <i>Inhibitory concentration 50</i>
NLRP-3	: <i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
PARP	: <i>Poly - ADP Ribose Polymerase</i>
PAK 2	: <i>p21-activated kinase 2</i>
PSGL-1	: <i>P selectin glycoprotein ligan-1</i>
PUFA	: <i>Poly unsaturated fatty acid</i>
PUMA	: <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
TRAIL	: <i>TNF- related Apoptosis Inducing Ligan</i>
TRADD	: <i>TNF- Reseptor Associated Death Domain</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 2.1 Senyawa pada ekstrak 100 gram <i>Eucheuma Cottonii</i>	23
Tabel 4.1 Komposisi Reagen Sintesis cDNA.....	42
Tabel 4.2 Komposisi Reagen Sintesis cDNA.....	43
Tabel 4.3 Komposisi Mix PCR.....	44
Tabel 5.1 Data Hasil Penelitian Kadar Interleukin 1 dan Ekspresi Caspase 3.	48
Tabel 5.2 Hasil Uji Mann Whitney Konsentrasi Interleukin 1.....	49
Tabel 5.3 Hasil Uji Mann Whitney Ekspresi Caspase 3.....	50



DAFTAR GAMBAR

1. Boraks berbentuk kristal putih.....	9
2. Mekanisme sekresi interleukin-1.....	12
3. Mekanisme interleukin-1 terhadap migrasi sel leukosit.....	13
4. Unit fungsional hepar.....	15
5. Peran ROS pada jejas sel.....	16
6. Peran mitokondria dalam jejas sel dan kematian sel.....	17
7. Mekanisme apoptosis.....	20
8. Morfologi <i>Eucheuma Cottonii</i>	21
9. Talus pada <i>Eucheuma Cottonii</i>	22
10. Aktivitas flavonoid sebagai antioksidan.....	24
11. Mekanisme flavonoid mereduksi radikal bebas.....	25
12. Mekanisme β -karoten mereduksi radikal bebas.....	27
13. Mekanisme flavonoid menghambat produksi sitokin proinflamasi...	27
14. Kerangka teori.....	30
15. Kerangka konsep.....	31
16. Alur penelitian.....	46
17. Grafik Perbedaan Rerata Konsentrasi IL 1 hari ke-18.....	49
18. Grafik Perbedaan Rerata Ekspresi Caspase 3 hari ke-18.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Konsentrasi Interleukin 1 dan Ekspresi Caspase 3.....	63
Lampiran 2 Hasil SPSS.....	64
Lampiran 3 Dokumentasi Penelitian.....	75
Lampiran 4 <i>Ethical Clearance</i>	78
Lampiran 5 Surat Keterangan Identifikasi Tumbuhan.....	79
Lampiran 6 Surat Keterangan Pembuatan Ekstrak.....	80
Lampiran 7 Surat Keterangan Penelitian.....	81



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kebutuhan makanan menjadi kebutuhan vital dalam kehidupan sehari-hari. Diantara usaha yang dilakukan untuk memenuhi kebutuhan makanan seperti menambahkan bahan kimia tambahan dalam makanan dengan tujuan untuk meningkatkan kualitas dari makanan tersebut seperti memperbaiki warna, tekstur dan mengawetkan makanan. Diantara bahan yang saat ini sering ditambahkan dalam makanan adalah boraks. Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan No. 033 tahun 2012 menjelaskan bahwa penggunaan boraks sebagai bahan kimia tambahan pada makanan dilarang karena beracun terhadap semua sel.¹ Menurut WHO dosis fatal yang menyebabkan kematian akibat konsumsi boraks pada anak kecil dan bayi berkisar 3-6 gram per hari, sedangkan pada orang dewasa berkisar 15-20 gram per hari. Dosis konsumsi makanan yang mengandung boraks yang tidak menyebabkan bahaya pada kesehatan manusia sebesar $\leq 8,8$ mg/kg berat badan per hari.²

Makanan yang mengandung boraks masih banyak ditemukan. Misalnya sampel lontong yang dijual di pasar tradisional Semarang mengandung kadar boraks 189,96 mg/kg bahan makanan dengan uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer pada tahun 2017.³ Sebuah hasil penelitian terbaru pada tahun 2020 yang dilakukan di daerah Semarang tengah pada sampel bakso ditemukan kadar

boraks 3,02 % dengan metode uji titrasi asam basa.⁴ Konsumsi makanan yang mengandung boraks tidak berakibat buruk pada kesehatan secara langsung, namun secara kumulatif dapat menyebabkan gangguan organ seperti otak, hati dan ginjal.⁵ Masih banyaknya makanan yang ditemukan mengandung boraks mendorong peneliti untuk menggunakan boraks sebagai zat yang menginduksi kerusakan pada sel hati.

Hati berperan penting dalam detoksifikasi zat beracun pada tubuh. Oleh karena itu, hati sangat rentan sekali mengalami kerusakan.⁶ Boraks ketika masuk dalam tubuh berubah menjadi ion radikal $4B(OH)4^-$ yang akan berikatan dengan ion asam lemak tidak jenuh membentuk radikal hidroksil $(OH)^*$. Radikal bebas hidroksil mengakibatkan stres oksidatif pada sel hepatosit seperti kerusakan DNA yang bisa mengaktifasi signal apoptosis melalui jalur mitokondria. Apoptosis pada sel hepatosit ditandai dengan peningkatan ekspresi caspase 3 yang merupakan caspase eksekutor pada proses apoptosis sel.⁷ Selain itu, radikal bebas dapat menyebabkan peningkatan sekresi sitokin proinflamasi seperti interleukin 1 yang berperan dalam proses inflamasi pada sel yang mengalami kerusakan dengan merekrut migrasi sel radang seperti neutrofil dan monosit.⁸ Reaksi inflamasi meningkatkan pembentukan radikal bebas yang dapat memperberat kerusakan sel hepatosit.⁸

Hasil penelitian pada hewan coba tikus galur wistar menunjukkan pemberian boraks selama 14 hari dengan dosis 40 mg/kgBB menyebabkan kerusakan pada sel hepatosit tikus berupa degenerasi dan nekrosis sel dengan metode pemeriksaan histopatologi.⁹ Dalam penelitian lain pada hewan coba tikus

menunjukkan pemberian boraks dengan dosis 56 mg/hari selama 14 hari dapat meningkatkan ekspresi interleukin 2 dengan metode imunohistokimia.¹⁰

Tubuh manusia membutuhkan antioksidan secara *endogen* maupun *eksogen* untuk menghambat dampak negatif dari radikal bebas. Penggunaan obat-obatan seperti Vitamin C telah terbukti meningkatkan kemampuan sel dalam menangkal radikal bebas dalam tubuh. Namun obat-obat tersebut mempunyai efek samping yang berbahaya apabila digunakan dalam jangka lama.¹¹ Sebagai alternatifnya adalah menggunakan antioksidan alami yang dapat ditemukan dalam berbagai tanaman. Indonesia mempunyai potensi yang sangat besar dalam pengembangan antioksidan alami dari jenis rumput laut. Dibandingkan dengan antioksidan konvensional rumput laut memiliki beberapa kelebihan seperti budidaya yang mudah, harga relatif lebih murah, mudah dalam pengolahan dan tidak menimbulkan efek samping yang membahayakan.¹²

Rumput laut jenis *Euचेuma cottonii* mengandung berbagai senyawa seperti protein, serat, karbohidrat, asam lemak esensial, dan mineral.¹³ Dalam sebuah studi fitokimia pada *Euचेuma cottonii* ditemukan kandungan alkaloid, flavonoid, dan saponin.¹⁴ Dalam suatu uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak rumput laut *Euचेuma cottonii* menghasilkan nilai IC₅₀ (*inhibitory concentration 50*) sejumlah 23,15 µg/mL. Nilai tersebut menunjukkan ekstrak *Euचेuma cottonii* mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Beberapa senyawa bioaktif pada rumput laut *Euचेuma cottonii* berperan dalam sintesis enzim antioksidan seperti *katalase*, *superoksida dismutase (SOD)* dan *glutathione*

*peroksidase (GPx)*¹⁵ Kandungan senyawa lain seperti karotenoid juga ditemukan pada rumput laut *Eucheuma cottonii*.¹⁶

Studi terdahulu menunjukkan pemberian ekstrak *Eucheuma cottonii* per oral dosis 800 mg/kg BW menurunkan level SGOT, SGPT, ALP, MDA, dan meningkatkan level SOD dan GPx pada tikus yang dipapar logam timbal asetat.¹⁷ Hasil studi lain menunjukkan pemberian ekstrak *Eucheuma cottonii* per oral dosis 150 mg/kgBB menurunkan tingkat kerusakan hati yang ditandai dengan penurunan kadar enzim SGOT dan SGPT serta nekrosis sel hepatosit tikus yang dipapar natrium nitrit.¹⁸

Berdasarkan data diatas untuk mencegah efek negatif dari paparan radikal bebas dalam tubuh perlu pemberian antioksidan yang seimbang. Studi tentang pengaruh ekstrak *Eucheuma cottonii* terhadap kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit akibat paparan boraks masih sangat terbatas, sehingga diperlukan penelitian untuk menjelaskan mekanisme ekstrak *Eucheuma cottonii* dalam melindungi organ hati dari paparan boraks. Penelitian ini membandingkan pengaruh ekstrak *Eucheuma cottonii* dosis 600 mg/kgBB dan 1200 mg/kgBB terhadap kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit tikus yang diinduksi dengan boraks.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian penjelasan diatas, maka dapat dirumuskan permasalahan pada penelitian ini yaitu “ Apakah terdapat pengaruh ekstrak

Eucheuma cottonii terhadap kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit tikus yang diinduksi dengan boraks “ ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Eucheuma cottonii* terhadap kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit yang diinduksi boraks.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk menilai kadar interleukin 1 pada tikus yang diinduksi boraks dan diberikan ekstrak *Eucheuma cottonii* dosis 600 mg/kgBB dan 1200 mg/kgBB.
2. Untuk menilai ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit tikus yang diinduksi boraks dan diberikan ekstrak *Eucheuma cottonii* dosis 600 mg/kgBB dan 1200 mg/kgBB.
3. Menganalisis perbedaan kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit tikus pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Variabel Bebas	Variabel Tergantung	Hasil
1.	Giftania, 2017 ¹⁷	Potensi ekstrak (<i>Eucheuma cottonii</i>) sebagai hepato protektor pada mencit yang diinduksi dengan timbal asesat	Ekstrak <i>Eucheuma cottonii</i>	SGOT, SGPT, ALP, MDA, SOD, GPx, dan histopatologi hepar	Pemberian ekstrak <i>Eucheuma cottonii</i> per oral dosis 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB menurunkan level SGOT, SGPT, ALP, MDA, dan meningkatkan level SOD dan GPx
2.	Romadhiana, 2014 ¹⁹	The effects of <i>Eucheuma cottonii</i> on alveolar macrophage MDA levels in bronchoalveolar lavage fluid in chronically particulate matter 10 coal dust-exposed rats	Ekstrak <i>Eucheuma cottonii</i>	Jumlah makrofag dan MDA	Pemberian ekstrak <i>Eucheuma cottonii</i> pada dosis 150 mg/kgBB dan dosis 300 mg/kgBB menurunkan level MDA
3.	Nurul 'Ain, 2015 ²⁰	(<i>Eucheuma cottonii</i>) reduced inflammation, mucin synthesis, eosinophil	Ekstrak <i>Eucheuma cottonii</i>	Ekspresi TNF- α , NF- κ B, EGFR dan MMP-9	Pemberian ekstrak <i>Eucheuma cottonii</i> dengan gastric tube dosis 300 mg/kgBB menurunkan

		infiltration and <i>MMP-9</i> expressions in asthma induced rats compared to Loratadine			jumlah eosinofil, penurunan ekspresi TNF- α , NF- κ B, EGFR dan ekspresi MMP-9
4.	Neca Herlina, 2021 ⁹	Pengaruh pemberian ekstrak seledri (apium Graveolens l.) terhadap gambaran mikroskopis Hepatosit tikus yang di induksi boraks	Pemberian ekstrak seledri (apium Graveolens s l.)	Gambaran sel hepatosit	Pemberian boraks 40 mg/kgBB per oral menunjukkan kerusakan sel hepatosit dan pemberian ekstrak seledri dosis 300 mg/kgBB dan 600 mg/kgBB menunjukkan penurunan tingkat kerusakan sel hepatosit
5.	Ida Ayu, 2020 ¹⁸	Hepato protektor Rumput Laut <i>Eucheuma cottonii</i> Pada tikus yang diinduksi Natrium Nitrit (NaNO ₂)	Ekstraks <i>Eucheuma cottonii</i>	SGOT, SGPT, dan histopatologi hepar.	Pemberian ekstrak <i>Eucheuma cottonii</i> per oral pada dosis 150 mg/kgBB, dosis 300 mg/kgBB dan dosis 450 mg/kgBB menurunkan kadar SGPT dan SGOT serta menurunkan degenerasi lemak dan nekrosis

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian lainnya adalah variabel terikat yaitu kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit tikus. Variabel lain yang berbeda adalah jenis induksi yang diberikan menggunakan boraks.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Memberikan informasi ilmiah yang menjelaskan pengaruh pemberian ekstrak rumput laut jenis *Eucheuma cottonii* terhadap kadar interleukin 1 sebagai sitokin yang berperan dalam reaksi inflamasi dan ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit akibat paparan boraks.

1.5.2. Manfaat Praktis

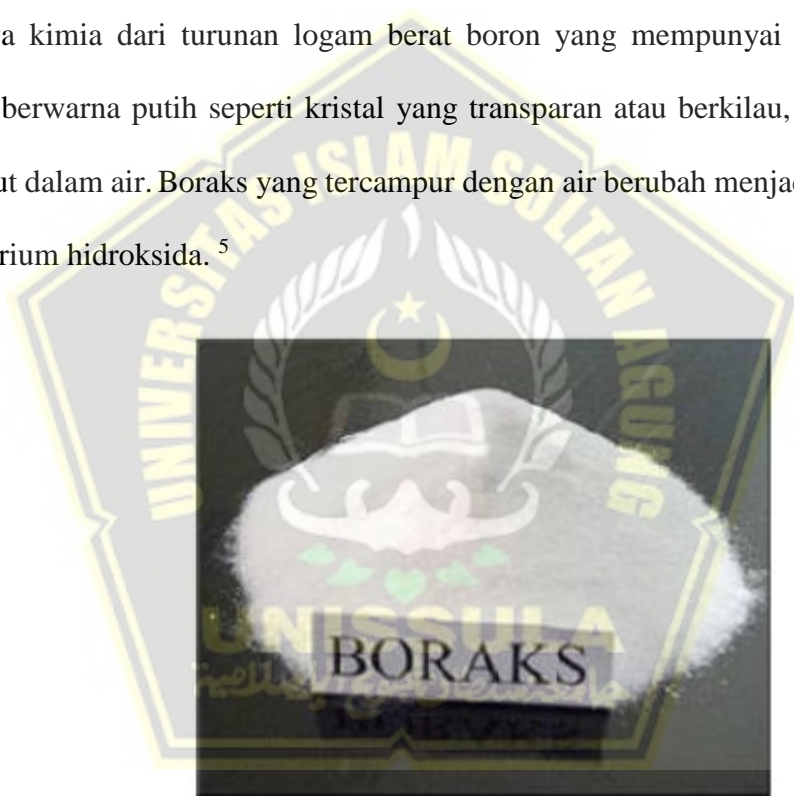
Dengan hasil penelitian ini rumput laut terutama jenis *Eucheuma cottonii* diharapkan dapat dimanfaatkan menjadi alternatif antioksidan alami untuk melindungi kerusakan hati dari paparan makanan yang mengandung boraks.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sifat Kimia dan Fisik pada Boraks

Boraks atau *natrium tetraborate decahydrate*, *natrium biborat*, *natrium piroborat*, *natrium tetraborate* dengan rumus kimia $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ merupakan senyawa kimia dari turunan logam berat boron yang mempunyai ciri-ciri fisik serbuk berwarna putih seperti kristal yang transparan atau berkilau, tidak berbau dan larut dalam air. Boraks yang tercampur dengan air berubah menjadi asam borat dan natrium hidroksida.⁵



Gambar 1. Boraks berbentuk kristal putih⁵

Senyawa asam borat kelarutannya bertambah apabila ditambahkan asam klorida. Asam borat ini mudah menguap dengan pemanasan dan pada suhu 100°C satu molekulnya airnya berkurang dan berubah menjadi senyawa asam metaborat (HBO_2). Asam borat mempunyai nilai pH 9,5 dan bersifat basa pada garam

alkalinya. Berat molekul senyawa ini 61,83 dengan sifat fisik berupa larutan jernih, tidak berbau serta sedikit manis.¹⁰ Kelarutan boraks pada air dengan suhu 25°C sekitar 62,5 g/L. Peningkatan suhu air menyebabkan kelarutannya meningkat. Boraks tidak larut dalam senyawa alkohol.²

2.2. Fungsi Boraks

Penggunaan boraks banyak pada industri kimia yang berfungsi untuk mempercepat proses peleburan dan memperbaiki kualitas warna lebih terang. Boraks juga digunakan pada industri keramik sebagai bahan pelapis agar tampak mengkilat.²¹ Pada industri obat, boraks digunakan sebagai bahan antiseptik dan desinfektan, selain itu juga digunakan sebagai bahan pengawet.²²

2.3. Interleukin 1

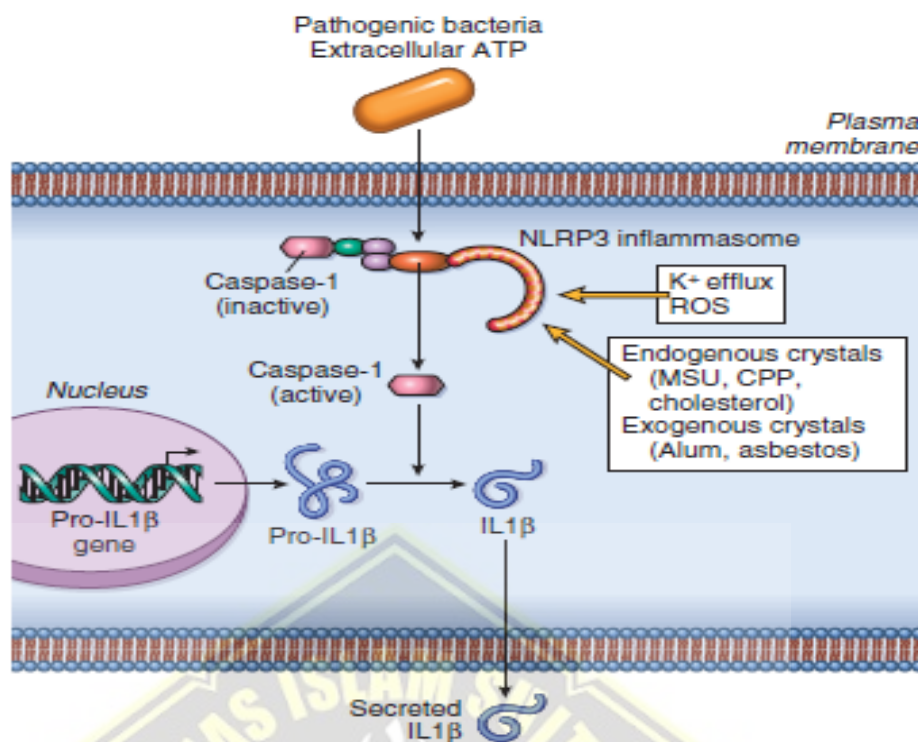
Interleukin 1 merupakan bagian dari sitokin proinflamasi interleukin *family* yang disekresikan oleh sel imun seperti sel makrofag dan monosit yang mempunyai beberapa fungsi seperti reaksi inflamasi, gejala demam, dan menginduksi sekresi protein pada fase akut cedera sel hepatosit.²³ Dalam proses terjadinya inflamasi interleukin 1 mengaktifkan migrasi sel radang seperti neutrofil dan monosit menuju ke jaringan yang mengalami kerusakan.²⁴

2.4. Produksi Interleukin 1 Akibat Paparan Boraks

Makanan yang mengandung boraks ketika berada di lambung berinteraksi dengan asam lambung berubah menjadi asam borat dan terdisosiasi menjadi

boron.²⁵ Selanjutnya boron diserap dan masuk ke aliran pembuluh darah vena porta hepatica dan arteri mesenterica, dan didistribusikan ke seluruh organ tubuh seperti organ hati, organ ginjal dan bisa sampai pada organ otak. ²⁶ Ion radikal bebas $4B(OH)4^-$ yang terbentuk akibat paparan boraks mencari pasangan ion asam lemak tidak jenuh pada membran sel hepatosit dan membentuk radikal bebas hidroksil (OH^*) sehingga terjadi peroksidasi lipid pada membran sel sel hepatosit.⁷

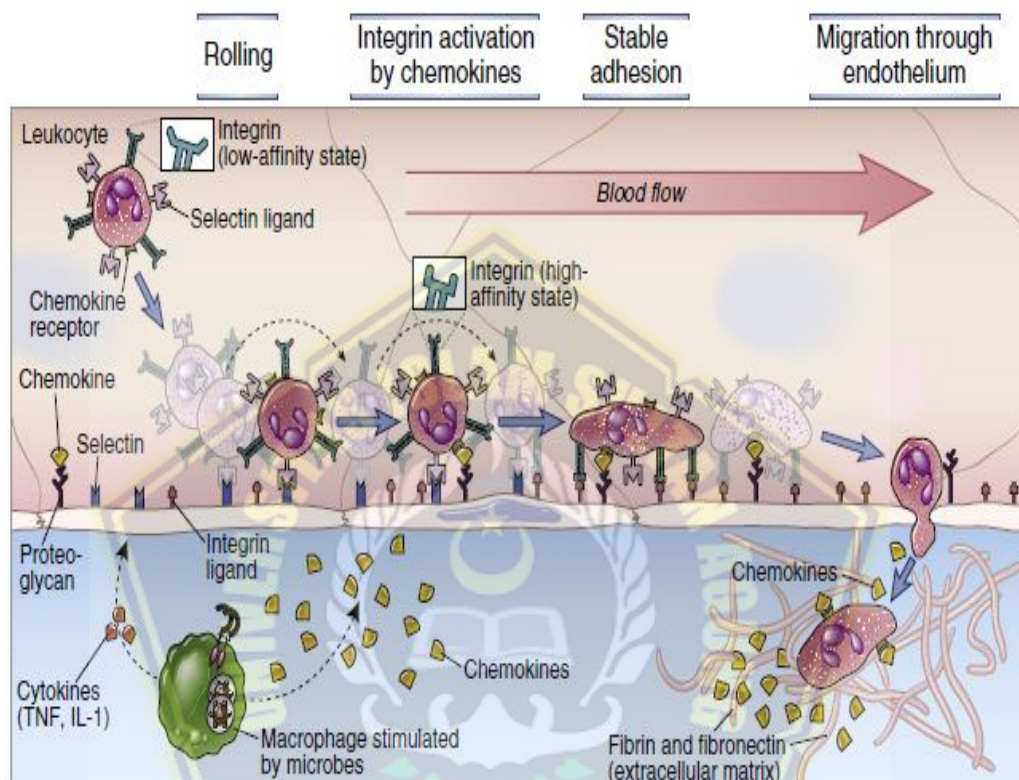
Reactive oxygen species (ROS) mengaktifkan sel makrofag yang ada pada hati atau disebut dengan sel kupfer untuk memproduksi sitokin proinflamasi dengan cara mengirimkan signal melalui reseptor *NOD-like receptor, pyrin domain containing 3 (NLRP-3)* sitosol untuk mengaktifkan faktor transkripsi NF-kB yang membentuk Pro IL 1β , kemudian NLRP-3 juga mengaktifkan caspase 1 sehingga terjadi perubahan Pro IL 1β menjadi IL 1β . Produksi sitokin interleukin 1 tersebut menyebabkan terjadinya migrasi sel radang menuju sel yang mengalami kerusakan dan berperan terjadi reaksi inflamasi.⁸ Aktifasi NLRP-3 juga bisa karena bakteri patogen ekstraselular ATP, efluks K^+ , kristal endogen seperti asam urat dan kolesterol.⁸



Gambar 2. Mekanisme sekresi interleukin 1 ⁷

Interleukin 1 yang disekresikan oleh sel kupfer aktif menyebabkan terjadinya migrasi neutrofil dan monosit menuju sel hepatosit yang mengalami kerusakan. Mekanismenya adalah sel kupfer aktif melepas interleukin 1 yang dapat mengaktivasi sel endotel untuk mengekspresikan molekul *Endotelial-selectin* (*E-Selectin*). Sel neutrofil aktif merespon dengan cara mengekspresikan reseptor *Pselectin glycoprotein ligand-1* (*PSGL-1*) yang dapat mengikat *P-selectin* dan *E-selectin* endotelial sehingga terjadi perlekatan dan migrasi.^{27,28} Proses migrasi dimulai dengan dilepaskannya kemokin CXCL8 oleh sel makrofag residen aktif sebagai sinyal kemoatraktan poten bagi sel neutrofil. Neutrofil merespon dengan mengikat CXCL8 melalui reseptor CXCR1 dan CXCR2. Bersamaan dengan hal tersebut sel makrofag juga melepas kemokin CXCL1 untuk memperkuat daya

kemotaksis. Faktor kemotaksis lainnya adalah aktivasi jalur komplemen (komplemen C5a aktif) sebagai sinyal kemotaksis dan aktivasi sel neutrofil dan monosit. Akhir dari proses aktivasi tersebut menyebabkan reaksi inflamasi dan fagositosis pada sel hepatosit yang mati.²⁷



Gambar 3. Mekanisme interleukin 1 terhadap migrasi sel leukosit²⁸

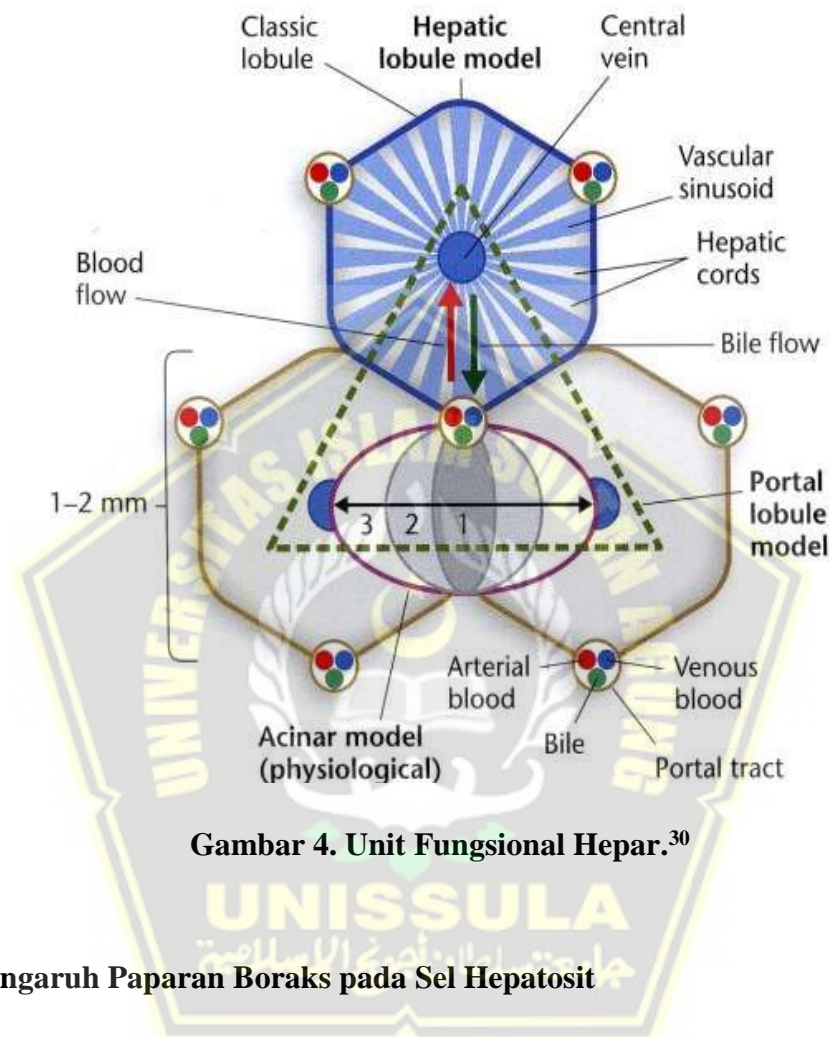
Paparan boraks secara kumulatif meningkatkan produksi radikal bebas seperti *superoksida* (O_2^-) dan *hidroksil* (OH^-) yang berakibat terjadinya peroksidasi lipid, modifikasi protein retikulum endoplasma dan kerusakan DNA. Kondisi ini akan berakhir dengan kematian sel melalui proses nekrosis atau proses apoptosis.⁷ Selain itu radikal bebas yang terbentuk juga dapat dilepaskan pada ruang

ekstraseluler yang dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan sekitar sel hepatosit.²⁹

2.5. Unit Fungsional Sel Hepatosit

Unsur utama pada struktur hepar adalah sel-hepatosit. Kumpulan sel hepatosit membentuk lapisan sel dengan satu atau dua inti bulat dan satu atau lebih nukleolus. Sel hepatosit tersusun berkelompok membentuk suatu unit struktural, yang disebut lobulus hepar. Struktur lobulus dikelompokkan dalam 3 golongan yang berbeda. Pertama yaitu lobulus klasik yang berbentuk heksagonal dengan vena sentralis terletak pada pusat lobulus. Kedua, saluran portal berbentuk segitiga dengan vena sentralis sebagai sudut-sudutnya dan segitiga Kiernan atau saluran portal sebagai pusatnya. Ketiga, asinus hepar yang merupakan unit terkecil hepar.³⁰ Sel-sel pada asinus hepar dibagi menjadi 3 zona berdasarkan sistem aliran darah di dalam lobulus, yaitu: zona 1 yang menerima darah dari arteri hepatica dan vena porta, zona ini disebut dengan zona perifer atau periportal; kemudian zona 3 terletak di sekitar vena sentralis yang disebut dengan zona sentrilobuler, dan zona 2 (*midzonal*) terletak di antara zona 1 dan zona 3. Sel-sel yang terletak pada zona 1 berdekatan dengan pembuluh darah, sehingga kaya *suplai* nutrisi dan oksigen, dan hanya sedikit metabolit-metabolit yang berada pada sel tersebut. Sel-sel pada zona 2 menerima *suplai* darah yang mengandung nutrisi dan oksigen tidak sebanyak pada zona 1. Sel-sel pada zona 3 adalah sel-sel yang paling dekat dengan vena sentralis yang mengandung sedikit oksigen dan nutrisi serta tinggi konsentrasi metabolitnya, karena pada zona ini terdapat enzim sitokrom P450 yang berperan

penting dalam katabolisme obat dan senyawa eksogen yang berpotensi toksik, akibatnya daerah sekeliling vena sentralis lebih sering mengalami kerusakan dibanding daerah perifer.³¹

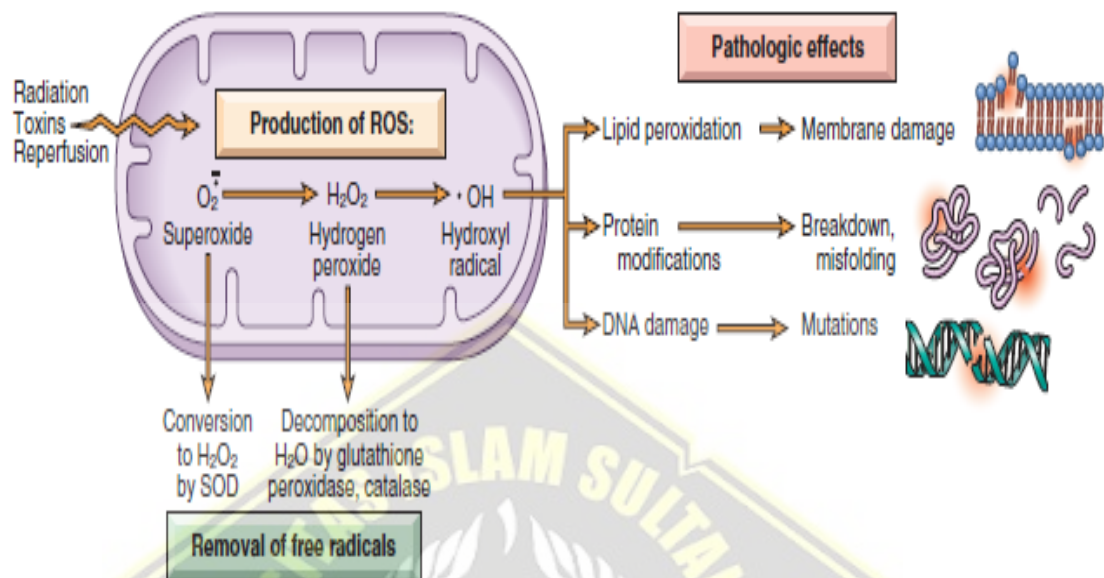


Gambar 4. Unit Fungsional Hepar.³⁰

2.6. Pengaruh Paparan Boraks pada Sel Hepatosit

Mekanisme boraks terhadap kerusakan sel hepatosit karena radikal hidroksil menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid sehingga terjadi kerusakan membran sel, kemudian terjadi kerusakan DNA yang menyebabkan mutasi dan modifikasi protein yang menyebabkan kesalahan pemecahan protein. Senyawa aktif pada ekstrak *Eucheuma cottonii* seperti Se, Zn, Cu, Fe berperan sebagai kofaktor sintesis

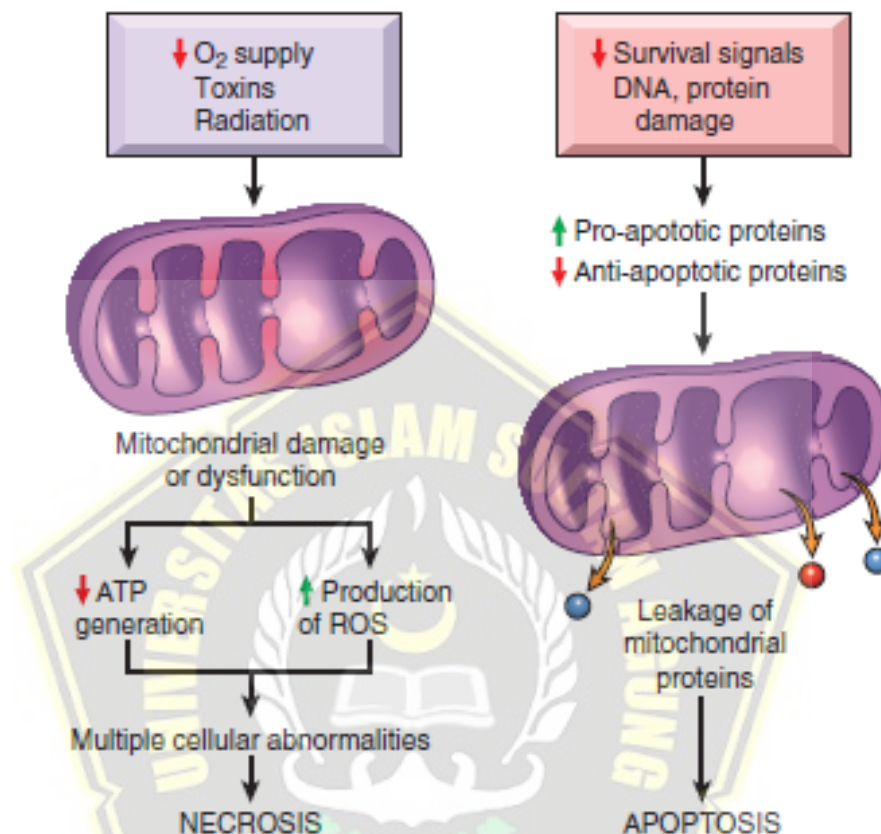
enzim *katalase*, *superoksida dismutase* dan *glutation peroksidase*. Enzim ini berfungsi mengkonversi radikal bebas aktif menjadi tidak aktif.⁷



Gambar 5. Peran ROS pada jejas sel⁷

Tahap akhir dari kerusakan pada sel hepatosit adalah kematian sel yang bisa terjadi karena proses nekrosis atau apoptosis. Kedua proses kematian sel ini diperankan oleh mitokondria pada sel hepatosit. Kondisi hipoksia, paparan toksin dan radiasi menyebabkan disfungsi atau kerusakan mitokondria yang dapat menyebabkan terjadinya penurunan ATP dan peningkatan produksi ROS sehingga terjadi nekrosis sel. Reaksi inflamasi berperan dalam peningkatan pembentukan ROS pada sel hepatosit. Tahap kerusakan ini dimulai dari degenerasi sel sampai nekrosis sel. Selanjutnya adanya penurunan signal DNA dan kerusakan protein menyebabkan peningkatan aktivasi protein pro-apoptosis dan penurunan aktivasi protein anti-apoptosis sehingga terjadi pelepasan protein ke sitoplasma dan

menginduksi terjadinya apoptosis sel.⁷ Berikut merupakan mekanisme terjadinya kematian sel yang diperankan oleh mitokondria.



Gambar 6. Peran mitokondria dalam jejas sel dan kematian sel⁷

2.7. Apoptosis Sel Hepatosit

Apoptosis merupakan suatu kematian sel yang terprogram pada berbagai proses biologi. Apoptosis sel dapat terjadi ketika sel yang mengalami kerusakan tidak dapat dilakukan perbaikan lagi. Signal apoptosis berasal dari sel imun, jaringan sekitar sel atau secara *intrinsik* berasal dari sel itu sendiri. Kerusakan DNA

dan stres retikulum endoplasma akibat paparan radikal bebas dari zat toksik dapat menginduksi sel untuk melakukan apoptosis.^{7,32}

Sinyal apoptosis dapat terjadi secara *ekstrinsik* (ekstraseluler) maupun secara *intrinsik* (intra seluler).³² Jalur apoptosis secara *ekstrinsik* terjadi akibat ikatan antara reseptor kematian (*death receptor*) dengan ligan pada membran sel sedangkan jalur *intrinsik* terjadi akibat pelepasan protein dari mitokondria. Mekanisme jalur *ekstrinsik*, diawali adanya pelepasan ligan seperti TNF α , FasL yang berikatan dengan reseptor kematian seperti *TNF-related Apoptosis Inducing Ligan* (TRAIL)-R1 dan R2, CD 95 (Fas) pada membrane sel. Adanya ikatan ligan dengan reseptor kematian membentuk *Fas Associated Death Domain* (FADD) dan *TNF-Reseptor Associated Death Domain* (TRADD) membentuk kompleks *Death Inducing Signaling Complex* (DISC) yang menginisiasi caspase 8 untuk mengaktifkan caspase 3 sebagai caspase eksekutor terjadinya apoptosis.^{32,33}

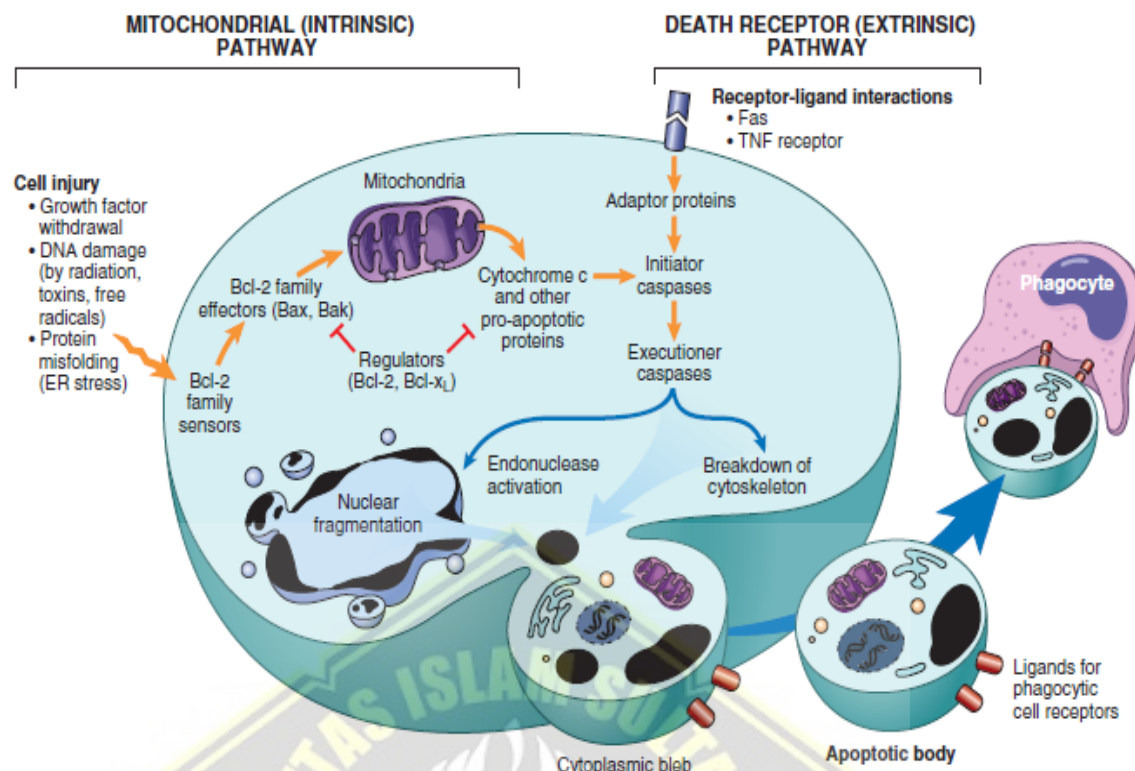
Mekanisme jalur *intrinsik* terjadi akibat paparan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan DNA. Adanya stress pada DNA mengaktifkan *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA), kemudian PUMA menyebabkan aktivasi *Bax* di sitosol dan terjadi insersi *Bax* dalam mitokondria dan menyebabkan gangguan pada mitokondria sehingga terjadi pelepasan berbagai protein apoptotik seperti sitokrom c dan *Apoptosis Inducing Factor* (AIF).³³

Kondisi dATP pada sel membentuk kompleks antara *APAF-1* dan sitokrom c, membentuk *Caspase Recruitment Domain* (CARD) yang diikuti dengan pembentukan kompleks apoptosom dan mengaktifasi caspase 9 sebagai caspase inisiator untuk mengaktifkan caspase 3.³³

2.8. Caspase 3

Protein *Cystein dependent aspartat specific protease* caspase 3 merupakan anggota dari keluarga caspase yang berperan sebagai caspase eksekutor pada proses apoptosis sel. Caspase 3 sebagai pro-enzim in aktif mengalami proses proteolitik pada residu aspartic menghasilkan dua sub unit dan mengalami dimerisasi membentuk enzim aktif. Caspase 3 juga berperan dalam memecah dan mengaktifkan caspase lainnya seperti caspase 6 dan 7. Caspase 3 sendiri diproses dan diaktifkan oleh caspase 8 pada jalur *ekstrinsik* dan caspase 9 pada jalur *intrinsik*.³³

Caspase 3 yang teraktivasi memecah berbagai substrat diantaranya enzim *repair DNA Poly - ADP Ribose Polymerase* (PARP) dan enzim DNA endonuklease sehingga terjadi *fragmentasi* inti sel dan kerusakan sitoskeleton. Caspase 3 juga mengaktifasi protein kinase *p21-activated kinase 2* (PAK 2) melalui proteolisis. Aktivasi protein ini dibutuhkan dalam membentuk *apoptotic body*. Sel yang membentuk *apoptotic body* mengeluarkan ligan yang terikat dengan reseptor pada makrofag untuk proses fagositosis.^{7,33} proses fagositosis *apoptotic body* oleh makrofag ini tidak menyebabkan terjadinya rreaksi inflamasi setelah terjadinya apoptosis sel.³³



Gambar 7. Mekanisme apoptosis ⁷

2.8. Rumput Laut *Euclima Cottoni*

Rumput laut adalah tumbuhan yang sulit dibedakan antara bagian akar, batang, dan daun. Semua bagian tumbuhannya disebut dengan *thallus*. Jenis rumput laut meliputi rumput laut hijau (*Chlorophyta*), rumput laut coklat (*Phaeophyta*), dan rumput laut merah (*Rhodophyta*). Rumput laut dari kelas (*Rhodophyceae*) menempati urutan terbanyak dari jumlah jenis rumput laut yang tumbuh di perairan laut Indonesia yaitu sekitar 452 jenis, setelah itu rumput laut (*Chlorophyceae*) sekitar 196 jenis dan rumput laut (*Phaeophyceae*) sekitar 134 jenis.³⁴

Negara Indonesia banyak mengembangkan budidaya rumput laut khususnya jenis rumput laut *Euclima Cottonii*. Diantara perairan yang banyak dikembangkan budidaya *Euclima Cottonii* seperti perairan Kalimantan dan perairan utara Jawa.¹²

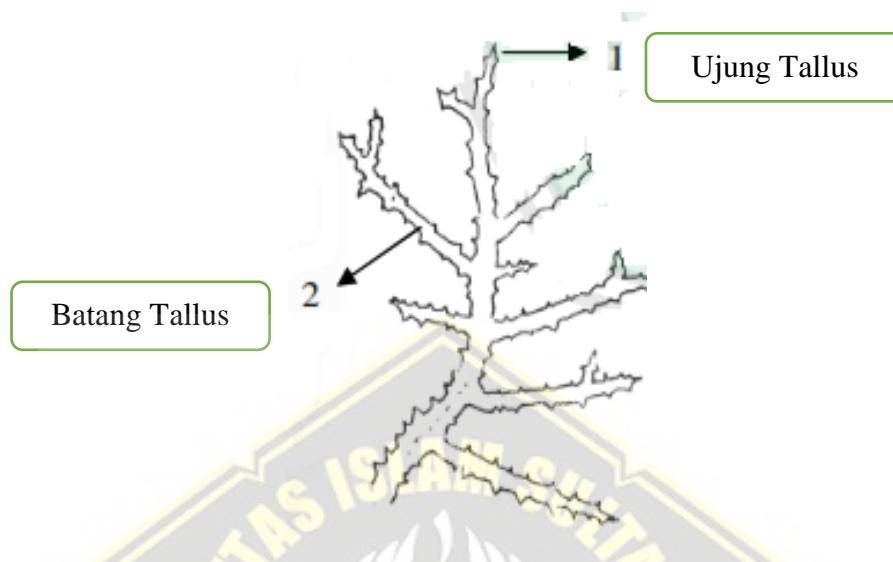
2.9. Morfologi *Euclima Cottonii*

Euclima Cottonii mempunyai karakteristik permukaannya licin, bentuk bulat silindris, berwarna merah kekuningan dan hijau, bercabang tidak teratur, dan talusnya menyerupai tulang rawan. Perubahan warna pada rumput laut terjadi karena faktor lingkungan sebagai suatu proses adaptasi kromatik antara proporsi pigmen klorofil dengan pencahayaan.³⁵



Gambar 8. Morfologi *Euclima Cottonii*³⁵

Struktur talus pada *Eucheuma Cottonii* bentuknya melintang dan memiliki susunan yang berbeda-beda pada sel nya. Perbedaan ini berperan penting dalam mengidentifikasi *genus*, *spesies* dan *famili* dari berbagai jenis rumput .³⁵



Gambar 9. Talus pada *Eucheuma Cottonii*³⁵

2.10. Taksonomi *Eucheuma Cottonii*

Eucheuma Cottonii menghasilkan fraksi kappa-karaginan sehingga sering disebut juga dengan nama *Kappaphycus alvarezii*.³⁵

Taksonomi pada rumput laut *Eucheuma Cottonii* adalah :³⁵

- Kingdom : *Plantae*
- Divisi : *Rhodophyta*
- Kelas : *Rhodophyceae*
- Ordo : *Gigartinales*
- Famili : *Solieracea*
- Genus : *Eucheuma*

Spesies : *Eucheuma Cottonii*

2.11. Kandungan Senyawa Bioaktif *Eucheuma Cottonii*

Eucheuma cottonii berdasarkan uji fitokimia dengan fraksi etanol mengandung senyawa bioaktif antara lain flavonoid, alkaloid dan saponin.¹⁴ Ekstrak dari *Eucheuma Cottonii* juga mempunyai kandungan senyawa yang beraneka ragam seperti tabel dibawah ini.³⁶

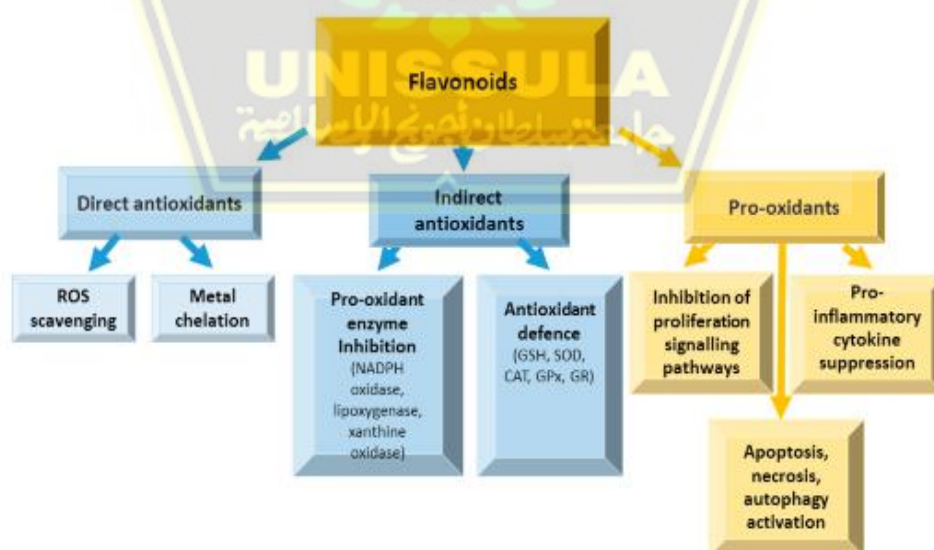
Tabel 2.1 Senyawa pada ekstrak 100 gram *Eucheuma Cottonii* ³⁶

Nutrient	<i>E. cottonii</i>
Protein (%)	9.76±1.33 ^a
Lipid (%)	1.10±0.05 ^a
Ash (%)	46.19±0.42 ^a
Crude fiber (%)	5.91±1.21 ^b
Carbohydrate (%)	26.49±3.01 ^c
Moisture content (%)	10.55±1.60 ^a
Soluble fiber (%)	18.25±0.93 ^a
Insoluble fiber (%)	6.80±0.06 ^c
Total dietary fiber (%)	25.05±0.99
Vitamin C (mg 100 g ⁻¹ WW)	35.3±0.01 ^a
α-tocopherol (mg/100 g DW)	5.85±0.27 ^c
Na (mg/100 g mg 100 g ⁻¹ DW)	1771.84±0.01 ^b
K (mg.100 g ⁻¹ DW)	13,155.19±1.14 ^a
Ca (mg.100 g ⁻¹ DW)	329.69±0.33 ^c
Mg (mg.100 g ⁻¹ DW)	271.33±0.20 ^c
Fe (mg.100 g ⁻¹ DW)	2.61±0.00 ^c
Zn (mg/100 g mg 100 g ⁻¹ DW)	4.30±0.02 ^a
Cu (mg.100 g ⁻¹ DW)	0.03±0.00 ^b
Se (mg.100 g ⁻¹ DW)	0.59±0.00 ^c
I (µg g ⁻¹ DW)	9.42±0.12 ^a
Na/K ratio	0.14
Total cations	15,535.58±1.70 ^a

Eucheuma Cottonii mempunyai kandungan lain seperti klorofil a berkisar antara $4,15 \pm 0,83$ mg/g, klorofil b berkisar $3,13 \pm 2,41$ mg/g dan fikoeritrin berkisar antara $42,88 \pm 2,55$ mg/g.¹³ Hasil identifikasi ekstrak *Eucheuma Cottonii* mengandung karotenoid sebesar 0,432 mg/g rumput laut.¹⁶

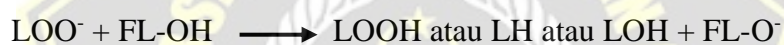
2.12. Peran *Eucheuma Cottonii* sebagai Antioksidan

Kandungan flavonoid yang ada pada ekstrak *Eucheuma Cottonii* berperan sebagai antioksidan. Mekanisme aktivitas bisa secara langsung menjadi antioksidan dengan cara memecah reaksi pembentukan ROS dan mengikat ion logam atau mineral. Flavonoid secara tidak langsung berperan dalam menghambat enzim prooksidan seperti *NADPH oksidase*, *lipooksigenasi* dan *xantin oksidase* serta meningkatkan sintesis enzim aktioksidan seperti *GSH*, *SOD* dan *katalase*. Flavonoid juga berperan dalam menginduksi terjadinya apoptosis dan menghambat proliferasi pada sel kanker.^{37,38}

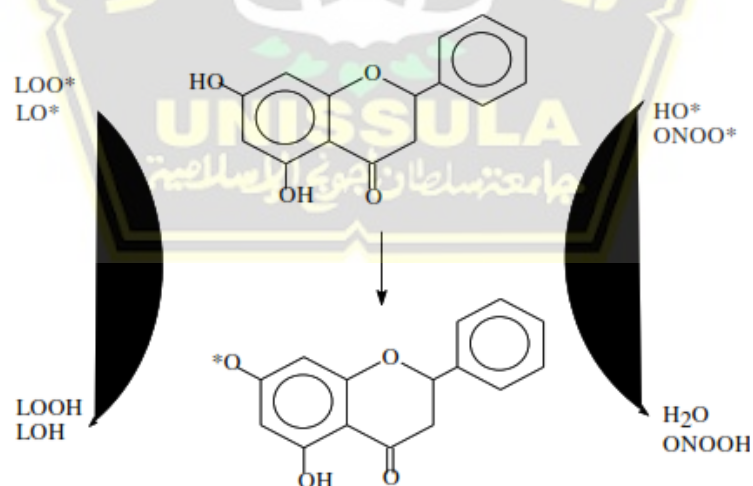


Gambar 10. Aktivitas flavonoid sebagai antioksidan³⁸

Peroksidasi lipid merupakan konsekuensi umum yang terjadi pada stres oksidatif. Flavonoid melindungi peroksidasi lipid dengan berbagai mekanisme. Ion logam bebas meningkatkan pembentukan ROS dengan mereduksi ion hidrogen pada *hydrogen peroxide* (H_2O_2) menjadi bentuk *hidoksil* radikal aktif (OH^\cdot).³⁷ Potensial redoks pada flavonoid (FL-OH) mampu mereduksi pembentukan oksidasi radikal bebas seperti *superoxide*, *peroxyl*, *alkoxyl*, dan *hydroxyl* dengan menambahkan atom hidrogen pada radikal peroksidasi lipid (LOO^\cdot). LOO^\cdot merupakan hasil reaksi radikal aktif ion OH^\cdot dengan ion PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acid*). Pemberian ion H^+ oleh suatu antioksidan dapat menghentikan reaksi radikal aktif selanjutnya, reaksinya sebagai berikut :³⁹

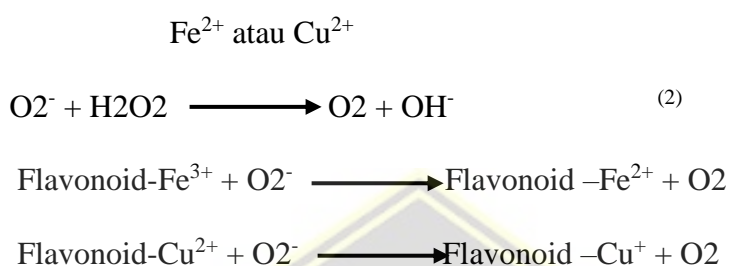


FL-OH adalah flavonoid dan $FL-O^\cdot$ adalah radikal flavonoid yang kurang reaktif.

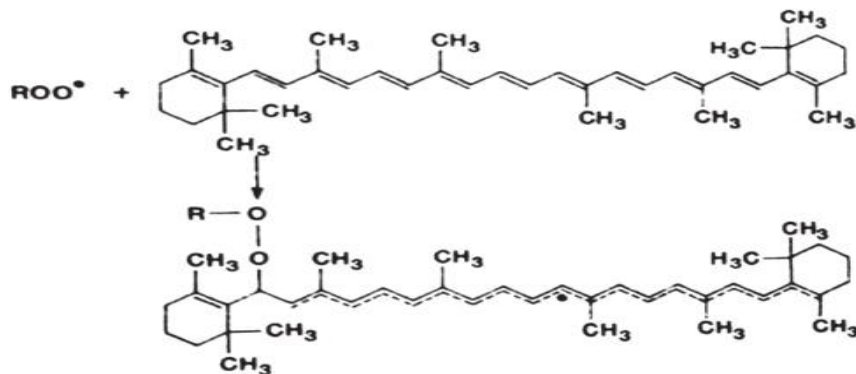


Gambar 11. Mekanisme flavonoid mereduksi radikal bebas³⁹

Flavonoid juga berfungsi sebagai zat pengkelat pada logam Cu dan Fe yang berfungsi sebagai katalisator dalam reaksi *Fenton*. Reaksi ini termasuk reaksi perubahan *Hidrogen Peroksida* (H₂O₂) menjadi OH⁻. Proses *khelat* ini menurunkan aktivitas katalitik pada logam Cu dan Fe sehingga mengurangi terbentuknya radikal OH⁻.³⁹

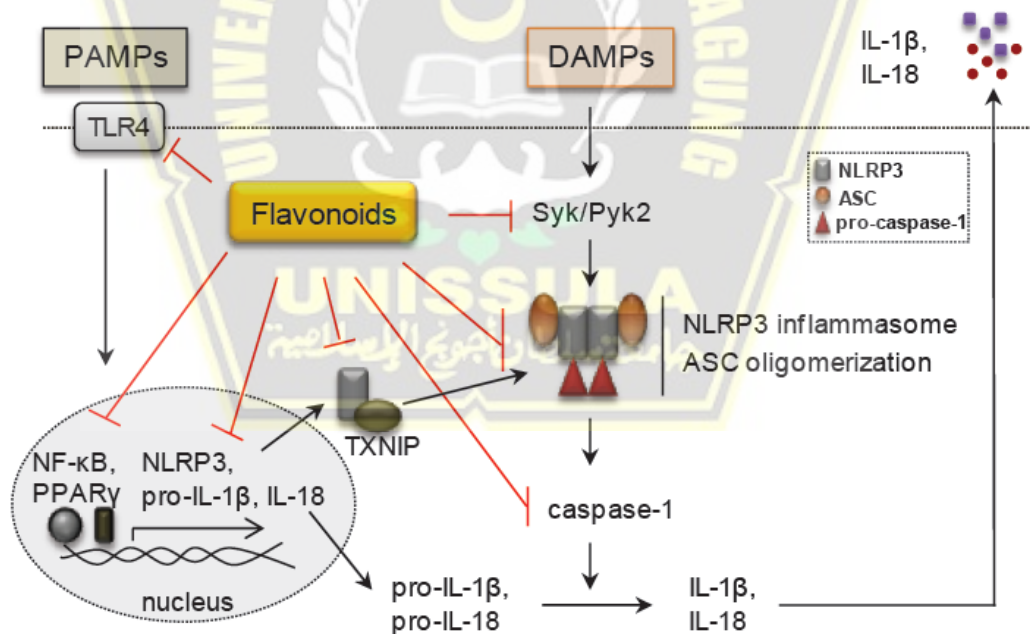


Kandungan karotenoid pada *Eucheuma Cottonii* melindungi sel dari stress oksidatif akibat radikal bebas. Karotenoid mempunyai kemampuan dalam menghilangkan aktivitas radikal bebas dengan mengkonversi menjadi radikal tidak aktif. Penghambatan radikal bebas pada karotenoid dilakukan oleh zat aktif β-karoten. Mekanisme kerjanya β-karoten bereaksi dengan radikal peroksil, sehingga terbentuk radikal ROO-Carotene dan selanjutnya terjadi perpindahan elektron. Hal ini menyebabkan elektron tersebar di seluruh struktur β-karoten sehingga membentuk radikal yang tidak aktif. β-karoten netral terbentuk jika radikal ROO-Carotene bereaksi dengan radikal ROOR-Carotene.⁴⁰



Gambar 12. Mekanisme β -karoten mereduksi radikal bebas⁴⁰

Kandungan flavonoid yang ada pada *Eucheuma Cottonii* juga berperan menghambat produksi sitokin proinflamasi dengan cara menghambat aktivasi NLRP3 inflammasome serta menghambat aktivasi caspase 1 sehingga tidak terjadi perubahan pro IL-1 β menjadi IL-1 β .⁴¹



Gambar 13. Mekanisme flavonoid menghambat produksi sitokin proinflamasi⁴¹

BAB III

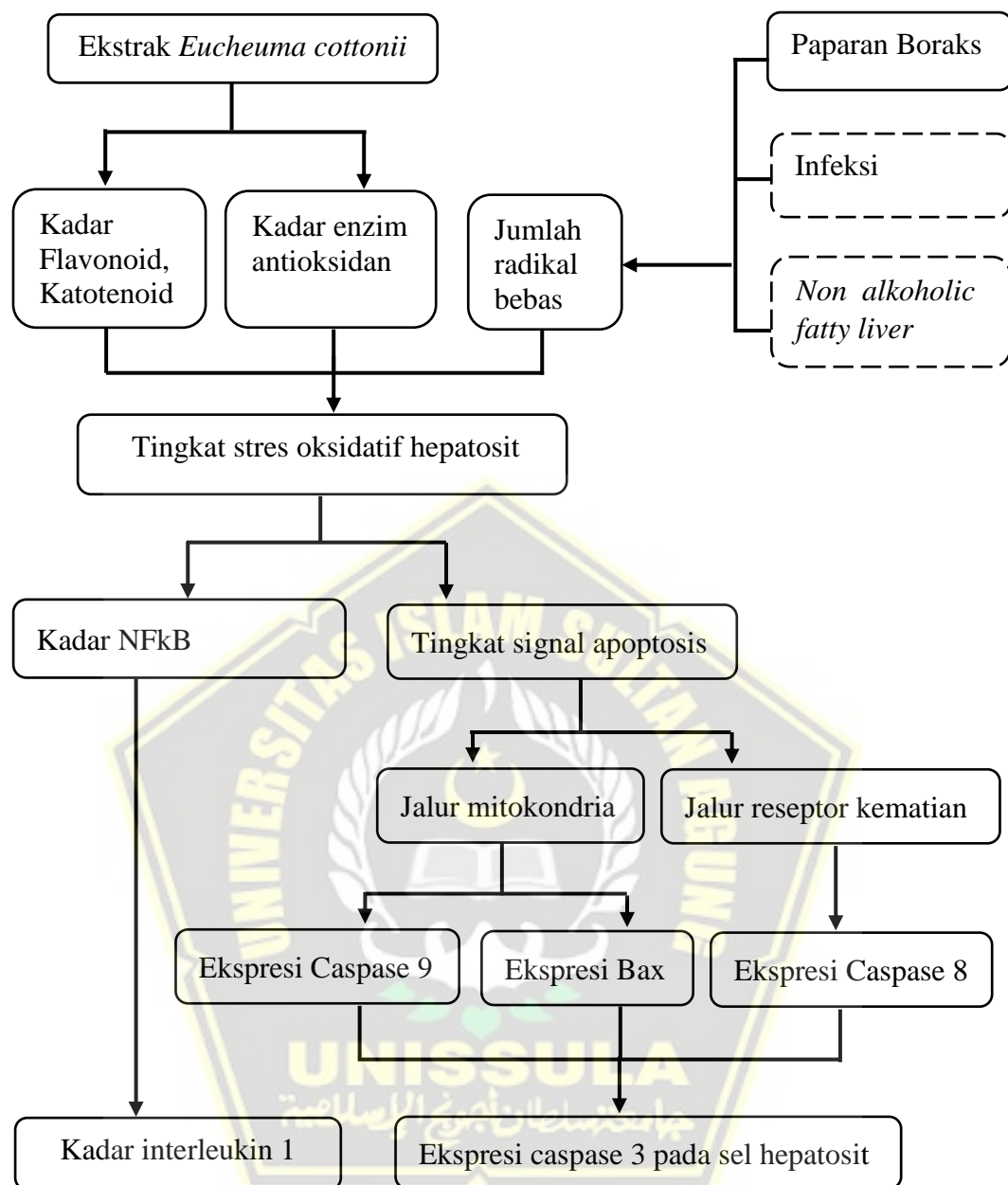
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Pembentukan radikal bebas pada sel hepatosit bisa disebabkan oleh zat kimia seperti boraks. Mekanisme boraks terhadap stres oksidatif sel hepatosit karena ion aktif radikal bebas $4B(OH)^-$ membentuk radikal bebas hidroksil $(OH)^*$.⁷ Stres oksidatif pada sel hepatosit dapat berakhir dengan kematian sel berupa nekrosis dan apoptosis. Mekanisme apoptosis pada sel hepatosit bisa melalui jalur *intrinsik* maupun *ekstrinsik*. Mekanisme jalur diawali radikal bebas menyebabkan terjadinya stres DNA sehingga mengakibatkan aktivasi sinyal *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA), kemudian PUMA menyebabkan aktivasi *Bax* di sitosol dan terjadi insersi *Bax* dalam mitokondria dan menyebabkan gangguan pada mitokondria sehingga terjadi pelepasan protein apoptotik seperti sitokrom c dan *Apoptosis Inducing Factor* (AIF). Protein tersebut membentuk kompleks apoptosom yang mengaktivasi caspase 9 sebagai caspase inisiator untuk mengaktifkan procaspase 3 menjadi caspase 3 sebagai caspase eksekutor pada apoptosis sel hepatosit. Signal apoptosis juga bisa melalui jalur *ekstrinsik* melalui jalur reseptor kematian melalui pelepasan ligan yang berikatan dengan reseptor kematian yaitu pelepasan ligan seperti $TNF\ \alpha$, FasL yang berikatan dengan reseptor kematian seperti TRAIL-R1 dan R2, CD 95 (Fas) pada membrane sel. Adanya ikatan ligan

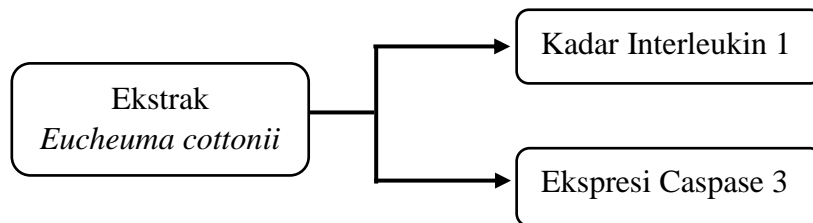
dengan reseptor kematian membentuk *Death Inducing Signaling Complex* (DISC). Kompleks ini akan menginisiasi caspase 8 untuk mengaktifkan caspase 3 sebagai caspase eksekutor terjadinya apoptosis.^{32,33}

ROS juga mengaktifkan sel kupfer untuk memproduksi sitokin proinflamasi dengan cara mengirimkan signal melalui NLRP 3 untuk mengaktifkan faktor transkripsi NF-kB yang membentuk Pro IL 1 β , kemudian NLRP-3 juga mengaktifkan caspase 1 sehingga terjadi perubahan Pro IL 1 β menjadi IL 1 β . Produksi sitokin interleukin 1 tersebut menyebabkan terjadinya migrasi sel-sel radang menuju sel hepatosit dan menimbulkan reaksi inflamasi. Kandungan antioksidan seperti flavonoid dan karotenoid pada ekstrak *Eucheuma cottonii* mampu mengubah radikal bebas menjadi bentuk tidak aktif dengan memecah reaksi oksidasi. Kandungan senyawa lain seperti Zn, Cu, Fe, Se berperan dalam sintesis enzim antioksidan. Hal ini menyebabkan sel hepatosit terlindungi dari stres oksidatif akibat paparan boraks sehingga mencegah terjadinya apoptosis. Flavonoid dan karotenoid juga mampu menghambat sekresi sitokin proinflamasi seperti interleukin 1 dengan cara menghambat jalur signal NLRP 3 *inflamosome* dan NFkB.⁸



Gambar 14. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 15. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian ekstrak *Eucheuma cottonii* terhadap kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit tikus yang diinduksi boraks.



BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *desain post test only control group* dengan metode pengambilan sampel secara *randomisasi* dengan lima kali ulangan per kelompok.

4.2. Variabel Penelitian

4.2.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pengaruh ekstrak *Eucheuma cottonii* dengan dosis 600 mg/kgBB dan dosis 1200 mg/kgBB.

4.2.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit.

4.3. Definisi Operasional

4.3.1. Ekstrak *Eucheuma cottonii*

Suatu produk yang dihasilkan dari proses ekstraksi rumput laut *Eucheuma cottonii* dengan metode maserasi. Dosis yang diberikan pada kelompok perlakuan (P1) 600 mg/kgBB dan kelompok perlakuan (P2) 1200 mg/kgBB secara per oral.

Skala : Kategorik ordinal

4.3.2. Kadar Interleukin 1

Interleukin-1 merupakan jenis sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh sel kupfer atau sel makrofag. Kadar interleukin-1 diperiksa dengan metode *ELISA*. Konsentrasi interleukin 1 dinilai secara kuantitatif.

Skala : Numerik rasio

4.3.3. Ekspresi caspase 3 pada Sel Hepatosit

Caspase 3 merupakan anggota dari keluarga caspase sebagai caspase eksekutor dari apoptosis sel. Ekspresi caspase 3 diperiksa dengan metode PCR. Ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit dinilai secara kuantitatif.

Skala : Numerik rasio

4.4. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.4.1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah tikus jantan dengan galur Wistar.

4.4.2. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian adalah tikus putih jantan dengan galur wistar yang memiliki kriteria sebagai berikut:

Kriteria Inklusi meliputi :

1. Umur 2 sampai dengan 3 bulan
2. Tidak dalam kondisi sakit
3. Berat badan antara 200-250 gram

Kriteria Eksklusi meliputi :

1. Memiliki kelainan anatomis
2. Pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya

Kriteria Drop Out meliputi :

1. Mati selama penelitian berlangsung

4.4.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan cara dilakukan randomisasi pada tikus putih jantan galur wistar dan dikelompokkan menjadi 4 kelompok yang terdiri dari kelompok K1 : tidak diberikan perlakuan, kelompok K2 : diberikan NaCMC 0,5 % per oral sekali sehari selama 17 hari, kemudian pada hari ke-4 selang 1 jam diberikan boraks dengan dosis 40 mg/kgBB per oral sekali sehari yang dilarutkan dalam *aquadest* selama 14 hari, kelompok P1: sebelumnya diberikan ekstrak *Eucheuma cottonii* dengan dosis 600 mg/kgBB dalam NaCMC 0,5% per oral sekali sehari selama 17 hari, kemudian pada hari ke-4 selang 1 jam diberikan boraks dosis 40 mg/kgBB per oral sekali sehari yang dilarutkan dalam *aquadest* selama 14 hari, kelompok P2: sebelumnya diberikan ekstrak *Eucheuma cottonii*

dengan dosis 1200 mg/kgBB dalam NaCMC 0,5% per oral sekali sehari selama 17 hari, kemudian pada hari ke-4 selang 1 jam diberikan boraks dosis 40 mg/kgBB per oral sekali sehari yang dilarutkan dalam *aquadest* selama 14 hari.

Penentuan dosis boraks berdasarkan hasil studi sebelumnya menunjukkan pemberian boraks selama 14 hari dengan dosis 40 mg/kgBB menyebabkan kerusakan hati yang ditandai dengan kerusakan berupa degenerasi dan nekrosis pada sel hepatosit tikus.⁹

Penentuan dosis ekstrak berdasarkan hasil studi sebelumnya menunjukkan pemberian ekstrak *Eucheuma cottonii* dengan dosis 400 mg/kgBB per hari dan dosis 800 mg/kgBB per hari selama 25 hari menurunkan degenerasi sel hepatosit pada tikus yang diinduksi timbal asetat.¹⁷

4.4.4. Besar Sampel

Sampel minimal dihitung menggunakan kriteria WHO dengan jumlah sampel perkelompok minimal 5 ekor dengan menggunakan rumus berikut :

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,7 \rightarrow 5$$

Keterangan:

p = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan sampel yang diperlukan

Maka pada penelitian ini menggunakan 5 sampel per kelompok sehingga didapatkan seluruh sampel penelitian menggunakan hewan percobaan sejumlah 20 sampel.

4.5. Alat dan Bahan

4.5.1. Alat

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi keranjang, timbangan, karung, tampah, gunting, pisau, telenan, lap kering, timbangan analitik, *oven drying*, *oven memmert*, blender, plat almunium, *moisture balance*, pinset, kuas, spatula, tissue, toples, *rotary evaporator*, desikator, *water bath*, sonde, kandang tikus, tempat makan dan minum tikus, toples *kloroform*, scalpel, pinset, gunting jaringan, spuit 5 cc, kamera, dan *microtome*, thermometer, penangas air, *stopwatch*, *microplate reader*, *inkubator 37°C*, *mikropipet*, tip, gelas beker, *miktotube 1,5 ml*, tissue, *polymerase tube*, vortex.

4.5.2. Bahan

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi *aquadest*, serum darah tikus, boraks, pakan tikus, etanol 96%, ketamin, aquabides, sekam, boraks, gloves, masker, *Neutral buffered formalin 10%*, NaCMC 0,5 %, ELISA Kit, anti IL-1 rats, *marker ink*, *primer caspase-3*, *nuclease free water*, *primer β -aktin*.

4.6. Cara Penelitian

4.6.1. Perolehan Ethical Clearance

Ethical clearance penelitian diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.6.2. Cara Pembuatan Ekstraks

Sampel *Eucheuma cottonii* segar dicuci hingga bersih. Setelah kering sampel di masukkan pada *drying oven* dengan suhu 40° C sampai kadar air yang terkandung di dalam tanaman kurang dari 10%. Rumput laut yang sudah dalam bentuk *simplisia* atau bahan kering dilakukan penggilingan agar menjadi serbuk menggunakan blender kering. Serbuk yang telah jadi dilakukan proses maserasi menggunakan pelarut etanol konsentrasi 96% dengan perbandingan serbuk dan pelarut 1:5 selama 3 hari dan dilakukan 1 kali penyaringan yang diaduk 2-3 kali sehari selama 2 menit. Kemudian ampas sisa penyaringan dilakukan remaserasi selama 3 kali dengan metode yang sama, dan maserat dikumpulkan menjadi satu wadah. Setelah maserat sudah terkumpul, selanjutnya dipisahkan antara pelarut dan ekstrak menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 50⁰C kemudian ekstrak disimpan pada botol.

4.6.4. Cara Pemeriksaan konsentrasi interleukin 1 dengan ELISA

4.6.4.1. Persiapan Reagen

1. Semua reagen yang dipakai harus dibawa ke ruangan dengan suhu kamar sebelum digunakan.
2. Pembuatan larutan standar yaitu 120µl standar (1600pg/ml) diencerkan dengan 120µl standar diluent untuk menghasilkan larutan stok standar sebanyak 800pg/ml. Biarkan standar selama 15 menit dengan melakukan pengadukan secara perlahan sebelum membuat pengenceran. Siapkan titik standar *duplikat* dengan cara mengencerkan larutan stok standar (800pg/ml) dengan perbandingan 1:2 secara berurutan dengan pengencer standar untuk menghasilkan larutan 400pg/ml, 200pg/ml, 100pg/ml dan 50pg/ml. Standar *diluent* berfungsi sebagai standar nol (0 pg/ml). Larutan yang tersisa harus disimpan pada suhu -20⁰ C dan digunakan dalam waktu satu bulan.
3. *Wash Buffer* 25x diencerkan dengan akuades dengan perbandingan 1 : 25 dan aduk perlahan.

4.6.4.2. Prosedur Pengujian

1. Siapkan semua reagen, larutan standar dan sampel sesuai instruksi. Semua reagen dibawa ke suhu ruang sebelum digunakan. Pengujian dilakukan pada suhu kamar.
2. Tentukan jumlah strip yang diperlukan untuk pengujian. Masukkan strip yang tersisa ke dalam aluminium *zip* untuk disimpan.
3. Strip yang tidak digunakan disimpan pada suhu 2-8°C.

4. Tambahkan 50 μ l standar ke sumuran standar dan tidak diperbolehkan menambahkan antibodi ke standar karena larutan standar mengandung antibodi terlabel biotin.
5. Tambahkan 40 μ l sampel ke dalam sumuran sampel lalu tambahkan 10 μ l antibodi anti IL 1 ke dalam sumuran sampel, lalu tambahkan 50 μ l *streptavidin-HRP* ke dalam sumuran sampel dan sumuran standar (bukan sumuran blanko). Setelah tercampur tutup *plate* dengan *sealer*. Lakukan inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.
6. Lepaskan *sealer* dan cuci sumuran sebanyak 5 kali dengan *wash buffer* sejumlah 0,3 ml selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap pencucian.
7. Tambahkan 50 μ l larutan substrat A ke setiap sumuran dan tambahkan 50 μ l larutan substrat B ke setiap sumuran.
8. Inkubasi *plate* yang ditutup dengan *sealer* baru selama 10 menit pada suhu 37°C pada ruang gelap.
9. Tambahkan 50 μ l *stop solution* ke setiap sumuran, kemudian warna biru akan berubah menjadi kuning.
10. Tentukan nilai *optical density* (OD) ke setiap sumuran menggunakan *microplate reader* yang diset pada 450 nm dalam waktu 10 menit setelah menambahkan *stop solution*.

4.6.4.3. Perhitungan Hasil

1. Membuat kurva standar dengan cara memplot *optical density* (OD) rata-rata untuk setiap standar pada sumbu vertikal (Y) terhadap konsentrasi atau

kadar pada sumbu horizontal (X) dan gambar kurva yang paling sesuai melalui titik-titik pada grafik. Perhitungan ini paling baik dilakukan menggunakan perangkat lunak dan garis yang paling sesuai dapat ditentukan dengan analisis regresi.

4.6.5. Cara Pemeriksaan ekspresi caspase 3 dengan metode PCR

4.6.5.1. Tahapan Ekstraksi RNA Sampel Hepar

1. Preparasi sampel hepar sebanyak 100 mg diambil dari RNA later dipotong sampai kecil-kecil dan halus,
2. Masukkan kedalam tabung dipisahkan pada conical 15 ml ($5 - 10 \times 10^6$ cells/mL TRI reagent; disentrifugasi pada 1900 rpm selama 10 menit), kemudian supernatan dibuang,
3. Separasi sampel, pertama – tama sampel diinkubasi di suhu ruang selama 5 menit. 0,2 mL *kloroform* dimasukkan ke sampel per mL *TRI Reagent*, kemudian sampel di tutup dan di homogenisasi menggunakan vortex dengan *speed high*. Selanjutnya sampel tersebut diinkubasi selama 2 – 15 menit, umumnya dilakukan selama 3 menit pada suhu ruang.
4. Sampel di sentrifugasi 1200 rpm selama 5 menit pada suhu 4⁰C. sentrifugasi tersebut memisahkan larutan menjadi 3 layer: 1) *lower red organic phase* (mengandung protein); 2) *interphase* (mengandung DNA); dan 3) *upper aqueous phase (containing RNA)*; dan yang terakhir lapisan paling atas dipindahkan ke *tube* baru.

4.6.5.2. Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi RNA

1. Siapkan 1x *TE buffer* dengan menambahkan sebanyak 19 ml *Nuclease free water* dan 1 ml 20x *TE buffer* kedalam *conical*, kemudian di homogenisasi menggunakan vortex dan disimpan.
2. Siapkan larutan kerja yang terdiri dari *high standard calibration* dengan konsentrasi 10 – 500 ng/ μ l dan *low standard calibration* dengan konsentrasi 0,1 – 10 ng/ μ l. Untuk larutan high standard, mula – mula disiapkan 10 μ l *quantiflour RNA dye* dengan 3990 μ l 1x *TE Buffer*, kemudian di homogenisasi menggunakan vortex dan disimpan dalam suhu -20°C . Larutan *low standard calibration* dipreparasi dengan menambahkan 2 μ l *quantiflour RNA dye* dengan 3998 μ l 1X *TE Buffer*, kemudian di homogenisasi dengan vortex dan disimpan dalam suhu -20°C .
3. Siapkan adalah blanko dengan menambahkan 200 μ l larutan kerja *quantiflour RNA Dye* ke dalam 0,5 ml tube PCR. Larutan selanjutnya yang perlu di preparasi adalah sampel standar RNA yang terdiri dari *high standard calibration* dan *low standard calibration*.
4. Larutan *High standard calibration* dipreparasi dengan menambahkan 5 μ l RNA standar dengan 200 μ l larutan *quantiflour RNA* dalam 0,5 ml tube PCR, homogenisasi dengan vortex. Larutan *low standard calibration* dipreparasi dengan cara mengencerkan 10 μ l RNA standar dengan 990 μ l 1X *TE Buffer*, homogenisasi menggunakan vortex. Mix larutan tersebut diambil sebanyak 10 μ l dan ditambahkan 200 μ l *quantiflour RNA dye* dalam 0,5 ml tube,

homogenisasi menggunakan vortex dan diinkubasi dalam keadaan gelap selama 5 menit. Setelah diinkubasi, nilai standard diukur menggunakan alat *quantiflour* RNA.

- Selanjutnya, pengukuran sampel RNA, mula – mula ditambahkan 1 – 20 μ l sampel RNA dalam 200 μ l *quantiflour* RNA dye dalam 0,5 ml PCR tube, kemudian di homogenisasi menggunakan vortex dan diinkubasi dalam ruangan gelap selama 5 menit. Konsentrasi sampel kemudian diukur menggunakan alat *quantiflour* RNA.

4.6.5.3. Sintesis cDNA

- Siapkan reagen untuk di mix kedalam tube *mikrosentrifuge* 200 – 500 μ l.

Tabel 4.1 Komposisi Reagen Sintesis cDNA

Reagen	Volume	Konsentrasi
RNA <i>template</i> / sampel	1 - 2 μ l	0,00050.25 μ g / μ l total RNA
<i>Deoxynucleotide mix (dTNP) random nonamers</i>	1 μ l	500 μ M each Dtnp
3' antisense spesifik primer yang disediakan oleh <i>user</i>	1 μ l	1 μ M
<i>oligo (dT)23 primer</i>	1 μ l	3.5 μ M
<i>Nuclease free water</i>	6 μ l	-
Total Volume	10 μl	

- Setelah seluruh reagen tersebut di mixed kedalam tube, kemudian di resuspensi dan di sentrifugasi. Tahapan selanjutnya adalah mix tersebut di sentrifugasi, di masukan kedalam *thermal cycler* (PCR) dan diinkubasi dengan 70⁰ C selama

10 menit. Setelah proses inkubasi selesai, tube tersebut diambil dan disimpan pada *freezing block*, kemudian ditambahkan komponen sebagai berikut:

Tabel 4.2 Komposisi Reagen Sintesis cDNA

Reagen	Volume	Konsentrasi
10X <i>buffer for eAMV-RT</i>	2 μ l	1X
<i>Enhanced avian RT</i>	1 μ l	1 unit/ μ l
<i>RNAse inhibitor</i>	1 μ l	1 unit/ μ l
<i>Nuclease free water</i>	6 μ l	
Sampel setelah di inkubasi	10 μ l	
Total Volume	20 μl	

3. Kemudian tube dimasukkan ke dalam thermal cycler (PCR) dan diinkubasi dengan suhu 45⁰ C selama 30 menit. Setelah reaksi selesai, tube dikeluarkan dan sampel di dalam tube siap untuk di analisis atau disimpan di dalam suhu -20⁰C.

4.6.5.4. Amplifikasi Caspase 3

1. Amplifikasi mula – mula dilakukan dengan mempersiapkan komponen PCR Mix. Komponen PCR Mix yang akan direaksikan.

Tabel 4.3 Komponen Mix PCR

Komponen Mix PCR	Jenis	Sekuens	Vol/Konsentrasi
Primer	<i>Forward β-aktin</i>	5'- CATGTACGTTG CTATCCAGGC-3'	1 μ l/ 200 nM
	<i>Reverse β-aktin</i>	5'- CTCCTTAATGTC ACGCACGAT-3	1 μ l/ 200 nM
	<i>Forward Caspase 3</i>	5' - GTGGAAGTAC GATGATATGGC- 3'	1 μ l/ 200 nM
	<i>Reverse Caspase 3</i>	5'- CGCAAAGTGAC TGGATGAACC- 3'	1 μ l/ 200 nM
Polymerase	<i>KAPA SYBR Green I FAST qPCR Master Mix (2x)</i>		10 μ l
PCR Water	<i>Grade Thermoscientific Nuclease Free Water</i>		Up to 20 μ l
RNA template	RNA Sampel Hepar dari seluruh kelompok dan ulangan		80 g/ μ l

- Setelah PCR Mix di *sub-aliquots*, maka masing – masing PCR *tube* ditambahkan sampel sebanyak 1 μ l sehingga total volume per reaksi adalah 10 μ l. Pengerjaan dilakukan di dalam *laminar air flow* serta menggunakan *PCR cooler* untuk mempertahankan suhu PCR mix sehingga mencegah *early reaction*.
- PCR Mix yang telah siap untuk di amplifikasi pada mesin RT-PCR , maka selanjutnya di reaksi sebanyak 35 siklus dengan kondisi *melt profile*

sebagai berikut; *Denaturation* 95⁰C selama 10 menit, *Annealing* 95⁰ C selama 10 detik dan *Extension* 60⁰C selama 30 detik. Target yang diamati pada pengujian ini adalah nilai *cycle threshold* (CT) *value* yang terbentuk.

4.7. Tempat dan Waktu Penelitian

4.7.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kimia dan Laboratorium SCCR FK Unissula Semarang.

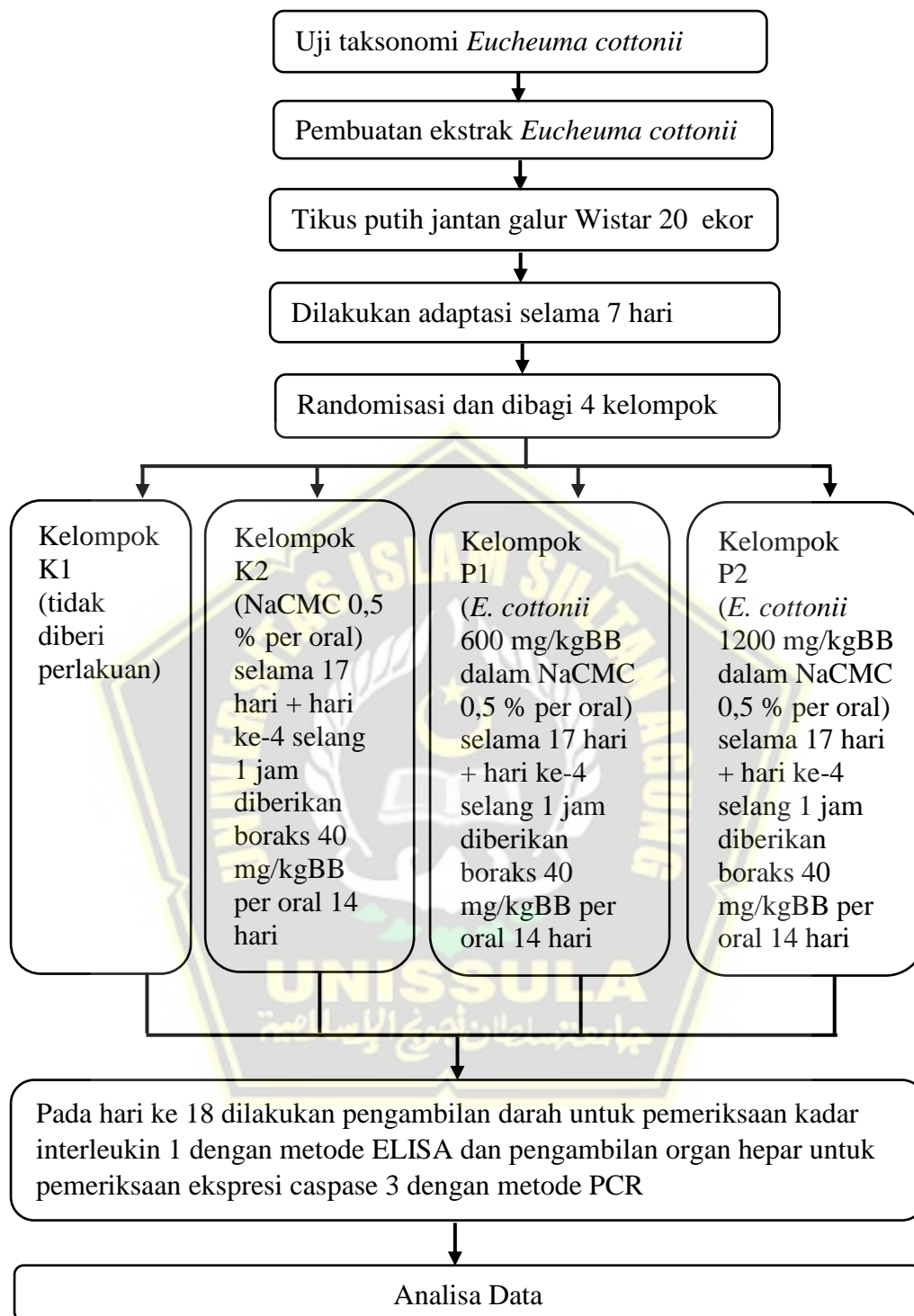
4.7.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan mulai pada bulan Mei – Juli 2022.

4.8. Analisa Hasil

Data yang sudah di dapat dari penelitian ini diproses, disunting, ditabulasi, kemudian dilakukan uji deskriptif meliputi variabel bebas menggunakan skala data kategorik ordinal dan variabel tergantung menggunakan skala data numerik rasio. Setelah dilakukan uji deskriptif kemudian dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk*. Hasil uji normalitas tidak bermakna ($p < 0.05$) maka dilanjutkan dengan uji *Kruskall-Wallis* yang menunjukkan hasil bermakna ($p < 0,05$), kemudian dilanjutkan dengan uji beda *Mann-Whitney*.⁴² Pengolahan analisis data pada penelitian menggunakan aplikasi IBM SPSS 25.0 *for Windows*.

4.9. Alur Penelitian



Gambar. 16 Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini dimulai dengan melakukan uji taksonomi rumput laut yang diperoleh dari budidaya rumput laut di perairan Karimunjawa, Jepara. Uji taksonomi dilakukan di laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang (UNNES) dan didapatkan hasil rumput laut jenis *Eucheuma cottonii*. Selanjutnya dilakukan pembuatan ekstrak dan proses perlakuan pada hewan coba. Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design* yang menggunakan 20 tikus jantan galur Wistar dengan berat badan 200 - 250 gram, umur 2-3 bulan yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok K1 : tidak diberikan perlakuan, kelompok K2 : diberikan NaCMC 0,5 % per oral sekali sehari selama 17 hari, kemudian pada hari ke-4, selang 1 jam diberikan boraks dengan dosis 40 mg/kgBB per oral sekali sehari yang dilarutkan dalam *aquadest* selama 14 hari, kelompok P1: sebelumnya diberikan ekstrak *Eucheuma cottonii* dengan dosis 600 mg/kgBB dalam NaCMC 0,5% per oral sekali sehari selama 17 hari, kemudian pada hari ke-4 selang 1 jam diberikan boraks dosis 40 mg/kgBB per oral sekali sehari yang dilarutkan dalam *aquadest* selama 14 hari, kelompok P2: sebelumnya diberikan ekstrak *Eucheuma cottonii* dengan dosis 1200 mg/kgBB dalam NaCMC 0,5% per oral sekali sehari selama 17 hari, kemudian pada hari ke-4 diberikan dosis ekstrak yang sama dan selang 1 jam diberikan boraks dosis 40

mg/kgBB per oral per sekali sehari yang dilarutkan dalam *aquadest* selama 14 hari. Pada hari ke 18 dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan kadar interleukin 1 dengan metode ELISA dan dilakukan terminasi pada hewan coba untuk pengambilan organ hepar untuk pemeriksaan ekspresi caspase 3 dengan metode PCR. Selama penelitian tidak terdapat *drop out* pada hewan coba.

Berikut ini merupakan data kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3.

Tabel 5.1. Data Hasil Penelitian Kadar Interleukin 1 dan Ekspresi Caspase 3

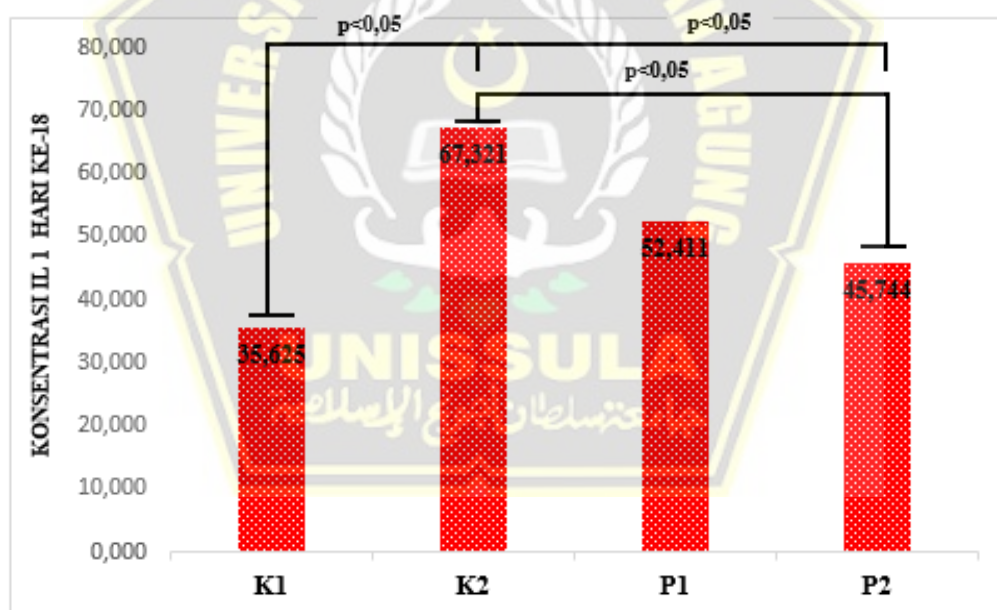
Variabel	Kelompok				<i>P value</i> <i>Kruskal</i> <i>Wallis</i>
	K1 n=5 <i>Mean±SD</i>	K2 n=5 <i>Mean±SD</i>	P1 n=5 <i>Mean±SD</i>	P2 n=5 <i>Mean±SD</i>	
Kadar interleukin 1 (pg/ml)	35,625±0,546	66,964±1,197	52,410±14,683	42,053±9,287	0,007
Ekspresi caspase 3	0,081±0,057	1,00±0,000	0,026±0,021	0,004±0,004	0,001

Data masing-masing kelompok di uji normalitasnya menggunakan uji *Saphiro Wilk*, didapatkan data kadar interleukin 1 terdistribusi tidak normal yaitu pada K2 dan P2 dengan nilai ($p < 0,05$). Setelah dilakukan transformasi juga didapatkan data kadar interleukin 1 terdistribusi tidak normal pada K2 dan P2 dengan nilai ($p < 0,05$). Karena data tidak terdistribusi normal, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* tiap kelompok. Berdasarkan analisa uji beda kadar interleukin 1 menghasilkan nilai $p = 0,007$ yang menunjukkan perbedaan signifikan dengan nilai ($p < 0,05$). Berdasarkan hasil uji yang signifikan ini, maka dilakukan uji beda antar kelompok menggunakan uji *Mann Whitney*.

Tabel 5.2. Hasil Uji Mann Whitney Kadar Interleukin 1

No	Kelompok	Nilai p	Keterangan
1	K1 dan K2	0,007	Ada perbedaan
2	K1 dan P1	0,110	Tidak ada perbedaan
3	K1 dan P2	0,017	Ada perbedaan
4	K2 dan P1	0,101	Tidak ada perbedaan
5	K2 dan P2	0,006	Ada perbedaan
6	P1 dan P2	0,335	Tidak ada perbedaan

Berdasarkan hasil uji *Mann Whitney* menunjukkan kadar interleukin 1 berbeda signifikan pada kelompok K1 dan K2, kelompok K1 dan P2 serta kelompok K2 dan P2. Namun, pada kelompok K1 dan P1, K2 dan P1 serta P1 dan P2 didapatkan hasil yang tidak signifikan. Berikut grafik rerata kadar interleukin 1 disajikan dalam gambar 5.1 dibawah ini.

**Gambar 5.1 Grafik Perbedaan Rerata Kadar IL 1 hari ke-18.**

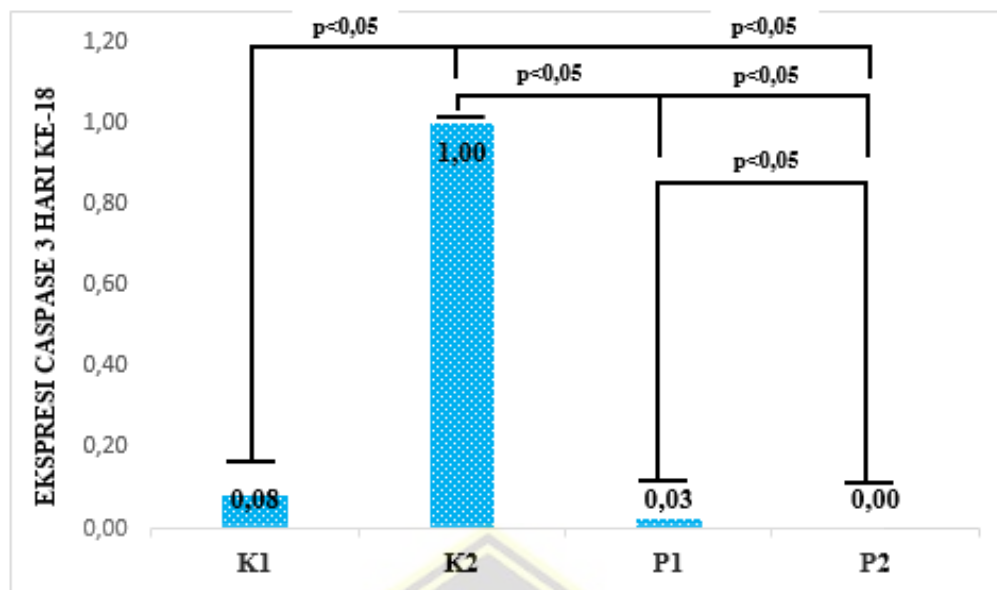
Keterangan: (K : Kontrol, P : Perlakuan)

Pada ekspresi caspase 3 di uji normalitasnya menggunakan uji *Saphiro Wilk*, didapatkan data eskpresi caspase 3 terdistribusi tidak normal yaitu pada K2 dan P3 dengan nilai ($p < 0,05$). Setelah dilakukan transformasi juga didapatkan data ekspresi caspase 3 terdistribusi tidak normal pada K2 dan P3 dengan nilai ($p < 0,05$). Karena data tidak terdistribusi normal, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Uji *Kruskal Wallis* dilakukan untuk membandingkan ekspresi caspase 3 pada kelompok K1, K2, P1 dan P2. Berdasarkan analisa uji beda ekspresi caspase 3 menghasilkan nilai $p = 0,001$ yang menunjukkan perbedaan signifikan dengan nilai ($p < 0,05$). Berdasarkan hasil uji yang signifikan ini, maka dilakukan uji beda antar kelompok menggunakan uji *Mann Whitney*.

Tabel 5.2. Hasil Uji Mann Whitney Ekspresi Caspase 3

No	Kelompok	Nilai p	Keterangan
1	K1 dan K2	0,007	Ada perbedaan
2	K1 dan P1	0,071	Tidak ada perbedaan
3	K1 dan P2	0,009	Ada perbedaan
4	K2 dan P1	0,006	Ada perbedaan
5	K2 dan P2	0,007	Ada perbedaan
6	P1 dan P2	0,008	Ada perbedaan

Berdasarkan hasil uji *Mann Whitney* didapatkan bahwa ekspresi caspase 3 tidak berbeda signifikan antara kelompok K1 dan P1, sedangkan kelompok lainnya didapatkan hasil yang signifikan. Berikut grafik rerata ekspresi caspase 3 disajikan dalam gambar 5.2 dibawah ini.



Gambar 5.2 Grafik Perbedaan Rerata Ekspresi Caspase 3 hari ke-18.

Keterangan: (K : Kontrol, P : Perlakuan)

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian ini melakukan pengukuran kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3. Berdasarkan tabel 5.1 menunjukkan kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 pada kelompok perlakuan P1 dan P2 lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol K2. Nilai kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 pada kelompok P2 lebih rendah dibandingkan kelompok P1. Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kadar interleukin 1 antara kelompok kontrol K2 dan kelompok perlakuan K4, dengan nilai $p=0,006$ ($p<0,05$), namun ditemukan hasil tidak signifikan pada kelompok perlakuan P1 dan P2 dengan nilai $p=0,335$ ($p>0,05$). Berdasarkan data tersebut menunjukkan pemberian dosis ekstrak 1200 mg/kgBB menunjukkan konsentrasi interleukin 1 lebih rendah dibandingkan dosis ekstrak 600 mg/kgBB. Pemberian boraks menyebabkan

pembentukan radikal hidoksil yang mengaktifkan sel kupfer untuk memproduksi sitokin proinflamasi melalui signal NLRP3 *inflamosome* dan faktor transkripsi NFkB untuk memproduksi sitokin pro interleukin 1 β .⁸ Kandungan flavonoid, karotenoid dan senyawa bioaktif lainnya pada ekstrak *Eucheuma cottonii* mempunyai kemampuan menghambat produksi sitokin proinflamasi interleukin 1, melalui mekanisme penghambatan NLRP3 *inflamosome* dan juga menghambat caspase 1 sehingga tidak terjadi perubahan pro interleukin 1 menjadi interleukin 1.^{8,41} Mekanisme lain dengan cara menurunkan IL 1 *reseptor kinase 4* yang terikat dengan TLR 4 pada sel makrofag, hal ini akan menyebabkan inhibisi pada NFkB sehingga terjadi penurunan produksi TNF α , IL 1 β , COX 2 dan iNOS yang berperan dalam proses inflamasi.⁴³ Pada penelitian sebelumnya menunjukkan pemberian ekstrak *Eucheuma cottonii* dengan dosis 300 mg/kgBB secara signifikan menurunkan ekspresi TNF α dan ekspresi NFkB pada mencit yang diinduksi asma dengan metode PCR.²⁰

Pada penelitian ini juga mengukur ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit pada hari ke-18. Hasil uji beda menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol K2 dengan kelompok perlakuan P1 dan P2 dengan nilai $p < 0,05$. Hasil uji beda kelompok perlakuan P1 dan P2 juga menunjukkan hasil yang signifikan dengan nilai $p = 0,008$ ($p < 0,05$). Berdasarkan data tersebut menunjukkan pemberian dosis ekstrak 1200 mg/kgBB menunjukkan ekspresi caspase 3 lebih rendah dibandingkan dosis ekstrak 600 mg/kgBB. Ekspresi caspase 3 merupakan tahap akhir dari jalur apoptosis baik dari jalur *intrinsik* maupun *ekstrinsik*. Pemberian boraks menyebabkan pembentukan radikal hidoksil yang berefek terhadap

terjadinya proses peroksidasi lipid, kerusakan DNA dan modifikasi protein.⁷ Kondisi stres pada DNA menyebabkan aktivasi signal apoptosis sel melalui jalur intrinsik. Adanya stres DNA mengakibatkan aktivasi signal *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA), kemudian PUMA menyebabkan aktivasi *Bax* di sitosol dan terjadi insersi *Bax* dalam mitokondria dan menyebabkan gangguan pada mitokondria sehingga terjadi pelepasan protein apoptotik yang membentuk kompleks apoptosom untuk menginisiasi caspase 9 dan mengaktifkan procaspase 3 menjadi caspase 3 sebagai caspase eksekutor pada apoptosis sel hepatosit.⁷

Kandungan flavonoid, karotenoid pada ekstrak *Eucheuma cottonii* mempunyai efek langsung dengan mengubah reaksi pembentukan radikal bebas menjadi bentuk non reaktif.⁴⁴ Selain itu kandungan mineral seperti Fe, Cu, Zn, Se berperan sebagai sintesis enzim antioksidan seperti *Katalase*, *Superoxide dismutase*, *Glutathione Peroxidase*. Enzim-enzim tersebut berperan dalam mengkonversi radikal aktif seperti *superoksida* dan *hidroksil*.^{44,45} Kondisi ini akan melindungi terjadinya stres DNA pada sel hepatosit akibat paparan boraks.^{37,38} Fungsi antioksidan pada ekstrak *Eucheuma cottonii* menghambat aktivasi signal apoptosis sel melalui jalur *intrinsic* dengan cara mencegah terjadinya stres DNA pada sel hepatosit, sehingga tidak terjadi aktivasi *Bax* pada sitosol dan berlanjut tidak terjadinya kerusakan mitokondria. Karena tidak terbentuknya kompleks apoptosom antara sitokrom c dan *APAF-1*, maka tidak terjadi aktivasi caspase 9 sebagai caspase inisiator untuk mengaktifkan caspase 3.^{32,46} Meskipun radikal hidroksil akibat paparan boraks berpotensi menyebabkan stres DNA pada sel hepatosit yang menjadi awal aktivasi jalur apoptosis secara *intrinsic*, namun pada

penelitian ini perlu dilakukan pemeriksaan tambahan seperti ekspresi *Bax* dan caspase 9 yang merupakan rangkaian jalur apoptosis *intrinsik* sebelum berakhir di ekspresi caspase 3.^{33,47} Selain melalui jalur *intrinsik*, penurunan ekspresi caspase 3 juga bisa terjadi melalui jalur *ekstrinsik*. Hal ini didukung dari hasil penelitian sebelumnya bahwa ekstrak *Eucheuma cottonii* juga bisa menurunkan produksi sitokin proinflamasi TNF α . Sitokin ini akan terikat dengan reseptor kematian pada membran sel dan akan mengaktifkan caspase 8 sebagai inisiator untuk mengaktifkan caspase 3.^{7,47} Hasil penelitian lain yang mendukung penelitian sebelumnya bahwa pemberian ekstrak *Eucheuma cottonii* dosis 90 mg/200 g berat badan menurunkan ekspresi caspase 8 pada sel tropoblas dengan metode imunohistokimia pada mencit yang diinduksi plumbum.⁴⁸ Dari data penelitian sebelumnya menunjukkan ekstrak *Eucheuma cottonii* bisa melindungi sel dari apoptosis dari jalur *ekstrinsik*.

Keterbatasan pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan kadar flavonoid, karotenoid serta enzim antioksidan sehingga belum bisa diketahui secara pasti manakah kandungan ekstrak *Eucheuma cottonii* yang berperan utama sebagai antioksidan. Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan kadar NFkB yang merupakan faktor transkripsi terjadi produksi interleukin 1. Pada penelitian ini jumlah radikal bebas akibat paparan boraks tidak dilakukan sehingga belum mengetahui seberapa besar potensinya dalam menyebabkan stres oksidatif pada sel hepatosit serta belum mengetahui apakah pemberian ekstrak *Eucheuma cottonii* mampu menurunkan jumlah radikal bebas. Pada penelitian ini juga belum bisa membuktikan apakah ekstrak *Eucheuma cottonii* bisa melindungi sel dari apoptosis

dari jalur *intrinsik*, *ekstrinsik* atau kedua jalur tersebut. Untuk itu penelitian selanjutnya perlu dilakukan pemeriksaan ekspresi *Bax* dan caspase 9 untuk menilai jalur apoptosis secara *intrinsik* dan pemeriksaan ekspresi caspase 8 untuk menilai jalur apoptosis secara *ekstrinsik*. Pada penelitian ini juga tidak dilakukan pemeriksaan apoptosis sel sebagai bukti akhir terjadinya kematian sel. Penelitian yang akan datang diharapkan dilakukan pemeriksaan apoptosis sel sehingga didapatkan kesesuaian antara ekspresi caspase 3 dengan apoptosis sel.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak *Eucheuma cottonii* dosis 600 mg/kgBB dan dosis 1200 mg/kgBB berpengaruh terhadap kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 pada sel hepatosit tikus yang diinduksi boraks.
2. Kadar interleukin 1 setelah perlakuan lebih rendah pada pemberian ekstrak *Eucheuma cottonii* dosis 1200 mg/kgBB dibandingkan dosis 600 mg/kgBB dan kontrol.
3. Ekspresi caspase 3 setelah perlakuan lebih rendah pada pemberian ekstrak *Eucheuma cottonii* dosis 1200 mg/kgBB dibandingkan dosis 600 mg/kgBB dan kontrol.
4. Kadar interleukin 1 dan ekspresi caspase 3 lebih rendah pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak *Eucheuma cottonii* dibandingkan kelompok kontrol.

6.2. Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan pemeriksaan kadar flavonoid, karotenoid dan enzim antioksidan sebelum perlakuan.
2. Perlu dilakukan pemeriksaan jumlah radikal bebas pada awal dan akhir perlakuan.
3. Perlu dilakukan pemeriksaan kadar NFkB pada akhir perlakuan.
4. Perlu dilakukan pemeriksaan ekspresi Bax dan caspase 9 dan caspase 8 pada akhir perlakuan.
5. Perlu dilakukan pemeriksaan apoptosis sel pada akhir perlakuan.



DAFTAR PUSTAKA

1. Kemenkes RI. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 003/PERMENKES/VII//2012 Tentang Bahan Tambahan Makanan. Available from URL www.kemkes.go.id.
2. Nadzirotul, M. Analisis faktor resiko pencemaran bahan toksik boraks pada bakso di kelurahan ciputat tahun 2014. Skripsi UIN Jakarta. 2014;26-27.
3. Rianun Nafisah, Ana H. Mukaromah, Diah H. Sitomurti. Analisis Kandungan Boraks Pada Lontong Dan Kue Lupis Yang Dijual Di Tiga Pasar Tradisional Kota Semarang. Skripsi Unimus. 2017;1-3
4. Eva Madinatul. Uji Kadar Boraks Dan Formalin Pedagang Bakso Di Wilayah Semarang Tengah Tahun 2020. Skripsi UDINUS. 2020;1-2
5. Adinugroho, Nurjaya. Pengaruh Pemberian Boraks Dosis Bertingkat Terhadap Perubahan Gambaran Makroskopis dan Mikroskopis Hepar Selama 28 Hari. Skripsi Universitas Diponegoro. 2013;1-4.
6. Guyton Ac, Hall Je. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 12. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran Elsevier. 2016;837-840.
7. Kumar, Vinay., Abbas, Abdul K., Aster, Jon C. Buku Ajar Patologi Robbins Edisi 9. Jakarta: Elsevier.2015;6-18.
8. Abul K. Abbas, Andrew H. Litcman, Shiv Pillai.. Basic Immunology edisi 5. Philadelphia : Elsevier. 2016;30-35.
9. Herlina, Neca. Pengaruh Pemberian Ekstraks Daun Seledri terhadap Gambaran Mikroskopis Sel Hepatosit Tikus yang Diinduksi Boraks. Skripsi Universitas Wahid Hasyim, Semarang.2021;33.
10. Puput Ade W. Hepatoprotektif Pasta Tomat Terhadap Ekspresi IL-2 Aktivasi Sel Kupfer dan Nekrosis Hepar Mencit Yang Dipapar Boraks. Tesis Udayana.2019;17-20.
11. Ni Wayan S, Iriana S, Ni Made S. Kadar SGPT, SGPT dan Kreatinin Plasma Darah Tikus Betina Yang Diinjeksi Vitamin C Dosis Tinggi. Laporan Penelitian, Udayana.2014;5-9.

12. Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia.. Peta Lalu Lintas Rumput Laut Nasional. 2018. Available from URL www.kkp.go.id.
13. Salnida Yuniarti, Dewi Nuraini, Alis Mukhlis, Dewi Putri, Fariq Azhar. Komposisi Nutrisi dan Kandungan Pigmen Fotosintesis Tiga Spesies Alga Merah (Rhodophyta sp.) Hasil Budidaya. *Journal of Marine Research* Vol 9, No.4. 2020; 431-438
14. Ilmiah Hudaifah, Dewi Mutamimah, Arfiati Ulfa. Komponen Bioaktif dari *Eucheuma cottonii*, *Ulva lactuca*, *Halimeda opuntia*, dan *Padina australis*. *Jurnal Ilmu Perikanan dan Kelautan*, Vol. 2. 2020; 63-70.
15. Yanuarti, R., Nurjanah, Anwar, E., dan Hidayat, T. Profil Fenolik dan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Rumput Laut *Turbinaria conoides* dan *Eucheuma cottonii*. *JPHPI*. Vol 20 (2). 2017;230-235.
16. Jaka F. Palawe, Sri Bulan. Analisis Kandungan Karotenoid Sebagai Antioksidan Dari Rumput Laut (*Eucheuma Cottonii*). *Jurnal Ilmiah Tindalung* Volume 4. Nomor 1.2018; 6-9.
17. Giftania Wardani, Nuraini Farida, Rina Andayani, Mahmiah Kuntoro, Sri Agus Sudjarwo. The Potency of Red Seaweed (*Eucheuma cottonii*) Extracts as Hepatoprotector on Lead Acetate-induced Hepatotoxicity in Mice. *Pharmacognosy Research*, Vol 9. 2017; 282-286.
18. Ida A. Ratih, Ngurah I. Wiratmini, Iriani Setyawati. Hepatoprotektor Rumput Laut *Eucheuma cottonii* Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Jantan Yang Diinduksi Natrium Nitrit (NaNO_2). *Metamorfosa : Journal of Biological Sciences* Vol 7 (2). 2020; 87-97.
19. Romadhiyana Kisno Saputri, Bambang Setiawan, Dian Nugrahenny, Nia Kania, Endang Sri Wahyuni, M Aris Widodo. The effects of *Eucheuma cottonii* on alveolar macrophages and malondialdehyde levels in bronchoalveolar lavage fluid in chronically particulate matter 10 coal dust-exposed rats. *Iran J Basic Med Sci*, Vol 17. 2014; 541-545.
20. Nurul'Ain A. Bakar, Victor U. Anyanji, Noordin M. Mustapha, Swee-Ling Lim, Suhaila Mohamed. Seaweed (*Eucheuma cottonii*) reduced inflammation, mucin synthesis, eosinophil infiltration and MMP-9

- expressions in asthma induced rats compared to Loratadine. *Journal of Functional Foods* Vol 19. 2015;710–722.
21. BPOM RI. Boraks, Bahan Berbahaya yang Dilarang untuk Pangan. 2019. Available from URL. www.pom.go.id.
 22. Larsen P, Nielsen F, Fotel P. Survey of boric acid and sodium borax. The danis enviromental protection agency, 2015; 23-25.
 23. Elok A. Widiyanti. Ekspresi interleukin-1 dan histopatologi hepar pada tikus fibrosis ginjal hasil induksi streptokinase. Skripsi Universitas Brawijaya, Malang. 2016;10-11.
 24. Jenni Punt, Sharon A. Stranford, Patricia P. Jones, Judith A. Owen. *Kuby Immunology*. USA : Freeman and Company Publising. 2019;254-260.
 25. Siti Nurchasanah. Kadar Serum Glutamic Pyruvate Transaminase (SGPT) Pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Boraks Dengan Perlakuan Ekstrak Seledri. *Medicomplementary Journal* Vol 1. 2021; 1-5.
 26. Amalia, Rizki., Wurlina., Eka Pramytha Hestianah. Efek Pemberian Vitamin C Dan Vitamin E Terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum Mencit Yang Dipapar Boraks. *Jurnal Veterina Medika* Vol 10(2). Surabaya. 2017; 23-24.
 27. Putra, Agung. *Basic Molecular Stem Cells*. Semarang : Unissula Press.2019; 340-345.
 28. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. *Cellular and Molecular Immunology* Edisi 9. Philadelphia : Elsevier. 2018; 23-26.
 29. Lestari B, Sunny Wangko. Peran sel kupfer pada steatohepatitis alkohol. *Jurnal Biomedik*, Volume 4, Nomor 2. 2012; 79-87.
 30. Maulina Meutia. *Zat-zat yang mempengaruhi histopatologi hepar edisi 1*. Lhokseumawe : Unimal Press.2018;8-13.
 31. Junquiera, LC and Carneiro, J. *Histologi dasar*, Edisi 10. trans. A Dharma, EGC, Jakarta. 2012. 15-20.
 32. Hongmei Z. *Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway in Apoptosis And Medicine*. Volume 3. 2012; 20-23.

33. Wong R. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Canc Res* 2011;30 (87):1-14
34. Angga Dwi Hernanto, Sri Rejeki, Restiana Wisnu Ariyati. Pertumbuhan Budidaya Rumput Laut (*Eucheuma cottonii* Dan *Gracilaria* sp.) dengan Metode Long Line di Perairan Pantai Bulu Jepara. *Journal of Aquaculture Management and Technology* Volume 4, Nomor 2. 2015;60-66.
35. Setyorini, Dwi. Skripsi. Ekstraksi senyawa fitokimia dari Alga *eucheuma cottonii* dan *Gracilaria* sp menggunakan CO_2 Superkritis dan air subkritis Sebagai pelarut. Skripsi ITS Surabaya.2017;25-30.
36. Matanjun P, Mohamed S, Mustapha NM, Muhammad K. Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Eucheuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. *J Appl Phycol* Vol 21, 2012; 75-80.
37. Shashank Kumar and Abhay K. Pandey. Review Article Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Hindawi Publishing Corporation .*The Scientific World Journal*. 2013; 1-11.
38. Dalia M. Kopustinskiene, Valdas Jakstas, Arunas Savickas, Jurga Bernatoniene. Review Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients* Vol 12. 2020; 457.
39. Made, Oka. Buku Ajar Antioksidan. Kimia Terapan Pascasarjana Universitas Udayana. Bali : Udayana Press. 2016;28-31.
40. Dwimayasanti, Rani. Rumput Laut Sebagai Antioksidan Alami Penangkal Radikal Bebas. *Oseana*, Volume XLIII, Nomor 2. 2018; 13 – 23.
41. Hyun Lim, Moon Young Heo, Hyun Pyo Kim. Flavonoids: Broad Spectrum Agents on Chronic Inflammation. *Biomol Ther* 27(3).2019;241-253.
42. Dahlan, Sopiudin. *Statistika Kedokteran dan Kesehatan Edisi 6*. Jakarta : Salemba Medika.2014;91-95.
43. Javier, Echave et all. Seaweed-Derived Proteins and Peptides: Promising Marine Bioactives. *Antioxidants* 2022, 11, 176.

44. Ade Arsianti. Phytochemical Test and Cytotoxic Activity of Macroalgae *Eucheuma cottonii* against Cervical HeLa Cells. *Pharmacogn J.* 2018; 10(5):1012-7.
45. Mn Chatterjea, Rana Shinde. Textbook of Medical Biochemistry Eight Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. 2012 ; 620-625.
46. Biswajita Pradhan , Rabindra Nayak , Srimanta Patra , Bimal Prasad Jit , Andrea Ragusa , and Mrutyunjay Jena. Bioactive Metabolites from Marine Algae as Potent Pharmacophores against Oxidative Stress-Associated Human Diseases: A Comprehensive Review. *Molecules* 2021, 26, 37.
47. Sue E. Huether, Kathryn L. McCance. Buku Ajar Patofisiologi Edisi Ke-6 Vol 1. Elsevier.2019 ; 68-70.
48. Ika Wahyuni, Lalu Faesal Fajri. Pemberian ekstrak rumput laut (*eucheuma cottonii*) terhadap ekspresi Caspase-8 dan jumlah sel tropoblas pada mencit (*mus musculus*) bunting sebelum dipapar plumbum (pb). *Jurnal Sangkareang Mataram.* Volume 4, No. 4. 2018; 13-18.

