



UNIVERSITAS AIRLANGGA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60131

Telepon 031-5020251, 031-5030253, Fax 031-5022472

Website : <http://www.unair.ac.id>; Email : dekan@fk.unair.ac.id

SURAT TUGAS

Nomor : 1886 /UN3.1.1/DL/2023

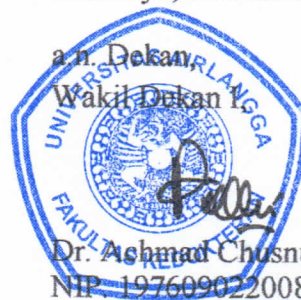
Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dengan ini menugaskan :

- | | |
|--|---------|
| 1. Dr. Sulistiawati, dr.,M.Kes | Ketua |
| 2. Prof. Sri Agus Soedjarwo, Ph.D.,drh | Anggota |
| 3. Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr., MS., Sp.PK(K) | Anggota |
| 4. Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si | Anggota |
| 5. Prof. Dr. Suharjono, Drs., MS., Apt | Anggota |
| 6. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes | Anggota |
| 7. Dr. Hj. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes | Anggota |
| 8. Dr. Lilik Herawati, dr.,M.Kes | Anggota |

Sebagai Ketua / Anggota Panitia Ujian Tahap Pertama (Tertutup) Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas nama Giftania Wardani Sudjarwo, S.Farm.,Apt.,M.S peserta Program Doktor Program studi Ilmu Kedokteran angkatan tahun 2019/2020 yang diselenggarakan pada tanggal 21 Pebruari 2023.

Surat tugas ini diterbitkan sementara untuk menunggu keluarnya Surat Keputusan dari Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Surabaya, 13 Pebruari 2023



Dr. Achmad Chusnu Romdhoni, dr., Sp.THT-KL(K), FICS

NIP 197609022008011009

DISERTASI

**SIGNAL TRANSDUKSI NANOPARTIKEL FUCOIDAN SEBAGAI
PROTEKTOR PADA AORTA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
HIPERGLIKEMIA**



GIFTANIA WARDANI

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2023

DISERTASI

**SIGNAL TRANSDUKSI NANOPARTIKEL FUCOIDAN SEBAGAI
PROTEKTOR PADA AORTA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
HIPERGLIKEMIA**



GIFTANIA WARDANI

NIM. 011917017302

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2023

DISERTASI

SIGNAL TRANSDUKSI NANOPARTIKEL FUCOIDAN SEBAGAI

PROTEKTOR PADA AORTA TIKUS (*Rattus norvegicus*)

HIPERGLIKEMIA

GIFTANIA WARDANI

PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2023

LEMBAR PENGESAHAN
DISERTASI
SIGNAL TRANSDUKSI NANOPARTIKEL FUCOIDAN SEBAGAI
PROTEKTOR PADA AORTA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
HIPERGLIKEMIA
YANG TELAH DISETUJUI PADA
TANGGAL 21 Februari 2023

Oleh

Promotor

Prof. Sri Agus Sudjarwo, Ph.D., drh

NIP. 195604091984031004

Kopromotor

Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr., MS., Sp.PK (K)

NIP.195602141985021001

**Disertasi ini Telah Disetujui untuk Diuji dan Dinilai
Oleh Panitia Penguji Ujian Pada Tertutup (Tahap I)
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Pada tanggal 21 Februari 2023**

Panitia Penguji :

Ketua : 1. Prof. Sri Agus Soedjarwo, Ph.D., drh

Anggota : 2. Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr., MS., Sp.PK (K)

3. Prof. Dr. Bayyinatul Muchtaromah, drh., M.Si

4. Prof. Dr. Suharjana, MS., Apt

5. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes

6. Dr. Sulistiawati, dr., M.Kes

7. Dr. Hj. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes

8. Dr. Lilik Herawati, dr., M.Kes

**Diterbitkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor : 1886/ UN3. 1. 1/DL/2023
Tanggal : 13 Februari 2023**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini saya :

Nama : Giftania Wardani
NIM : 011917017302
Program Studi : S3 Ilmu Kedokteran
Alamat / No. Telp : JL. Jend. S parman V no 97 A/ 081221448990

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Disertasi saya ini adalah asli dan benar-benar hasil karya sendiri, dan bukan hasil karya orang lain dengan mengatas namakan saya, serta bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (plagiatism) dari hasil karya orang lain. Disertasi belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik baik di Universitas Airlangga, maupun di Perguruan Tinggi lainnya;
2. Dalam Disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar kepustakaan;
3. Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh. Karena karya tulis Disertasi ini, serta sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Surabaya,

Yang membuat pernyataan,

Giftania Wardani S

NIM. 011917017302

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia-Nya sehingga Disertasi ini berhasil diselesaikan dengan judul “**SIGNAL TRANSDUKSI NANOPARTIKEL FUCOIDAN SEBAGAI PROTEKTOR PADA AORTA TIKUS (*Rattus norvegicus*) HIPERGLIKEMIA**”. Tujuan dari penyusunan Disertasi ini adalah untuk memenuhi salah satu syarat dalam menempuh ujian guna memperoleh gelar Doktor di Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Desertasi ini dapat diselesaikan berkat dorongan, bimbingan, arahan, saran serta koreksi dari Promotor, Kopromotor, Tim penguji dan banyak pihak, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati perkenankan saya mengucapkan banyak terima kasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Yang Terhormat :

Prof. Sri Agus Soedjarwo, Drh., Ph.D, sebagai promotor dan Guru saya yang telah membimbing dengan penuh perhatian, kesabaran, keikhlasan dan memberikan arahan, dorongan, motivasi serta telah meluangkan waktu untuk berdiskusi serta memberikan ruang berpikir yang luas, sehingga dapat tersusun kerangka berpikir ilmiah sampai proses ujian saat ini. Sekali lagi saya sampaikan ta'dzim dan terimakasih yang tulus teriring doa *jazakumullohu fii jaza Aamiin*.

Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr., MS., Sp.PK (K) sebagai ko-promotor dan guru saya yang dengan penuh kesabaran, perhatian dan keikhlasan dalam memberikan bimbingan, arahan, dorongan, semangat dalam menyelesaikan disertasi ini sampai

pada tahap ujian saat ini, oleh karena itu saya sampaikan ta'dzim dan terimakasih yang setinggi-tingginya serta teriring doa *jazakumullohu fii jaza Aamiin*.

Dengan selesainya disertasi ini perkenankanlah pula saya menghaturkan ucapan terimakasih yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

Prof. Dr Mohammad Nasih, SE., MT., Ak., selaku rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang telah diberikan untuk mengikuti dan menyelesaikan studi pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Budi Santoso, dr. SpOG (K)., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan segenap jajarannya yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti dan menyelesaikan studi pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Laksamana Muda TNI (Purn) Prof. Dr. Ir. Supartono, MM., CIQaR sebagai Rektor Universitas Hang Tuah dan jajarannya, **Djatiwidodo Edi., dr., M.Kes., SpKL** sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hang Tuah dan jajarannya, **Ana Khusnul Faizah, S.Farm., M.Farm.Klin** sebagai Ketua Program Studi Farmasi Universitas Hang Tuah dan jajarannya yang telah memberikan ijin tugas belajar dan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program studi ilmu Kedokteran Jenjang Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr. SpOG (K)., selaku Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas dan dukungan kepada saya selama menjalani proses dan menyelesaikan pendidikan Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga.

Tim penguji Materi kualifikasi, proposal, ujian kelayakan serta ujian tertutup **Prof. Sri Agus Sudjarwo Drh., Ph.D; Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr., MS., Sp.PK (K); Prof. Dr. Prof. Dr.Suharjana., M.Si; Prof. Win Darmanto, Drs., M.Si., Ph.D; Prof. Dr. Bayyinatul Muchtaromah, drh., M.Si , Drh., Dr. Hari Basuki Notobroto dr., M.Kes; Dr.Sulistiawati, dr., M.Kes; Dr. Hj. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes; Dr. Lilik Herawati, dr., M.Kes** yang banyak memberikan saran dan masukan yang sangat penting dan mendasar sesuai keahliannya dan bermanfaat untuk peningkatan mutu disertasi ini, oleh karena itu sekali lagi saya sampaikan *ta,dzim* dan terimakasih yang setinggi-tingginya.

Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) yang telah mendukung penuh saya selama menempuh studi di Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, baik secara finansial maupun pencapaian saya dalam akademik dan non-akademik.

Kedua orang tua tercinta, terimakasih atas kasih sayang, doa, bimbingan, dorongan, dan motivasi serta pengorbanannya baik fisik maupun materi dan semuanya yang tak pernah bisa terbalas.

Suamiku **Mayor Laut (P) Wahyu Widarta** dan putraku **Nevsky Antares Valery Yusuf** tercinta yang selalu menjadi motivasi utama dan senantiasa memberikan semangat dalam pengerjaan Disertasi ini.

Saya juga mengucapkan terimakasih kepada rekan-rekan sejawat dan karyawan pada Program Studi Farmasi Universitas Hang Tuah atas segala kerjasama dan bantuan yang telah diberikan kepada saya selama menempuh pendidikan

Penulis menyadari bahwa disertasi ini masih jauh dari sempurna, mengingat keterbatasan kemampuan, pengalaman, dan pengetahuan penulis baik dalam hal

penyajian maupun penggunaan bahasa. Namun semoga disertasi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Surabaya, Februari 2023

Giftania Wardani

RINGKASAN:

Hiperglikemia merupakan salah satu tanda dari penyakit Diabetes Melitus (DM), yang dapat disebabkan oleh adanya gangguan sekresi insulin, kerja insulin atau kedua-duanya. Hiperglikemia merupakan penyebab utama komplikasi pada penderita DM yang berupa gangguan mikrovaskuler (retinopati, nefropati, neuropati) dan makrovaskuler (hipertensi, stroke, disfungsi sel endothelium). Hal ini karena pada keadaan hiperglikemia dapat terjadi *glucose toxicity* yaitu dapat menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang dapat mengaktivasi *NADPH oxidase* dan *Xantin Oxidase* sehingga dapat terjadi peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang meliputi *superoxide* (O_2^-), *hydroxyl radical* (*OH), *hydrogen peroxides* (H_2O_2) dan menurunkan antioksidan endogen yang meliputi *Superoxide Dismutase* (SOD), *Catalase* dan *Glutathion Peroxidase* (GPx) (1,2). Ketidak seimbangan antara ROS dan antioksidan ini dapat menyebabkan stress oksidatif yang selanjutnya mengakibatkan oksidasi pada lemak, protein dan DNA pada sel endotel pembuluh darah sehingga akan terjadi kerusakan oksidatif pada sel endotel yang menyebabkan terjadinya disfungsi endotel dan vasokonstriksi. Oksidasi pada lemak membran sel endotel pembuluh dapat menghasilkan *Malondialdehyde* (MDA) atau peroksida lipid yang merupakan salah satu produk akhir dari peroksidasi lipid.

Pada hiperglikemia, kerusakan sel endotel dapat menyebabkan disfungsi endotel yang dapat mengakibatkan hambatan masuknya ion kalsium dalam sel endotel sehingga dapat menyebabkan inaktivasi *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) sehingga dapat menghambat pembentukan *Nitric Oxide* (NO) (3,4). Menurunnya produksi NO dapat menyebabkan inaktivasi *Soluble Guanylate Cyclase*

(sGC) yang dapat menghambat pembentukan *cyclic Guanosine Monophosphate* (cGMP) pada sel otot polos pembuluh darah. Terhambatnya produksi cGMP dapat menghambat vasodilatasi atau dapat terjadi vasokonstriksi sehingga diameter lumen pembuluh darah mengecil.

Telah dilaporkan bahwa komplikasi makrovaskular yaitu disfungsi sel endothelium dan sel otot polos pembuluh darah pada hiperglikemia dapat dihambat dengan pemberian antioksidan (5-7). Antioksidan dapat menghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas atau menetralkan dan merusak radikal bebas sehingga dapat menghambat kerusakan sel dan juga menghambat kerusakan biomolekul, seperti DNA, protein, dan lipoprotein di dalam tubuh yang akhirnya dapat menghambat terjadinya komplikasi DM.

Indonesia sebagai negara tropis yang dikenal dengan julukan *The Second Mega Biodiversity*, memiliki berbagai jenis tanaman yang diketahui mempunyai khasiat antioksidan. Salah satu jenis tanaman herbal yang mempunyai khasiat antioksidan adalah rumput laut coklat. Telah dilaporkan bahwa rumput laut coklat (brown algae) seperti *Sargassum stenophyllum*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum* dan *Fucus vesiculosus* banyak mengandung senyawa aktif fucoidan yang memiliki bioaktivitas sebagai antidiabetes, antikanker, anti atherosklerosis, anti-inflamasi, antikoagulan, imunomodulator dan antioksidan.

Pada saat ini telah berkembang teknologi nano yang dapat digunakan untuk membuat bahan obat berukuran nanometer sehingga dapat meningkatkan stabilitas, kelarutan obat, absorpsi, bioavailabilitas, potensi dan efektifitasnya (8–10). Oleh karena fucoidan mempunyai efek antioksidan dan antidiabetes maka pada penelitian ini bertujuan membuat sediaan fucoidan dalam bentuk nanopartikel

untuk menjelaskan signal transduksi nanopartikel Fucoidan dalam mencegah kerusakan aorta pada rat hiperglikemia.

Fucoidan dibuat dibuat dalam bentuk sediaan nanopartikel dengan metode *Ball milling*. Nanopartikel fucoidan dikarakterisasi dengan *Dynamic Light Scattering* (DLS) dan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Pada penelitian ini digunakan tikus (*Rattus norvegicus*) sebanyak 50 ekor yang kadar gula darahnya > 250 mg/dl dibagi menjadi 5 kelompok sebagai berikut: Kelompok Kontrol (tikus diberi pelarut streptozotocin secara intraperitoneal dan pelarut Nanopartikel Fucoidan secara oral); Kelompok Streptozotocin (tikus di injeksi streptozotocin secara intraperitoneal dan pelarut Nanopartikel Fucoidan secara oral); Kelompok Perlakuan Nanopartikel Fucoidan (tikus di injeksi streptozotocin secara intraperitoneal dan diberi Nanopartikel Fucoidan dengan dosis 75, 150 dan 300 mg/kg BB peroral).

Tikus disuntik dengan streptozotocin dengan dosis tunggal 55 mg/Kg BB secara intraperitoneal. Pada hari ke-3, nanopartikel Fucoidan diberikan secara oral 2 kali sehari selama 72 hari. Pada hari ke 75, tikus dibius dengan dietil eter dan diambil sampel darahnya secara intrakardial untuk mengukur kadar glukosa darah dan insulin. Jaringan aorta dikumpulkan untuk pemeriksaan ROS dengan Flow cytometri, pemeriksaan kadar Malondialdehyde (MDA) dan NO dengan ELISA, pemeriksaan faktor nuklir faktor eritroid 2 terkait 2 (Nrf2) dengan RT-PCR, pemeriksaan NOS endotel (eNOS), superoksida dismutase (SOD), dan glutathione peroksidase (GPx) dengan imunohistokimia, pemeriksaan respon relaksasi asetilkolin (Ach) pada kontraksi Norepinephrine (NE) dengan organ bath, dan pengamatan histopatologi dengan Hematoxylin & Eosin (H&E) untuk mengukur

diameter lumen aorta. Pemeriksaan dengan DLS menunjukkan bahwa ukuran nanopartikel fucoïdan adalah 201.8 ± 14.6 nm. Pada pemeriksaan dengan SEM, permukaan nanopartikel fucoïdan cenderung bulat dan permukaannya tidak rata. Pemberian streptozotocin secara signifikan meningkatkan kadar ROS, MDA dan glukosa, sedangkan kadar insulin, NO, respon relaksasi Ach dan diameter lumen aorta menurun, serta ekspresi Nrf2, eNOS, SOD, dan GPx menurun dibandingkan dengan kontrol normal (hal. $<0,05$). Pemberian nanopartikel Fucoïdan hanya pada dosis 300 mg/kg BB secara signifikan menghambat peningkatan ROS, MDA dan kadar glukosa. Namun nanopartikel Fucoïdan pada dosis 300 mg/kg BB secara signifikan menghambat penurunan kadar insulin, NO, respon relaksasi Ach dan diameter lumen aorta, juga secara signifikan menghambat penurunan ekspresi Nrf2, eNOS, SOD, dan GPx dibandingkan dengan yang kelompok Streptozotocin (Diabetes) ($p<0,05$). Pemberian Streptozotocin menyebabkan hilangnya struktur sel endotel normal dan nekrosis, sedangkan pengobatan dengan nanopartikel Fucoïdan menghambat nekrosis sel endotel. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa nanopartikel fucoïdan dapat menghambat kerusakan pembuluh darah aorta yang diinduksi streptozotocin melalui efek antioksidan dengan menghambat peningkatan kadar MDA dan menghambat penurunan ekspresi Nrf2, SOD, GPx, eNOS, dan kadar NO. Nanopartikel Fucoïdan Juga dapat menghambat penurunan kadar insulin dan glukosa.

SUMMARY:

Hyperglycemia is a sign of Diabetes Melitus (DM), which can be caused by impaired insulin secretion, insulin action, or both (11–13). Hyperglycemia is the main cause of complications in DM patients in the form of microvascular disorders (retinopathy, nephropathy, neuropathy) and macrovascular (hypertension, stroke, endothelium cell dysfunction) (14,15). This is because, in a hyperglycemic state, glucose toxicity can occur, which can cause glucose auto-oxidation, protein glycation, and activation of the polyol metabolism pathway that can activate NADPH oxidase and Xanthine Oxidase so that an increase in Reactive Oxygen Species (ROS) which includes superoxide (O_2^-), hydroxyl radical ($*OH$), hydrogen peroxides (H_2O_2) and reduce endogenous antioxidants including Superoxide Dismutase (SOD), Catalase and Glutathione Peroxidase (GPx) (1,2). This imbalance between ROS and antioxidants can cause oxidative stress which can lead to the oxidation of lipids, proteins, and DNA in vascular endothelium cells, resulting in oxidative damage to endothelium cells which causes endothelial dysfunction and vasoconstriction (16,17). Oxidation of vascular endothelial cell membrane lipids can produce malondialdehyde (MDA) or lipid peroxide which is one of the end products of lipid peroxidation (18,19).

In hyperglycemia, endothelial cell damage can cause endothelial dysfunction, which can result in inhibition of the entry of calcium ions into endothelial cells so that it can cause endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) inactivation so can inhibit the formation of Nitric Oxide (NO) (3,4). Decreased NO production can cause inactivation of Soluble Guanylate Cyclase (sGC) which can inhibit the formation of cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP) in vascular

smooth muscle cells. The inhibition of cGMP production can inhibit vasodilation or vasoconstriction can occur so the diameter of the blood vessel lumen shrinks (20,21).

It has been reported that macrovascular complications, namely endothelial cell and vascular smooth muscle cell dysfunction in hyperglycemia can be inhibited by the administration of antioxidants (5–7). Antioxidants can inhibit oxidation reactions by free radicals or neutralize and damage free radicals so they can inhibit cell damage and also inhibit damage to biomolecules, such as DNA, protein, and lipoproteins in the body which can ultimately inhibit complications of DM (22–24).

Indonesia as a tropical country known as The Second Mega Biodiversity has various types of plants that are known to have antioxidant effects. One type of herbal plant that has antioxidant effects is brown seaweed. It has been reported that brown seaweed such as *Sargassum stenophyllum*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, and *Fucus vesiculosus* contains many active compounds fucoidan which has bioactivity as anti-diabetic, anticancer, antiatherosclerosis, anti-inflammatory, anticoagulant, immunomodulatory and antioxidant (25–29).

At this time, nanotechnology has been developed that can be used to make nanometer-sized medicinal materials so it can increase drug solubility, absorption, bioavailability, potency, and effectiveness (8-10). This study aims to make fucoidan preparations in the form of nanoparticles for research that can explain the signal transduction of Fucoidan nanoparticles in preventing aortic damage in hyperglycemic rats.

Fucoidan was prepared in the form of nanoparticles using the ball milling method. Fucoidan nanoparticles were characterized by Dynamic Light Scattering

(DLS) and Scanning Electron Microscope (SEM). In this study, 50 rats (*Rattus norvegicus*) were used whose blood sugar levels > 250 mg/dl were divided into 5 groups as follows: Control Group (rats were given streptozotocin solvent intraperitoneally and orally Fucoidan Nanoparticle solvent); Streptozotocin Group (rats were injected intraperitoneally with streptozotocin and orally with Fucoidan Nanoparticle solvent); Fucoidan Nanoparticles Treatment Group (rats were injected with streptozotocin intraperitoneally and given Fucoidan Nanoparticles at doses of 75, 150 and 300 mg/kg BW orally).

Rats were injected with streptozotocin in a single dose of 55 mg/Kg intraperitoneally. On the 3rd day of treatment, Fucoidan nanoparticles were administered orally twice a day for 72 days. On day 75, the rat was anesthetized with diethyl ether and blood samples were taken intracardially to evaluate the level of Blood glucose and insulin. The aorta tissues were collected for Flow cytometry analysis of ROS, ELISA analysis of malondialdehyde (MDA) and NO, RT-PCR analysis of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), immunohistochemical staining of endothelial NOS (eNOS), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx), relaxation response of Acetylcholine (Ach) on Norepinephrine (NE) contraction by organ bath, and histological observation by Hematoxylin & Eosin (H&E) to measure the diameter of aorta lumen. The DLS demonstrated that the fucoidan nanoparticle size was 201.8 ± 14.6 nm. In SEM examination, the surface of the fucoidan nanoparticles tends to be round and the surface is uneven. The giving of streptozotocin significantly increase ROS, MDA and glucose levels, whereas the level of insulin, NO, relaxation response of Ach and aorta lumen diameter decreased, also an expression of Nrf2, eNOS, SOD, and GPx decreased

as compared with the control group ($p < 0.05$). The administration of Fucoidan nanoparticles only at a dose of 300 mg/kg BW significantly inhibited increasing ROS, MDA and glucose levels. However, Fucoidan nanoparticles at a dose of 300 mg/kg BW significantly inhibited decreasing the level of insulin, NO, relaxation response of Ach and aorta lumen diameter, also significantly inhibited decreasing Nrf2, eNOS, SOD, and GPx expression as compared with the diabetic group (Streptozotocin) ($p < 0.05$). The administration of streptozotocin caused the loss of normal endothelial cell structure and necrosis, while treatment with fucoidan nanoparticles inhibited endothelial cell necrosis. It can be concluded that fucoidan nanoparticles are promising agents in terms of the protection afforded against streptozotocin-induced aorta vascular damage through antioxidant effect by inhibiting increasing MDA levels and inhibiting decreasing expression of Nrf2, SOD, GPx, eNOS, and levels of NO. Nanoparticle Fucoidan also can inhibit decreasing insulin and glucose level.

Abstract

Antioxidants have a pivotal role in protecting vascular cell damage from diabetic complications. Fucoidan has a strong antioxidant effect, so the aim of this study was to investigate the role of the antioxidant effect of fucoidan nanoparticles against aorta cell damage of streptozotocin-induced diabetic rat. Fucoidan nanoparticles are characterized using Dynamic Light Scattering (DLS) and Scanning Electron Microscope (SEM). 50 male rats were divided into Control group (rats were given with aqua dest), Streptozotocin group (rats were injected with streptozotocin at dose 55 mg/kg BW i.p), and Fucoidan nanoparticle treatment group (Rats were given orally with Fucoidan at dose 75, 150, and 300 mg/kg BW and then injected streptozotocin at dose 55 mg/kg BW i.p). The blood was taken to evaluate the level of Blood glucose and insulin. The aorta tissues were collected for Flow cytometry analysis of ROS, ELISA analysis of malondialdehyde (MDA) and Nitric Oxide (NO), RT-PCR analysis of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), immunohistochemical staining of endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx), relaxation response of Acetylcholine (Ach) on Norepinephrine (NE) contraction by organ bath, and histological observation by Hematoxylin & Eosin (H&E) to measure the diameter of aorta lumen. The DLS demonstrated that the fucoidan nanoparticle size was 201.8 ± 14.6 nm. In SEM examination, the surface of the fucoidan nanoparticles tends to be round and the surface is uneven. The giving of streptozotocin significantly increase ROS, MDA and glucose levels, whereas the level of insulin, NO, relaxation response of Ach and aorta lumen diameter

decreased, also an expression of Nrf2, eNOS, SOD, and GPx decreased as compared with the normal control ($p < 0.05$). The administration of Fucoidan nanoparticles only at a dose of 300 mg/kg BW significantly inhibited increasing ROS, MDA and glucose levels. However, Fucoidan nanoparticles at a dose of 300 mg/kg BW significantly inhibited decreasing the level of insulin, NO, relaxation response of Ach and aorta lumen diameter, also significantly inhibited decreasing Nrf2, eNOS, SOD, and GPx expression as compared with the negative control (Streptozotocin) ($p < 0.05$). The administration of streptozotocin caused the loss of normal endothelial cell structure and necrosis, while treatment with fucoidan nanoparticles inhibited endothelial cell necrosis. It can be concluded that fucoidan nanoparticles are promising agents in terms of the protection afforded against streptozotocin-induced aorta vascular damage through antioxidant effect by inhibiting increasing MDA levels and inhibiting decreasing expression of Nrf2, SOD, GPx, eNOS, and levels of NO. Also, can inhibit decreasing insulin and glucose level.

Keywords: Fucoidan Nanoparticles, Aorta Vascular, Antioxidant, Diabetes

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Lembar Awal Disertasi.....	iii
Lembar Pengesahan.....	iv
Lembar Penetapan Panitia Penguji.....	v
Surat Pernyataan.....	vi
Ucapan Terimakasih.....	vii
Ringkasan.....	xi
<i>Summary</i>	xv
<i>Abstract</i>	xix
Daftar Isi.....	xxi
Daftar Tabel.....	xxvii
Daftar Gambar.....	xxxii
Daftar Lampiran.....	xxxv
Daftar Singkatan.....	xxxvi
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.3.1 Tujuan Umum.....	7
1.3.2 Tujuan Khusus.....	7

1.4 Manfaat Penelitian.....	9
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	9
1.4.2 Manfaat Praktis.....	9
1.5 Ruang Lingkup Penelitian.....	10
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	11
2.1 Tinjauan Umum Tentang Fucoidan.....	11
2.1.1 Mekanisme Kerja Fucoidan Sebagai Antioksidan.....	13
2.2.2 Bioaktivitas Fucoidan Terhadap Hewan Coba.....	14
2.3 Tinjauan Tentang Nanopartikel.....	15
2.3.1 Metode Pembuatan Nanopartikel.....	15
2.3.2 Karakterisasi Nanopartikel.....	18
2.4 Tinjauan Tentang Diabetes Melitus.....	21
2.4.1 Akumulasi ROS Pada Diabetes Melitus.....	23
2.4.2 Komplikasi Diabetes Melitus.....	24
2.5 Tinjauan Tentang NOS dan NO.....	26
2.6 Tinjauan Tentang cGMP.....	28
2.7 Tinjauan Tentang Stress Oksidatif.....	29
2.8 Tinjauan Tentang Radikal Bebas.....	30
2.8.1 Pembentukan Radikal Bebas.....	32
2.8.2 Sifat Radikal Bebas.....	33
2.8.3 Efek Radikal Bebas Dalam Tubuh.....	33
2.8.4 Sumber Radikal Bebas.....	36
2.9 Tinjauan Tentang <i>Malondialdehida</i> (MDA).....	39
2.9.1 Biokimia <i>Malondialdehida</i> (MDA).....	40

2.9.2 Cara Pengukuran <i>Malondialdehida</i> (MDA).....	42
2.10 Tinjauan Tentang Antioksidan.....	43
2.10.1 Enzim Antioksidan.....	45
2.11 Tinjauan Tentang Streptozotocin.....	49
2.12 Tinjauan Tentang Aorta.....	52
2.12.1 Histologi Aorta.....	54
2.13 Tinjauan Tentang Tikus Putih (Rat).....	56
BAB 3.KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
PENELITIAN.....	59
3.1 Penjelasan Kerangka Konseptual.....	60
3.2 Hipotesis Penelitian.....	62
BAB 4.METODE PENELITIAN.....	64
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	64
4.2 Populasi dan Besar Sampel.....	65
4.2.1 Populasi Penelitian.....	65
4.2.2 Besar Sampel Penelitian.....	65
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	67
4.3.1 Variabel Independen.....	68
4.3.2 Variabel Dependent.....	68
4.3.3 Variabel Kendali.....	68
4.3.4 Definisi Operasional Variabel.....	63
4.4 Alat dan Bahan Penelitian.....	70
4.4.1 Alat Penelitian.....	70
4.4.2 Bahan Penelitian.....	70

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	71
4.6 Prosedur Penelitian.....	71
4.6.1 Persiapan Hewan Coba Rat.....	71
4.6.2 Pembuatan Nanopartikel Fucoidan.....	71
4.6.3 Pemeriksaan Karakteristik Nanopartikel Fucoidan.....	72
4.6.4 Pembagian Kelompok dan Perlakuan Penelitian.....	73
4.7 Analisis Data.....	74
BAB 5. HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN.....	76
5.1 Karakteristik Nanopartikel Fucoidan.....	77
5.2 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Kadar Insulin pada Rat yang di Induksi dengan Streptozotocin.....	79
5.3 Pengaruh Pemberian Fucoidan terhadap Kadar Gula Darah pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	82
5.4 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Kadar MDA Aorta pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin...	86
5.5 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Ekspresi Nrf2 Aorta pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	90
5.6 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi SOD aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin.....	95
5.7 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi GPx aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	100
5.8 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	105

5.9 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fukoidan terhadap Kadar NO Aorta pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	110
5.10 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap Ekspresi cGMP Aorta pada Rat yang di induksi dengan streptozotocin.....	114
5.11 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Respon Relaksasi Ach pada Kontraksi NE Aorta Rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	120
5.12 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap Diameter Lumen Aorta pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	125
5.13 Analisis Jalur Signal Transduksi Nanopartikel Fucoidan Sebagai Protektor Aorta pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	130
BAB 6. PEMBAHASAN, KESIMPULAN DAN SARAN.....	134
6.1 Pembahasan.....	134
6.1.1. Nanopartikel Fucoidan.....	136
6.1.2. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Kadar Insulin dan Kadar Glukosa Darah pada Tikus yang diinduksi Streptozotocin.....	137
6.1.3. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Kadar MDA Aorta pada Tikus yang diinduksi Streptozotocin.....	140
6.1.4. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Ekspresi Nrf2 pada Aorta Tikus yang diinduksi Streptozotocin.....	144

6.1.5. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Ekspresi SOD dan GPx Aorta pada Tikus yang diinduksi Streptozotocin	147
6.1.6. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Ekspresi eNOS dan Kadar NO aorta pada rat yang diinduksi Streptozotocin.....	151
6.1.7. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Ekspresi cGMP Aorta pada Rat yang diinduksi Streptozotocin.....	155
6.1.8. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Respon Relaksasi Ach terhadap Kontraksi Norepinefrin pada Aorta Rat yang diinduksi Streptozotocin.....	157
6.1.9. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Diameter Lumen Aorta pada Rat yang diinduksi Streptozotocin.....	160
6.1.10. Temuan Baru	161
6.1.11. Keterbatasan Penelitian.....	163
6.2 Kesimpulan	164
6.3. Saran	165
DAFTAR PUSTAKA.....	166

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1 Uji normalitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar insulin serum darah rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	79
Tabel 5.2 Uji <i>Kruskal-Walls Test</i> pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar insulin serum darah rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	80
Tabel 5.3 Uji <i>Mann-Whitney Test</i> pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar insulin serum darah rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	81
Tabel 5.4 Uji normalitas dan homogenitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar gula darah pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	83
Tabel 5.5 Uji LSD pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar insulin serum darah pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	84
Tabel 5.6 Uji normalitas pengaruh pemberian nanopartikel Fucoidan terhadap kadar insulin serum darah pada rat yang di induksi dengan streptozotocin.....	86
Tabel 5.7 Uji <i>Kruskal-Walls Test</i> pengaruh pemberian nano fucoidan terhadap kadar MDA aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin.....	87

Tabel 5.8 Uji <i>Mann-Whitney Test</i> pengaruh pemberian nanofucoidan terhadap kadar MDA aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin.....	87
Tabel 5.9 Uji Normalitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	90
Tabel 5.10 Uji <i>Kruskal-Walls Test</i> pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	91
Tabel 5.11 Uji <i>Mann-Whitney Test</i> pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	92
Tabel 5.12 Uji normalitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi SOD aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	95
Tabel 5.13 Uji <i>Kruskal-Walls Test</i> pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi SOD aorta yang di induksi dengan Streptozotocin.....	96
Tabel 5.14 Uji <i>Mann-Whitney Test</i> pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi SOD aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	96
Tabel 5.15 Uji normalitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi GPx aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	100

Tabel 5.16 Uji <i>Kruskal-Wallis Test</i> pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi Gpx aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	101
Tabel 5.17 Uji <i>Mann-Whitney Test</i> pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi GPx aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	102
Tabel 5.18 Uji normalitas pengaruh pemberian nano fucoidan terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin.....	105
Tabel 5.19 Uji <i>Kruskal-Wallis Test</i> pengaruh pemberian nano fucoidan terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin.....	106
Tabel 5.20 Uji Mann-Whitney Test pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin.....	107
Tabel 5.21 Uji Normalitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Kadar NO aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	110
Tabel 5.22 Uji <i>Kruskal-Wallis Test</i> pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar NO aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	111

Tabel 5.23 Uji <i>Mann-Whitney Test</i> pengaruh pemberian nanofucoidan terhadap kadar NO aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	112
Tabel 5.24 Uji normalitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi cGMP aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	114
Tabel 5.25 Uji <i>Kruskal-Walls Test</i> pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi cGMP aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin.....	115
Tabel 5.26 Uji <i>Mann-Whitney Test</i> pengaruh pemberian nanofucoidan terhadap ekspresi cGMP aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin.....	116
Tabel 5.27 Uji normalitas dan homogenitas pengaruh pemberian nano fucoidan terhadap respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta rat yang di induksi dengan streptozotocin.....	120
Tabel 5.28 Uji <i>Kruskal-Walls Test</i> pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta rat pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin.....	121
Tabel 5.29 Uji <i>Mann-Whitney Test</i> pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta rat pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin.....	122
Tabel 5.30 Uji normalitas pengaruh pemberian nano fucoidan terhadap diameter lumen aorta pada rat diabetes.....	125

Tabel 5.31 Uji <i>Kruskal-Wallis Test</i> pengaruh pemberian nano fucoidan terhadap diameter lumen aorta pada rat diabetes.....	126
Tabel 5.32 Uji <i>Mann-Whitney Test</i> pengaruh pemberian nanofucoidan terhadap diameter lumen aorta pada rat diabetes.....	127
Tabel 5.33 Analisis Jalur Signal Transduksi Nanopartikel Fucoidan 300 mg/kg BB Sebagai Protektor Aorta pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	131

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Kimia Fucoidan.....	12
Gambar 2.2 Mekanisme Komplikasi Pada Hiperglikemia.....	26
Gambar 2.3 Peran NO dan cGMP Pada Pembuluh Darah Hiperglikemia...	29
Gambar 2.4 Mekanisme Pembentukan Radikal Bebas.....	32
Gambar 2.5 Pengaruh ROS Pada Berbagai Organ Tubuh.....	34
Gambar 2.6 Sumber – sumber Radikal Bebas Yang Menyerang DNA.....	37
Gambar 2.7 Pembentukan ROS dan RNS Pada Proses Inflamasi.....	37
Gambar 2.8 Mekanisme Pembentukan ROS/RNS Pada Proses Metabolisme.....	39
Gambar 2.9 Mekanisme Kerja Antioksidan Enzimatik.....	47
Gambar 2.10 Struktur Kimia Streptozotosin.....	50
Gambar 2.11 Anatomi Aorta.....	53
Gambar 2.12 Histologi Aorta.....	55
Gambar 2.13 Tikus Putih (Rat) Galur Wistar.....	58
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual.....	59
Gambar 4.1 Design Penelitian Signal Transduksi Nanopartikel Fucoidan Sebagai Protektor Pada Aorta Rat Hiperglikemia.....	64
Gambar 4.2 Alur Penelitian.....	75
Gambar 5.1. Karakterisasi Fucoida, Fucoidan sebelum dibuat sediaan nanopartikel (A); dan Nanopartikel Fucoidan (B) yang diperiksa dengan <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM).....	77
Gambar 5.2. Distribusi ukuran Fucoidan (A) dan nanopartikel fucoidan (B) yang diperiksa dengan <i>Particle Size Analyzer</i> (PSA).....	78

Gambar 5.3. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap kadar insulin pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin.....	82
Gambar 5.4. Pengaruh Pemberian <i>Fucoidan</i> Terhadap kadar gula darah pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin.....	85
Gambar 5.5. Pengaruh Pemberian <i>Fucoidan</i> Terhadap kadar MDA pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	89
Gambar 5.6 Pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin...	92
Gambar 5.7. Pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Nrf2/ β actin aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin...	94
Gambar 5.8. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi SOD aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin.....	98
Gambar 5.9. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi SOD aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin.....	99
Gambar 5.10. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi GPx aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin.....	103
Gambar 5.11. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi GPx aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin.....	104
Gambar 5.12. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin.....	108

Gambar 5.13. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fukoidan Terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat diabet.....	109
Gambar 5.14. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap Kadar NO aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	113
Gambar 5.15. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi cGMP aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin.....	117
Gambar 5.16. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi cGMP aorta pada rat diabet.....	119
Gambar 5.17. Pengaruh Pemberian <i>Fucoidan</i> Terhadap respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta pada rat diabet.....	123
Gambar 5.18. Pengaruh Pemberian Fucoidan Terhadap respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta pada rat diabet.....	124
Gambar 5.19. Pengaruh Pemberian <i>Fucoidan</i> Terhadap diameter lumen aorta pada rat diabet.....	128
Gambar 5.20. Pengaruh Pemberian <i>Fucoidan</i> Terhadap diameter lumen aorta pada rat diabet.....	129
Gambar 5.21 Analisis Jalur Signal Transduksi Nanopartikel Fucoidan.....	133

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Publikasi Ilmiah 1.....	186
Lampiran 2. Publikasi Ilmiah 2.....	200
Lampiran 3. Publikasi Ilmiah 3.....	210

DAFTAR SINGKATAN

- ADA** : *American Diabetes Association*
- AGEs** : *Advanced Glycation End-products*
- ATP** : Adenosin Trifosfat
- CaM** : *Calcium calmodulin*
- cGMP** : Cyclic guanosine monophosphate
- DM** : Diabetes Melitus
- DNA** : *Deoxyribonucleic Acid*
- DLS** : *Dynamic light scattering*
- EDRF** : *Endothelium-derived relaxing factor*
- eNOS** : *Endhotelial Nitric Oxide Synthase*
- GAPDH** : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
- GLUT** : Glucose Transporter
- GPx** : Gluthatione Peroxidase
- GSH** : Gluthatione
- GTP** : Guanosine triphosphate
- GSH** : Gluthatione
- IDDM** : *Insulin-dependent diabetes mellitus*
- IDF** : *International Diabetes Federation*
- IRS** : *Insulin receptor substrate*
- MDA** : *Malondialdehyde*
- NMR** : *Nuclear magnetic resonance*
- NO** : *Nitric oxide*

NOS : *Nitric oxide synthase*

PKG : *Protein Kinase G*

PKC : *Protein kinase C*

PSA : *Particle size analyzer*

PUFA : *Polyunsaturated Fatty Acid*

ROS : *Reactive oxygen species*

SEM : *Scanning electron microscope*

SGC : *Soluble Guanylate Cyclase*

SOD : *Superoxide dismutase*

TBARS : *Thiobarbituric acid reactive substances*

TEM : *Transmission electron microscope*

WHO : *World Health Organization*

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hiperglikemia adalah suatu kondisi medik berupa peningkatan kadar glukosa dalam darah yang melebihi batas normal. Hiperglikemia merupakan salah satu tanda khas penyakit diabetes mellitus (DM). Pada penelitian epidemiologi menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan angka insidensi dan prevalensi DM di berbagai penjuru dunia. Diabetes adalah penyakit yang berbahaya dan mematikan. Data milik Kementerian Kesehatan yang diperoleh dari *Sample Registration Survey* 2014 menunjukkan diabetes menjadi penyebab kematian terbesar nomor 3 di Indonesia dengan persentase sebesar 6,7%, setelah stroke (21,1%), dan penyakit jantung koroner (12,9%).

Menurut International Diabetes Federation (2019) jumlah penderita diabetes melitus diseluruh dunia diperkirakan 9,3% (463 juta orang), naik menjadi 10,2% (578 juta) pada tahun 2030 dan 10,9% (700 juta) pada tahun 2045. Jumlah penderita diabetes di Indonesia terus meningkat dari 10,7 juta jiwa pada 2019 menjadi 19,5 juta pada 2021, membuat Indonesia ke peringkat kelima di dunia. *World Health Organization* (WHO) bahkan mengestimasi angka kejadian diabetes di Indonesia akan melonjak drastis menjadi 21,3 juta jiwa pada 2030. 90% dari total kasus diabetes merupakan diabetes tipe 2. Diabetes tipe 2 umumnya terjadi pada orang dewasa, namun beberapa tahun terakhir juga ditemukan pada anak-anak dan remaja (30). Prevalensi diabetes di Indonesia meningkat dari tahun ke tahun. Lima provinsi dengan prevalensi diabetes tertinggi adalah DKI Jakarta, DI Yogyakarta, Kalimantan Timur, Sulawesi Utara, dan Jawa Timur (31).

Hiperglikemia pada DM dapat disebabkan oleh adanya gangguan sekresi insulin, kerja insulin atau kedua-duanya. Defisiensi insulin dapat terjadi karena gangguan atau rusaknya sel pankreas karena pengaruh dari bahan diabetogenik, desensitasi atau penurunan reseptor glukosa pada kelenjar pancreas, desensitisasi atau kerusakan reseptor insulin di jaringan perifer (11–13). Hiperglikemia merupakan penyebab utama komplikasi pada penderita DM yang berupa gangguan mikrovaskuler (retinopati, nefropati, neuropati) dan makrovaskuler (hipertensi, stoke, disfungsi endothel) (14,15). Hal ini karena pada keadaan hiperglikemia dapat terjadi *glucose toxicity* yaitu dapat menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang dapat mengaktivasi NADPH oxidase dan Xantin Oxidase sehingga dapat terjadi peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang meliputi *superoxide* (O_2^-), *hydroxyl radical* ($*OH$), *hydrogen peroxides* (H_2O_2) dan menurunkan antioksidan endogen yang meliputi *Superoxide Dismutase* (SOD), *Catalase* dan *Glutathion Peroxidase* (GPx) (1,2). Enzim *catalase* dan *glutathion peroksidase* bekerja dengan cara mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 sedangkan *Superoxide Dismutase* bekerja dengan cara mengkatalisis reaksi dismutasi dari radikal anion superoksida (O_2^-) menjadi H_2O_2 (32,33). Radikal hidroksil adalah ROS yang paling toksik. ROS menimbulkan ikatan silang protein yang diperantarai sulfhidril, menyebabkan peningkatan kecepatan degradasi atau hilangnya aktivitas enzimatik. Reaksi ROS juga dapat secara langsung menyebabkan fragmentasi polipeptida. ROS yang berlebihan dapat merusak lipid, protein, atau *Deoxyribonucleic acid* (DNA), dan dapat menghambat fungsi normal sel (9,34,35). ROS juga dapat memodulasi ekspresi gen, adhesi sel, metabolisme

sel, siklus sel, dan kematian sel. Kerusakan oksidatif DNA dapat menyebabkan fragmentasi DNA sehingga dapat terjadi apoptosis (36,37).

Ketidak seimbangan antara ROS dan antioksidan ini dapat menyebabkan stres oksidatif yang dapat mengakibatkan oksidasi pada lemak, protein dan DNA pada sel endotel pembuluh darah sehingga akan terjadi kerusakan oksidatif pada sel endotel yang menyebabkan terjadinya disfungsi endotel dan vasokonstriksi (16,17). Oksidasi pada lemak membran sel endotel pembuluh darah, terutama radikal hidroksil yang mengoksidasi membran sel endotel pembuluh darah yang banyak mengandung asam lemak tak jenuh ganda yang dapat menghasilkan *Malondialdehyde* (MDA) atau peroksida lipid yang merupakan salah satu produk akhir dari peroksidasi lipid (18,19). Kadar MDA yang tinggi dalam plasma dan jaringan dapat digunakan sebagai indikator adanya ROS atau radikal bebas dan kerusakan oksidatif pada membran sel endotel pembuluh darah (32,38,39).

Pada hiperglikemia, kerusakan sel endotel dapat menyebabkan disfungsi endotel yang dapat mengakibatkan hambatan masuknya ion kalsium dalam sel endotel sehingga dapat menghambat pembentukan *Calcium-Calmodulin* (CaM). Terhambatnya pembentukan *calcium-calmodulin* dapat menyebabkan inaktivasi *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) sehingga dapat menghambat perubahan *L-Arginine* menjadi *Nitric Oxide* (NO) dan *L-Citrulline* (3,4,40). Menurunnya produksi NO dapat menyebabkan inaktivasi *Soluble Guanylate Cyclase* (sGC) sehingga dapat terjadi hambatan perubahan *Guanosine-5'-Triphosphate* (GTP) menjadi *cyclic Guanosine Monophosphate* (cGMP) pada sel otot polos pembuluh darah. Terhambatnya pembentukan cGMP dapat menginaktivasi *Protein Kinase G*

(PKG) dan dapat menyebabkan terjadinya hambatan vasodilatasi atau dapat terjadi vasokonstriksi sehingga diameter lumen pembuluh darah mengecil (20,21,39,41).

Telah dilaporkan bahwa komplikasi makrovaskular yaitu disfungsi sel endotel dan sel otot polos pembuluh darah pada hiperglikemia dapat dihambat dengan pemberian antioksidan (5–7). Senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donors*) secara biologis. Pengertian antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat diredam (37,42,43). Antioksidan dapat menghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas atau menetralkan dan merusak radikal bebas sehingga dapat menghambat kerusakan sel dan juga menghambat kerusakan biomolekul, seperti DNA, protein, dan lipoprotein di dalam tubuh yang akhirnya dapat menghambat terjadinya komplikasi DM (22–24).

Antioksidan eksogen seperti vitamin A, C dan E telah dilaporkan dapat digunakan untuk melindungi kerusakan sel endotel pembuluh darah akibat meningkatnya produksi ROS dan menurunnya antioksidan endogen pada tikus hiperglikemia akibat pemberian streptozotocin (44,45). Telah dilaporkan bahwa streptozotocin merupakan salah satu bahan diabetogenik yang digunakan untuk meningkatkan kadar gula darah (hiperglikemia) pada hewan coba. Senyawa Streptozotocin memiliki waktu paruh yang cukup lama dan tidak mudah teroksidasi yang bekerja dengan cara meningkatkan ROS dan menurunkan antioksidan endogen (SOD, GPx, Catalase) sehingga dapat menyebabkan stress oksidatif (46–48). Meningkatnya ROS (radikal bebas) yang sangat reaktif dapat menimbulkan

kerusakan pada membran sel, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA) sel beta langerhans pankreas, sehingga menyebabkan gangguan produksi insulin dan meningkatnya kadar gula darah (12,34,39).

Indonesia sebagai negara tropis yang dikenal dengan julukan *The Second Mega Biodiversity*, memiliki berbagai jenis tanaman yang diketahui mempunyai khasiat antioksidan. Salah satu jenis tanaman herbal yang mempunyai khasiat antioksidan adalah rumput laut coklat. Rumput laut coklat merupakan alga laut yang banyak dibudidayakan oleh masyarakat di Indonesia yang diolah menjadi berbagai produk makanan, minuman, obat serta berbagai produk lainnya (49–51). Telah dilaporkan bahwa rumput laut coklat (*brown algae*) seperti *Sargassum stenophyllum*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum* dan *Fucus vesiculosus* banyak mengandung senyawa aktif fucoidan yang memiliki bioaktivitas sebagai antidiabetes, antikanker, antiatherosklerosis, antiinflamasi, antikoagulan, imunomodulator dan antioksidan. (25–29)

Pada dinding sel rumput laut coklat (*Sargassum Sp*) banyak mengandung senyawa aktif fucoidan yang merupakan polisakarida sulfat yang terdiri dari fucose dan sulfat. *Fucoidan* mempunyai kemampuan untuk menangkap dan menetralkan radikal bebas sehingga reaksi lanjutan yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif dapat berhenti dan kerusakan sel dapat dihindari atau induksi suatu penyakit dapat dihentikan (52–54). Telah dilaporkan bahwa fucoidan dapat menghambat produksi MDA dan dapat meningkatkan antioksidan endogen seperti catalase, SOD dan GPx pada paru rat hiperglikemia dan pada ginjal yang induksi dengan streptozotocin, siklosporin dan pada liver yang diinduksi dengan CCl₄ (10,46,55).

Pada saat ini telah berkembang teknologi nano yang dapat digunakan untuk membuat nanopartikel bahan obat. Aplikasi nanoteknologi membuat revolusi baru dalam dunia industri obat. Dalam bidang farmasi, pengertian nanopartikel yaitu senyawa obat melalui suatu cara dibuat berukuran nanometer (nanokristal) yang dapat meningkatkan stabilitas dan kelarutan obat sehingga dapat meningkatkan absorpsi, bioavailabilitas, potensi dan efektifitasnya (8–10). Pada penelitian ini dilakukan pembuatan sediaan fucoidan dalam bentuk nanopartikel yang digunakan untuk penelitian signal transduksi nanopartikel Fucoidan dalam mencegah kerusakan aorta pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar insulin pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia ?
2. Apakah pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat peningkatan kadar glukosa darah pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia ?
3. Apakah pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat peningkatan kadar ROS pada endothelium aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia ?
4. Apakah pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat peningkatan kadar MDA pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia ?
5. Apakah pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan ekspresi SOD pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia ?
6. Apakah pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan

- ekspresi GPx pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia ?
7. Apakah pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan ekspresi eNOS pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia ?
 8. Apakah pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan ekspresi NO pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia ?
 9. Apakah pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan ekspresi cGMP pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia ?
 10. Apakah pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan respon relaksasi Ach terhadap kontraksi Noerfinefrin pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
 11. Apakah pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan diameter lumen aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum dalam penelitian ini adalah menjelaskan signal transduksi nanopartikel Fucoidan dalam menghambat kerusakan aorta pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus pada penelitian ini adalah :

1. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar insulin pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
2. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat

- peningkatan kadar glukosa darah pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
3. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat peningkatan kadar ROS pada endothelium aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
 4. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat peningkatan kadar MDA pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
 5. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan ekspresi SOD pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
 6. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan ekspresi GPx pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
 7. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar eNOS pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
 8. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar NO pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
 9. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar cGMP pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
 10. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan respon Ach terhadap kontraksi Noerrefinefrin pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
 11. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan diameter lumen aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

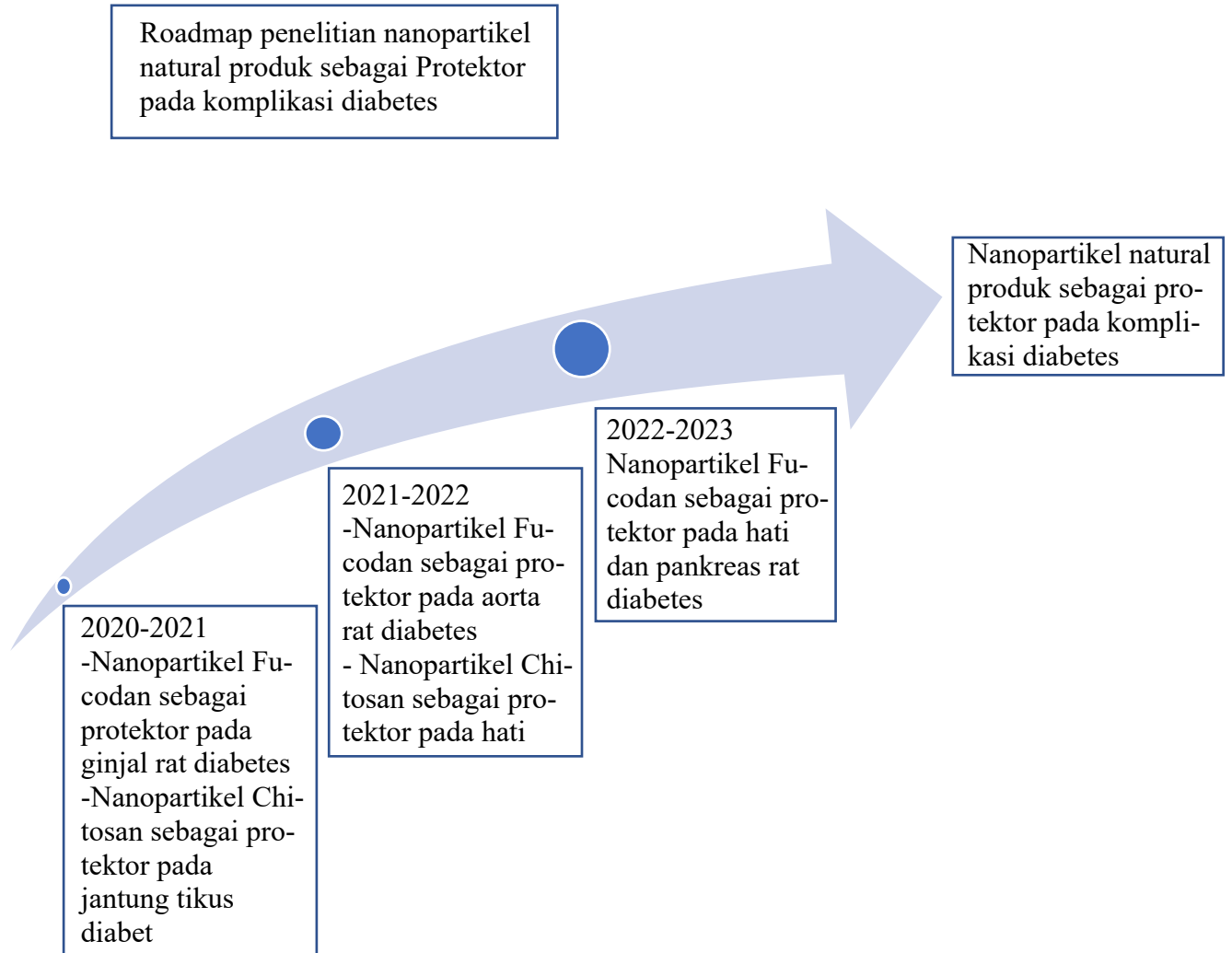
Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah dan memberikan kontribusi dalam menyajikan informasi ilmiah tentang signal transduksi nanopartikel Fucoidan dalam memproteksi aorta pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia yang di induksi streptozotocin. Data ilmiah yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai rujukan penelitian selanjutnya yang terkait dengan *Fucoidan* sebagai senyawa antioksidan untuk mencegah kerusakan sel endothelium dan sel otot polos pembuluh darah pada hiperglikemia (Diabetes Melitus).

1.4.2. Manfaat Praktis

Pada penelitian ini diharapkan dapat dilakukan penelitian lanjutan sehingga hasil akhirnya nanti, nanopartikel Fucoidan dapat digunakan oleh masyarakat umum untuk mencegah terjadinya komplikasi pada penderita diabetes mellitus terutama pada gangguan fungsi sel endothelium dan otot polos pembuluh darah aorta yang dapat menyebabkan komplikasi kardiovaskuler pada penderita diabetes melitus.

1.5 Ruang Lingkup Penelitian

Roadmap penelitian



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

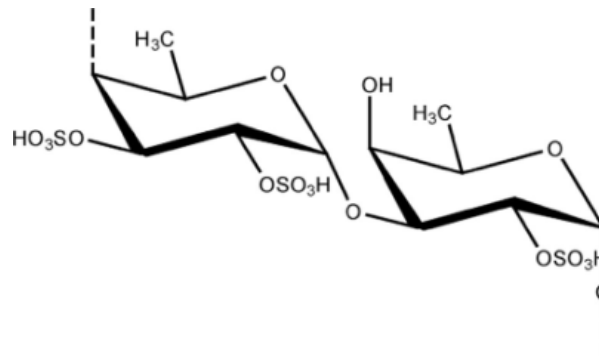
2.1 Tinjauan Umum Tentang Fucoidan

Indonesia merupakan Negara kepulauan dengan wilayah laut sangat luas yang memiliki sumberdaya alam hayati laut yang besar. Di dalam lautan terdapat bermacam-macam biota laut baik berupa tumbuhan air maupun hewan air. Sumber daya biota laut tersebut merupakan aset potensial yang dapat didayagunakan menjadi aneka produk.

Saat ini, Phaeophyceae (*Sargassum* sp. dan *Turbinaria* sp.) belum dimanfaatkan secara optimal, padahal Phaeophyceae sangat bermanfaat, misalnya di bidang kesehatan, mikrobiologi, enzimologi dan ekotoksikologi. Phaeophyceae menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi diantara Rhodophyceae dan Chlorophyceae. Phaeophyceae di daerah tropis memproduksi metabolit sekunder yaitu senyawa fenol dan turunannya yang menjadi komponen utama senyawa antioksidan yang dihasilkan oleh Phaeophyceae (52). Salah satu Phaeophyceae adalah *Sargassum duplicatum* yang merupakan jenis rumput laut coklat dari Indonesia yang berpotensi sebagai antioksidan karena mengandung zat-zat aktif seperti fucoidan (56–58)

Fucoidan adalah adalah polisakarida kompleks yang terdiri dari komponen penyusun utamanya yaitu fukosa yang mengandung sulfat dan sedikit monosakarida lain seperti: galaktosa, glukosa atau monosakarida lain. Fukoidan terdapat pada dinding sel dan bagian intraseluler rumput laut coklat. Kandungan fucoidan dipengaruhi beberapa hal antara lain: lingkungan tempat tumbuh, spesies, musim, metode ekstraksi dan umur panen (28,35). Jenis rumput laut coklat sudah

banyak diteliti di seluruh dunia. Menurut Kim (2011) struktur kimia fucoidan adalah sebagai berikut:



Gambar 2.1. Struktur kimia fucoidan (59)

Hubungan antara struktur dan aktivitas polisakarida sulit ditetapkan karena strukturnya heterogen, *irregular*, bercabang dengan variasi sulfonat yang besar (28,60). Setiap jenis rumput laut cokelat menghasilkan kandungan monosakarida yang berbeda. Beberapa faktor yang menyebabkan perbedaan struktur fucoidan adalah lingkungan hidupnya (suhu, arus laut, kedalaman tumbuh, salinitas), masa panen, spesies, tahap pertumbuhan, musim, proses ekstraksi, jenis pelarut ekstraksi, suhu dan waktu ekstraksi (50,56).

Telah dilaporkan bahwa kandungan zat aktif *fucoidan* dalam *Sargassum* sp. memiliki bioaktivitas sebagai antikanker, antiatherosklerosis, antivirus, antiulkus, antiinflamasi, antikoagulan, imunomodulator dan antioksidan. (16,29,61,62)

2.1.1. Mekanisme Kerja Fucoidan Sebagai Antioksidan

Senyawa fucoidan sebagai antioksidan yang terdapat dalam ekstrak rumput laut bekerja dengan cara menghambat dan menetralkan terjadinya reaksi oksidasi yang melibatkan radikal bebas, baik yang eksogen maupun endogen. Reaksi terminasi fucoidan terjadi dengan cara menangkap radikal hidroksil (*OH) pada tahap reaksi peroksidasi lemak, protein atau molekul lainnya pada membran sel normal sehingga kerusakan membran sel normal di sekitarnya dan kerusakan komposisi DNA serta disfungsi protein dapat dihindari (63)

Fucoidan dapat menetralkan radikal bebas dilakukan dengan cara memberikan satu elektronnya sehingga menjadi senyawa yang lebih stabil atau terjadi reaksi terminasi dan reaksi radikal berakhir atau stres oksidatif tidak terjadi pada sel.(25,61)

Kemampuan antioksidan fucoidan berhubungan dengan kandungan sulfat dan rasio molar dari sulfat dan gulanya. Menurut Wang *et al.* (2020), semakin tinggi kandungan sulfat, maka semakin tinggi pula kemampuan peredaman radikal superoksida. Gugus sulfat dapat berperan sebagai gugus pendonor elektron, yang mendeaktivasi superoksida. Penelitian lain menunjukkan bahwa fucoidan dengan struktur modifikasi yang telah dioversulfatasi, asetilasi, dan benzotilasi memiliki kemampuan pemerangkapan radikal bebas DPPH yang lebih tinggi. Turunan fucoidan tersebut memiliki kemampuan donor hidrogen lebih tinggi yang berhubungan dengan rasio molar antara gugus sulfat dan gulanya. Semakin tinggi kemampuan donor hidrogen akan menghasilkan kemampuan antioksidan yang tinggi pula.

2.2.2. Bioaktivitas Fucoidan Terhadap Hewan Coba

Beberapa peneliti telah melakukan penelitian *Fucoidan* secara *in vivo* maupun *in vitro* yang hasilnya sebagai berikut:

1. Pemberian *Fucoidan* dapat meningkatkan kadar *SOD*, *GPx*, *Catalase* dan menurunkan kadar *MDA* hati rat yang di induksi dengan CCl_4 (56,64).
2. Pemberian *Fucoidan* menunjukkan aktivitas anti atherosclerosis melalui hambatannya terhadap *ICAM-1*, *VCAM-1* dan *NADPH* oxidase pada mencit (25,65).
3. Pemberian *Fucoidan* dapat meningkatkan kadar antioksidan *SOD*, menurunkan *MDA* dan kadar gula darah pada tikus yang diinduksi dengan streptozotocin (29).
4. Pemberian *Fucoidan* dapat menghambat pembentukan *ROS* dan dapat meningkatkan antioksidan endogen (*SOD*, *GSH* dan *Catalase*) serta dapat meningkatkan ekspresi *Nrf2* pada hati tikus yang di induksi dengan asetaminofen (61)
5. Pemberian *Fucoidan* dapat menurunkan kadar *MDA* dan meningkatkan kadar *SOD*, *GPx*, *Glutathione (GSH)* pada porcine intestinal epithelial cell line (*IPEC-1*) yang di induksi H_2O_2 secara invitro (66)
6. Pemberian *Fucoidan* dapat menghambat kerusakan DNA, menurunkan kadar *MDA* dan meningkatkan kadar *SOD*, *Catalase*, *Glutathione (GSH)* pada hati dan ginjal tikus yang di induksi dengan streptozotocin dan aflatoxin B1 (67)
7. Pemberian nanopartikel *Fucoidan* dapat menurunkan kadar *MDA*, menurunkan ekspresi mRNA caspase 3, meningkatkan kadar antioksidan *SOD* dan *GPx* pada paru tikus yg diinduksi dengan streptozotocin (68)

2.3. Tinjauan Tentang Nanopartikel

Nanopartikel adalah partikel berukuran 1-100 nanometer dan kebanyakan metode menyarankan sebaiknya ukuran diameter partikel antara 200 dan 400 nm. Nanopartikel menurut bidang farmasi yaitu senyawa obat dengan cara tertentu dibuat berukuran nanometer disebut nanokristal atau senyawa obat dienkapsulasi dalam suatu system pembawa tertentu berukuran nanometer disebut nanocarrier(9,68). Nanopartikel bertujuan untuk mengatasi kelarutan zat aktif yang sukar larut, memperbaiki bioavailabilitas yang buruk, memodifikasi sistem penghantaran obat sehingga obat dapat langsung menuju daerah yang spesifik, meningkatkan stabilitas zat aktif dari degradasi lingkungan (penguraian enzimatik, oksidasi, hidrolisis), memperbaiki absorpsi suatu senyawa makromolekul, dan mengurangi efek iritasi zat aktif pada saluran cerna (12).

2.3.1. Metode Pembuatan Nanopartikel

Metode Pembuatan Nanopartikel Pemilihan metode pembuatan nanopartikel bergantung pada polimer dan sifat obat. Secara konvensional nanopartikel dibuat dengan dua metode, yaitu polimerisasi monomer sintesis dan dispersi polimer sintesis. Pada dasarnya, monomer yang tidak larut air didispersikan dalam air kemudian polimerisasi dikendalikan dengan penambahan inisiator kimia. Senyawa obat akan terjerat dalam dinding polimer ketika ditambahkan dalam medium polimerisasi atau diabsorpsi di permukaan partikel (63).

Pembuatan nanopartikel dapat diklasifikasikan secara luas menjadi dua kategori yaitu:

1. Proses *top-down*

Proses *top-down* terdiri atas pengurangan ukuran partikel dari partikel obat yang besar menjadi partikel yang lebih kecil dengan menggunakan teknik penggilingan yang bervariasi seperti penggilingan media, mikrofluidisasi dan homogenisasi tekanan tinggi. Tidak ada pelarut keras yang digunakan dalam teknik ini (9,69)

2. Proses *bottom-up*

Pembuatan *bottom-up* berupa pembentukan nanostruktur atom demi atom atau molekul demi molekul. Pada pendekatan *bottom-up*, obat dilarutkan dalam pelarut organik dan kemudian diendapkan pada penambahan antisolvent dalam adanya stabilizer (9).

Pemilihan metode pembuatan nanopartikel bergantung pada polimer dan sifat obat. Pembuatan nanopartikel dengan sistem polimer memiliki dua metode yang umum digunakan. Metode polimerisasi monomer sintesis dan dispersi polimer.

1. Polimerisasi Monomer. Sintesis Nanopartikel yang terbentuk didapatkan dengan menginduksi reaksi polimerisasi dari monomer agar menjadi polimer sebagai suatu pembawa. Prosesnya yaitu dengan mendispersikan suatu monomer yang tidak larut air ke dalam fase pendispersi air, kemudian diinduksi dan diberi pengendali reaksi berupa inisiator kimia, variasi pH, dan stabilizer (63)

2. Dispersi Polimer. Pembuatan nanopartikel menggunakan polimer memiliki prinsip presipitasi. Pada dasarnya proses ini dibuat dengan pembentukan emulsi dari fase organik yang terlarut polimer di dalamnya dengan fase air, kemudian untuk pembentukan partikel maka fase organik harus dihilangkan (70).

Beberapa jenis metode dispersi polimer:

- a. Metode Penguapan Pelarut.

Polimer dilarutkan dalam pelarut organik seperti etil asetat yang digunakan sebagai pelarut dalam melarutkan obat yang bersifat hidrofob. Campuran polimer dan larutan obat lalu diemulsifikasi dalam larutan yang mengandung surfaktan dan menjadi bentuk emulsi minyak dalam air (o/w). Setelah terbentuk emulsi yang stabil, pelarut organik kemudian diuapkan dengan ditekan atau diputar secara terus menerus menggunakan pengaduk magnetik. Ukuran partikel dipengaruhi oleh tipe dan konsentrasi penstabil yang digunakan, kecepatan homogenizer, dan konsentrasi polimer (70)

- b. Emulsifikasi Spontan

Merupakan metode modifikasi dari penguapan pelarut. Dalam metode ini pelarut yang larut dalam air bersama dengan sejumlah kecil pelarut organik yang tidak larut air, digunakan sebagai fase minyak. Karena difusi spontan dari pelarut menyebabkan turbulensi antarmuka antara dua fase yang membentuk partikel kecil. Semakin banyak konsentrasi air yang larut dalam pelarut, ukuran dari partikel yang dihasilkan akan semakin kecil (71).

- c. Gelasi Ionik

Metode ini melibatkan proses sambung silang antara polielektrolit dengan adanya pasangan ion multivalennya. Gelasi ionic diikuti dengan kompleksasi polielektrolit dengan polielektrolit yang berlawanan. Pembentukan ikatan sambung silang ini akan memperkuat kekuatan mekanis dari partikel yang terbentuk. Kitosan yang merupakan polimer kationik dapat bereaksi dengan anion multivalen seperti tripolifosfat. Pembentukan mikropartikel dengan metode gelasi ionik dapat dilakukan dengan pengerasan tetesan cair yang didispersikan pada fase minyak atau organik. Prosedur meliputi pencampuran dua fase cair, fase yang satu mengandung kitosan dan fase yang satu mengandung anion multivalen (71)

d. Spray Drying

Polimer dilarutkan dalam pelarut organik, obat didispersikan ke dalamnya, kemudian dimasukkan ke dalam alat spray dry. Sampel menjalani proses penyemprotan melalui aliran udara panas tersebut, pelarut akan menguap sehingga menyisakan partikel padat berukuran nanometer (70).

2.3.2. Karakterisasi Nanopartikel

Penentuan karakteristik nanopartikel diperlukan untuk mendapat pengertian mekanis dari perilaku nanopartikel. Hal ini dapat digunakan untuk memperkirakan kinerja dan untuk merancang partikel, pengembangan formulasi dan mengatasi masalah-masalah dalam proses pembuatan nanopartikel.

1. Sifat Organoleptis

Mengetahui morfologi dari nanopartikel yang mempengaruhi sifat pelepasan zat aktif dari nanopartikel tersebut. Pengamatan ini dapat

dilakukan menggunakan mikroskop optic dengan perbesaran yang disesuaikan. Pengamatan kejernihan dilakukan untuk mengetahui morfologi dan ukuran dari *nanocarrier* secara visual. Partikel yang berukuran nanometer tidak dapat terlihat secara kasat mata, suspense akan terlihat jernih dan transparan (10)

2. Ukuran dan Distribusi Ukuran Nanopartikel

Ukuran dan distribusi nanopartikel diukur menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) menggunakan prinsip *Photon Correlation Spectroscopy* dan *Electrophoretic Light Scattering*(9). Konsepnya bahwa partikel kecil dalam suspense bergerak dengan pola secara acak, kemudian sinar laser menyinarinya. Semakin besar ukuran partikel, semakin lambat Gerak Brown. Ukuran dan distribusi partikel merupakan karakteristik yang paling penting dalam sistem nanopartikel. Hal ini digunakan untuk memperkirakan distribusi secara *in vivo*, biologis, toksisitas, dan kemampuan membidik dari sistem nanopartikel (71). Penentuan ukuran dan distribusi ukuran nanopartikel harus dilakukan karena mempengaruhi secara langsung keunikan sifat nanopartikel. Metode yang dapat digunakan antara lain *Dynamic Light Scattering* (DLS), *Statis Light Scattering* (SLS), NMR, turbidimetri, dan lain sebagainya (72). Setelah sampel diukur dengan perhitungan beberapa jenis menghasilkan representasi dari distribusi ukuran partikel. Partikel distribusi ukuran dapat dihitung sebagai angka atau volume distribusi massa. Analisis memberikan nilai ukuran untuk setiap partikel yang diperiksa.

3. Morfologi Nanopartikel

Bentuk dan keadaan permukaan nanopartikel dapat memberi informasi tentang sifat pelepasan obat. Dapat digunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM), *Transmission Electron Microscopy* (TEM), dan mikroskop daya atom(70).

4. Potensial Zeta

Potensial zeta biasanya digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan nanopartikel, berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Interaksi elektrostatik akan menentukan kecenderungan agregasi dan tolak menolak. Potensial zeta adalah ukuran muatan permukaan partikel yang tersebar dalam medium pendispersi. Idealnya, muatan potensial zeta partikel harus lebih tinggi daripada medium pendispersi untuk mencegah agregasi. Potensial zeta harus dapat dikendalikan(73). Nanopartikel dengan nilai potensial zeta lebih kecil dari -30 mV dan lebih besar dari +30 mV memiliki stabilitas lebih tinggi(71). Sistem dispersi dengan nilai zeta potensial yang rendah lebih mudah membentuk agregat seiring dengan gaya Van der Waals dalam interaksi partikel (70).

2.4 Tinjauan Tentang Diabetes Melitus

Diabetes melitus merupakan suatu kelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia akibat terjadinya kelainan pada sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya (*American Diabetes Association, 2018*). *American Diabetes Association (ADA)* mengklasifikasikan diabetes melitus berdasarkan etiologinya yakni: Diabetes melitus tipe 1 yang disebabkan karena destruksi dari sel beta pankreas yang menyebabkan defisiensi insulin, diabetes melitus tipe 2 yang disebabkan karena resistensi insulin akibat defek progresif dari sekresi insulin, diabetes melitus tipe lain, dan diabetes gestasional. Sekitar 90-95% dari prevalensi DM merupakan DM tipe 2 (4).

Kekurangan hormon insulin baik secara absolut maupun relatif merupakan penyebab terjadinya hiperglikemia atau peningkatan kadar gula darah dalam darah. Diabetes melitus tipe 1 atau *Insulin-dependent Diabetes Melitus (IDDM)* terjadi akibat kerusakan sel beta pankreas sehingga tubuh menjadi kekurangan insulin dan biasanya disebabkan karena serangan autoimun. Terjadinya diabetes melitus tipe 1 biasanya dimulai saat masa kanak-kanak, manifestasi tampak saat masa pubertas, dan terus berkembang seiring perjalanan usia. Pasien dengan diabetes melitus tipe 1 biasanya membutuhkan insulin eksogen seumur hidup karena jika tanpa insulin dapat menyebabkan komplikasi seperti ketoasidosis dan koma (64).

Diabetes melitus tipe 2 atau *Non-insulin Dependent Diabetes Melitus* dapat disebabkan karena resistensi insulin atau disfungsi dari sel beta yang bermanifestasi terhadap jumlah sekresi insulin yang tidak adekuat. Diabetes melitus tipe 2 merupakan penyakit multifaktorial. Walaupun faktor genetic berperan dalam patogenesis dari DM tipe 2, faktor lingkungan seperti gaya hidup memiliki peran

yang lebih besar(47). DM tipe 2 merupakan interaksi antara variabilitas genetik subjek dengan lingkungan, terutama disebabkan karena pola hidup. Kondisi hiperglikemia biasanya disebabkan karena kegagalan subjek menjalani pola hidup sehat(74). Pola hidup yang tidak sehat serta kurangnya aktivitas fisik menyebabkan peningkatan jumlah pasien DM dan diikuti pula semakin cepatnya terjadi DM (30)

Menurut Yaribeygi *et al.*, (2019), resistensi insulin dan disfungsi sel beta pankreas adalah dua defek metabolik utama yang memicu terjadinya DM tipe 2 dengan mekanisme yang belum diketahui, namun sama-sama menginduksi hiperglikemia dan akhirnya meningkatkan kebutuhan insulin. Resistensi insulin adalah sebuah kegagalan organ target untuk merespon terhadap insulin. Keadaan ini menyebabkan penurunan ambilan glukosa pada sel otot, mengurangi glikolisis dan oksidasi asam lemak di hati, dan ketidak mampuan untuk menekan glukoneogenesis hepatic. Kelainan saat penyampaian sinyal insulin dapat berupa penurunan jumlah reseptor insulin, penurunan fosforilasi reseptor insulin serta aktivitas tirosin kinase dan berkurangnya kadar zat-zat yang berperan dalam penyampaian sinyal insulin.

Disfungsi sel beta pada DM tipe 2 bisa disebabkan karena sitokin proinflamasi, obesitas dan resistensi insulin serta konsumsi berlebih dari lemak dan asam lemak bebas (75). Sitokin proinflamasi yang dihasilkan dapat menyebabkan kematian sel beta dengan cara menginduksistres mitokondria. Sitokin juga dapat terinfiltrasi oleh pankreas dapat menjadi mediator yang penting untuk terjadinya kerusakan sel beta. Kondisi hiperglikemia yang berlangsung terus menerus dapat menyebabkan perubahan dalam ekspresi gen yang dapat berakibat pada sekresi insulin yang lemah dan peningkatan apoptosis (76).

Obesitas merupakan faktor yang berperan dalam terjadinya resistensi insulin. Penyerapan glukosa ke dalam sel diawali dengan penangkapan insulin oleh insulin receptor substrat-1 (IRS-1) yang kemudian memberikan sinyal pada GLUT 4 untuk memindahkan glukosa dari luar ke dalam sel. Keadaan hiperglikemia kronis menyebabkan terjadinya *glucose toxicity* yang berakibat pada penurunan ambilan glukosa di membrane sel otot oleh karena terjadinya gangguan translokasi pada GLUT 4, penurunan aktifitas IRS-1 sehingga terjadi resistensi pada insulin. Hal ini menyebabkan glukosa plasma akan meningkat. Resistensi insulin awalnya dapat ditoleransi dengan peningkatan sekresi insulin yang apabila terjadi terus menerus akan menyebabkan kelelahan pada sel beta pancreas yang mengakibatkan destruksinya sel beta sehingga berdampak pada penurunan sekresi insulin (77)

2.4.1. Akumulasi ROS Pada Diabetes Melitus

Telah dilaporkan bahwa hiperglikemia pada diabetes melitus dapat menyebabkan stres oksidatif karena berhubungan dengan meningkatnya pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) dan menurunnya pertahanan antioksidan endogen. Akumulasi ROS dalam tubuh akan menyebabkan kerusakan DNA, karbohidrat, protein dan lipid yang berkontribusi pada perkembangan perkembangan komplikasi hiperglikemia (12)

Hiperglikemia dapat meningkatkan akumulasi ROS melalui berbagai cara (78,79) yaitu

- (1) meningkatkan fluks glukosa melalui jalur poliol;
- (2) meningkatkan pembentukan AGEs dan aktivasi reseptor nya;
- (3) mengaktivasi isoform- PKC

(4) mengaktivasi jalur hexosamine, dan

(5) menurunkan pertahanan antioksidan endogen

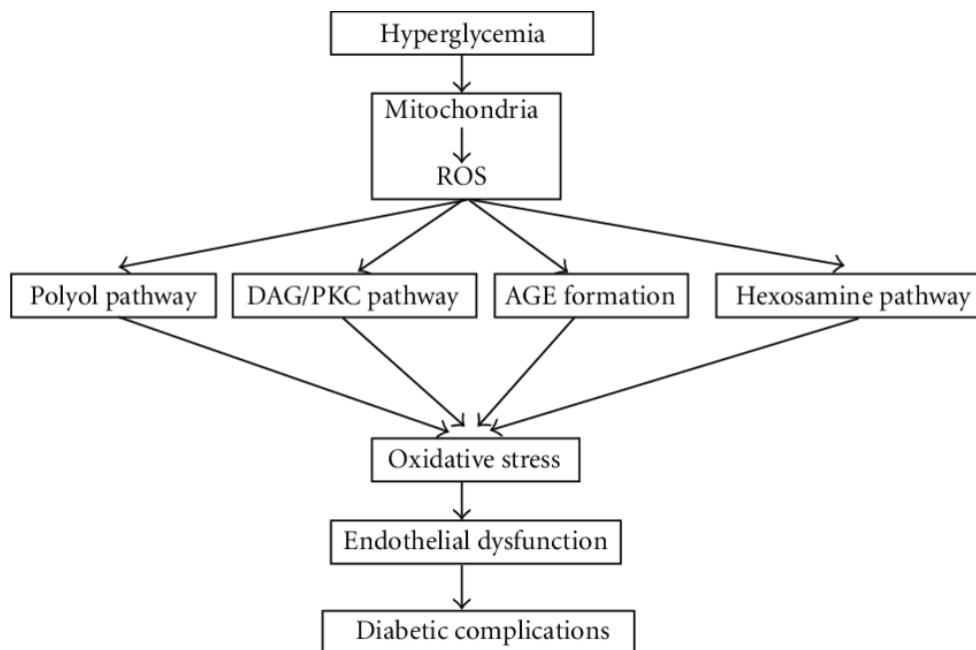
Pada kondisi hiperglikemik, glukosa melalui jalur poliol diubah menjadi polialkohol sorbitol, yang dapat menurunkan antioksidan NADPH dan GSH sehingga dapat menyebabkan peningkatan pembentukan ROS terutama O₂⁻. Akumulasi ROS dapat menghambat glukosa-6 fosfat dehidrogenase, yang dapat menurunkan pembentukan antioksidan endogen (GPx, SOD dan Catalase) sehingga dapat menyebabkan stres oksidatif. Selain itu, sorbitol dimetabolisme menjadi fruktosa oleh sorbitol dehidrogenase yang dapat meningkatkan rasio intraseluler NADH / NAD⁺, sehingga dapat mengakibatkan hambatan gliseraldehida-3-fosfat dehidrogenase (GAPDH). Hal ini selanjutnya, dapat meningkatkan konsentrasi triose fosfat. Kadar triose fosfat yang tinggi dapat menyebabkan pembentukan metilglioksal, prekursor AGEs, dan diasilgliserol (DAG) (melalui-gliserol-3-fosfat), sehingga dapat mengaktifkan PKC. Aktivasi jalur pembentukan *advanced glycation end products* (AGEs), glukosa yang berlebih akan berikatan dengan asam amino bebas yang akan membentuk AGEs. AGEs akan berikatan dengan reseptornya di berbagai jaringan yang dapat menghasilkan ROS. Peningkatan sintesis molekul diasil gliserol yang merupakan kofaktor penting pada aktivasi protein kinase- C (PKC), yang akan meningkatkan NAD(P)H *oxydased* pada membran sel yang mengkatalis terbentuknya *radical superoxide* (37,79)

2.4.2. Komplikasi Diabetes Melitus

Komplikasi diabetes melitus diklasifikasikan menjadi 2 kelompok, yakni mikrovaskular dan makrovaskular. Komplikasi mikrovaskular pada DM dapat

menyebabkan kerusakan, disfungsi dan kegagalan dalam banyak organ seperti retinopati yang dapat menyebabkan kehilangan kemampuan untuk melihat, nefropati yang dapat berakhir dengan gagal ginjal, neuropati perifer yang ditandai dengan luka yang lama sembuh dan dapat berakhir dengan amputasi, dan neuropati autonom yang dapat menyebabkan disfungsi gastrointestinal, *genitourinary*, kardiovaskuler, dan disfungsi seksual (Ohiagu *et al.*, 2021). Penyebab utama kematian penyandang DM tipe 2 adalah komplikasi makrovaskular. Komplikasi makrovaskular melibatkan pembuluh darah besar yaitu pembuluh darah koroner, pembuluh darah otak, dan pembuluh darah perifer.

Kondisi stres oksidatif yang diinduksi hiperglikemia pada diabetes melitus biasa dikaitkan dengan peningkatan apoptosis sel endotel secara *in vitro* dan *in vivo* yang dibuktikan dengan berbagai penelitian yang menunjukkan adanya peningkatan pembentukan radikal bebas dan penurunan kapasitas antioksidan. Mekanisme ROS dalam membuat kerusakan jaringan pada kondisi hiperglikemia dipercepat dengan empat mekanisme molekuler penting yaitu aktivasi protein kinase C (PKC), peningkatan jalur heksosamin, peningkatan produk akhir glikasi (AGE), dan peningkatan jalur poliol yang dapat dilihat pada gambar 2.2 (37)



Gambar 2.2. Mekanisme komplikasi pada hiperglikemia

Stres oksidatif dapat ditunjukkan dengan meningkatnya malondialdehid (MDA) serum maupun jaringan. Malondialdehid terbentuk dari peroksidasi lipid (*lipid peroxidation*) pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas (radikal hidroksil) dengan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA). Peningkatan MDA ini menandakan adanya proses peroksidasi lemak yang berpotensi besar terjadinya komplikasi baik mikro maupun makrovaskular (19).

2.5 Tinjauan Tentang *Nitric Oxide Synthase* (NOS) dan *Nitric Oxide* (NO)

Aktifitas NOS mengkatalisis asam amino *L-Arginine* menjadi NO dan *L-Citrulline*. NOS memiliki tiga isoenzim yang terdiri dari neuronal/syaraf NOS (nNOS atau NOS1), inducible NOS (iNOS atau NOS2), dan endothelial/lapisan pembuluh darah NOS (eNOS atau NOS3). Semua tiga isoenzim ini memiliki lokalisasi jaringan yang berbeda dan peran yang terpisah (18,80)

Ada beberapa perbedaan terhadap ketiga isoenzim NOS pada mamalia dalam memproduksi NO. nNOS dan eNOS menghasilkan NO dalam jumlah kecil selama periode waktu yang relative singkat dan selama produksi NO sangat tergantung terhadap Ca^{2+} , sementara iNOS tidak tergantung terhadap Ca^{2+} selama proses sintesis NO dan dapat menghasilkan NO dalam jumlah besar selama periode waktu yang cukup lama (68)

Aktivitas eNOS dominan dalam sistem kardiovaskular, NO yang diproduksi oleh eNOS berfungsi sebagai vasodilatasi yang berguna untuk mempertahankan aliran dan tekanan darah normal. Pada hiperglikemia dapat terjadi reaksi NO dengan superoxid akan dihasilkan peroxynitrit ($ONOO^-$) yang merupakan reaktif nitrogen spesies. Peroksinitrit pada sel endothelium akan mengoksidasi BH4 (pteridin tetrahydrobiopterin) yang merupakan kofaktor untuk eNOS (endothelial Nitric oxide synthase) yang dapat mengakibatkan menurunnya eNOS sehingga terjadi penurunan pembentukan NO. Penurunan kadar NO dapat menyebabkan terjadinya konstriksi otot polos pembuluh darah sehingga berakibat terjadinya hipertensi dan penurunan NO ini juga dapat menyebabkan efek yang tidak diinginkan seperti agregasi platelet, peningkatan aktivasi sel darah putih, peningkatan aterogenesis. Kadar NO juga berperan sebagai biomarker atau penanda semakin buruknya perkembangan fungsi endotel (26). Senyawa NO merupakan suatu *endothelium-derived relaxing factor (EDRF)* yang dalam kondisi fisiologis dilepaskan dari sel endotel sebagai respon terhadap rangsangan mekanik, asetilkolin dan peningkatan kalsium intraseluler. Senyawa NO dapat menyebabkan vasodilatasi dan berperan sebagai regulator tonus otot polos pembuluh darah melalui aktivasi *soluble guanylate cyclase* (Gambar 2.3) dan memperbaiki perfusi

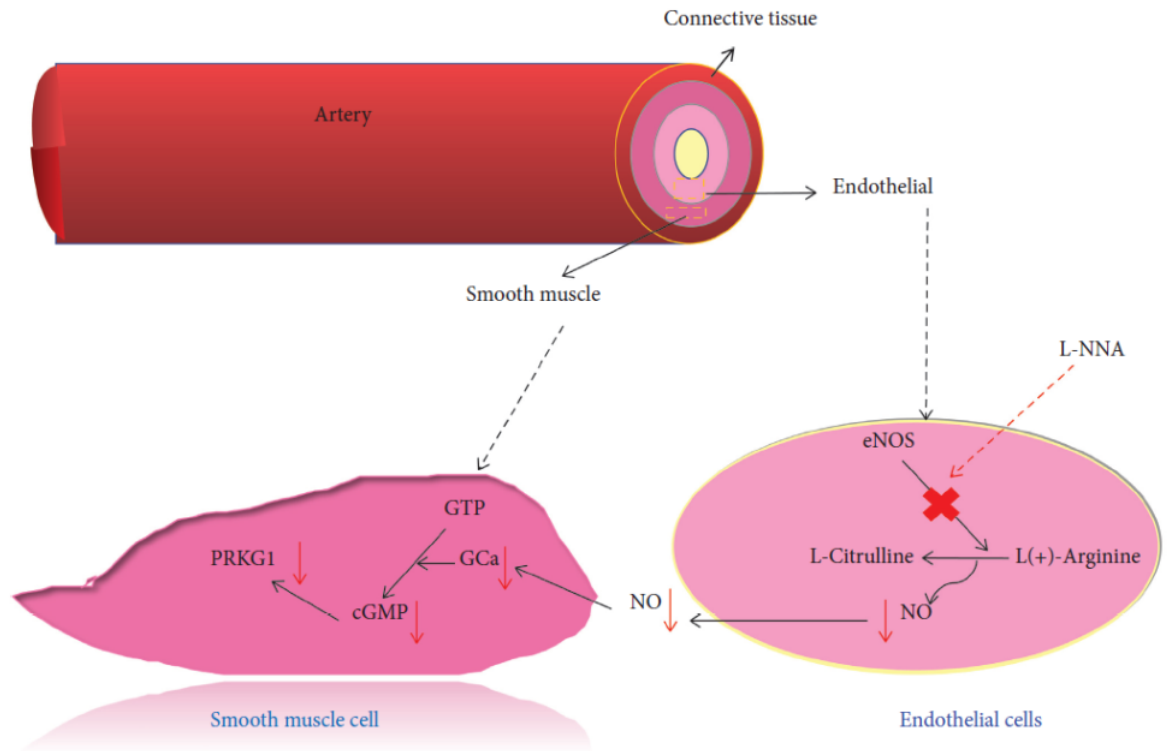
jaringan dengan menghambat adhesi dan agregasi trombosit serta menghambat adhesi leukosit pada permukaan endotel. Di samping itu NO secara tidak langsung juga dapat menyebabkan vasorelaksasi pembuluh darah dengan cara menghambat pelepasan renin dan norepinefrin (50,81,82).

nNOS dilokalisasi terutama di otak dan sistem saraf pusat (SSP). NO yang dihasilkan oleh nNOS digunakan untuk neurogenesis dan regulasi jalur sinyal glutaminergik, kolinergik, dan dopaminergik. Sedangkan iNOS diinduksi oleh endotoksin yang dihasilkan mikroba seperti lipopolisakarida (LPS) dan sitokin inflamasi seperti TNF- α , IL-1 dan sel-sel lain. Apabila terjadi produksi NO berlebih oleh enzim iNOS maka akan dapat menyebabkan inflamasi, radang sendi, peradangan usus serta efek sitotoksik dan mutagenik (kondisi stress oksidatif) (6,65).

2.6 Tinjauan Tentang cGMP

Pada hiperglikemia dapat menghasilkan peroxynitrit (ONOO^-) yang merupakan reaktif nitrogen spesies. Peroksinitrit pada sel endothelium akan mengoksidasi BH4 (pteridin tetrahydrobiopterin) yang merupakan kofaktor untuk eNOS (endothelial Nitric oxide synthase) yang dapat mengakibatkan menurunnya eNOS sehingga terjadi penurunan pembentukan NO. Menurunnya NO dari endothelium dapat menyebabkan inaktivasi *soluble Guanylate Cyclase* (sGC) pada sel otot polos pembuluh darah sehingga dapat terjadi penurunan perubahan dari GTP menjadi cGMP. Penurunan pembentukan cGMP dapat menginaktivasi protein kinase G, yang dapat menyebabkan hambatan relaksasi sel otot polos pembuluh

darah atau dapat terjadi vasokonstriksi yang dapat dilihat pada gambar 2.3 (47,57,61).



Gambar 2.3. Peran NO dan c GMP pada pembuluh darah Hiperglikemia (63).

2.7 Tinjauan Tentang Stres Oksidatif

Ketidak seimbangan jumlah ROS dengan jumlah antioksidan endogen yang diproduksi tubuh seperti Superoksida dismutase (SOD), Glutation peroksidase (GPx) dan Catalase (CAT) disebut stres oksidatif. Keadaan ini dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel yang dapat menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, komplikasi pada diabetes, serta penyakit degeneratif lainnya. Keadaan ini mengakibatkan jumlah radikal bebas menjadi berlebihan yang selanjutnya akan bereaksi dengan lemak, protein, asam nukleat seluler, sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu. Stres oksidatif dapat terjadi karena adanya peningkatan produksi ROS seperti anion superoksida (O_2^-), radikal

hidroksil ($\cdot\text{OH}$), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal nitrit oksida (NO^\cdot) dan peroksinitrit (ONOO^\cdot) dan penurunan antioksidan. Salah satu efek lanjutan dari stres oksidatif adalah memicu terjadinya kerusakan sel dari berbagai macam jaringan tubuh (13).

Sistem pertahanan antioksidan bisa terjadi penurunan karena berbagai faktor patologi atau lingkungan sehingga *ROS* tidak mengalami kerusakan dan membentuk radikal hidroksil yang lebih reaktif. Peningkatan *ROS* menimbulkan kerusakan pada *DNA* dan biomolekul lainnya sehingga dapat merusak fungsi normal sel dan menyebabkan penuaan serta berbagai penyakit (83). Stres oksidatif dapat dipengaruhi oleh faktor internal seperti genetik, umur, oksidasi fosforilasi, proses patofisiologi, dan faktor eksternal seperti olahraga berlebih, asupan makanan, patogen, sinar ultraviolet, dan bahan kimia beracun. Faktor internal utama yang menimbulkan stres oksidatif adalah oksidasi fosforilasi akibat melakukan aktivitas fisik maksimal. Selama aktivitas fisik, terbentuk radikal bebas bersamaan dengan reaksi oksidasi fosforilasi untuk membentuk energi (*ATP*) dalam mitokondria. Dalam reaksi tersebut dibutuhkan oksigen di mana oksigen akan bereaksi dengan hidrogen untuk membentuk air, tetapi sejumlah oksigen dapat berubah menjadi radikal bebas. Dengan demikian semakin berat aktivitas fisik maka dibutuhkan semakin banyak *ATP*, juga semakin banyak radikal bebas yang dihasilkan sebagai produk samping (16,17).

2.8 Tinjauan Tentang Radikal bebas

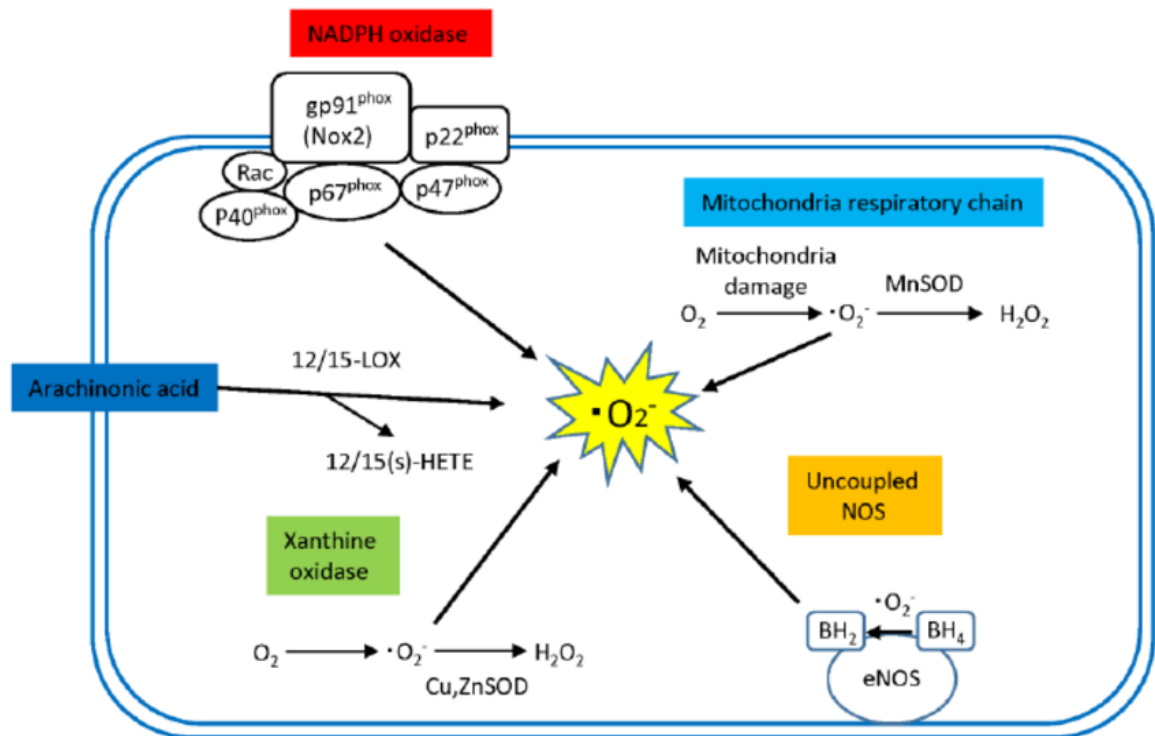
Radikal bebas atau sering juga disebut *reactive oxygen species (ROS)* berasal dari bahasa latin *radicalis* adalah bahan kimia yang dapat berupa atom

maupun molekul yang tidak memiliki elektron berpasangan pada lapisan luarnya. Akibatnya radikal bebas akan selalu berusaha mengambil elektron dari molekul atau senyawa lain di sekitarnya. Apabila radikal bebas mengambil elektron dari protein, lemak, asam nukleat dari suatu sel maka komponen protein, lemak dan asam nukleat dari sel tersebut akan berubah dan fungsi sel tersebut akan terganggu. Radikal bebas cukup banyak jenisnya tapi yang keberadaannya paling banyak dalam sistem biologis tubuh adalah radikal bebas turunan oksigen atau *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS). *Reactive Oxygen Species* sebagian besar merupakan hasil metabolisme sel normal di dalam tubuh (ROS Endogen) dan sebagian kecil merupakan paparan dari zat-zat lain atau radikal-radikal dari luar tubuh (ROS eksogen). ROS endogen merupakan respon fisiologis dari hasil metabolisme sel-sel normal tubuh seperti misalnya metabolisme karbohidrat dan protein. *Reactive Oxygen Species* merupakan senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas dan kelompok non radikal. Kelompok radikal bebas misalnya *superoxide anion*, *hydroxyl radicals*, dan *peroxyl radicals*. Kelompok non radikal seperti hidrogen peroksida dan *organic peroxides*. Selain itu terdapat pula radikal bebas lain seperti *6 hydroperoxyl*, *alkoxyl*, karbonat, karbon dioksida, *atomic chlorine* dan nitrogen dioksida (84).

Radikal bebas yang paling banyak terbentuk di dalam tubuh adalah superoksida. Superoksida ini akan diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen ini dalam tahap propagasi akan diubah menjadi radikal hidroksil ($*OH$). Radikal hidrosil inilah yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak pada membran sel sehingga sel mengalami kerusakan (32).

2.8.1. Pembentukan Radikal Bebas

Radikal bebas dapat dihasilkan pada proses terbentuknya asam urat yang dikatalisis oleh enzim xantin oksidase. Dalam proses ini akan dihasilkan radikal superoksida ($\cdot\text{O}_2$). Proses metabolisme ini biasanya terjadi pada mitokondria, seperti yang ditunjukkan dalam gambar 2.4.



Gambar 2.4 Mekanisme pembentukan radikal bebas (32)

Radikal bebas juga dapat dihasilkan pada kerusakan mitokondria dan pada proses inflamasi yaitu pada proses perubahan NADPH menjadi NADP dengan katalis NADPH oksidase. Dalam proses ini terjadi kebocoran O_2 yang selanjutnya berubah menjadi radikal superoksida ($\cdot\text{O}_2$)

2.8.2. Sifat radikal bebas

Radikal bebas memiliki dua sifat yaitu memiliki reaktivitas yang tinggi karena memiliki kecenderungan menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal. Sifat kecenderungan untuk menarik elektron merupakan sifat radikal bebas yang mirip dengan oksidan sehingga disebut juga penerima elektron. Namun tidak setiap oksidan adalah radikal bebas. Reaksi rantai (*chain reaction*) terbentuk karena kedua sifat radikal bebas diatas yang apabila menjumpai molekul lain akan membentuk radikal baru lagi. Radikal hidroksil merupakan senyawa yang paling berbahaya karena memiliki reaktivitas yang sangat tinggi. Awal dari kerusakan-kerusakan sel terjadi apabila radikal bebas sempat bertemu dengan enzim atau asam lemak tak jenuh yang disertai dengan penurunan mekanisme pertahanan tubuh. Kerusakan tersebut dapat berupa kerusakan *deoxyribonucleic acid* pada inti sel, kerusakan membran sel, kerusakan protein, kerusakan lipid peroksida, dan proses penuaan (84).

2.8.3. Efek Radikal Bebas dalam tubuh

Radikal bebas di dalam tubuh merupakan hasil samping dari proses oksidasi dan pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernafas, metabolisme sel, olahraga yang berlebihan, peradangan, dan terpapar polusi (asap kendaraan, asap rokok, makanan, logam berat, dan radiasi matahari). Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sel di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron sehingga menjadi lebih stabil, tetapi molekul sel tubuh yang diambil elektronnya akan berubah menjadi radikal bebas. Reaksi ini akan berlangsung terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan stress oksidatif yang

menyebabkan suatu peradangan, kerusakan DNA atau sel dan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya (60) seperti yang ditunjukkan dalam gambar 2.5

Keberadaan radikal bebas tidak selamanya merugikan tubuh manusia akan tetapi ada juga yang mempunyai efek yang menguntungkan, seperti membantu destruksi sel-sel mikroorganisme, kanker dan proses pematangan sel-sel di dalam tubuh. Leukosit memproduksi radikal bebas untuk memusnahkan gingiva, ligamen periodontal dan tulang alveolar dengan cara merusak DNA, mengganggu produksi prostaglandin dan merangsang pembentukan sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan TNF- α . Akan tetapi produksi radikal bebas yang berlebihan dan produksi antioksidan yang tidak memadai dapat menyebabkan kerusakan sel-sel jaringan dan enzim-enzim. Kerusakan jaringan dapat terjadi akibat gangguan oksidatif yang disebabkan radikal bebas asam lemak atau dikenal sebagai peroksidasi lipid (16).



Gambar 2.5 Pengaruh ROS pada berbagai organ tubuh (21).

Pada keadaan dimana tingkat oksigen reaktif species (ROS) yang toksik melebihi pertahanan antioksidan endogen maka dapat mengakibatkan kelebihan radikal bebas, yang akan bereaksi dengan lemak, protein, asam nukleat seluler, sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu.

1. Peroksidasi lemak

Mekanisme kerusakan sel atau jaringan akibat serangan radikal bebas yang paling awal diketahui dan terbanyak diteliti adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid paling banyak terjadi di membran sel, terutama asam lemak tidak jenuh yang merupakan komponen penting penyusun membran sel. Membran sel kaya akan sumber *poly unsaturated fatty acid (PUFA)*, yang mudah dirusak oleh bahan-bahan pengoksidasi; proses tersebut dinamakan peroksidasi lemak. Hal ini sangat merusak karena merupakan suatu proses berkelanjutan. Membran sel sangat penting bagi fungsi reseptor dan fungsi enzim, sehingga terjadinya peroksidasi lipid membran sel oleh radikal bebas yang dapat mengakibatkan hilangnya fungsi seluler secara total (32,74). *Malondialdehyde (MDA)* adalah salah satu hasil dari peroksidasi lipid yang disebabkan oleh radikal bebas sehingga *MDA* merupakan indikator umum yang digunakan untuk menentukan jumlah radikal bebas dan secara tidak langsung menilai kapasitas oksidan tubuh (19).

2. Kerusakan protein

Mekanisme keterlibatan *ROS* dalam oksidasi protein telah dilaporkan oleh beberapa peneliti dimana radikal hidroksil atau campuran radikal hidroksil dan superoksida yang terbentuk bereaksi dengan amino, peptida sederhana dan protein. Oksidasi residu sistein oleh *ROS* dapat menyebabkan pembentukan

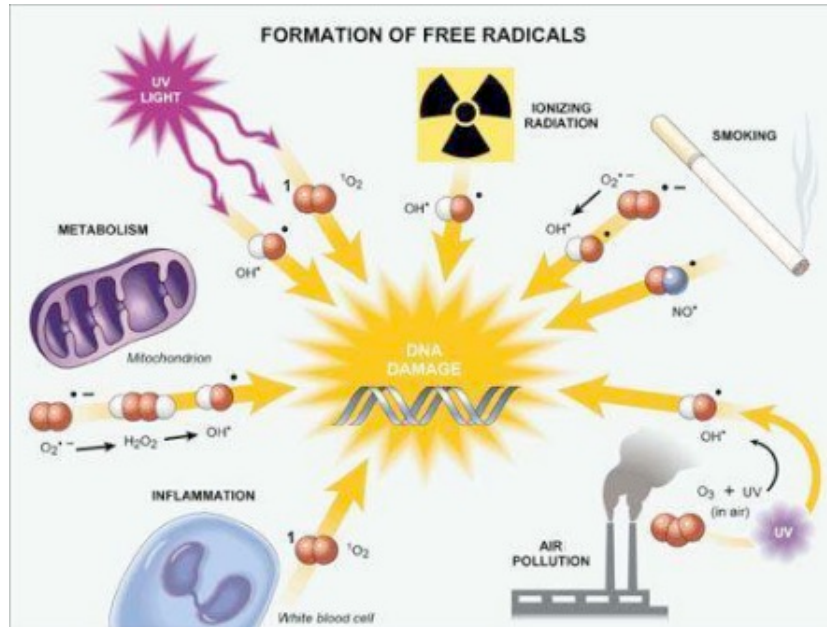
campuran disulfida antara kelompok tiol protein (-SH) dan tiol molekul rendah, khususnya *GSH* (*S-glutathion*). Selain sistein, metionin, arginin, dan histidin mudah mengalami oksidasi oleh ROS. Oksidasi protein dapat mempengaruhi perubahan mekanisme sinyal transduksi, aktivitas enzim, dan mudah terjadi proteolisis, sehingga dapat menyebabkan kematian sel atau proses penuaan (32).

3. Kerusakan DNA

Radikal hidroksil diketahui bereaksi dengan semua komponen DNA molekul, merusak basis purin dan pirimidin, dan bagian deoksiribosa. Lesi DNA yang paling banyak diteliti adalah pembentukan 8-OH-G. Perubahan permanen bahan genetik yang dihasilkan dari insiden kerusakan oksidatif ini merupakan langkah pertama untuk terlibat dalam mutagenesis, karsinogenesis, apoptosis, necrosis dan penuaan, DNA dianggap sebagai target utama terutama pada kanker dan penuaan (39).

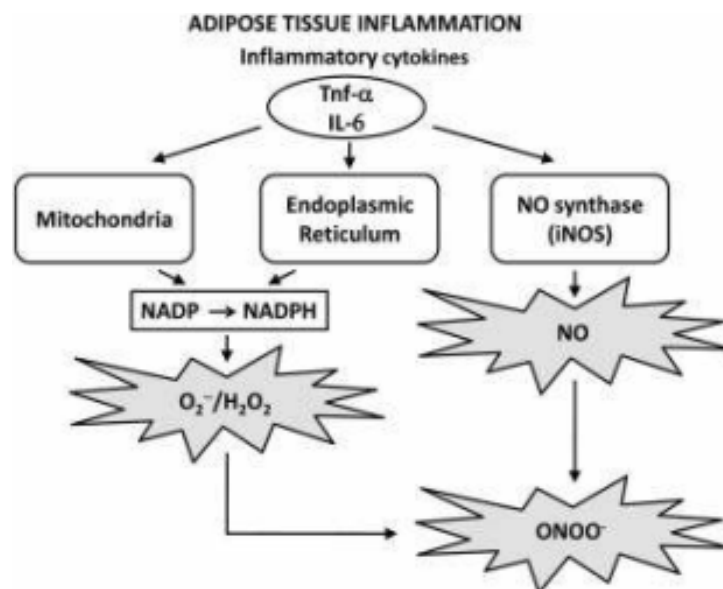
2.8.4. Sumber Radikal Bebas

Sumber radikal bebas ada dua yaitu sumber eksogen dan sumber endogen. Sumber eksogen biasanya berasal dari luar tubuh seperti polutan udara, radiasi, zat-zat kimia karsinogenik, asap rokok, bakteri, virus dan efek obat (obat anastesi dan pestisida). Sumber endogen yaitu radikal bebas yang merupakan hasil metabolik normal dalam tubuh manusia seperti proses oksidasi makanan, proses oksidasi xantin dan olah raga yang berlebihan, seperti yang ditunjukkan dalam gambar 2.6 (19)



Gambar 2.6 Sumber-sumber Radikal bebas yang menyerang DNA (85)

Sumber lain dari ROS dan RNS dapat terbentuk dari proses inflamasi seperti yang ditunjukkan dalam gambar 2.7.

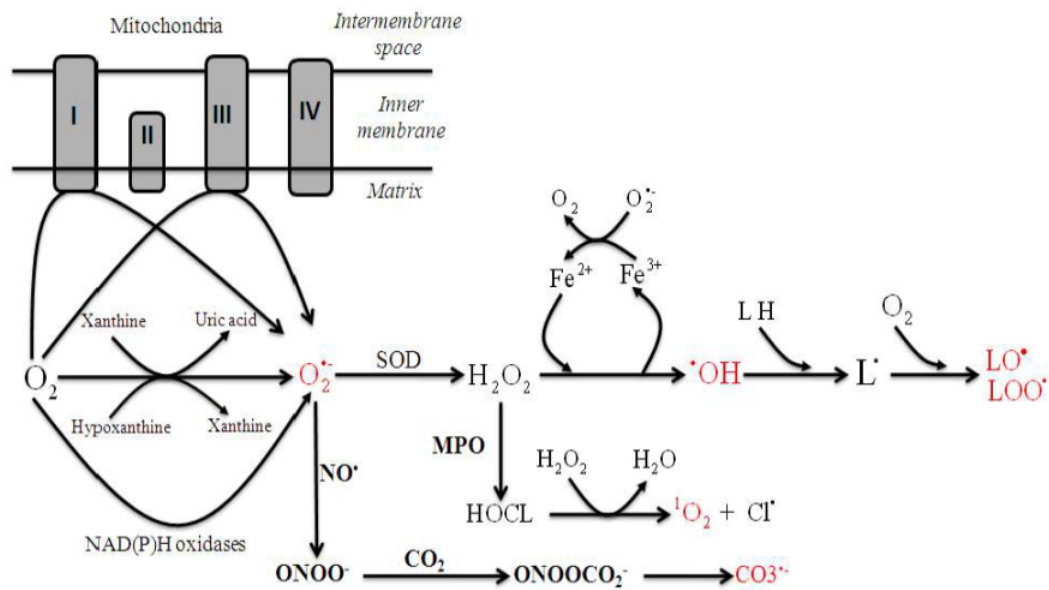


Gambar 2.7. Pembentukan ROS dan RNS pada proses inflamasi

Pembentukan ROS atau RNS dapat terjadi pada proses metabolisme dimana terjadi kebocoran O₂ yang pada proses selanjutnya menjadi radikal O₂^{*}, radikal ONOO^{*}, ^{*}OH dan radikal yang lain. Radikal ^{*}OH akan memperoksidasi lemak sehingga menjadi radikal baru LO^{*} atau LOO^{*} seperti yang ditunjukkan dalam gambar 2.8.

Pelatihan fisik memulai respon fisiologis dan biokimia yang kompleks. Setiap gerakan otot yang cepat dimulai dengan metabolisme anaerobik. Tenaganya berasal dari pemecahan ATP dengan hasil ADP atau AMP dan berlangsung di mitokondria. Pelepasan energi disertai dengan meningkatnya aliran elektron dalam rangkaian respirasi mitokondria sehingga pembentukan oksigen reaktif (O₂⁻) dan H₂O₂ dan upaya pembentukan ATP. Pelatihan cenderung mengosongkan ATP dan meningkatkan jumlah ADP yang tentunya akan merangsang ADP katabolisme dan konversi *Xanthine dehydrogenase* menjadi *Xanthene oxidase*. *Xanthene oxidase* yang akan membentuk radikal bebas (O₂⁻). Terbentuknya radikal bebas akan menyebabkan ketidakseimbangan yang disebut sebagai stress oksidatif dengan hasil akhir rusaknya lemak, protein dan DNA. Terjadinya stres oksidatif akibat paparan radikal eksogen dan aktivitas berlebih dapat menyebabkan terjadinya defisiensi Glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PD). Defisiensi G6PD akan mempengaruhi metabolisme karbohidrat yang pada akhirnya akan mengganggu kesehatan manusia. Metabolisme glukosa melalui jalur heksosa monofosfat meningkat beberapa kali ketika eritrosit terpapar dengan obat-obatan atau toksin yang membentuk radikal bebas (65). G6PD menginisiasi jalur ini dengan menjadi katalis oksidasi glukosa-6-fosfat menjadi 6-phosphogluconolactone oleh ko-enzim nikotinamida adenin dinucleotidephosphate (NADP), yang dikurangi menjadi

NADPH. 6-phosphogluconolactone menghidrolisis secara spontan untuk 6-phosphogluconate. Ini berfungsi sebagai substrat untuk 6-phosphogluconate dehidrogenase dan NADP. Langkah kedua dalam jalur enzimatik ini juga berhubungan dengan pengurangan NADP⁺ untuk NADPH. NADPH dihasilkan sebagai akibat dari reaksi mengurangi glutathion teroksidasi (GSSG) untuk mengurangi glutathion (GSH) dalam reaksi dikatalisis oleh glutathion reduktase. GSH kemudian mengurangi hidrogen peroksida, oksidan kuat yang dihasilkan dalam metabolisme sel dan sebagai konsekuensi dari respon inflamasi, dan oksidan endogen dan eksogen lainnya, pada reaksi katalis oleh glutathione peroksidase (84).



Gambar 2.8. Mekanisme pembentukan ROS/RNS pada proses Metabolisme (86).

2.9 Tinjauan Tentang Malondialdehida (MDA)

Malondialdehida merupakan salah satu produk final dari peroksidasi lipid. Senyawa ini terbentuk akibat degradasi radikal bebas *OH* terhadap asam lemak tak jenuh yang nantinya menjadi radikal yang sangat reaktif. *MDA* adalah senyawa

dialdehid yang merupakan produk akhir peroksidasi lipid di dalam tubuh. Senyawa ini memiliki tiga rantai karbon dengan rumus molekul $C_3H_4O_2$. *MDA* juga merupakan produk dekomposisi dari asam amino, karbohidrat kompleks, pentosa dan heksosa. Selain itu, *MDA* juga merupakan produk yang dihasilkan oleh radikal bebas melalui reaksi ionisasi dalam tubuh dan produk samping biosintesis prostaglandin yang merupakan produk akhir oksidasi lipid membran. Di samping itu, *MDA* juga merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas. Oleh sebab itu, konsentrasi *MDA* yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi dalam membran sel. Status antioksidan yang tinggi biasanya diikuti oleh penurunan kadar *MDA*. *MDA* dapat bereaksi dengan komponen nukleofilik atau elektrofilik. Aktivitas non-spesifiknya, *MDA* dapat berikatan dengan berbagai molekul biologis seperti protein, asam nukleat, dan aminofosfolipid secara kovalen. *MDA* dapat menghasilkan polimer dalam berbagai berat molekul dan polaritas (87). Efek negatif senyawa radikal maupun metabolit elektrofil ini dapat diredam oleh antioksidan eksogen, baik yang berupa vitamin A, C, E, albumin, flavonoid dan gingerol maupun antioksidan endogen *GSH*, *Catalase*, *SOD* dan *GPx*. Oleh karena itu, tinggi rendahnya kadar *MDA* sangat bergantung pada status antioksidan dalam tubuh seseorang (32).

2.9.1. Biokimia malondialdehida (*MDA*)

Radikal bebas memiliki waktu paruh yang sangat pendek sehingga sulit diukur dalam laboratorium. Kerusakan jaringan lipid akibat *ROS* dapat diperiksa menggunakan senyawa *MDA*. *MDA* merupakan senyawa hasil peroksidasi lipid yang terbentuk dari peroksidasi lipid pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas

(radikal hidroksi) dengan *PUFA*. Reaksi tersebut terjadi secara berantai akan menghasilkan sejumlah radikal lipid dan senyawa yang sangat sitotoksik terhadap endotel. Radikal-radikal lipid tersebut akan bereaksi dengan logam-logam transisi bebas dalam darah seperti Fe^{2+} dan Cu^{2+} menghasilkan aldehyd toksik, salah satunya adalah *MDA*. Eliminasi *MDA* dari sirkulasi dengan bantuan enzim *aldehid dehidrogenase* dan *thiokinasi* yang terjadi dihepar terjadi dalam waktu 2 jam pada tikus namun 10-30% melekat semi permanen pada protein dan dieliminasi dalam waktu 12 jam (Shingh *et al.*, 2014). Toksisitas *MDA* meningkat karena reaktivitasnya yang tinggi terutama terhadap protein dan *DNA*. Kadar *MDA* telah digunakan secara luas sebagai indikator stres oksidatif pada lemak tak jenuh sekaligus merupakan indikator keberadaan radikal bebas.

MDA merupakan senyawa berbentuk kristal putih yang higroskopis diperoleh dari hidrolisis asam 1,1,3,3 *tetraethoxypropane*. Radioaktif *C-MDA* dapat dibuat dari 1,3 propanediol menggunakan alkohol dehidrogenase. Stres oksidatif adalah keadaan yang tidak seimbang antara antioksidan yang ada dalam tubuh dengan produksi *ROS*. Stres oksidatif dapat menyebabkan terjadinya reaksi peroksidasi lipid, protein termasuk enzim dan *DNA*, yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif. Kerusakan oksidatif pada senyawa lipid terjadi ketika senyawa radikal bebas bereaksi dengan senyawa *PUFA*. Peroksidasi lipid merupakan reaksi berantai yang terus menghasilkan pasokan radikal bebas sehingga terjadi reaksi peroksidasi-peroksidasi selanjutnya (84).

2.9.2. Cara pengukuran *malondialdehida (MDA)*

Metode pengukuran *MDA* yang sering digunakan adalah metode *Thio Barbituric Acid Reactive Substances (TBARS)* menggunakan spektrofotometer atas dasar penyerapan warna yang terbentuk dari reaksi *TBARS* dan *MDA*. Tes ini didasarkan pada reaksi kondensasi antara satu molekul *MDA* dengan dua molekul *TBARS* pada pH rendah. Reaksi ini terjadi pada suasana asam pada suhu 90-100° C, *TBARS* akan memberikan warna pink-cromogen yang dapat diperiksa secara spektrofotometrik pada panjang gelombang 530-535 nm atau fluoresen pada panjang gelombang 553 nm. Jumlah *MDA* yang terdeteksi menunjukkan banyaknya peroksidasi lipid yang terjadi. Tes *TBARS* selain mengukur kadar *MDA* yang terbentuk karena proses peroksidasi lipid juga mengukur produk non-volatil yang terbentuk akibat panas yang ditimbulkan pada saat pengukuran kadar *MDA* plasma yang sebenarnya. Kadar *MDA* dapat diperiksa baik di plasma, jaringan, maupun urin. Metode pengukuran *MDA* lain adalah dengan pengukuran kadar *MDA* serum bebas menggunakan *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* namun metode ini membutuhkan penanganan sampel yang sangat rumit. Pengukuran *MDA* dipengaruhi oleh variasi diurnal, spesimen hemolisis dan jenis spesimen. Sampel hemolisis dapat menyebabkan peningkatan kadar *MDA* oleh karena itu pemisahan sampel harus dilakukan secepat mungkin dalam waktu kurang dari 30 menit. Penggunaan sampel serum mendapatkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan sampel plasma dengan antikoagulan (37).

2.10 Tinjauan Tentang Antioksidan

Hiperglikemia menyebabkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan peningkatan produksi radikal bebas. Hal itu merupakan awal kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stres oksidatif. Untuk meredam kerusakan oksidatif tersebut diperlukan antioksidan. Peningkatan suplai antioksidan yang cukup akan membantu pencegahan komplikasi klinis diabetes melitus. Penelitian pada hewan percobaan membuktikan bahwa antioksidan dapat menghambat tahap awal retinopati, nefropati, dan neuropati. Demikian juga pada penelitian manusia, antioksidan dapat menghambat komplikasi mikrovaskular, penurunan insidens penyakit jantung koroner, perbaikan sistem saraf otonom jantung, dan perbaikan vasodilatasi. Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menyerap atau menetralkan radikal bebas sehingga mampu mencegah penyakit-penyakit degeneratif seperti kardiovaskuler, karsinogenesis, dan penyakit lainnya (19,67).

Senyawa antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Senyawa ini memiliki struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas (88).

Berdasarkan mekanisme pertahanannya, antioksidan dapat dibagi menjadi tiga yaitu antioksidan primer, sekunder dan tersier (33).

1. Antioksidan Primer yaitu antioksidan yang berfungsi mencegah pembentukan radikal bebas selanjutnya (propagasi), antioksidan tersebut adalah transferin, feritin, albumin.
2. Antioksidan Sekunder yaitu antioksidan yang berfungsi menangkap radikal bebas dan menghentikan pembentukan radikal bebas, antioksidan tersebut adalah Superoxide Dismutase (SOD), Glutathion Peroxidase (GPx) dan katalase.
3. Antioksidan Tersier atau repair enzyme yaitu antioksidan yang berfungsi memperbaiki jaringan tubuh yang rusak oleh radikal bebas, antioksidan tersebut adalah Metionin sulfosida reduktase, Metionin sulfosida reduktase, *DNA repair enzymes*, *protease*, *transferase* dan *lipase*.

Berdasarkan sumbernya terdapat antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen dapat dibagi menjadi enzimatis (*SOD*, *Catalase*, *GPx*) dan non enzimatis (misalnya *glutathione*, *bilirubin*, *plasmin*, *transferin* dan lain-lain). Antioksidan eksogen misalnya vitamin C, vitamin E, zinc, selenium, dan lipoic acid.

Berdasarkan interaksinya dapat dibagi menjadi tiga yaitu enzimatis, pencegah dan pemutus reaksi rantai. Antioksidan enzimatis bekerja dengan cara mengkatalisasi pemusnahan radikal bebas. Antioksidan pencegah bekerja mengikat ion logam transisi. Antioksidan pemutus reaksi rantai bekerja sebagai donor elektron yang kuat dan bereaksi dengan radikal bebas sebelum merusak molekul sasaran.

Berdasarkan kelarutannya terdiri dari antioksidan larut dalam lemak (vitamin A dan vitamin E), antioksidan yang larut dalam air (vitamin C dan *glutathione*), antioksidan yang larut dalam lemak dan air (*alpha lipoic acid*) (7)

2.10.1. Enzim antioksidan

Enzim antioksidan atau antioksidan endogenous enzimatis adalah antioksidan yang diproduksi oleh tubuh manusia sebagai penangkal radikal bebas eksogen maupun radikal bebas endogen seperti : superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathion peroksidase (GPx). Antioksidan enzimatis disebut juga antioksidan sekunder yaitu antioksidan yang berfungsi menangkap radikal bebas dan menghentikan pembentukan radikal bebas (22).

1. Superoksida Dismutase (SOD)

Superoksida dismutase adalah metaloenzim yang mengkatalis reaksi reduksi radikal anion superoksida (O_2^*) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2). Enzim ini bersifat tidak stabil terhadap panas, cukup stabil pada kondisi basa, dan masih mempunyai aktivitas walaupun disimpan sampai 5 tahun pada suhu $5^\circ C$. Aktivitas SOD tertinggi ditemukan di hati, kelenjar adrenalin, ginjal, darah, limfa, pankreas, otak, paru-paru, lambung, usus, ovarium dan timus. Superoxide Dismutase (SOD) merupakan salah satu antioksidan enzimatis dan metaloenzim dalam tubuh karena aktivitasnya tergantung pada kofaktor logam Cu, Fe, Zn dan Mn. Berdasarkan hal ini SOD dikelompokkan menjadi Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD dan ada juga namanya EC-SOD. Cu/Zn-SOD ditemukan dalam sitosol, kloroplas tanaman tingkat tinggi dan kemungkinan juga di ekstraseluler, Mn-SOD ditemukan dalam mitokondria sel eukariot dan peroksisom, Fe-SOD ditemukan berikatan dengan kloroplas, dan EC-SOD pada cairan ekstraseluler mamalia (89).

Derajat aktivitas masing-masing SOD dipengaruhi oleh derajat stres oksidatif pada kompartemen subseluler. Kerja enzim SOD dapat dilihat pada banyaknya produk peroksidasi lipid dari setiap organel. Tingginya aktivitas SOD akan tergambarkan oleh rendahnya produk oksidasi lipid (Kurutas, 2016). SOD diidentifikasi sebagai eritrocuprein, indofenol oksidase, dan tetrazolium oksidase. Gen SOD terletak pada kromosom 21, 6 dan 4, secara berurutan (21q22.1, 6q25.3 dan 4p15.3-p15.1) dan berfungsi sebagai katalisator reaksi dismutasi dari anion superoksida (O_2^*) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) & molekul oksigen (O_2) (16).

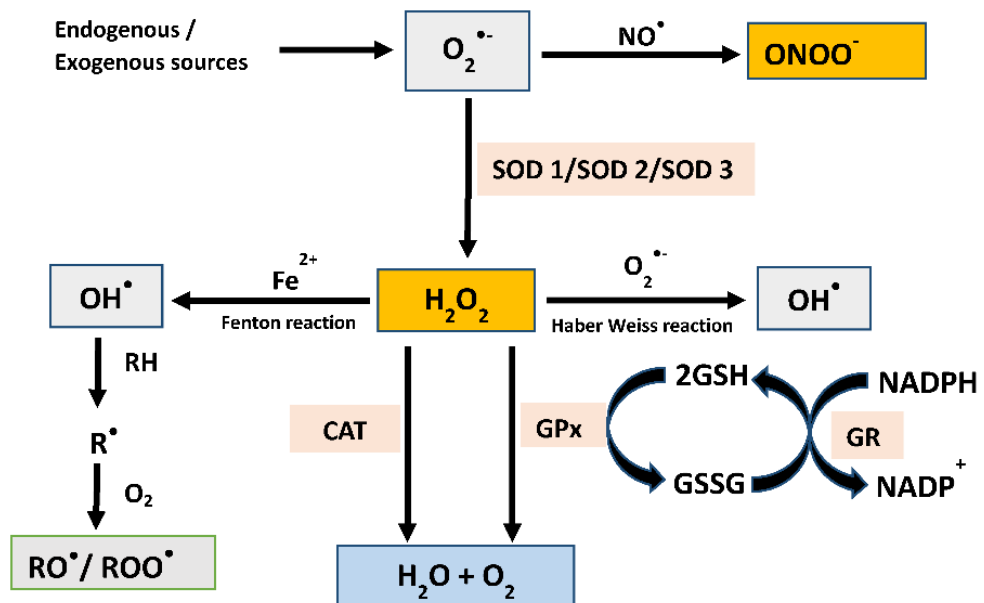
Pada dinding pembuluh darah arteri terdapat sel endotel yang melepaskan nitric oxide dan mengatur relaksasi otot polos pembuluh darah, menjaga komposisi otot tetap seimbang, dan mencegah pembekuan darah sehingga tidak terjadi inflamasi dan stress oksidatif (90).

Gangguan fungsi SOD dan peningkatan jumlah radikal bebas yang terjadi pada penderita diabetes melitus dapat menyebabkan terjadinya kerusakan atau disfungsi endotel pada pembuluh darah. Jika sel endotel mengalami kerusakan, maka nitric oxide berkurang, sistem keseimbangan dinding pembuluh darah akan terganggu dan terjadi penebalan otot dinding pembuluh darah sehingga makrofag, trombosit, LDL kolesterol yang teroksidasi akan membentuk suatu kompleks yang disebut fatty streak dan plak aterosklerosis. Proses pembentukan aterosklerosis secara teor inflamasi dan stress oksidatif dapat dicegah, yaitu terapi antioksidan dengan cara pemberian suplemen antioksidan secara oral (91).

2. Catalase

Catalase adalah enzim yang disusun oleh lebih dari 500 asam amino dan memiliki gugus forfirin. Enzim ini mengkatalis reaksi reduksi senyawa hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi oksigen (O_2) dan air (H_2O). Aktivitas katalase optimal pada pH 7 dan dapat meningkat dengan meningkatnya akumulasi H_2O_2 . Katalase dengan konsentrasi yang tinggi ditemukan pada hati, darah, ginjal, otak, paru-paru, jaringan adiposa dan kelenjar adrenal. Adapun reaksinya adalah $\text{O}_2^{\bullet-}$ (radikal superoksida) yang dihasilkan dalam perubahan NADH menjadi NAD, PADH2 menjadi PADH dirubah menjadi H_2O_2 oleh MnSOD dan selanjutnya produk H_2O_2 dirubah menjadi H_2O dan O_2 oleh Katalase (92).

Mekanisme kerja antioksidan enzimatik di atas dapat dilihat dalam gambar 2.9



Gambar 2.9 Mekanisme kerja antioksidan enzimatik (1)

3. Glutation Peroksidase

Glutation Peroksidase adalah enzim yang berperan aktif dalam menghilangkan H_2O_2 dalam tubuh dan mempergunakannya untuk merubah glutathion (GSH) menjadi glutathion *teroksidasi* (GSSG)

Selain mengkatalis H_2O_2 , GPx juga dapat memecah senyawa peroksida lainnya, yaitu dengan menggunakan GSH sebagai donor hidrogen. Hasil reduksi semua senyawa peroksida tersebut adalah alcohol (93).

Aktivitas GPx memerlukan glutathion sebagai kosubstrat dan enzim glutathion reduktase untuk mengubah glutathion teroksidasi (GSSG) menjadi bentuk tereduksi (GSH). Logam Se dalam GPx berfungsi sebagai katalitik pada bagian aktifnya, kemudian memusnahkan H_2O_2 . Enzim tersebut juga dapat menyingkirkan lipid peroksida dari membran sel (94). Kerja enzim glutathion peroksidase memerlukan ko-substrat yaitu GSH yang merupakan tripeptida asam amino : glutamine, sistein dan glisin. Sistein inilah yang mengandung gugus SH sehingga GSH mampu sebagai donor atom hidrogen pada reaksi dengan radikal bebas dan membentuk glutathion teroksidasi (GSSG), reaksi ini berjalan reversibel. GSSG kemudian akan dikembalikan lagi ke bentuk aktifnya yaitu GSH oleh enzim glutathion reduktase. Pada reaksi ini diperlukan NADPH sebagai donor hidrogen. Jadi ada dua fungsi utama Glutation yaitu detoksifikasi hidrogen peroksida dan sebagai anti oksidan yang bertugas didalam sel untuk menetralkan oksidan melalui glutathion redox cycle N- acetyl-L-Cysteine (NAC) adalah thiol grup dengan berat molekul rendah yaitu 163,2 g/mol.

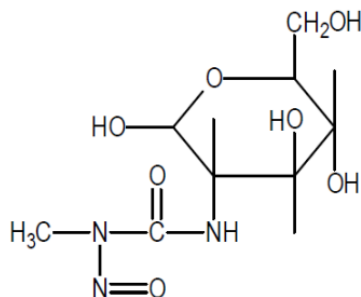
Rasio antara GSH/GSSG merupakan indikator sensitif untuk stress oksidasi. GSH dengan enzim glutathione peroksidase (GPx) dapat mengkatalisis proses reduksi Hidroperoksida lemak menjadi alkohol dan hydrogen peroksida menjadi air. Pada saat mengkatalisis tadi ikatan disulfida dari 2 GSH akan berikatan membentuk Glutathione teroksidasi (GSSG), dan enzim glutathione reductase dapat mendaur ulang GSSG menjadi GSH kembali dengan cara mengoksidasi NADPH. Ketika sel terekspos dengan stress oksidasi maka akan terjadi penumpukan GSSG dan rasio GSH/GSSG akan menurun. Mekanisme kerja dari GSH didalam proses peredaman radikal bebas yaitu dalam segi kemampuannya mereduksi hidroksil radikal (.OH) yang berasal dari reaksi Fenton (37).

Disamping itu enzim Glutathione peroxidase menetralkan Hidrogen Peroksida (H_2O_2) dengan cara mengambil hydrogen untuk membentuk 2 H_2O dan satu GSSG, sedangkan enzim glutathione reductase akan menjadikan GSSG, dengan menggunakan enzim NADPH sebagai sumber hydrogen, menjadi GSH kembali. Dengan kata lain glutathione di sini mencegah hidroksil radikal yang dapat merubah molekul lemak menjadi lemak radikal (.L) atau peroksida lemak (LOO.) melalui dua sisi yaitu mencegah terbentuknya hidroksil radikal (.OH) bereaksi dengan molekul lemak atau mencegah terbentuknya hidroksil radikal dengan merubah Hidrogen Peroksida (H_2O_2) menjadi molekul air.

2.11 Tinjauan Tentang Streptozotocin

Streptozotocin (STZ) atau 2-deoksi-2-[3-(metil-3nitrosoureido)-D-glukopiranosil] diperoleh dari *Streptomyces achromogenes* dapat digunakan untuk

menginduksi baik DM tipe 1 maupun tipe 2 pada hewan coba. Struktur kimia streptozotosin dapat dilihat pada gambar 2.10.



Gambar 2.10 Struktur kimia streptozotosin (95).

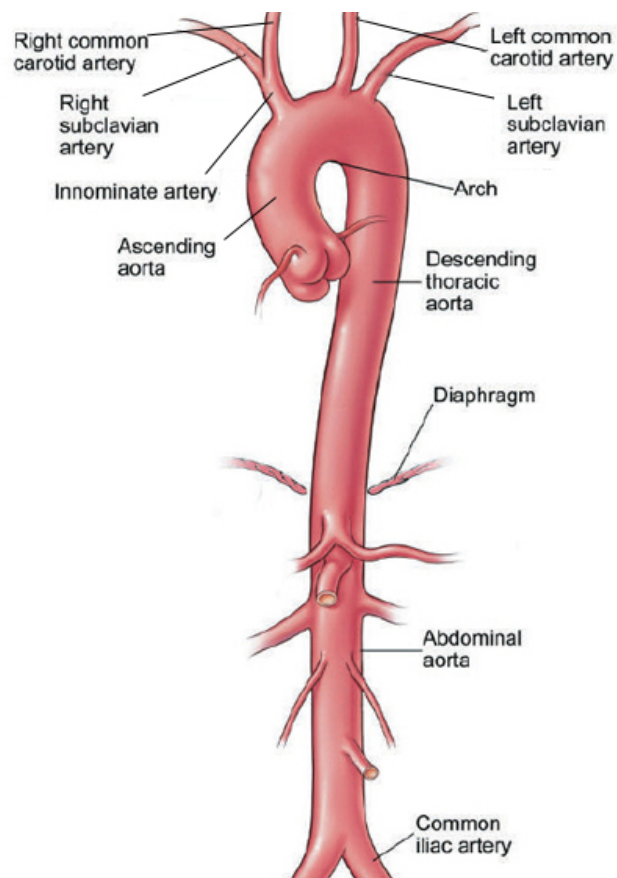
Streptozotosin (STZ) dapat digunakan sebagai penginduksi DM tipe 1 dan 2 dengan dosis 60-100 mg/kg BB secara intravena maupun intraperitoneal pada mencit atau tikus yang dapat mengakibatkan kerusakan pada sel beta langerhans pancreas dan menurunnya sekresi insulin sehingga dapat menyebabkan kenaikan kadar gula darah > 200 mg/dL. Senyawa streptozozin memiliki waktu paruh yang cukup lama dan tidak mudah teroksidasi. Streptozotocin bekerja dengan cara meningkatkan ROS dan menurunkan antioksidan endogen (SOD, GPx, Catalase) sehingga dapat menyebabkan stress oksidatif. Meningkatnya ROS (radikal bebas) yang sangat reaktif dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA) sel beta langerhans pankreas, sehingga menyebabkan gangguan produksi insulin dan meningkatnya kadar gula darah (29). Senyawa streptozozin memiliki waktu paruh yang cukup lama dan tidak mudah teroksidasi. Streptozotocin bekerja dengan cara meningkatkan ROS dan menurunkan antioksidan endogen (SOD, GPx, Catalase) sehingga dapat menyebabkan stress oksidatif. Meningkatnya ROS (radikal bebas) yang sangat reaktif dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan *deoxyribonucleic acid*

(DNA) sel beta langerhans pankreas, sehingga menyebabkan gangguan produksi insulin dan meningkatnya kadar gula darah (Wu and Yan, 2015). Akbarzadeh (2007) menyatakan bahwa streptozotocin memasuki sel beta langerhans pankreas melalui *glucose transporter 2* (GLUT 2) dan menyebabkan alkilasi. Hal ini didahului oleh pembatasan pembentukan adenosin trifosfat pada mitokondria akibat pembentukan radikal bebas, peningkatan enzim *xanthine oxidase* dan penghambatan siklus Krebs. Xantin oksidase mengkatalisis reaksi pembentukan anion superoksida aktif, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil. Telah dilaporkan bahwa pemberian streptozotocin pada hewan coba dapat menimbulkan kerusakan pada organ jantung, hati, paru, mata, saraf dan aorta (48).

2.12. Tinjauan Tentang Aorta

Aorta adalah arteri terbesar di tubuh yang menerima curah jantung dari ventrikel kiri dan memasok tubuh dengan darah beroksigen melalui sirkulasi sistemik. Aorta dapat dibagi menjadi empat bagian, meliputi : aorta asenden, arkus aorta, aorta torakalis (aorta descendens), aorta abdominalis, dan berakhir setinggi vertebra lumbalis IV dengan bifurkasio menjadi arteri iliaca comunis sinistra dan dekstra yang dapat dilihat pada gambar 2.11. Aorta ascendens mulai dari basis ventrikulus sinistra dan berjalan ke atas dan depan sehingga terletak di belakang pertengahan kanan angulus sterni, tempat pembuluh nadi ini melanjutkan diri menjadi arkus aorta (82,96). Aorta ascenden terletak di dalam pericardium fibrosum dan terbungkus bersama dengan truncus pulmonalis di dalam sarung pericardium serosum. Hanya arcus aorta yang berada di mediastinum superius. Struktur ini dimulai saat aorta ascenden muncul dari cavitas pericardialis dan berjalan ke atas, ke belakang, dan ke sisi kiri saat melewati mediastinum superius, berakhir di sisi kiri vertebra torakalis IV/V. Membentang sampai setinggi garis pertengahan manubrium sterni, arcus aorta mulanya berada di anterior dan akhirnya di sisi lateral trachea. Cabang pertama arcus aorta adalah truncus brachicephalica, merupakan cabang paling besar dari ketiga cabang arkus aorta. Cabang kedua adalah arteria karotis comunis sinistra. Cabang ketiga adalah arteri subklavia sinistra, merupakan suplai utama untuk ekstremitas superior sinistra. Aorta descendens terletak di dalam mediastinum posterius dan mulai sebagai lanjutan arcus aorta di sebelah kiri pinggir bawah corpus vertebra torakalis IV (setinggi angulus sterni). Kemudian berjalan turun ke bawah di dalam mediastinum posterius, miring ke depan dan medial untuk mencapai permukaan anterior columna vertebralis.

Setinggi vertebra torakalis XII pembuluh ini berjalan di belakang diafragma (melalui hiatus aorticus) pada garis tengah dan melanjutkan diri sebagai aorta abdominalis. Aorta abdominalis dimulai dari hiatus aorticus diafragma sebagai suatu struktur garis tengah tubuh setinggi kira-kira tepi bawah vertebra torakalis XII. Aorta ini turun ke bawah pada fascies anterior corpus vertebra lumbalis I-IV dan berakhir tepat di kiri garis tengah tubuh pada tepi bawah vertebra lumbalis IV.



Gambar 2.11 Anatomi Aorta (97).

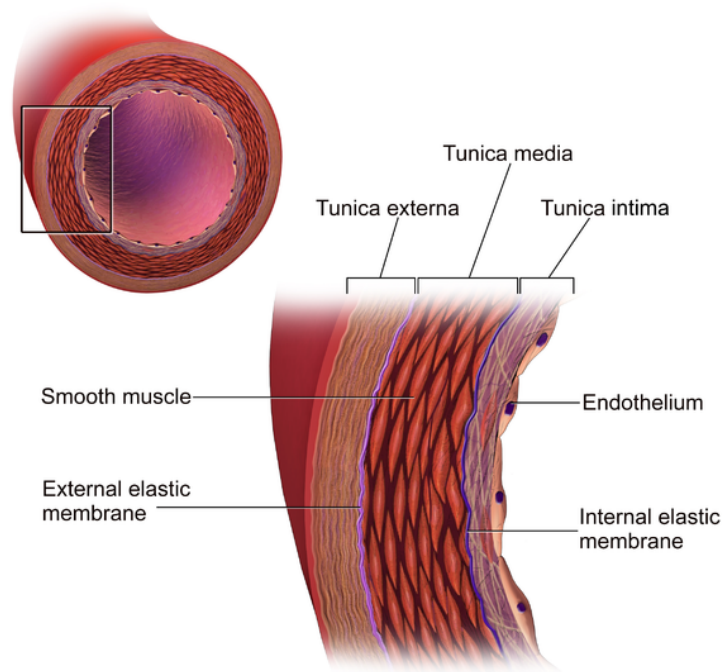
Fungsi aorta sama halnya seperti arteri besar. Arteri dikhususkan untuk 1) berfungsi sebagai transit bagi darah dari jantung ke berbagai organ (karena jaringannya besar, arteri tidak banyak menimbulkan resistensi terhadap aliran darah) dan

2) berfungsi sebagai *reservoir* tekanan untuk menghasilkan gaya pendorong bagi darah ketika jantung dalam keadaan relaksasi. Gaya pendorong bagi aliran darah yang terus-menerus ke organ sewaktu relaksasi jantung ini dihasilkan oleh sifat elastik dinding arteri. Jaringan ikat arteri mengandung dua jenis serat jaringan ikat dalam jumlah banyak : kolagen, yang menghasilkan kekuatan peregangan terhadap tekanan pendorong yang tinggi dari darah yang disemprotkan oleh jantung; dan serat elastin, yang memberi dinding arteri elastisitas sehingga arteri berperilaku seperti balon. Elastisitas arteri memungkinkan pembuluh ini mengembang secara temporer menampung kelebihan volume darah yang disemprotkan oleh jantung. Ketika jantung melemas dan berhenti memompa darah ke dalam arteri, dinding arteri yang teregang secara pasif mengalami *recoil*. *Recoil* ini menimbulkan tekanan darah pada diastol. Tekanan ini mendorong kelebihan darah yang terkandung dalam arteri ke dalam pembuluh-pembuluh di hilir, memastikan aliran darah yang kontinu ke organ-organ ketika jantung melemas dan tidak memompa darah ke dalam sistem.

2.12.1 Histologi Aorta

Terdapat tiga jenis arteri di tubuh : arteri elastik, arteri muskular, dan arteriol. Arteri elastik adalah pembuluh paling besar di dalam tubuh mencakup trunkus pulmonalis dan aorta serta cabang-cabang utamanya. Dinding pembuluh darah ini terutama terdiri atas serat jaringan elastik. Serat ini memberi kelenturan dan daya regang sewaktu darah mengalir. Dalam keadaan segar, dinding arteri tipe ini dapat terlihat berwarna kuning karena banyak sekali lembaran-lembaran elastin.

Tunika intima arteri elastis disusun oleh endotel yang dipotong oleh lapisan tipis jaringan ikat di bawahnya. Dalam jaringan tersebut, terdapat fibroblas, sedikit otot polos, dan serat kolagen. Lamina elastika interna dapat ditemukan pada arteri tipe ini. Tunika media arteri tipe elastis unsur penyusunnya didominasi oleh lembaran elastin berpori, yang disebut membran fenestrata. Lamina elastika eksterna juga dapat ditemukan di tunika media. Tunika adventisia arteri elastis relatif tipis, disusun oleh jaringan ikat fibroelastis longgar yang mengandung fibroblast yang dapat dilihat pada gambar 2.12. Vasa vasorum banyak ditemukan di tunika adventisia. Dari vasa vasorum pembuluh terus menjadi bantalan kapilar dan masuk sampai ke tunika media untuk membawa nutrisi dan oksigen bagi jaringan ikat (50).



Gambar 2.12. Histologi Aorta (67).

2.13 Tjauan Tentang Tikus Putih (Rat)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau biasa dikenal dengan nama lain Norway Rat berasal dari wilayah Cina dan menyebar ke Eropa bagian barat (Sirois 2005). Pada wilayah Asia Tenggara, tikus ini berkembang biak di Filipina, Indonesia, Laos, Malaysia, dan Singapura (Adiyati, 2011). Tikus digolongkan ke dalam Ordo Rodentia (hewan pengerat), Famili Muridae dari kelompok mamalia (hewan menyusui). Tikus putih merupakan strain albino dari *Rattus norvegicus*. Tikus memiliki beberapa galur yang merupakan hasil pembiakkan sesama jenis atau 15 persilangan. Galur tikus yang sering digunakan untuk penelitian adalah galur Wistar dan Sprague dawley. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague dawley dikembangkan dari tikus putih galur Wistar (memperlihatkan ciri-ciri galur Wistar, yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit, telinga tebal dan pendek dengan rambut halus, mata berwarna merah, dan ekornya tidak pernah lebih panjang dari tubuhnya. Bobot badan tikus jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar antara 4 – 5 tahun dengan berat badan umum tikus jantan berkisar antara 267 – 500 gram dan betina 225 – 325 gram. Galur ini berasal dari peternakan Institut Wistar pada tahun 1906 (65).

Tikus putih merupakan rodensia yang mudah dipelihara, praktis juga dapat berkembang biak dengan cepat, sehingga dapat diperoleh keturunan dalam jumlah yang banyak dalam waktu singkat serta anatomis dan fisiologisnya terkarakterisasi dengan baik. Di Indonesia hewan percobaan ini sering dinamakan tikus besar, sedangkan hewan percobaan lain yang lebih kecil, dinamakan mencit. Ada dua sifat

yang membedakan tikus dari hewan percobaan lainnya, yaitu bahwa tikus tidak mudah muntah karena struktur anatomi yang tidak lazim di tempat esofagus bermuara ke dalam lambung, dan tikus tidak mempunyai kantung empedu Bivin et al. 1979. Data biologi dan fisiologis untuk volume darah normal tikus putih berkisar antara 57-70 ml/kg; sel darah merah berkisar antara $7,2-9,6 \times 10^6 \text{ mm}^3$; sel darah putih berkisar antara $5-13 \times 10^3 \text{ mm}^3$; netrofil tikus putih berkisar antara 9-34; limfosit berkisar antara 63-84; monosit berkisar antara 0-5; eosinofil berkisar antara 0-6; nilai kadar hematokrit berkisar antara 45-47; nilai kadar Hb berkisar antara 13-16 g/100 ml, sedangkan kadar gula normal 85-132 mg/dl (98).

Gambar 2.13. memperlihatkan ciri-ciri galur Wistar, yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit, telinga tebal dan pendek dengan rambut halus, mata berwarna merah, dan ekornya tidak pernah lebih panjang dari tubuhnya. Bobot badan tikus jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar antara 4-5 tahun dengan berat badan umum tikus jantan berkisar antara 267-500 gram dan betina 225-325 gram. Galur ini berasal dari peternakan Institut Wistar pada tahun 1906 (98). Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar menurut Myres & Armitage (2004):

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Sciurognathi

Famili : Muridae

Sub-Famili : Murinae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus*

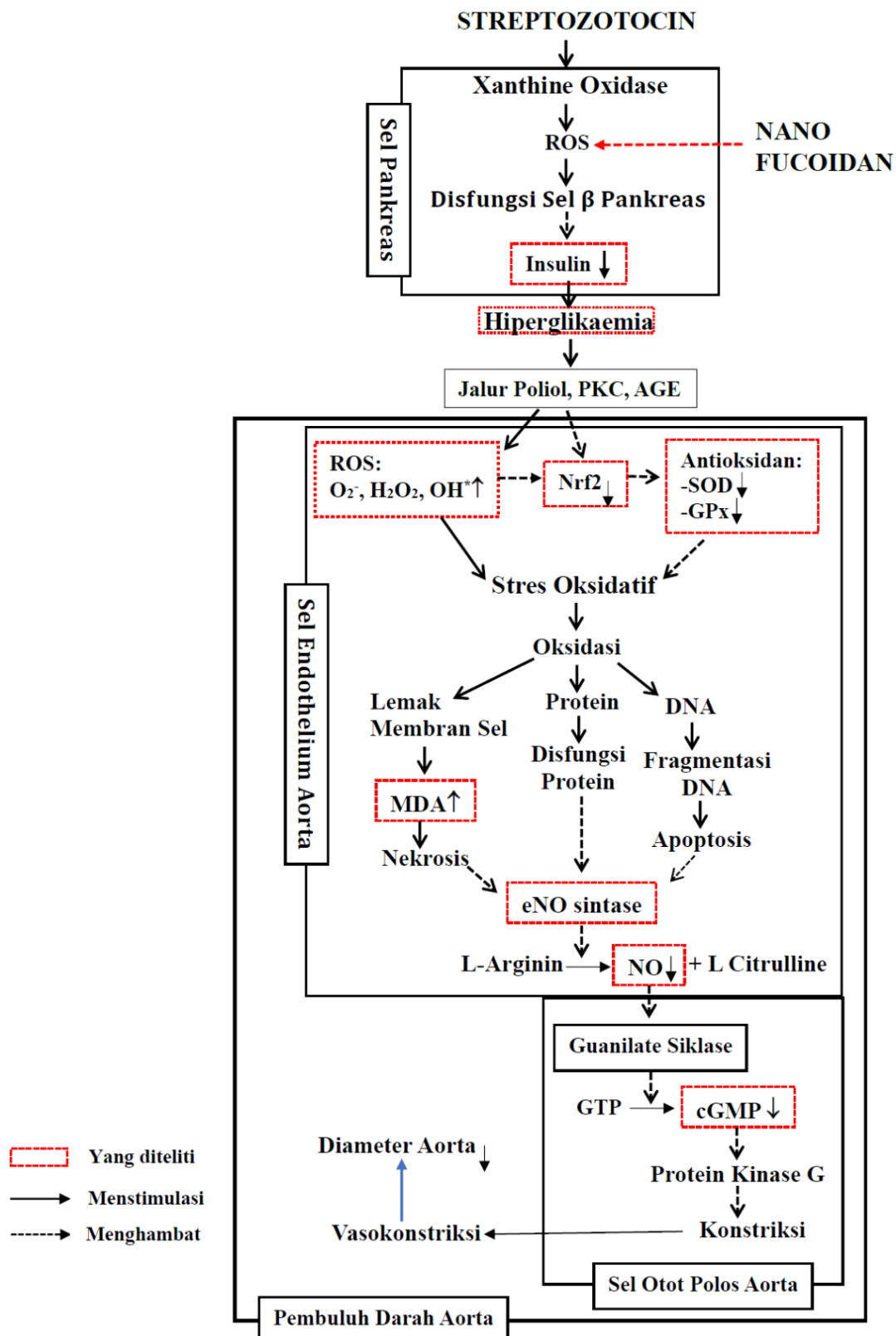
Galur/Strain : Wistar



Gambar 2.13. Tikus Putih (Rat) Galur Wistar

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN



Gambar 3.1. Kerangka Konseptual

3.1 Penjelasan Kerangka Konseptual

Streptozotocin bekerja dengan cara mengaktivasi xanthine oxidase yang dapat meningkatkan ROS sehingga terjadi stress oksidatif. Meningkatnya ROS dapat mengoksidasi lemak membran, protein, dan *Deoxyribonucleic acid* (DNA) sel pankreas yang dapat menyebabkan gangguan fungsi sel β pankreas dan dapat terjadi hambatan sekresi insulin yang dapat menyebabkan hiperglikemia

Pada hiperglikemia dapat mengaktivasi jalur poliol, PKC dan AGE dapat meningkatkan pembentukan ROS yang menyebabkan terhambatnya Nrf2 dan menurunnya produksi antioksidan (SOD dan GPx) sehingga dapat terjadi stress oksidatif, yang selanjutnya dapat menimbulkan kerusakan atau disfungsi sel endothelium. Kerusakan endothelium dapat menyebabkan inaktivasi *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) sehingga dapat menghambat perubahan L-Arginine menjadi *Nitric Oxide* (NO) dan L-Citruline. Menurunnya produksi NO dapat menyebabkan inaktivasi *Soluble Guanylate Cyclase* sehingga dapat terjadi hambatan perubahan *Guanosine-5-riphosphate* (GTP) menjadi *cyclic Guanosine Monophosphate* (cGMP) pada sel otot polos pembuluh darah. Terhambatnya pembentukan cGMP dapat menginaktivasi *Protein Kinase G* (PKG) sehingga dapat menyebabkan terjadinya vasokonstriksi atau mengecilnya diameter lumen pembuluh darah aorta.

Telah dilaporkan bahwa komplikasi hiperglikemia pada makrovaskular yaitu disfungsi endothelium pembuluh darah dapat dihambat dengan pemberian antioksidan. Antioksidan dapat menghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas atau menetralkan radikal bebas sehingga dapat menghambat kerusakan sel dan

menghambat kerusakan biomolekul, seperti DNA, protein, dan lipoprotein di dalam tubuh yang akhirnya dapat menghambat terjadinya kerusakan sel.

Antioksidan eksogen seperti vitamin C dan E telah dilaporkan dapat digunakan untuk melindungi kerusakan sel endothelium pembuluh darah akibat meningkatnya produksi ROS dan menurunnya antioksidan endogen pada tikus hiperglikemia akibat pemberian streptozotocin. Fucoidan juga merupakan salah satu antioksidan eksogen yang mempunyai kemampuan untuk menangkap dan menetralkan radikal bebas sehingga reaksi lanjutan yang menyebabkan terjadinya peningkatan ROS, penurunan Nrf2 dan penurunan SOD dan GPX dapat dihambat. Hal ini dapat menghambat terjadinya stres oksidatif dan kerusakan sel endothelium dapat dihindari, yang selanjutnya eNOS tetap aktif dan produksi NO tetap terbentuk. NO yang terbentuk akan mengaktifkan soluble guanylate cyclase dan produksi cGMP akan meningkat, sehingga dapat terjadi vasodilatasi atau pelebaran lumen pembuluh darah aorta.

Pada saat ini telah berkembang teknologi nano yang dapat digunakan untuk membuat nanopartikel bahan obat. Aplikasi nanoteknologi membuat revolusi baru dalam dunia industri obat. Nanopartikel yaitu senyawa obat yang dibuat dengan ukuran nanometer sehingga dapat meningkatkan absorpsi, bioavailabilitas, potensi dan efektifitasnya. Oleh karena Fucoidan mempunyai efek antioksidan yang sangat kuat maka perlu dibuat dalam bentuk sediaan nanopartikel dan dilakukan penelitian untuk menjelaskan signal transduksi nanopartikel Fucoidan dalam mencegah kerusakan pembuluh darah aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin.

3.2 Hipotesis

1. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar insulin pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
2. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat peningkatan kadar gula darah pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
3. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat peningkatan kadar ROS pada endothelium aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
4. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat peningkatan kadar MDA pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
5. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan ekspresi SOD pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
6. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan ekspresi GPx pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
7. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar eNOS pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
8. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar NO pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
9. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar cGMP pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
10. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan respon Ach terhadap kontraksi Noerrefinefrin pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia

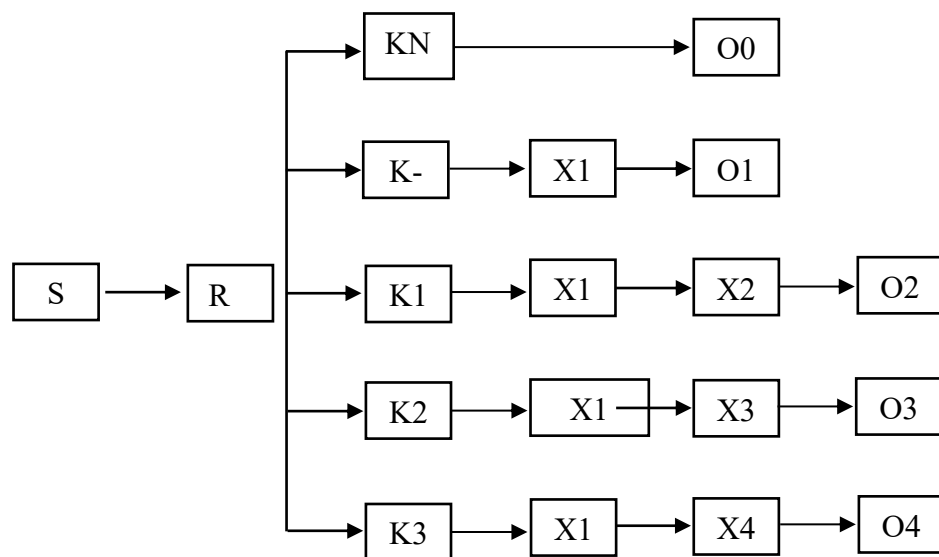
11. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan diameter lumen aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan eksperimental murni laboratorik (*true experimental*) dengan rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan pendekatan *post test only control group design*. Penelitian ini menggunakan hewan coba Rat (*Wistar*) yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan 3 kelompok perlakuan. Desain penelitian dapat dilihat pada gambar 4.1



Gambar 4.1 Desain penelitian signal transduksi nanopartikel fucoidan sebagai protector pada aorta rat hiperglikaemia

Keterangan :

S : Sampel

RA : Randomisasi

KN : Kelompok kontrol normal

K- : Kelompok kontrol negatif

K1-K3 : Kelompok Perlakuan

X1 : Pemberian *Streptozotocin*

X2-X4 : Pemberian Fucoidan

O0-O4 : Pengamatan *Post test*

4.2 Populasi dan Besar Sampel

4.2.1 Populasi penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah rat (Wistar) jantan berumur 6 minggu dengan berat badan 100 -110 gram.

4.2.2 Besar sampel penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah rat jantan strain Wistar dengan kriteria berumur 6 minggu, berat badan 100-110 gram, kondisi fisik sehat yang ditandai dengan gerakan lincah dan nafsu makan baik. Desain penelitian eksperimental ini menggunakan 5 kelompok perlakuan yang terpisah, maka besar replikasi menggunakan rumus Lemeshow *et al.*, (1990) :

$$n = \frac{2\sigma^2 [z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta}]^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Keterangan :

n : Jumlah replikasi tiap kelompok

$Z_{1-\alpha/2}$: Nilai pada distribusi normal standart yang sama dengan tingkat kemaknaan α (untuk $\alpha= 0,05$ adalah 1,96)

$Z_{1-\beta}$: Nilai pada distribusi normal standar yang sama dengan kuasa (power) sebesar diinginkan (untuk $\beta=0,10$ adalah 1,28)

σ : Standart deviasi kesudahan (outcome)

μ_1 : Mean outcome kelompok kontrol

μ_2 : Mean outcome kelompok perlakuan

Mengacu penelitian terdahulu tentang efek pemberian timbal asetat (PbAc) terhadap ekspresi MDA testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) didapatkan standar deviasi kesudahan (outcome) adalah 1,87; mean outcome kelompok kontrol (μ_1) adalah 32,50; mean outcome kelompok perlakuan (μ_2) adalah 35,83 (Sudjarwo et al., 2017) dan angka drop out (f) ditetapkan 20%, maka jumlah replikasi tiap kelompok adalah :

$$n = \frac{2(1,87)^2 (1,96 + 1,28)^2}{(32,50 - 35,83)^2}$$

$$n = \frac{73,42}{11,09}$$

$$n = 6,62$$

$n = 6,62$ dibulatkan menjadi 7.

Untuk mengantisipasi hilangnya unit eksperimen dilakukan koreksi dengan rumus $1/(1-f)$, dimana f adalah angka drop out yang telah ditetapkan yaitu 20%. Sehingga jumlah replikasi untuk masing-masing kelompok adalah :

$$n = 7 + 1/(1-0,2); n = 7 + 1/0,8; n = 7 + 1,25; n = 8,25 \text{ dan dibulatkan menjadi } 9.$$

Jadi besar replikasi tiap-tiap kelompok adalah 9 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*). Tahap selanjutnya, sampel penelitian dipisahkan kedalam 5 kelompok (kelompok KN, K-, K1, K2 dan K3) secara *random allocation*.

Berdasarkan perhitungan diatas besar sampel tiap kelompok adalah 9 rat (*wistar*). Karena ada 5 kelompok penelitian, berarti total besar sampel adalah $9 \times 5 = 45$ rat (*Wistar*).

4.3. Kriteria Subyek Penelitian, Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.3.1. Kriteria Subyek Penelitian

Kriteria Inklusi

1. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur strain wistar
2. Umur 6-7 minggu
3. Berat badan 100-110 gram
4. Kadar glukosa darah >240 mg/dl
5. Sehat ditandai dengan bulu halus, mata bersinar, gerakan aktif, feces tidak lembek, tidak terdapat bekas luka

Kriteria Eksklusi

1. Tidak pernah dipakaisebagai hewan coba penelitian lain
2. Kadar glukosa darah < 240 mg/dl
3. Tikus tidak mau makan, sakit pada masa adaptasi

Kriteria Droup Out

Tikus tidak mau makan, sakit atau mati pada masa perlakuan

4.3.2 Variabel Penelitian

Variabel independen

Fucoidan (Sargassum Sp) dari Sigma-Aldrich

Variabel *dependent*

Kadar gula darah, Kadar insulin darah, Jumlah ekspresi *Glutation Peroxidase, catalase, Superoxide Dismutase*, MDA, Kadar NO, kadar NO, kadar cGMP dan diameter lumen pada aorta

Variabel kendali

Jenis spesies, jenis kelamin, umur, berat badan, kembang, minuman, makanan hewan coba dan kadar Streptozotocin.

4.3.3. Definisi operasional variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur
Fucoidan	Serbuk senyawa organik dengan rumus molekul yang di ekstraksi dan di isolasi dari Sargassum Sp dengan kemurnian 98 % yang dibeli dari Sigma-Aldrich	Timbangan	Nominal
Streptozotocin	Senyawa organik dengan rumus molekul $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	Timbangan	Nominal

	dengan kemurnian 98,8 % yang dibeli dari Sigma-Aldrich		
Kadar gula darah	Jumlah kandungan glukosa dalam plasma darah yang diukur dengan spektrofotometer	Glukometer	Nominal
Kadar insulin	Jumlah kandungan insulin dalam plasma darah yang diukur dengan ELISA	ELISA	Nominal
Ekspresi Superoxide Dismutase (SOD)	Jumlah sel endothelium dan sel otot polos pembuluh darah aorta yang memberikan reaksi positif terhadap anti SOD poliklonal antibodi yang ditandai warna kecoklatan	Pemeriksaan imunohistokimia yang dievaluasi dengan mikroskop cahaya yang hasilnya adalah rata-rata dari 5 lapangan pandang dengan pembesaran 400x dan dihitung rerata jumlah sel yang mengekspresikan SOD.	Interval
Ekspresi Glutathion Peroxidase (GPx)	Jumlah sel endothelium dan sel otot polos pembuluh darah aorta yang memberikan reaksi positif terhadap anti GPx monoklonal antibodi yang ditandai warna kecoklatan	Pemeriksaan imunohistokimia yang dievaluasi dengan mikroskop cahaya yang hasilnya adalah rata-rata dari 5 lapangan pandang dengan pembesaran 400x dan dihitung rerata jumlah sel yang mengekspresikan GPx.	Interval
Ekspresi Catalase (Cat)	Jumlah sel endothelium dan sel otot polos pembuluh darah aorta yang memberikan reaksi positif terhadap anti catalase monoklonal antibodi yang ditandai warna kecoklatan	Pemeriksaan imunohistokimia yang dievaluasi dengan mikroskop cahaya yang hasilnya adalah rata-rata dari 5 lapangan pandang dengan pembesaran 400x dan dihitung rerata jumlah sel yang mengekspresikan Cat.	Interval
Ekspresi MDA	Jumlah sel endothelium dan sel otot polos pembuluh darah aorta yang memberikan reaksi positif terhadap anti MDA	Pemeriksaan imunohistokimia yang dievaluasi dengan mikroskop cahaya yang hasilnya adalah rata-	Interval

	monklonal antibodi yang ditandai warna kecoklatan pada pemeriksaan imunohistokimia yang dievaluasi dengan mikroskop cahaya yang hasilnya adalah rata-rata dari 5 lapang pandang dengan pembesaran 400x.	rata dari 5 lapang pandang dengan pembesaran 400x dan dihitung rerata jumlah sel yang mengekspresikan MDA.	
Kadar eNO sintase	Jumlah kandungan eNO sintase dalam aorta.	ELISA	Nominal
Kadar cGMP	Jumlah kandungan cGMP dalam aorta	ELISA	Nominal
Diameter lumen aorta adalah	Rata-rata diameter lumen aorta terpanjang dan terpendek pada preparat histopatologi dengan pewarnaan haematoxylin-eosin	Pemeriksaan dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 x yang pengukuran dilakukan 5 kali pengukuran tiap sampel dalam satuan mikrometer (μm)	Nominal

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1. Alat penelitian

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah kandang rat, timbangan, *disposable syringe*, set alat bedah steril, *object glass*, *cover glass*, tabung reaksi, petri disk, , mikro pipet, mikroskop cahaya, Komputer, ELISA

4.4.2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rat jantan (wistar) 6-7 minggu dengan berat badan 100-110 gram. *Fucoidan* (98%), Streptozotocin, aquadest, alkohol 70%, Buffer formalin, metanol, safranin, kristal violet, eter, ortho toluidin, hemaktosilin, eosin, minyak emersi. Anti MDA monoklonal antibodi, anti SOD poliklonal antibody, Anti GPx monoklonal antibodi, anti cGMP antibodi, dan anti eNO sintase antibodi

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Tempat pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran dan pembuatan nanopartikel Fucoidan dikerjakan di Fakultas Sain dan Teknologi, Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian dilakukan bulan Nopember sampai dengan Januari 2021

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Persiapan hewan coba rat

Rat diaklimatisasi dalam kandang selama satu minggu. Aklimatisasi bertujuan untuk adaptasi dari hewan coba terhadap lingkungan yang baru. Hewan yang mati, tidak sehat atau kadar gulanya < 240 mg/dl dikeluarkan dari penelitian. Selama penelitian kandang ditempatkan pada tempat tertentu semua hewan coba mendapatkan faktor lingkungan (antara lain cahaya, temperatur dan kelembapan) yang homogen dan konstan

4.6.2. Pembuatan nanopartikel Fucoidan

Pembuatan nano fucoidan dilakukan di laboratorium Fisika, Fakultas Sain dan Teknologi, Universitas Airlangga. Metode yang digunakan dalam pembuatan nano fucoidan adalah dengan metode milling, dengan alasan bahwa secara mekanik milling merupakan teknik yang sederhana dan efektif untuk membuat ukuran kristal padat yang cukup besar menjadi lebih kecil tanpa melalui fase penguapan atau reaksi kimia. Biaya yang dikeluarkan menggunakan metode milling juga lebih rendah. Metode ini menggunakan mesin *High Energy Milling* (HEM). Proses pembuatan nano fucoidan dengan menggunakan bahan bubuk fucoidan merk sigma

yang dilakukan dengan penumbukan oleh bola-bola zicornia, dengan perbandingan 1:10 (1 gram fucoidan : 10 gram bola). Waktu pemillingan adalah 20 menit dengan pengaturan 5 menit milling, 5 menit istirahat.

4.6.3. Pemeriksaan karakteristik nanopartikel fucoidan

Analisis karakteristik nanopartikel fucoidan pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ukuran fucoidan sebelum dan setelah dilakukan pemillingan. Metode yang digunakan untuk analisis ukuran nanopartikel fucoidan pada penelitian ini menggunakan dua metode yaitu metode *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan *Particle Size Analysis* (PSA).

a. Pemeriksaan nanopartikel fucoidan dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM)

Fucoidan dan nanopartikel fucoidan yang sudah disiapkan ditempelkan pada tempat bahan dengan menggunakan *conducting glue*. Hand blower digunakan pada sampel agar sampel dapat menempel dengan baik pada *conducting glue* yang ada pada tempat bahan. Kemudian dilakukan coating, proses coating ini untuk melapisi sampel dengan Pt dan Au agar sampel tidak rusak saat discanning. Sampel disimpan di ruang vakum, kemudian siap untuk dianalisa. Terbentuknya gambar pada SEM dibuat berdasarkan deteksi electron baru (electron sekunder) atau electron pantul yang muncul dari permukaan sampel ketika permukaan sampel tersebut di scan dengan sinar electron. Elektron sekunder atau electron pantul yang terdeteksi selanjutnya diperkuat sinyalnya, yang ditampilkan dalam gradasi gelap-terang pada layar monitor Cathode Ray tube (CRT). Di layar CRT inilah gambar struktur sampel yang sudah diperbesar bisa dilihat.

b. Pemeriksaan nanopartikel fucoidan dengan *Particle Size Analysis* (PSA)

Sebanyak 5 mL suspensi nanopartikel fucoidan dikarakterisasi menggunakan Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) untuk mengetahui ukuran, distribusi dan nilai potensial zeta partikel. Pemeriksaan ini dilakukan berdasarkan metode Dynamic Light Scattering (DLS) menggunakan Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) (Zeng *et al.*, 2017).

4.6.2. Pembagian kelompok dan perlakuan penelitian

Pada penelitian ini digunakan Rat (Wistar) sebanyak 40 ekor yang kadar gula darahnya > 240 mg/dl dibagi menjadi 5 kelompok sebagai berikut:

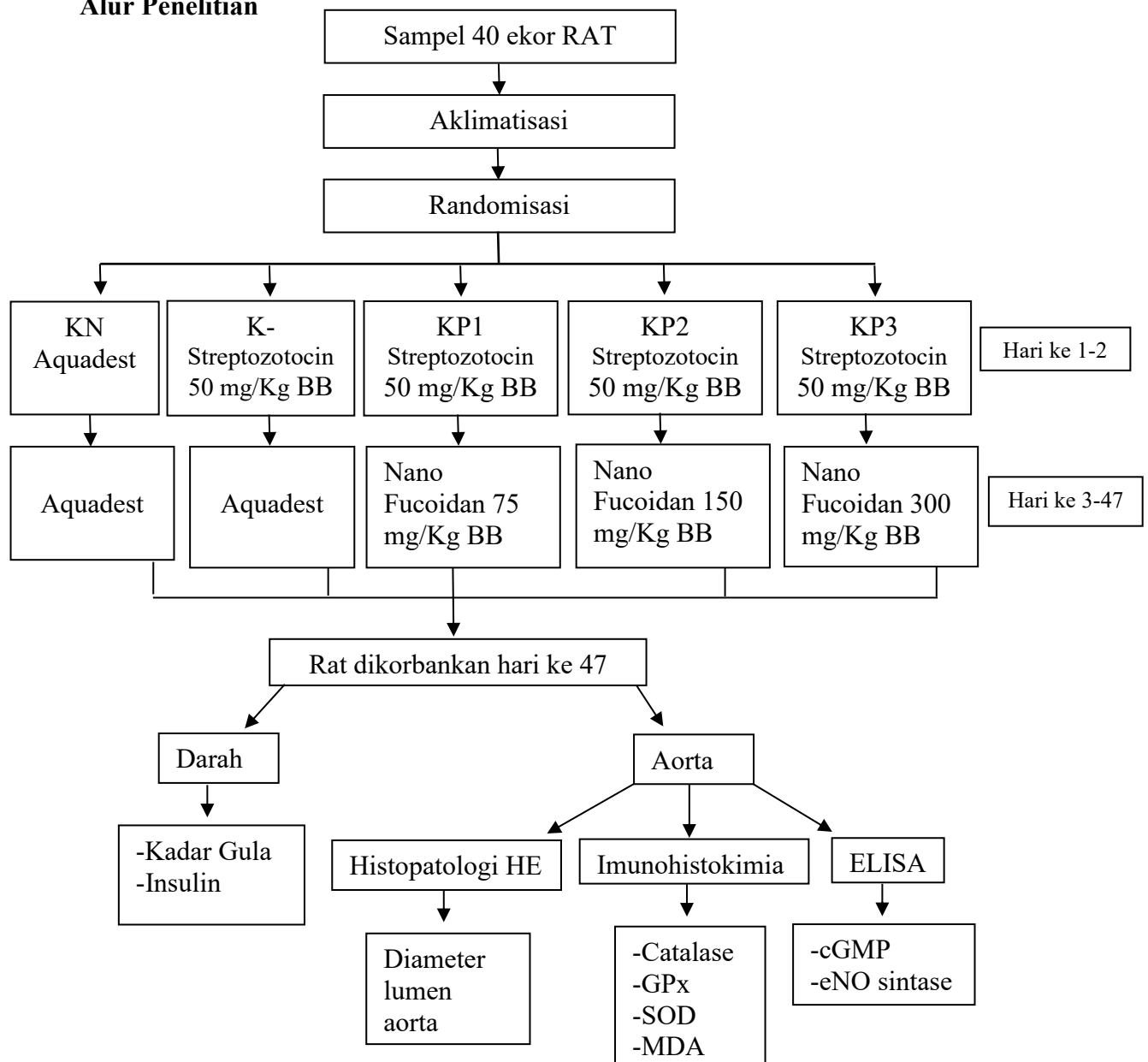
- Kelompok kontrol normal : Rat hanya diberi pelarut streptozotocin (Buffer sitrat) dan pelarut nanopartikel Fucoidan (Aquadest)
- Kelompok kontrol negatif : Rat di injeksi streptozotocin dosis 50 mg/Kg BB secara intra peritoneal dan diberi pelarut nanopartikel Fucoidan (Aquadest)
- Kelompok Perlakuan 1 : Rat di injeksi streptozotocin dosis 50 mg/Kg BB secara intra peritoneal dan diberi nanopartikel Fucoidan dengan dosis 75 mg/kg BB
- Kelompok Perlakuan 2 : Rat di injeksi streptozotocin dosis 50 mg/Kg BB secara intra peritoneal dan diberi nanopartikel Fucoidan dengan dosis 150 mg/kg BB
- Kelompok Perlakuan 3 : Rat di injeksi streptozotocin dosis 50 mg/Kg BB secara intra peritoneal dan diberi nanopartikel Fucoidan dengan dosis 300 mg/kg BB

Rat di injeksi streptozotocin dosis 50 mg/Kg BB secara intra peritoneal sekali sehari selama 2 hari. Pada hari ke 3 pada kelompok perlakuan diberi nanopartikel Fucoidan secara oral 2 kali sehari selama 45 hari. Pada hari ke 47, rat dianestesi dengan dietil eter dan dilakukan pengambilan sampel darah mencit secara intrakardial untuk pemeriksaan kadar gula darah dan insulin. Selanjutnya dilakukan pengambilan pembuluh darah aorta untuk pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan H&E untuk pemeriksaan diameter lumen aorta, dan pemeriksaan imunohistokimia ekspresi MDA, Katalase, SOD dan GPx. Juga dilakukan pemeriksaan eNO sintase, dan cGMP pada jaringan aorta dengan ELISA

4.7 Analisis Data

Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Saphiro-Wilk test dan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene test*. Distribusi data dikatakan normal dan homogen apabila nilai $p \geq 0,05$. Jika distribusi data normal dan homogen, maka dilakukan *one way ANOVA*. Jika distribusi data tidak normal, maka digunakan uji alternatif yaitu uji *Kruskal-Wallis*. Hasil bermakna jika $p < 0,05$, sedangkan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna, maka dilakukan analisis *Post - Hoc*. Analisis jalur untuk mengetahui signal transduksi nanopartikel fucoidan terhadap berbagai variable dengan menggunakan PLS (Partial Least Square) dengan software Smart PLS for students.

Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

BAB 5

HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN

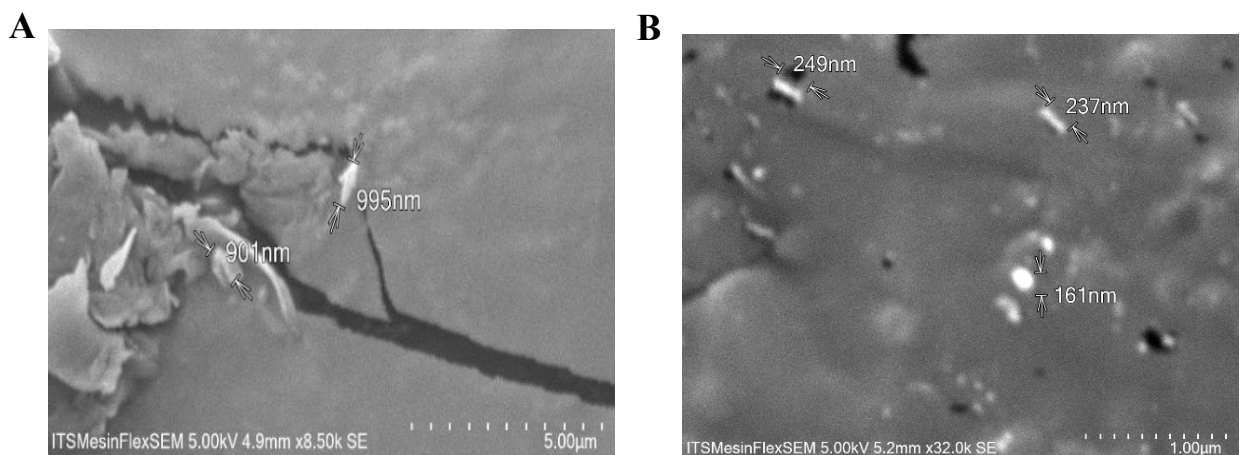
Fucoidan merupakan polisakarida yang telah menarik perhatian dari industri makanan dan farmasi karena efek terapeutiknya sebagai antioksidan. Fucoidan yang terdiri dari gugus L-fucose dan sulfat juga mempunyai khasiat yang sangat baik sebagai antitumor, antikoagulan, antitrombotik, imunoregulasi, antivirus, antiinflamasi dan antioksidan (Luthuli et al., 2019; Wang et al., 2019; Lutfia et al., 2020).

Nanoteknologi merupakan teknologi baru untuk membuat bahan dalam skala ukuran nano yang pada saat ini banyak dilakukan penelitian yang salah satunya untuk membuat obat berukuran nano sehingga hasilnya diharapkan dapat meningkatkan absorpsi, distribusi dan efektifitas obat (Feitosa et al., 2019; Chenthamara et al., 2019; Zhang et al., 2020).

Banyak peneliti yang melaporkan bahwa bahan yang mempunyai khasiat sebagai antioksidan dapat digunakan untuk proteksi kerusakan sel dari berbagai organ akibat komplikasi pada penyakit diabetes (Ali and woodman, 2019; Ramesh, 2021; Wardani et al., 2022). Pada penelitian ini telah dilakukan untuk membuktikan efek antioksidan dan signal transduksi nanopartikel fucoidan dalam melindungi sel pembuluh darah aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin. Data yang diperoleh dari pengamatan dianalisis melalui uji statistik yang berkaitan dengan hipotesis dan hasil penelitian. Penyajian hasil penelitian dan analisa disajikan dalam bentuk gambar, diagram dan table yang disusun dan diolah sesuai dengan rancangan penelitian yang hasilnya sebagai berikut:

5.1 Karakteristik Nanopartikel Fucoidan

Nanopartikel Fucoidan dibuat dengan metode penumbukan dengan bola (*ball milling*). Bubuk Fucoidan dengan rata-rata ukuran partikelnya 986.4 ± 54.6 nm digunakan sebagai bahan baku utama. Karakterisasi nanopartikel Fucoidan yang diperoleh diperiksa dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM) yang hasilnya dapat dilihat seperti pada gambar 5.1.



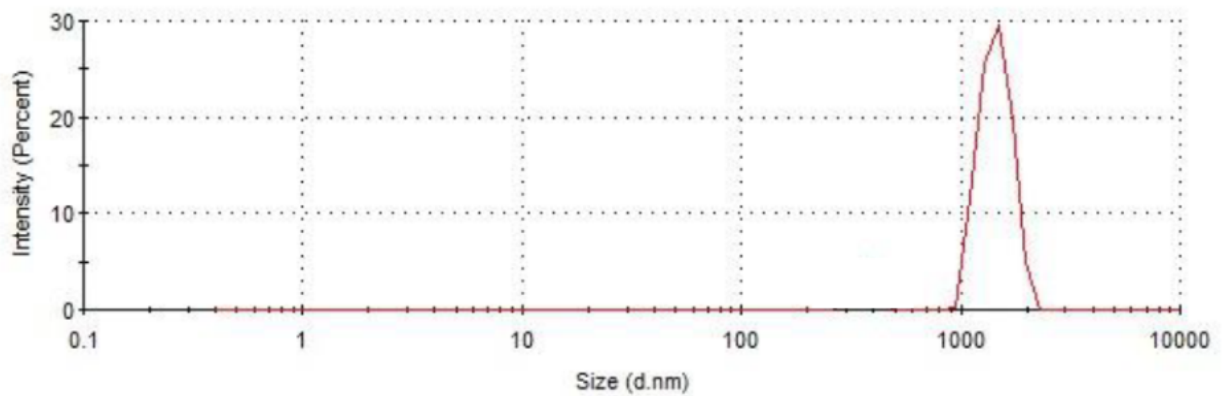
Gambar 5.1. Karakterisasi Fucoida, Fucoidan sebelum dibuat sediaan nanopartikel (A); dan Nanopartikel Fucoidan (B) yang diperiksa dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM)

Pada pemeriksaan dengan SEM menunjukkan bahwa pada permukaan fucoidan tidak rata dan bentuknya tidak beraturan sedangkan permukaan nanopartikel fucoidan tidak rata dan bentuknya cenderung bulat.

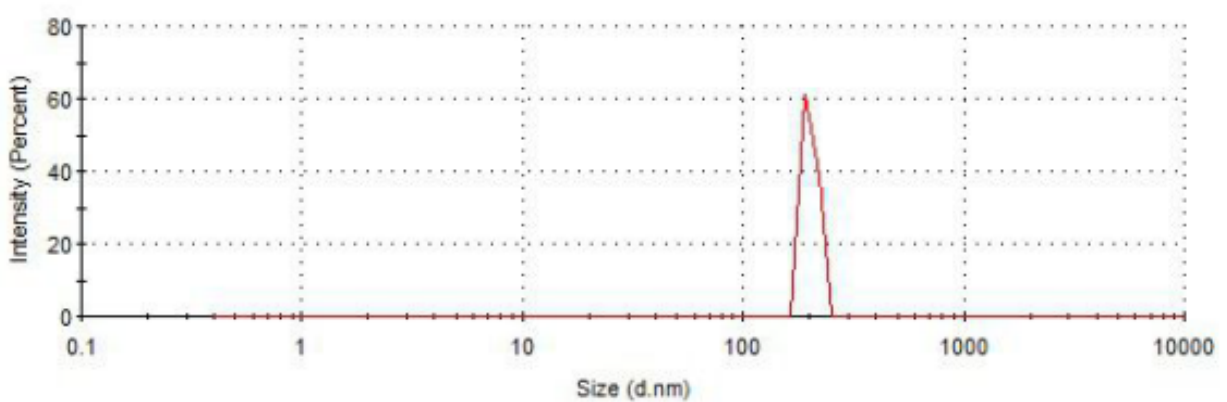
Ukuran dan distribusi nanopartikel diukur menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) menggunakan prinsip *Photon Correlation Spectroscopy* dan *Electrophoretic Light Scattering* yang hasilnya dapat dilihat seperti pada gambar 5.2.

Pemeriksaan ukuran nanopartikel fucoidan dilakukan dengan PSA yang menunjukkan bahwa distribusi ukuran nanopartikel fucoidan adalah 201.8 ± 14.6 nm, yang sebelumnya distribusi ukuran bubuk fucoidan adalah 986.4 ± 54.6 nm. Hasil ini sesuai dengan standard pembuatan sediaan obat dalam bentuk nano yaitu ukurannya antara 100 - 300 nm yang digunakan untuk pengobatan.

A



B



Gambar 5.2. Distribusi ukuran Fucoidan (A) dan nanopartikel fucoidan (B) yang diperiksa dengan *Particle Size Analyzer* (PSA)

5.2 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Kadar Insulin pada Rat yang di Induksi dengan Streptozotocin

Data hasil pemeriksaan pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar insulin serum darah pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin dapat dilihat pada lampiran 1. Data kadar insulin serum darah selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk test* untuk mengetahui sebaran data apakah berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Saphiro-Wilk test* menunjukkan distribusi data tidak normal $p < 0.05$ pada kelompok Kontrol Normal, sedangkan pada kelompok Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoidan 75; 150 dan 300 mg/kg BB menunjukkan data berdistribusi normal $p > 0.05$ seperti terlihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Uji normalitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar insulin serum darah rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Kadar Insulin (U/L)			
	Besar Sampel	Median	Min-Max	<i>Saphiro-Wilk test</i> (p)
Kontrol Normal	10	19	17-21	0.028
Kontrol Negatif	10	8.5	7-10	0.124
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	9.5	7-12	0.188
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	9	7-11	0.268
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	14.5	12-17	0.452

Hasil analisis data kadar insulin serum darah pada seluruh kelompok menunjukkan adanya kelompok yang berdistribusi tidak normal, maka untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok yaitu dengan menggunakan *Kruskal-Wallis Test* seperti terlihat pada table 5.2

Tabel 5.2 Uji *Kruskal-Wallis Test* pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar insulin serum darah rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Kadar Insulin (U/L)			
	Besar Sampel	Mean Rank	Chi-Square/ df	p
Kontrol Normal	10	45.10	38.22/4	0.000
Kontrol Negatif	10	13.40		
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	18.15		
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	15.00		
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	35.85		

Hasil analisis dengan menggunakan *Kruskal-Wallis Test* menunjukkan bahwa rerata kadar insulin serum darah pada rat diabetes berbeda bermakna antar kelompok ($p=0.000$, *Kruskal-Wallis* $H=38.22$). Oleh karena itu untuk uji statistik selanjutnya dengan menggunakan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nano Fucoidan 75; 150 dan 300 mg/kg BB seperti terlihat pada tabel 5.3

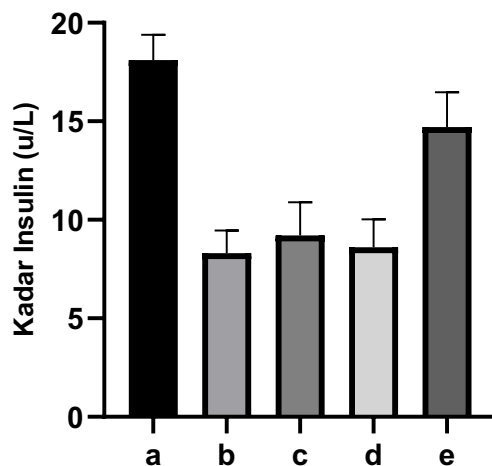
Tabel 5.3 Uji *Mann-Whitney Test* pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar insulin serum darah rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Kadar Insulin (U/L)	
	Besar Sampel	($\bar{X} \pm SD$)
Kontrol Normal	10	18.1 ^a \pm 1.29
Kontrol Negatif	10	8.3 ^b \pm 1.16
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	9.2 ^b \pm 1.69
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	8.6 ^b \pm 1.43
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	14.7 ^c \pm 1.77

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p < 0.05$

Hasil uji *Mann-Whitney Test* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada kadar insulin serum darah antara kelompok Kontrol Normal dengan Kontrol Negatif pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Streptozotocin dapat menurunkan kadar insulin serum darah pada rat. Pemberian Nanopartikel Fucoidan tergantung dosis yang diberikan dapat menghambat penurunan kadar insulin serum darah seperti terlihat pada table 5.3 dan gambar 5.3. Pemberian nanopartikel fucoidan dosis 75 mg/kg BB dan dosis 150 mg/kg BB tidak berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif sedangkan pemberian nanopartikel fucoidan dosis 300 mg/kg BB dapat menghambat penurunan kadar insulin serum darah yang berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif maupun dengan kelompok Kontrol Normal pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel fucoidan tergantung dosis yang diberikan, semakin besar dosis yang diberikan semakin menghambat penurunan kadar insulin serum darah. Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/kg BB adalah dosis yang efektif dalam menghambat penurunan kadar insulin serum

darah pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin, walaupun hambatan penurunan kadar insulin serum darah ini belum bisa mencapai seperti pada kelompok Kontrol Normal.



Gambar 5.3. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap kadar insulin pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB

5.3 Pengaruh Pemberian Fucoidan terhadap Kadar Gula Darah pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Data hasil pemeriksaan pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar gula darah pada rat diabetes yang diinduksi dengan Streptozotocin dapat dilihat pada lampiran 2. Data kadar gula darah selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk test* untuk mengetahui sebaran data apakah berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Saphiro-Wilk test* menunjukkan bahwa pada Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoidan 75; 150; 300 mg/kg BB berdistribusi normal $p > 0.05$, dan pada uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene test* terhadap data kadar gula darah pada semua kelompok didapatkan nilai $P > 0.05$, yang menunjukkan bahwa data homogen (Tabel 5.4).

Tabel 5.4 Uji normalitas dan homogenitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar gula darah pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Kadar gula darah (ml/dl)				
	Besar Sampel	Median	Min-Max	<i>Saphiro-Wilk test (p)</i>	<i>Levene test (p)</i>
Kontrol Normal	10	123	117-129	0.836	0.127
Kontrol Negatif	10	299	280-318	0.462	
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	310.5	295-326	0.922	
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	299	282-316	0.320	
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	179	162-196	0.592	

Hasil analisis data kadar gula darah pada seluruh kelompok menunjukkan berdistribusi normal dan homogen, maka untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok yaitu dengan menggunakan uji anova. Hasil uji anova menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata kadar gula darah antar kelompok (kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB, 150 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB) pada $p < 0.05$, maka uji statistik dilanjutkan dengan uji LSD yang hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.5.

Pada uji LSD menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna kadar gula darah antara kelompok Kontrol Normal dengan Kontrol Negatif $p < 0.05$. Pada kelompok Kontrol Normal dimana rat hanya diberi pelarut Streptozotocin dan pelarut Nanopartikel Fucoidan menunjukkan kadar gula darah yang paling rendah, sedangkan pada Kontrol Negatif dimana rat hanya diberi Streptozotocin menunjukkan kadar gula darah yang paling tinggi. Hasil ini

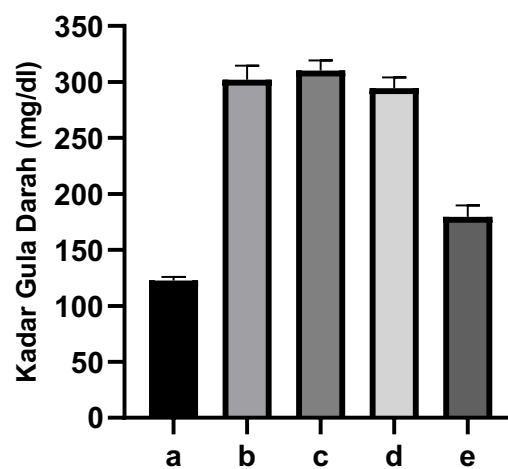
memperlihatkan bahwa pemberian Streptozotocin pada rat dapat meningkatkan kadar gula darah. Pemberian Nanopartikel Fucoidan hanya pada dosis 300 mg/kg BB dapat menghambat peningkatan kadar gula darah yang berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif maupun dengan dengan kelompok Kontrol Normal pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/kg BB adalah dosis yang efektif dalam menghambat peningkatan kadar gula darah pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin, walaupun penurunan kadar gula darah ini belum bisa mencapai kadar gula darah yang terdapat pada kelompok Kontrol Normal.

Tabel 5.5 Uji LSD pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar insulin serum darah pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Kadar Gula Darah (mg/dl)	
	Besar Sampel	($\bar{X} \pm SD$)
Kontrol Normal	10	122.5 ^a \pm 3.31
Kontrol Negatif	10	301.9 ^b \pm 12.65
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	310.2 ^b \pm 8.95
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	294.4 ^b \pm 9.68
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	179.6 ^c \pm 10.16

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p < 0.05$

Pemberian Nanopartikel Fucoidan dalam menghambat peningkatan kadar gula darah pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin tergantung pada dosis Nanopartikel Fucoidan yang diberikan. Semakin besar dosis Nanopartikel Fucoidan yang diberikan semakin menghambat peningkatan pula kadar gula darah pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin seperti terlihat pada gambar 5.4



Gambar 5.4. Pengaruh Pemberian *Fucoidan* Terhadap kadar gula darah pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

5.4 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Kadar MDA Aorta pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Data hasil pemeriksaan pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar MDA aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin dapat dilihat pada lampiran 3. Data kadar MDA aorta selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk test* untuk mengetahui sebaran data apakah berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Saphiro-Wilk test* menunjukkan distribusi data normal $p > 0.05$ pada kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, dan Nanopartikel Fucoidan 75; 150 mg/kg BB sedangkan pada kelompok Nanopartikel Fucoidan 300 mg/kg BB menunjukkan data berdistribusi tidak normal $p < 0.05$ seperti terlihat pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6 Uji normalitas pengaruh pemberian nanopartikel Fucoidan terhadap kadar insulin serum darah pada rat yang di induksi dengan streptozotocin

Kelompok	Kadar MDA (nmol/mg)			
	Besar Sampel	Median	Min-Max	<i>Saphiro-Wilk test (p)</i>
Kontrol Normal	10	3.18	2.94-3.42	0.729
Kontrol Negatif	10	11.66	9.89-13.43	0.602
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	12.58	9.86-15.29	0.975
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	10.37	8.98-11.75	0.104
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	6.48	5.87-7.08	0.021

Hasil analisis data kadar MDA aorta rat pada seluruh kelompok menunjukkan adanya kelompok yang berdistribusi tidak normal, maka untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok yaitu dengan menggunakan *Kruskal-Wallis Test* seperti terlihat pada table 5.7

Tabel 5.7 Uji *Kruskal-Wallis Test* pengaruh pemberian nano fucoidan terhadap kadar MDA aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin

Kelompok	Kadar MDA (nmol/mg)			p
	Besar Sampel	Median	Chi-Square/ df	
Kontrol Normal	10	5.50	42.85/4	0.000
Kontrol Negatif	10	38.20		
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	41.20		
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	27.10		
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	15.50		

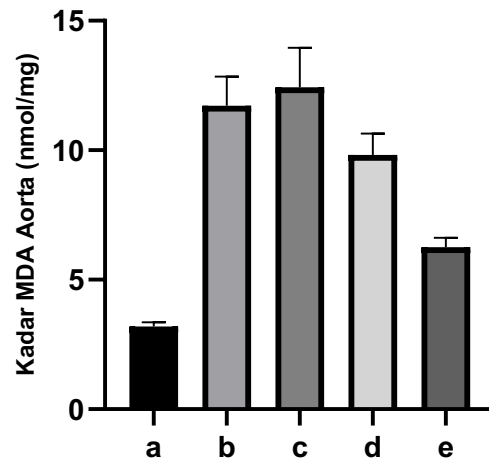
Hasil analisis menggunakan *Kruskal-Wallis Test* menunjukkan bahwa rerata kadar MDA aorta pada pada semua kelompok berbeda bermakna antar kelompok ($p=0.000$, *Kruskal-Wallis* $H=42.85$). Uji statistik selanjutnya yaitu dengan menggunakan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nano Fucoidan 75; 150 dan 300 mg/kg BB seperti terlihat pada tabel 5.8

Tabel 5.8 Uji *Mann-Whitney Test* pengaruh pemberian nanofucoidan terhadap kadar MDA aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin

Kelompok	Kadar MDA Aorta (nmol/mg)	
	Besar Sampel	($\bar{X} \pm SD$)
Kontrol Normal	10	3.19 ^a \pm 0.15
Kontrol Negatif	10	11.71 ^b \pm 1.13
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	12.44 ^b \pm 1.52
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	9.82 ^b \pm 0.83
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	6.25 ^c \pm 0.37

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p < 0.05$

Hasil uji *Mann-Whitney Test* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna kadar MDA aorta rat antara kelompok Kontrol Normal dengan Kontrol Negatif pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian streptozotocin dapat menghambat peningkatan kadar MDA aorta pada rat. Pemberian Nanopartikel Fucoidan tergantung dosis yang diberikan dapat menurunkan kadar MDA aorta rat pada tikus yang di induksi streptozotocin seperti terlihat pada table 5.8 dan gambar 5.5. Pemberian Nanopartikel Fucoidan dosis 75 mg/kg BB dan dosis 150 mg/kg BB tidak berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif, sedangkan pemberian Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/kg BB dapat menghambat peningkatan kadar MDA pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin yang berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif maupun dengan dengan kelompok Kontrol Normal pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Nanopartikel Fukoidan tergantung dosis yang diberikan, semakin besar dosis yang diberikan semakin menghambat peningkatan kadar MDA aorta pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin. Dosis 300 mg/kg BB adalah dosis yang efektif dalam menghambat peningkatan kadar MDA pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin, walaupun penurunan kadar MDA aorta rat yang diinduksi dengan Streptozotocin ini belum bisa mencapai seperti pada kelompok Kontrol Normal seperti terlihat pada gambar 5.5



Gambar 5.5. Pengaruh Pemberian *Fucoidan* Terhadap kadar MDA pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel *Fucoidan* 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

5.5 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Ekspresi Nrf2 Aorta pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Data hasil pemeriksaan pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin dapat dilihat pada lampiran 4. Data ekspresi Nrf2 aorta selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk test* untuk mengetahui sebaran data apakah berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Saphiro-Wilk test* menunjukkan distribusi tidak normal $p < 0.05$ pada kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoidan 75; 150 mg/kg BB, sedangkan pada kelompok Nanopartikel Fucoidan 300 mg/kg BB berdistribusi normal $p > 0.05$ seperti terlihat pada table 5.9.

Tabel 5.9 Uji Normalitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Ekspresi Nrf2			
	Besar Sampel	Median	Min-Max	Saphiro-Wilk test (p)
Kontrol Normal	10	1.05	0.9-1.2	0.042
Kontrol Negatif	10	0.3	0.2-0,4	0.036
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	0.3	0.2-0.4	0.015
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	0.4	0.3-0.5	0.008
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	0.8	0.6-1	0.392

Hasil analisis data ekspresi Nrf2 aorta pada seluruh kelompok menunjukkan berdistribusi tidak normal $p < 0.05$, kecuali pada kelompok Nanopartikel Fucoidan 300 mg/kg

BB yang berdistribusi normal $p > 0.05$, maka untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok yaitu dengan menggunakan *Kruskal-Wallis Test* seperti terlihat pada table 5.10

Hasil analisis menggunakan *Kruskal-Wallis Test* menunjukkan bahwa rerata ekspresi Nrf2 aorta pada rat diabetes berbeda bermakna antar kelompok ($p = 0.000$, *Kruskal-Wallis* $H = 40.46$). Uji statistik selanjutnya dilakukan dengan menggunakan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoidan 75; 150 dan 300 mg/kg BB yang hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.11

Tabel 5.10 Uji *Kruskal-Wallis Test* pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Ekspresi Nrf2 pada aorta			
	Besar Sampel	Mean Rank	Chi-Square/ df	p
Kontrol Normal	10	44.65	40.46/4	0.000
Kontrol Negatif	10	13.90		
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	11.70		
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	20.90		
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	36.35		

Hasil uji *Mann-Whitney Test* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada ekspresi Nrf2 aorta rat antara kelompok Kontrol Normal dengan Kontrol Negatif pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian streptozotocin dapat menurunkan ekspresi Nrf2 aorta pada rat. Pemberian Nanopartikel Fucoidan tergantung dosis yang diberikan dapat

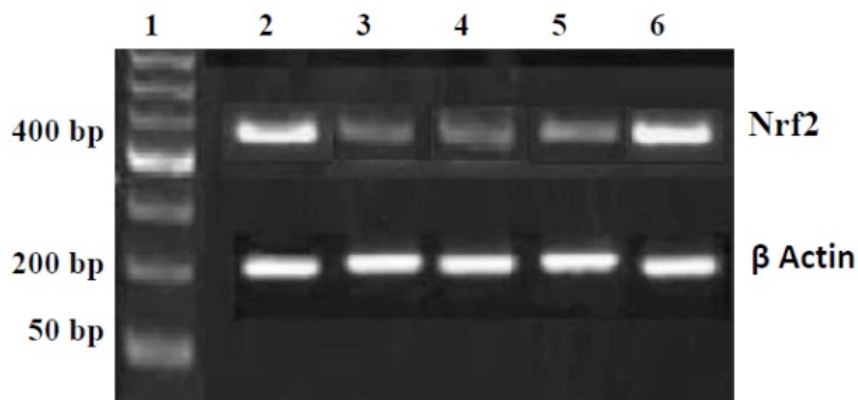
menghambat penurunan ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

5.11 dan gambar 5.6

Tabel 5.11 Uji *Mann-Whitney Test* pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

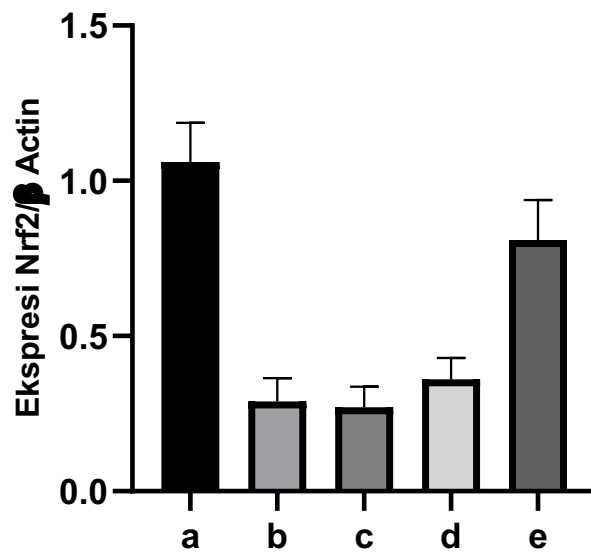
Kelompok	Ekspresi Nrf2 aorta	
	Besar Sampel	($\bar{X} \pm SD$)
Kontrol Normal	10	1.06 ^a \pm 0.13
Kontrol Negatif	10	0.29 ^b \pm 0.07
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	0.27 ^{bc} \pm 0.06
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	0.36 ^c \pm 0.06
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	0.81 ^d \pm 0.12

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p < 0.05$



Gambar 5.6 Pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin . Ekspresi Nrf2 pada rat aorta, marker (1); Kontrol Normal (2); Kontrol Negatif (3); dan Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BW (4), 150 mg/kg BW (5) dan 300 mg/kg BW (6).

Pemberian Nanopartikel Fucoïdan dosis 75 mg/kg BB dan dosis 150 mg/kg BB meningkatkan ekspresi Nrf2 aorta tidak berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif, sedangkan pemberian Nanopartikel Fucoïdan dosis 300 mg/kg BB dapat menghambat penurunan ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang di induksi Streptozotocin berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif maupun dengan dengan kelompok Kontrol normal pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Nanopartikel Fukoidan tergantung dosis yang diberikan, semakin besar dosis yang diberikan semakin menghambat penurunan ekspresi Nrf2 aorta pada tikus yang di induksi dengan Streptozotocin. Nanopartikel Fucoïdan dosis 300 mg/kg BB adalah dosis yang efektif dalam meningkatkan ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin, walaupun hambatan penurunan ekspresi Nrf2 aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin ini, hasilnya belum bisa mencapai seperti pada kelompok Kontrol Normal yang dapat dilihat pada gambar 5.7



Gambar 5.7. Pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Nrf2/ β actin aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

5.6 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi SOD aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin

Data hasil pemeriksaan pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi SOD aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin dapat dilihat pada lampiran 5. Data ekspresi SOD aorta selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk test* untuk mengetahui sebaran data apakah berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Saphiro-Wilk test* menunjukkan distribusi tidak normal $p < 0.05$ pada semua kelompok (kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, nano fucoidan 75; 150; 300 mg/kg BB) seperti terlihat pada table 5.12.

Tabel 5.12 Uji normalitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi SOD aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Ekspresi SOD			
	Besar Sampel	Median	Min-Max	Saphiro-Wilk test (p)
Kontrol Normal	10	2.5	2-3	0.000
Kontrol Negatif	10	0.5	0-1	0.000
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	0.5	0-1	0.000
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	1	0-2	0.002
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	1.5	1-2	0.000

Hasil analisis data ekspresi SOD aorta rat pada seluruh kelompok tidak menunjukkan berdistribusi normal, maka untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok dilakukan dengan menggunakan *Kruskal-Walls Test* seperti terlihat pada table 5.13

Tabel 5.13 Uji *Kruskal-Wallis Test* pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi SOD aorta yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Ekspresi SOD aorta			
	Besar Sampel	Mean Rank	Chi-Square/ df	p
Kontrol Normal	10	43.25	34.97/4	0.000
Kontrol Negatif	10	16.75		
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	15.20		
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	16.60		
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	35.70		

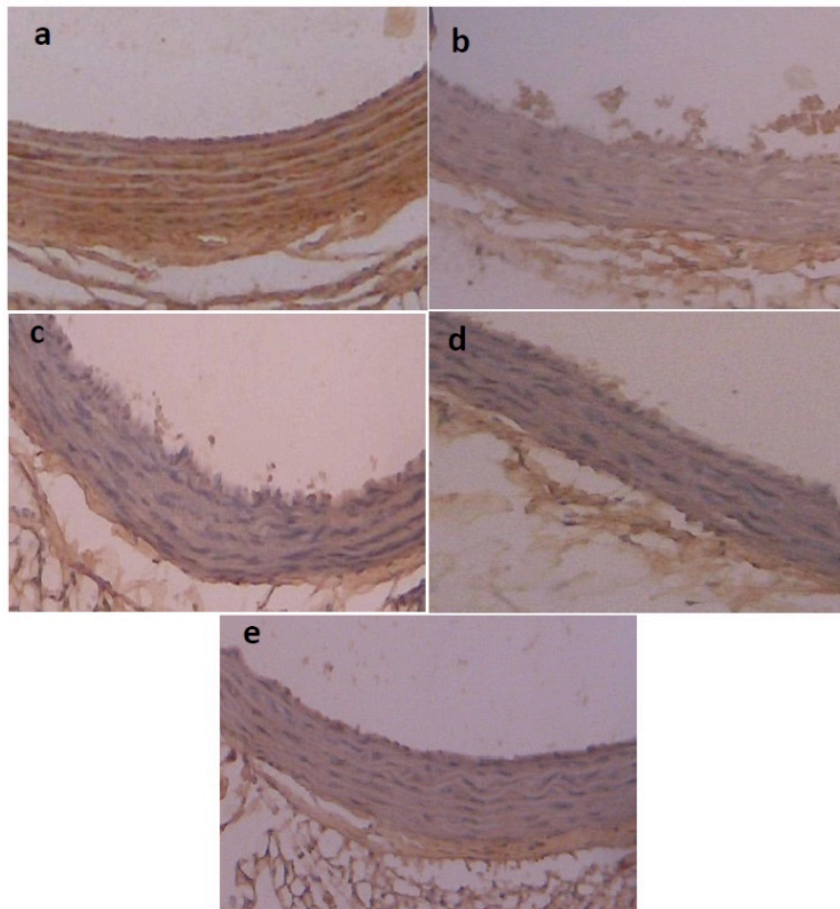
Hasil analisis menggunakan *Kruskal-Wallis Test* menunjukkan bahwa rerata ekspresi SOD aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin berbeda bermakna antar kelompok ($p=0.000$, *Kruskal-Wallis* $H=34.97$). Uji statistik selanjutnya dilakukan dengan menggunakan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nano Fucoidan 75; 150 dan 300 mg/kg BB dengan hasil seperti terlihat pada tabel 5.14

Tabel 5.14 Uji *Mann-Whitney Test* pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi SOD aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Ekspresi SOD aorta	
	Besar Sampel	($\bar{X} \pm SD$)
Kontrol Normal	10	2.50 ^a \pm 0.53
Kontrol Negatif	10	0.50 ^b \pm 0.52
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	0.40 ^b \pm 0.51
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	0.50 ^b \pm 0.70
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	1.80 ^a \pm 0.43

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p < 0.05$

Hasil uji *Mann-Whitney Test* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada ekspresi SOD aorta rat antara kelompok Kontrol Normal dengan Kontrol Negatif pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Streptozotocin dapat menurunkan ekspresi SOD aorta pada rat. Pemberian Nanopartikel Fucoïdan tergantung dosis yang diberikan dapat menghambat penurunan ekspresi SOD aorta pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin seperti terlihat pada table 5.14 dan gambar 5.8.

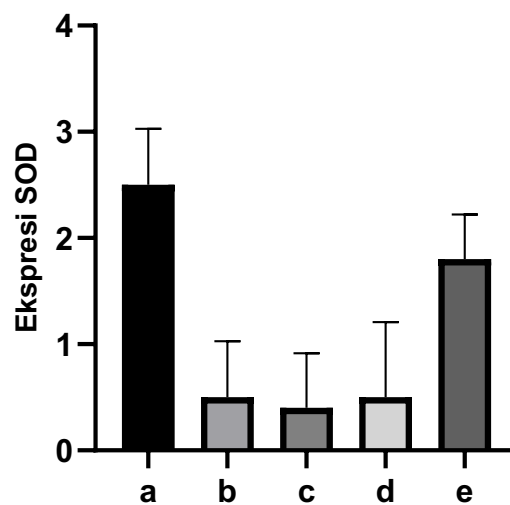


Gambar 5.8. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi SOD aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

Pemberian Nanopartikel Fucoidan dosis 75 mg/kg BB dan dosis 150 mg/kg BB tidak berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif, sedangkan pemberian Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/kg BB dapat menghambat penurunan ekspresi SOD aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif dan Kontrol Normal pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Nanopartikel

Furoidan tergantung dosis yang diberikan, semakin besar dosis yang diberikan semakin menghambat penurunan ekspresi SOD aorta pada tikus yang diinduksi dengan Streptozotocin. Dosis 300 mg/kg BB adalah dosis yang efektif dalam menghambat penurunan ekspresi SOD aorta pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin, dan hambatan penurunan ekspresi SOD ini belum bisa mencapai seperti hasil pada kelompok Kontrol

Gambar 5.9



Gambar 5.9. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Furoidan Terhadap ekspresi SOD aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Furoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

5.7 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi GPx aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Data hasil pemeriksaan pemberian *fucoidan* terhadap ekspresi GPx aorta pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin dapat dilihat pada lampiran 6. Data ekspresi GPx aorta selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk test* untuk mengetahui sebaran data apakah berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Saphiro-Wilk test* menunjukkan distribusi tidak normal $p < 0.05$ pada semua kelompok (Kontrol Normal, Kontrol Negatif, nano fucoidan 75; 150; 300 mg/kg BB) seperti terlihat pada table 5.15.

Tabel 5.15 Uji normalitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi GPx aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Ekspresi GPx			
	Besar Sampel	Median	Min-Max	Saphiro-Wilk test (p)
Kontrol Normal	10	2.5	2-3	0.000
Kontrol Negatif	10	0.5	0-1	0.000
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	1	0-2	0.002
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	1	0-2	0.000
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	1.5	1-2	0.000

Hasil analisis data ekspresi GPx aorta rat pada seluruh kelompok tidak menunjukkan berdistribusi normal, maka untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok yaitu dengan menggunakan *Kruskal-Wallis Test* seperti terlihat pada table 5.16

Tabel 5.16 Uji *Kruskal-Wallis Test* pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi Gpx aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Ekspresi GPx pada aorta			
	Besar Sampel	Mean Rank	Chi-Square/ df	p
Kontrol Normal	10	42.80	32.71/4	0.000
Kontrol Negatif	10	16.20		
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	17.55		
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	16.00		
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	34.95		

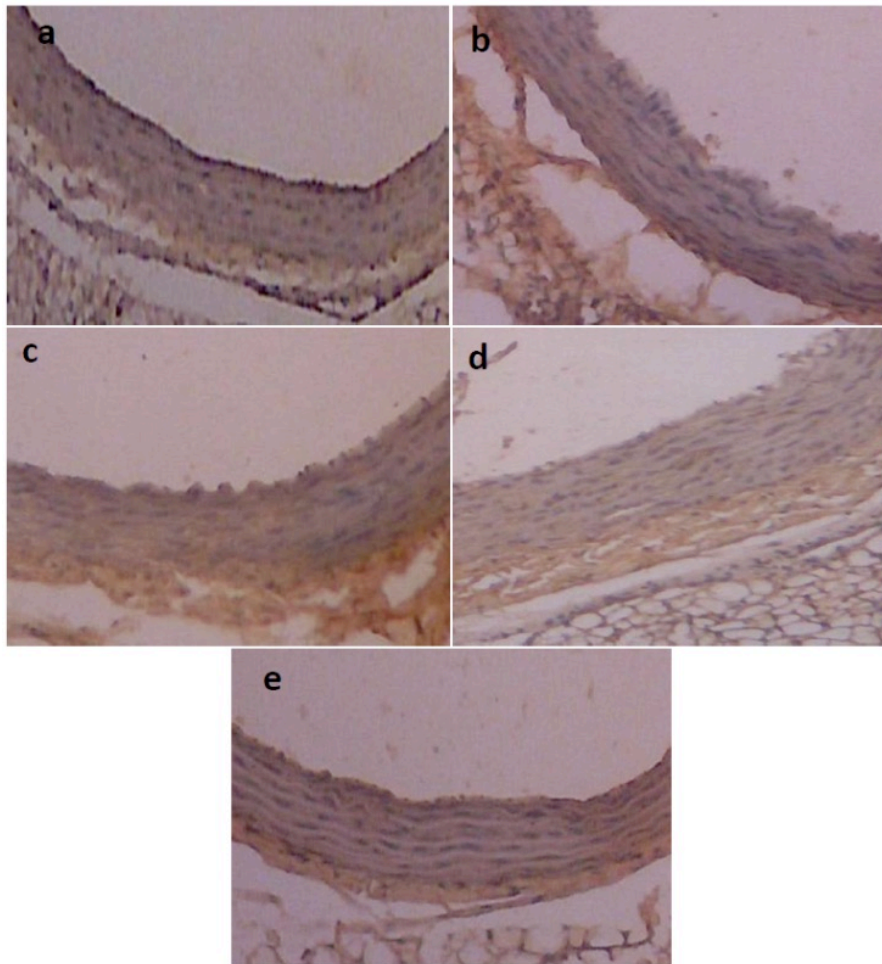
Hasil analisis menggunakan *Kruskal-Wallis Test* menunjukkan bahwa rerata ekspresi GPx aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin berbeda bermakna antar kelompok ($p=0.000$, $Kruskal-Wallis H=32.71$). Uji statistik selanjutnya dengan menggunakan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nano Fucoidan 75; 150 dan 300 mg/kg BB dengan hasil seperti pada tabel 5.17

Tabel 5.17 Uji *Mann-Whitney Test* pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi GPx aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Ekspresi GPx aorta	
	Besar Sampel	($\bar{X} \pm SD$)
Kontrol Normal	10	2.40 ^a \pm 0.52
Kontrol Negatif	10	0.40 ^b \pm 0.51
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	0.50 ^b \pm 0.71
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	0.40 ^b \pm 0.69
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	1.70 ^c \pm 0.48

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p < 0.05$

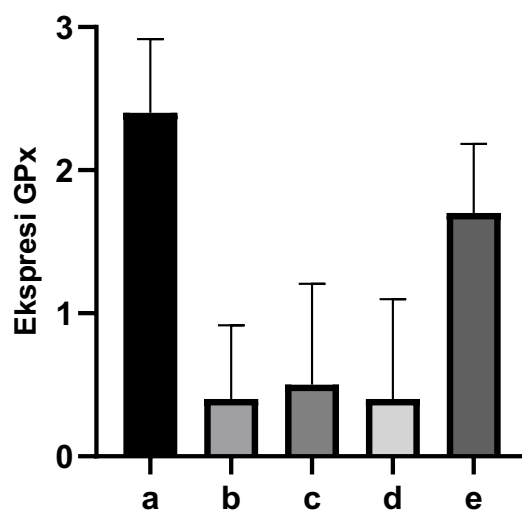
Hasil uji *Mann-Whitney Test* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ekspresi GPx pada aorta rat antara kelompok Kontrol Normal dengan Kontrol Negatif pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Streptozotocin dapat menurunkan ekspresi GPx aorta pada rat. Pemberian Nanopartikel Fucoidan tergantung dosis yang diberikan dapat menghambat penurunan ekspresi GPx aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin seperti terlihat pada table 5.17 dan gambar 5.10.



Gambar 5.10. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi GPx aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

Pemberian Nanopartikel Fucoidan dosis 75 mg/kg BB dan dosis 150 mg/kg BB tidak berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif, namun berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Normal, sedangkan pemberian Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/kg

BB dapat meningkatkan ekspresi GPx aorta pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Normal dan dengan Kontrol Negatif pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Nanopartikel Fukoidan tergantung dosis yang diberikan dalam menghambat penurunan ekspresi GPx, semakin besar dosis yang diberikan semakin meningkatkan ekspresi GPx aorta pada tikus diabetes. Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/kg BB adalah dosis yang efektif dalam menghambat penurunan ekspresi GPx aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin, dan penurunan ekspresi GPx aorta rat yang diinduksi dengan Streptozotocin ini belum bisa mencapai seperti pada kelompok Kontrol Normal (Gambar 5.11)



Gambar 5.11. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi GPx aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

5.8 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Data hasil pemeriksaan pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin dapat dilihat pada lampiran 7. Data ekspresi eNOS aorta selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk test* untuk mengetahui sebaran data apakah berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Saphiro-Wilk test* menunjukkan distribusi tidak normal $p < 0.05$ pada semua kelompok (Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoidan 75; 150; 300 mg/kg BB) seperti terlihat pada table 5.18.

Tabel 5.18 Uji normalitas pengaruh pemberian nano fucoidan terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Ekspresi eNOS			
	Besar Sampel	Median	Min-Max	Saphiro-Wilk test (p)
Kontrol Normal	10	2	1-3	0.004
Kontrol Negatif	10	0.5	0-1	0.000
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	0.5	0-1	0.000
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	1	0-2	0.015
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	1.5	1-2	0.000

Hasil analisis data ekspresi eNOS aorta rat dengan uji *Saphiro-Wilk test* pada seluruh kelompok tidak menunjukkan berdistribusi normal, maka untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok yaitu dengan menggunakan *Kruskal-Walls Test* seperti terlihat pada table 5.19

Tabel 5.19 Uji *Kruskal-Walls Test* pengaruh pemberian nano fucoidan terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin

Kelompok	Ekspresi eNOS pada Aorta			
	Besar Sampel	Mean Rank	Chi-Square/ df	p
Kontrol Normal	10	41.40	27.61/4	0.000
Kontrol Negatif	10	14.70		
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	16.60		
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	22.00		
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	32.80		

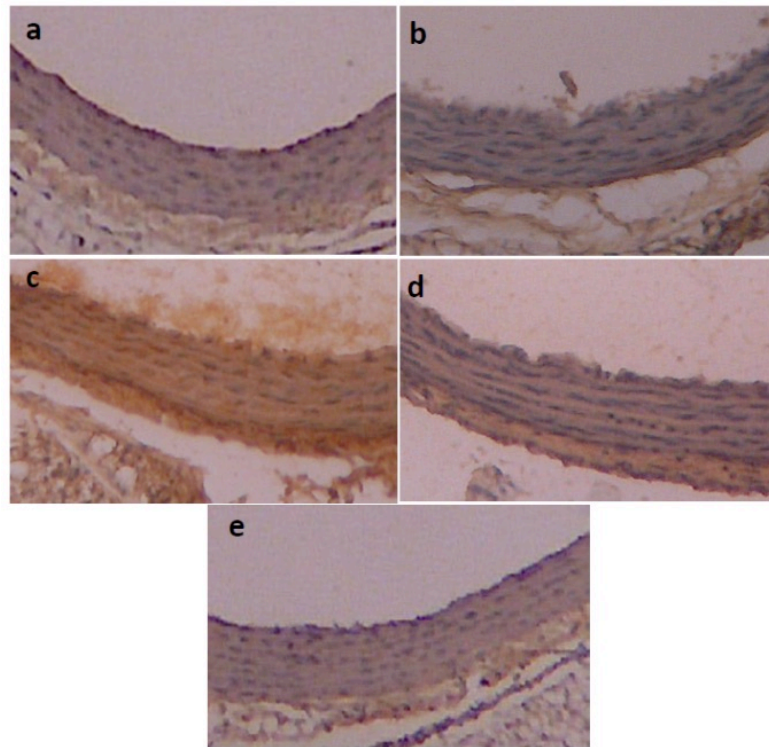
Hasil analisis menggunakan *Kruskal-Walls Test* menunjukkan bahwa rerata ekspresi eNOS aorta pada rat diabetes berbeda bermakna antar kelompok ($p=0.000$, *Kruskal-Walls* $H=27.61$). Uji statistik selanjutnya dilakukan dengan menggunakan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoidan 75; 150 dan 300 mg/kg BB yang hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.20

Tabel 5.20 Uji Mann-Whitney Test pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin

Kelompok	Ekspresi eNOS aorta	
	Besar Sampel	($\bar{X} \pm SD$)
Kontrol Normal	10	1.90 ^a \pm 0.57
Kontrol Negatif	10	0.30 ^b \pm 0.48
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	0.40 ^b \pm 0.52
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	0.70 ^b \pm 0.67
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	1.30 ^c \pm 0.48

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p < 0.05$

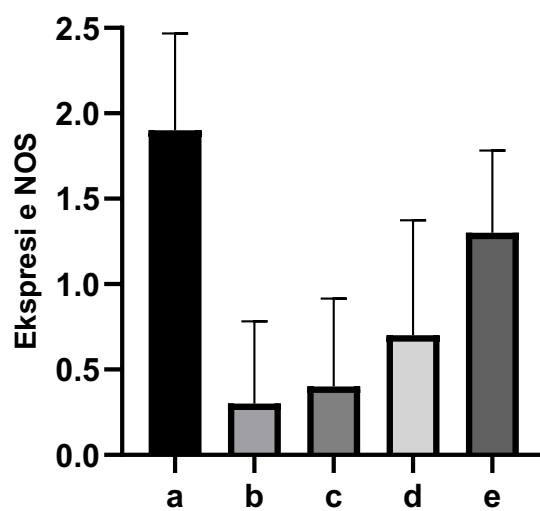
Hasil uji *Mann-Whitney Test* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada ekspresi eNOS aorta rat antara kelompok Kontrol Normal dengan Kontrol Negatif pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Streptozotocin dapat menurunkan ekspresi eNOS aorta pada rat. Pemberian Nanopartikel Fucoidan tergantung dosis yang diberikan dapat menghambat penurunan ekspresi eNOS aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin seperti terlihat pada table 5.20 dan gambar 5.12.



Gambar 5.12. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

Pemberian Nanopartikel Fucoidan dosis 75 mg/kg BB dan dosis 150 mg/kg BB tidak berbeda bermakna dalam meningkatkan ekspresi eNOS dengan kelompok Kontrol Negatif dan berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Normal, sedangkan pemberian Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/kg BB dapat menghambat penurunan ekspresi eNOS aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif maupun dengan kelompok Kontrol Normal pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Nanopartikel Fucoidan tergantung dosis yang diberikan

dalam menghambat penurunan ekspresi eNOS, semakin besar dosis yang diberikan semakin menghambat penurunan ekspresi eNOS aorta pada tikus yang di induksi dengan Streptozotocin. Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/kg BB adalah dosis yang efektif dalam menghambat penurunan ekspresi eNOS aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin, dan hambatan penurunan ekspresi eNOS aorta rat yang di induksi dengan Streptozotocin ini belum bisa mencapai seperti hasil pada kelompok Kontrol Normal (Gambar 5.13)



Gambar 5.13. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fukoidan Terhadap ekspresi eNOS aorta pada rat diabet. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

5.9 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fukoidan terhadap Kadar NO Aorta pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Data hasil pemeriksaan pemberian *fucoïdan* terhadap kadar NO aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin dapat dilihat pada lampiran 8. Data kadar NO aorta selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk test* untuk mengetahui sebaran data apakah berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Saphiro-Wilk test* menunjukkan distribusi tidak normal $p < 0.05$ pada kelompok Kontrol Normal, sedangkan pada kelompok Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoïdan 75; 150; 300 mg/kg BB berdistribusi normal seperti terlihat pada table 5.21.

Tabel 5.21 Uji Normalitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoïdan terhadap Kadar NO aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Kadar NO aorta (nmol/mg)			
	Besar Sampel	Median	Min-Max	Saphiro-Wilk test (p)
Kontrol Normal	10	1.72	1.36-2.07	0.000
Kontrol Negatif	10	0.42	0.36-0.47	0.737
Nano Fucoïdan 75 mg/kg BB	10	0.39	0.34-0.44	0.979
Nano Fucoïdan 150 mg/kg BB	10	0.42	0.38-0.46	0.804
Nano Fucoïdan 300 mg/kg BB	10	0.96	0.90-1.02	0.158

Hasil analisis data kadar NO aorta rat dengan uji *Saphiro-Wilk test* pada kelompok Kontrol Normal tidak menunjukkan berdistribusi normal $p < 0.05$, sedangkan pada kelompok Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoïdan 75; 150 dan 300 mg/kg BB berdistribusi normal

$p > 0.05$, maka untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok yaitu dengan menggunakan *Kruskal-Wallis Test* seperti terlihat pada table 5.22

Tabel 5.22 Uji *Kruskal-Wallis Test* pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap kadar NO aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Kadar NO pada aorta			
	Besar Sampel	Mean Rank	Chi-Square/ df	p
Kontrol Normal	10	45.50	39.13/4	0.000
Kontrol Negatif	10	16.80		
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	11.15		
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	18.55		
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	35.50		

Hasil analisis menggunakan *Kruskal-Wallis Test* menunjukkan bahwa rerata kadar NO aorta pada rat diabetes berbeda bermakna antar kelompok ($p=0.000$, *Kruskal-Wallis* $H=39.13$), selanjutnya dilakukan uji statistik dengan menggunakan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoidan 75; 150 dan 300 mg/kg BB yang hasilnya seperti terlihat pada tabel 5.23

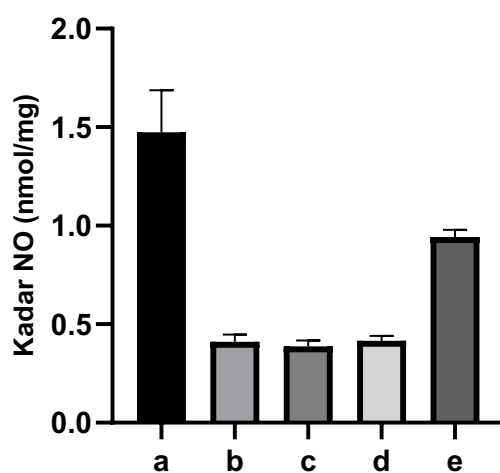
Tabel 5.23 Uji *Mann-Whitney Test* pengaruh pemberian nanofucoidan terhadap kadar NO aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Kadar NO Aorta (nmol/mg)	
	Besar Sampel	($\bar{X} \pm SD$)
Kontrol Normal	10	1.47 ^a \pm 0.21
Kontrol Negatif	10	0.41 ^b \pm 0.37
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	0.39 ^b \pm 0.31
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	0.42 ^b \pm 0.26
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	0.94 ^c \pm 0.37

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p < 0.05$

Hasil uji *Mann-Whitney Test* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada kadar NO pada aorta rat antara kelompok Kontrol Normal dengan kelompok Kontrol Negatif pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Streptozotocin dapat menurunkan kadar NO aorta pada rat. Pemberian Nanopartikel Fucoidan tergantung dosis yang diberikan dapat menghambat penurunan kadar NO aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin seperti terlihat pada table 5.23. Pemberian Nanopartikel Fucoidan dosis 75 mg/kg BB dan dosis 150 mg/kg BB tidak berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif, namun berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Normal dalam meningkatkan kadar NO aorta, sedangkan pemberian nanopartikel fucoidan dosis 300 mg/kg BB dapat meningkatkan kadar NO aorta pada rat diabetes yang berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif maupun dengan kelompok Kontrol Normal pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Nanopartikel Fukoidan tergantung dosis yang diberikan dalam meningkatkan kadar NO aorta, semakin besar dosis yang diberikan semakin menghambat penurunan kadar NO aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin. Nanopartikel Fucoidan dosis 300

mg/kg BB adalah dosis yang efektif dalam menghambat penurunan kadar NO aorta pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin, dan hambatan penurunan kadar NO aorta rat diabetes ini belum bisa mencapai seperti pada kelompok Kontrol Normal(Gambar 5.14)



Gambar 5.14. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap Kadar NO aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

5.10 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap Ekspresi cGMP Aorta pada Rat yang di induksi dengan streptozotocin

Data hasil pemeriksaan pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi cGMP aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin dapat dilihat pada lampiran 9. Data ekspresi cGMP aorta selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk test* untuk mengetahui sebaran data apakah berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Saphiro-Wilk test* menunjukkan distribusi tidak normal $p < 0.05$ pada semua kelompok (Kontrol Normal, Kontrol Negatif, nano fucoidan 75; 150; 300 mg/kg BB) seperti terlihat pada table 5.24.

Tabel 5.24 Uji normalitas pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi cGMP aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Kelompok	Ekspresi cGMP Aorta			
	Besar Sampel	Median	Min-Max	Saphiro-Wilk test (p)
Kontrol Normal	10	2.5	2-3	0.000
Kontrol Negatif	10	0.5	0-1	0.000
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	1	0-2	0.000
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	1	0-2	0.002
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	1.5	1-2	0.000

Hasil analisis data ekspresi cGMP aorta rat pada seluruh kelompok tidak menunjukkan berdistribusi normal, maka untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok yaitu dengan menggunakan *Kruskal-Wallis Test* seperti terlihat pada table 5.25.

Tabel 5.25 Uji *Kruskal-Wallis Test* pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap ekspresi cGMP aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin

Kelompok	Ekspresi cGMP pada Aorta			
	Besar Sampel	Mean Rank	Chi-Square/ df	p
Kontrol Normal	10	42.70	32.28/4	0.000
Kontrol Negatif	10	15.60		
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	17.25		
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	17.15		
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	34.80		

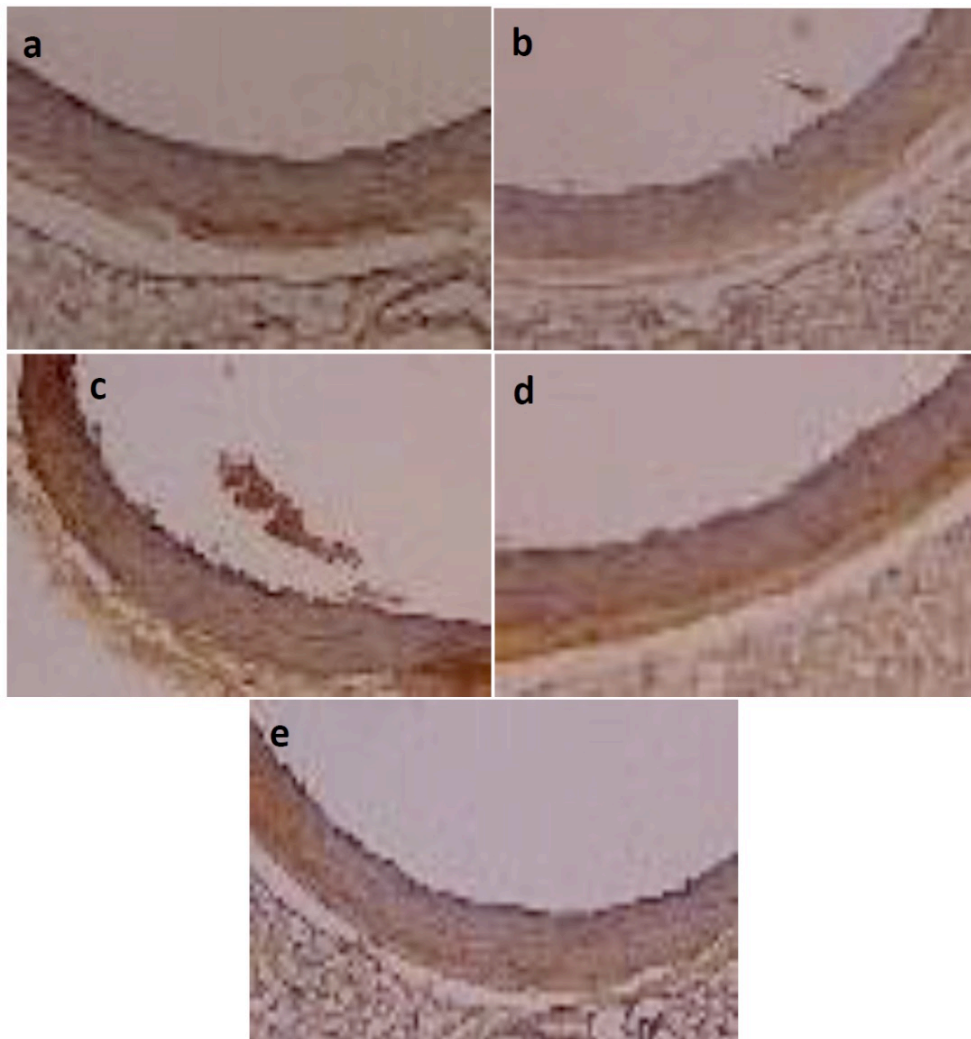
Hasil analisis menggunakan *Kruskal-Wallis Test* menunjukkan bahwa rerata ekspresi cGMP aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin berbeda bermakna antar kelompok ($p=0.000$, *Kruskal-Wallis* $H=32.28$). Uji statistik selanjutnya dilakukan dengan menggunakan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoidan 75; 150 dan 300 mg/kg BB dengan hasil seperti terlihat pada tabel 5.26

Tabel 5.26 Uji *Mann-Whitney Test* pengaruh pemberian nanofucoidan terhadap ekspresi cGMP aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin

Kelompok	Ekspresi cGMP aorta	
	Besar Sampel	($\bar{X} \pm SD$)
Kontrol Normal	10	2.20 ^a \pm 0.42
Kontrol Negatif	10	0.40 ^b \pm 0.51
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	0.50 ^b \pm 0.53
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	0.50 ^b \pm 0.70
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	1.60 ^c \pm 0.52

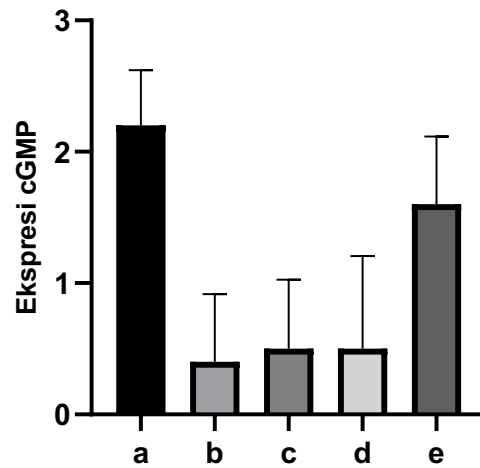
Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p < 0.05$

Hasil uji *Mann-Whitney Test* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada ekspresi cGMP pada aorta rat antara kelompok Kontrol Normal dengan kelompok Kontrol Negatif pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Streptozotocin dapat menurunkan ekspresi cGMP aorta pada rat. Pemberian Nanopartikel Fucoidan tergantung dosis yang diberikan dapat menghambat penurunan ekspresi cGMP aorta pada rat yang di induksi dengan streptozotocin seperti terlihat pada table 5.26 dan gambar 5.15.



Gambar 5.15. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi cGMP aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

Pemberian Nanopartikel Fucoïdan dosis 75 mg/kg BB dan dosis 150 mg/kg BB tidak berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif dan berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol normal, sedangkan pemberian Nanopartikel Fucoïdan dosis 300 mg/kg BB dapat menghambat penurunan ekspresi cGMP aorta pada rat yang di induksi dengan Streptozotocin berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol perlakuan naupun dengan kelompok kontrol pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Nanopartikel Fukoidan tergantung dosis yang diberikan dalam menghambat penurunan ekspresi cGMP, semakin besar dosis yang diberikan semakin menghambat penurunan ekspresi cGMP aorta pada tikus yang di induksi dengan streptozotocin. Nanopartikel Fukoidan dosis 300 mg/kg BB adalah dosis yang efektif dalam menghambat penurunan ekspresi cGMP aorta pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin, dan hambatan penurunan ekspresi cGMP aorta rat yang di induksi dengan Streptozotocin ini belum bisa mencapai seperti pada kelompok Kontrol Normal seperti terlihat pada gambar 5.1



Gambar 5.16. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap ekspresi cGMP aorta pada rat diabet. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

5.11 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Respon Relaksasi Ach pada Kontraksi NE Aorta Rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Data hasil pemeriksaan pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta rat yang diinduksi dengan streptozotocin dapat dilihat pada lampiran 10. Data respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk* test untuk mengetahui sebaran data apakah berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Saphiro-Wilk* test menunjukkan pada kelompok Kontrol Normal, kelompok Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoidan 75; 150; 300 mg/kg BB berdistribusi normal $p > 0.05$, dan pada uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene test* terhadap data respon relaksasi Ach pada kontraksi NE pada semua kelompok didapatkan nilai $P < 0.05$ yang menunjukkan bahwa data tidak homogen (Tabel 5.27).

Tabel 5.27 Uji normalitas dan homogenitas pengaruh pemberian nano fucoidan terhadap respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta rat yang di induksi dengan streptozotocin

Kelompok	Respon relaksasi Ach pada kontraksi NE Aorta (%)				
	Besar Sampel	Median	Min-Max	<i>Saphiro-Wilk test (p)</i>	<i>Levene test (p)</i>
Kontrol Normal	10	69	58-80	0.627	0.000
Kontrol Negatif	10	6	2-10	0.887	
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	6	4-8	0.080	
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	11	6-16	0.246	
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	43.5	38-49	0.457	

Hasil analisis respon relaksasi Ach terhadap kontraksi NE aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin pada seluruh kelompok menunjukkan berdistribusi normal dan tidak homogen, maka untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok yaitu dengan menggunakan *Kruskal-Wallis Test* seperti terlihat pada table 5.28

Tabel 5.28 Uji *Kruskal-Wallis Test* pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta rat pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin

Kelompok	Respon Relaksasi Ach pada kontraksi NE pada aorta			
	Besar Sampel	Mean Rank	Chi-Square/ df	p
Kontrol Normal	10	45.50	41.89/4	0.000
Kontrol Negatif	10	12.30		
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	11.35		
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	22.85		
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	35.50		

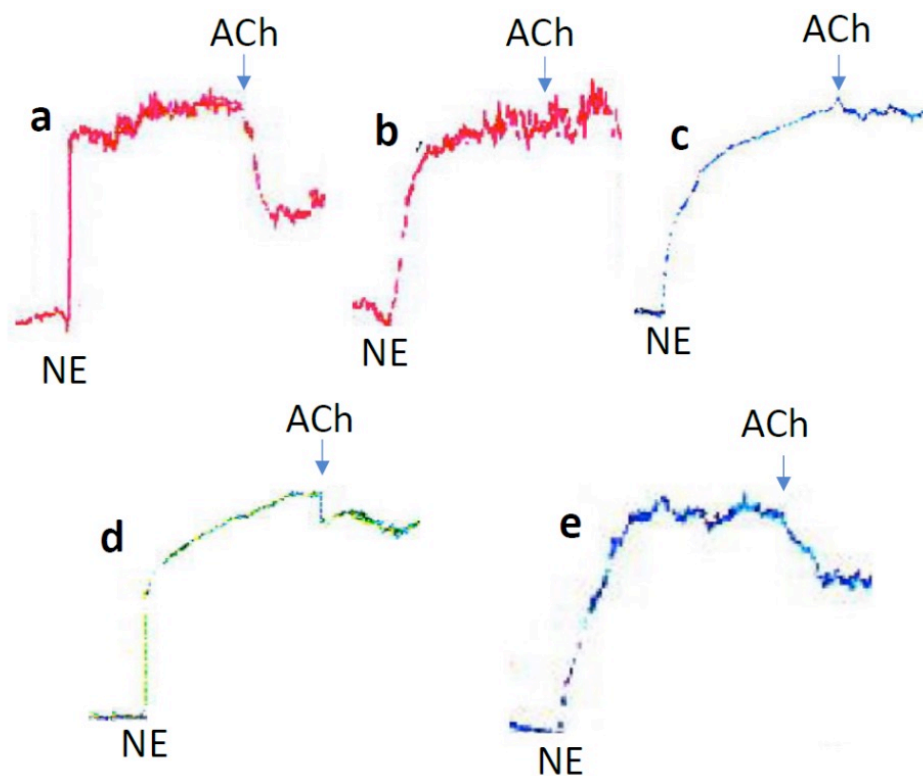
Hasil analisis menggunakan *Kruskal-Wallis Test* menunjukkan bahwa rerata ekspresi cGMP aorta pada pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin berbeda bermakna antar kelompok ($p=0.000$, *Kruskal-Wallis* $H=41.89$). Uji statistik selanjutnya dengan menggunakan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoidan 75; 150 dan 300 mg/kg BB dengan hasil seperti pada tabel 5.29

Tabel 5.29 Uji *Mann-Whitney Test* pengaruh pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta rat pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin

Kelompok	Respon Relaksasi Ach pada kontraksi NE pada aorta	
	Besar Sampel	($\bar{X} \pm SD$)
Kontrol Normal	10	67.7 ^a \pm 7.5
Kontrol Negatif	10	5.9 ^b \pm 2.3
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	5.7 ^b \pm 1.4
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	10.2 ^c \pm 3.4
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	43.3 ^d \pm 3.7

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p < 0.05$

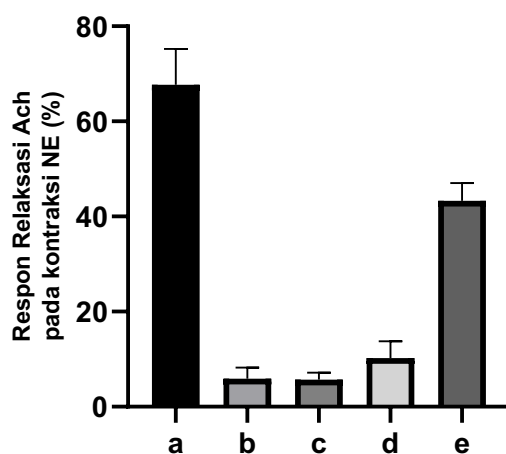
Hasil uji *Mann-Whitney Test* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta rat antara kelompok kontrol Normal dengan kelompok Kontrol Negatif pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Streptozotocin dapat menurunkan respon relaksasi Ach terhadap kontraksi NE aorta pada rat. Pemberian Nanopartikel Fucoidan tergantung dosis yang diberikan dapat meningkatkan respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta pada rat yang di induksi Streptozotocin seperti terlihat pada table 5.29 dan gambar 5.17.



Gambar 5.17. Pengaruh Pemberian *Fucoidan* Terhadap respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta pada rat diabet. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel *Fucoidan* 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

Pemberian nanopartikel fucoidan dosis 75 dan 150 mg/kg BB tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol Negatif dan berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Normal, sedangkan pemberian nanopartikel fucoidan dosis 300 mg/kg BB dapat menghambat penurunan respon relaksasi Ach terhadap kontraksi NE aorta pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin berbeda bermakna dengan kelompok kontrol Negatif dan dengan kelompok Kontrol Normal pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Nanopartikel Fukoidan tergantung dosis yang diberikan dalam menghambat penurunan

respon relaksasi Ach terhadap kontraksi NE pada aorta rat diabetes, semakin besar dosis yang diberikan semakin menghambat penurunan respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta pada tikus diabetes. Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/kg BB adalah dosis yang efektif dalam meningkatkan respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin, dan hambatan penurunan respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta rat diabetes ini belum bisa mencapai hasil seperti pada kelompok Kontrol Normal (Gambar 5.18)



Gambar 5.18. Pengaruh Pemberian Fucoidan Terhadap respon relaksasi Ach pada kontraksi NE aorta pada rat diabet. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

5.12 Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan Terhadap Diameter Lumen Aorta pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Data hasil pemeriksaan pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap diameter lumen aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin dapat dilihat pada lampiran 11. Data diameter lumen aorta selanjutnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk* test untuk mengetahui sebaran data apakah berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Saphiro-Wilk* test menunjukkan distribusi tidak normal $p < 0.05$ pada kelompok Kontrol Negatif, sedangkan pada kelompok Kontrol Normal, Nanopartikel Fucoidan 75; 150; 300 mg/kg BB berdistribusi normal $p > 0.05$ seperti terlihat pada table 5.30.

Tabel 5.30 Uji normalitas pengaruh pemberian nano fucoidan terhadap diameter lumen aorta pada rat diabetes

Kelompok	Diameter Lumen Aorta (mm)			
	Besar Sampel	Median	Min-Max	Saphiro-Wilk test (p)
Kontrol Normal	10	2.25	2.1-2.4	0.177
Kontrol Negatif	10	1.55	1.4-1.7	0.029
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	1.60	1.4-1.8	0.445
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	1.60	1.4-1.8	0.575
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	1.95	1.8-2.1	0.067

Hasil analisis data diameter lumen aorta rat terdapat kelompok yang menunjukkan berdistribusi tidak normal, maka untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok yaitu dengan menggunakan *Kruskal-Walls Test* seperti terlihat pada table 5.31

Tabel 5.31 Uji *Kruskal-Walls Test* pengaruh pemberian nano fucoidan terhadap diameter lumen aorta pada rat diabetes

Kelompok	Diameter Lumen Aorta			p
	Besar Sampel	Mean Rank	Chi-Square/ df	
Kontrol Normal	10	45.10	38.11	0.000
Kontrol Negatif	10	13.40		
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	15.85		
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	17.35		
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	35.80		

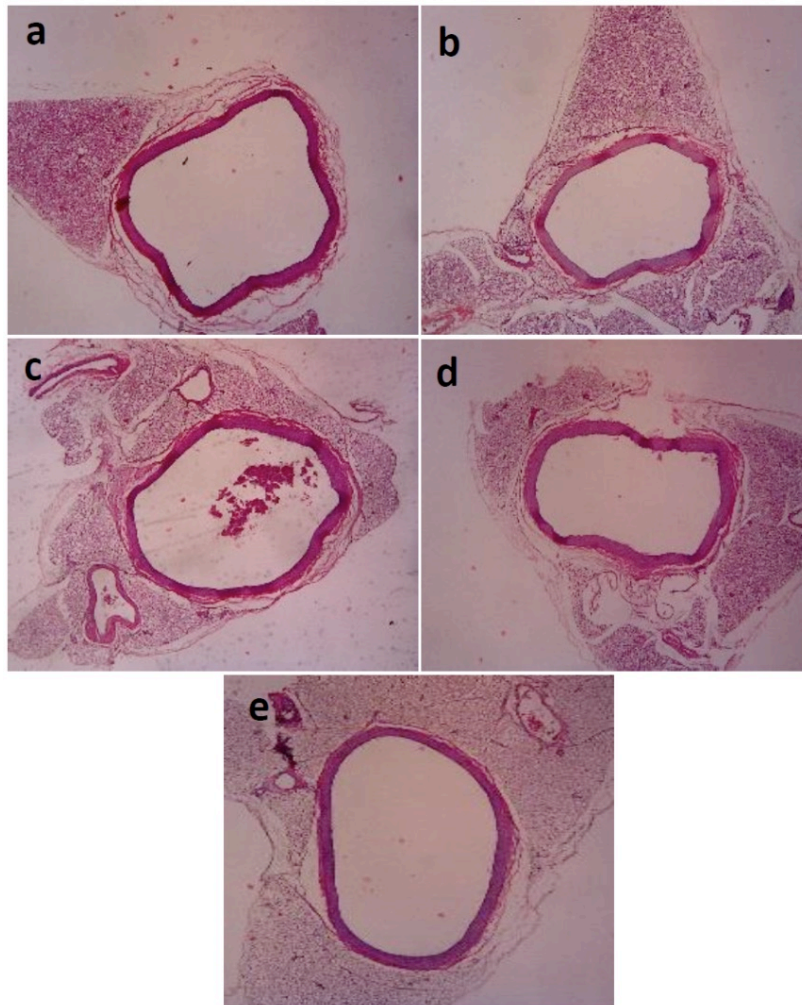
Hasil analisis menggunakan *Kruskal-Walls Test* menunjukkan bahwa rerata diameter lumen aorta pada rat diabetes berbeda bermakna antar kelompok ($p=0.000$, *Kruskal-Walls* $H=38.11$). Uji statistik selanjutnya dengan menggunakan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok Kontrol Normal, Kontrol Negatif, Nanopartikel Fucoidan 75; 150 dan 300 mg/kg BB dengan hasil seperti pada tabel 5.32

Tabel 5.32 Uji *Mann-Whitney Test* pengaruh pemberian nanofucoidan terhadap diameter lumen aorta pada rat diabetes

Kelompok	Diameter Lumen Aorta (μm)	
	Besar Sampel	($\bar{X} \pm \text{SD}$)
Kontrol Normal	10	2.24 ^a \pm 0.10
Kontrol Negatif	10	1.52 ^b \pm 0.11
Nano Fucoidan 75 mg/kg BB	10	1.56 ^b \pm 0.13
Nano Fucoidan 150 mg/kg BB	10	1.58 ^b \pm 0.13
Nano Fucoidan 300 mg/kg BB	10	1.99 ^c \pm 0.11

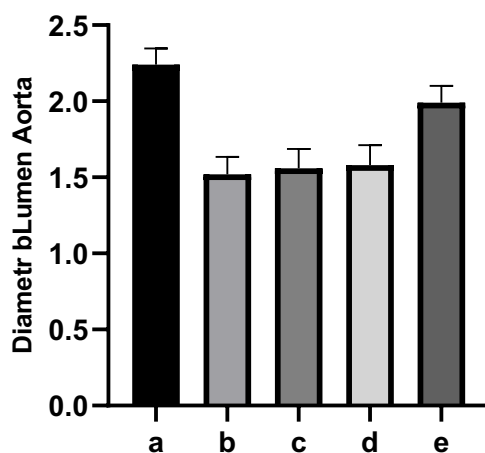
Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p < 0.05$

Hasil uji *Mann-Whitney Test* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada diameter lumen aorta rat antara kelompok Kontrol Normal dengan kelompok Kontrol Negatif pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian streptozotocin dapat menurunkan diameter lumen aorta pada rat. Pemberian Nanopartikel Fucoidan tergantung dosis yang diberikan dapat menghambat penurunan diameter lumen aorta pada rat diabetes seperti terlihat pada table 5.32 dan gambar 5.19.



Gambar 5.19. Pengaruh Pemberian *Fucoïdan* Terhadap diameter lumen aorta pada rat diabet. Kontrol Normal (a); Kontrol Negatif (b), Nanopartikel *Fucoïdan* 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

Pemberian nanopartikel fucoidan dosis 75 mg/kg BB dan dosis 150 mg/kg BB tidak berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Negatif dan berbeda bermakna dengan kelompok Kontrol Normal, sedangkan pemberian Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/kg BB dapat menghambat penurunan diameter lumen aorta pada rat yang diinduksi dengan Streptozotocin berbeda bermakna dengan kelompok kontrol Negatif dan dengan kelompok Kontrol Normal pada $p < 0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Nanopartikel Fucoidan tergantung dosis yang diberikan dalam menghambat penurunan diameter lumen aorta, semakin besar dosis yang diberikan semakin menghambat penurunan diameter lumen aorta pada rat diabetes. Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/kg BB adalah dosis yang efektif dalam meningkatkan diameter lumen aorta pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin, dan hambatan penurunan diameter lumen aorta rat diabetes ini belum bisa mencapai seperti pada kelompok Kontrol Normal (Gambar 5.20)



Gambar 5.20. Pengaruh Pemberian *Fucoidan* Terhadap diameter lumen aorta pada rat diabet. Kontrol (a); Kontrol Perlakuan (b), Nanopartikel Fucoidan 75 mg/kg BB (c), 150 mg/kg BB (d) dan 300 mg/kg BB (e)

5.13 Analisis Jalur Signal Transduksi Nanopartikel Fucoidan Sebagai Protektor Aorta pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin

Pemberian Nanopartikel Fucoidan yang berpengaruh signifikan dan yang paling efektif adalah dosis 300 mg/Kg BB dalam menghambat peningkatan kadar gula darah, kadar MDA, dan menghambat penurunan kadar insulin, ekspresi Nrf2, SOD, GPx, eNOS, kadar NO, ekspresi cGMP, respon relaksasi Ach pada kontraksi NE dan diameter aorta rat yang diinduksi dengan Streptozotocin. Oleh karena itu perlu untuk menjelaskan signal transduksi Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/Kg BB sebagai protektor pada aorta rat yang diinduksi Streptozotocin dengan menggunakan analisis jalur sehingga dapat diketahui hubungan dan pengaruh setiap variable yang terlibat dalam signal transduksi dari Nanopartikel Fucoidan seperti terlihat pada table 5.33

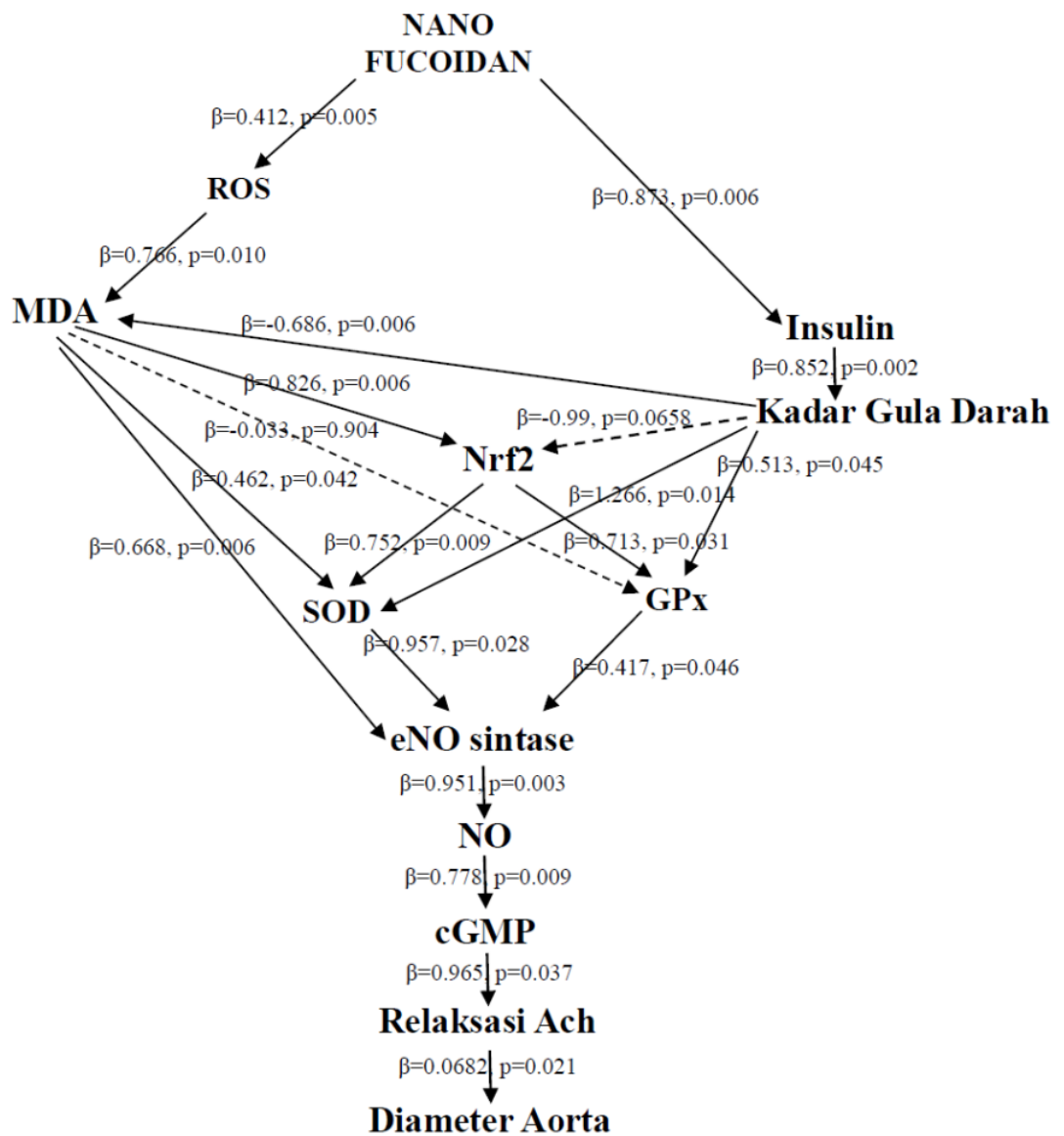
Tabel 5.33 dan gambar 5.21 menunjukkan bahwa pemberian Nanopartikel Fucoidan dosis 300 mg/Kg BB berpengaruh langsung terhadap hambatan penurunan insulin serum ($\beta=0.873$, $p=0.006$) dan berpengaruh langsung terhadap hambatan peningkatan kadar MDA Aorta ($\beta=0.766$, $p=0.010$). Hambatan penurunan kadar insulin serum dapat berpengaruh langsung terhadap hambatan peningkatan kadar gula darah ($\beta=0.852$, $p=0.002$). Selanjutnya hambatan peningkatan kadar gula darah dapat berpengaruh langsung terhadap hambatan peningkatan kadar MDA ($\beta=-0.686$, $p=0.042$), hambatan penurunan ekspresi SOD ($\beta=1.266$, $p=0.014$) dan hambatan penurunan ekspresi GPx ($\beta=0.513$, $p=0.045$), namun penurunan kadar gula darah tidak berpengaruh langsung terhadap hambatan penurunan ekspresi Nrf2 ($\beta=-0.099$, $p=0.658$), sedangkan hambatan peningkatan kadar MDA berpengaruh langsung terhadap hambatan penurunan ekspresi Nrf2 ($\beta=0.826$, $p=0.006$) dan hambatan penurunan

ekspresi SOD ($\beta=0.462$, $p=0.042$), namun tidak berpengaruh langsung terhadap hambatan penurunan ekspresi GPx ($\beta=0.033$, $p=0.904$). Hambatan penurunan ekspresi Nrf2 secara langsung dapat mempengaruhi hambatan penurunan ekspresi SOD ($\beta=0.752$, $p=0.009$) dan hambatan penurunan ekspresi GPx ($\beta=0.713$, $p=0.031$). Hasil ini menunjukkan bahwa hambatan peningkatan kadar MDA berpengaruh tidak langsung terhadap hambatan penurunan ekspresi SOD dan hambatan penurunan ekspresi GPx melalui hambatan penurunan ekspresi Nrf2 seperti terlihat pada table 5.33 dan gambar 5.21

Tabel 5.33 Analisis Jalur Signal Transduksi Nanopartikel Fucoïdan 300 mg/kg BB Sebagai Protektor Aorta pada Rat yang di induksi dengan Streptozotocin

No	Jalur	Koefisien Jalur (β)	Nilai p
1	Nano Fucoïdan \rightarrow Kadar Insulin	0.873	0.006
2	Nano Fucoïdan \rightarrow Kadar ROS	0.412	0.005
3	Kadar ROS \rightarrow Kadar MDA	0.852	0.002
3	Kadar Insulin \rightarrow Kadar Gula darah	0.852	0.002
4	Kadar Gula darah \rightarrow Kadar MDA	-0.686	0.042
5	Kadar Gula darah \rightarrow Ekspresi SOD	1.266	0.014
6	Kadar Gula darah \rightarrow Ekspresi GPx	0.513	0.045
7	Kadar Gula darah \rightarrow Ekspresi Nrf2	-0.099	0.658
8	Kadar MDA \rightarrow Ekspresi Nrf2	0.826	0.006
9	Kadar MDA \rightarrow Kadar SOD	0.462	0.042
10	Ekspresi Nrf2 \rightarrow Kadar SOD	0.752	0.009
11	Kadar MDA \rightarrow Kadar GPx	-0.033	0.904
12	Ekspresi Nrf2 \rightarrow Kadar GPx	0.713	0.031
13	Kadar MDA \rightarrow Ekspresi eNOS	0.668	0.006
14	Ekspresi SOD \rightarrow Ekspresi eNOS	0.957	0.028
15	Ekspresi GPx \rightarrow Ekspresi eNOS	0.417	0.046
16	Ekspresi eNOS \rightarrow Kadar NO	0.951	0.003
17	Kadar NO \rightarrow Ekspresi c GMP	0.778	0.009
18	Ekspresi c GMP \rightarrow Respon Relaksasi Ach	0.965	0.037
19	Respon Relaksasi Ach \rightarrow Diameter Aorta	0.682	0.021

Hambatan peningkatan kadar MDA, hambatan penurunan ekspresi SOD dan hambatan penurunan ekspresi GPx berpengaruh langsung terhadap hambatan penurunan ekspresi eNOS dengan ($\beta=0.668$, $p=0.006$); ($\beta=0.957$, $p=0.028$) dan ($\beta=0.417$, $p=0.046$), yang selanjutnya hambatan penurunan ekspresi eNOS secara langsung dapat mempengaruhi hambatan penurunan kadar NO ($\beta=0.951$, $p=0.003$). Hambatan penurunan kadar NO berpengaruh langsung terhadap hambatan penurunan ekspresi cGMP ($\beta=0.778$, $p=0.009$), dan hambatan penurunan ekspresi cGMP ini secara langsung dapat mempengaruhi hambatan penurunan respon Ach pada kontraksi NE ($\beta=0.965$, $p=0.037$). Pada akhirnya hambatan penurunan respon Ach pada kontraksi NE dapat berpengaruh langsung terhadap diameter hambatan penurunan lumen aorta ($\beta=0.682$, $p=0.021$) seperti terlihat pada table 5.33 dan gambar 5.21



Gambar 5.21 Analisis Jalur Signal Transduksi Nanopartikel Fucoidan

BAB 6

PEMBAHASAN, KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Pembahasan

Hiperglikemia adalah faktor penyebab utama penyakit kardiovaskular yang meningkatkan sebagian besar morbiditas dan mortalitas yang terkait dengan komplikasi pada diabetes mellitus, baik DM tipe 1 (T1DM) maupun DM tipe 2 (T2DM) yang merupakan kontributor pada risiko aterosklerosis, infark miokard, stroke, hipertensi, gagal ginjal dan amputasi ekstremitas bawah (13,17,100).

Namun kontrol glikemik yang ketat tidak sepenuhnya dapat mencegah perkembangan komplikasi diabetes melitus. Bukti ini mendukung pandangan bahwa patogenesis komplikasi DM bersifat kompleks dan multifaktorial. Oleh karena itu, selain hiperglikemia, modifikasi faktor risiko komplikasi diabetes termasuk stress oksidatif, inflamasi, apoptosis wajib menjadi perhatian dalam manajemen medis penderita dengan DM (19,77,101). Dengan demikian, tingkat komplikasi diabetes masih menjadi perhatian utama bagi penderita diabetes, karena itu, terapi modifikasi penyakit komplikasi diabetes yang menargetkan dampak toksisitas glukosa pada jantung dan pembuluh darah sangat dibutuhkan.

Banyak hipotesis telah diajukan untuk menjelaskan penyebab komplikasi diabetes yaitu aktivasi jalur *Advanced glycation end products* (AGEs), stres oksidatif, jalur poliol, peningkatan aktivitas protein kinase C, dan peningkatan ekspresi sitokin inflamasi. Banyaknya jumlah dan variasi hipotesis yang diajukan menunjukkan pentingnya pemahaman patogenesis komplikasi diabetes yang dapat

mencerminkan upaya untuk menemukan obat alternatif dalam mencegah terjadinya komplikasi diabetes melitus (13,78,102).

Banyak laporan dari hasil penelitian menunjukkan bahwa stres oksidatif dapat bertindak sebagai benang merah utama antara berbagai hipotesis faktor penyebab pada komplikasi diabetes. Stress oksidatif dapat meningkatkan ekspresi sitokin inflamasi dan mengaktifasi jalur nekrosis maupun apoptosis yang merupakan konsekuensi sekaligus pemicu terjadinya komplikasi diabetes (21,89). Oleh karena itu, stress oksidatif dengan perkembangan yang pesat menjadi landasan teori dan mampu menarik perhatian sebagian besar dari banyak peneliti di bidang komplikasi diabetes sampai saat ini. Banyak laporan dari hasil penelitian anti stress oksidatif (antioksidan) pada hewan coba model komplikasi diabetes, telah menunjukkan efek proteksi terhadap terjadinya komplikasi diabetes seperti pada retinopati, neuropati, nefropati, arterosklerosis, cardiopati, luka ganggraene dan disfungsi endothelium (46,92).

Telah dikembangkan nanoteknologi untuk meningkatkan absorpsi, bioavailabilitas, farmakokinetik, farmakodinamik, efektifitas dan mengurangi efek toksik dari antioksidan, dan dilaporkan bahwa nanopartikel fucoidan mempunyai efek antioksidan yang sangat kuat sehingga dapat digunakan untuk melindungi kerusakan sel pada ginjal dan paru pada tikus diabetes yang diinduksi dengan Streptozotocin (8,93). Pada penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan signal transduksi efek antioksidan dari nanopartikel fucoidan untuk melindungi gangguan fungsi dan kerusakan pembuluh darah aorta pada komplikasi diabetes akibat pemberian Streptozotocin yang penjelasannya sebagai berikut:

6.1.1. Nanopartikel Fucoidan

Salah satu komplikasi diabetes adalah penyakit kardiovaskular telah menjadi masalah kesehatan masyarakat yang serius di seluruh dunia, dan morbiditas dan mortalitas menempati urutan pertama di atas penyakit lain di dunia (103–105). Prioritas utama untuk mengatasi keadaan ini maka perlu mengembangkan obat untuk penyakit kardiovaskular akibat komplikasi diabetes. Kemajuan nanoteknologi cukup pesat dan efektifitas bahan nano yang luar biasa maka nanoteknologi telah menjadi solusi baru untuk pengobatan penyakit kardiovaskular. Nanopartikel Fucoidan dibuat metode *Ball Milling* adalah teknik yang luas digunakan untuk menggilas bubuk (powder) menjadi partikel yang sangat halus (termasuk dalam skala nanometer). Tidak memerlukan pelarut organik, mudah, ramah lingkungan dan ekonomis menjadi kelebihan dari metode ini, pada umumnya terdiri dari cangkang silinder berlubang yang berputar pada porosnya, diisi dengan bola yang terbuat dari *steel* (baja). Kinerjanya bergantung pada energi yang dilepaskan dari dampak antara gesekan antara bola, bubuk dan waktu. Semakin lama mesin dioperasikan, maka partikel yang dihasilkan semakin halus (9). Bahan obat yang berukuran nano memiliki kemampuan untuk meningkatkan stabilitas, kelarutan, penyerapan, mula kerja, memperpanjang lama kerja obat pada jaringan target, dan mengurangi degradasi enzim, sehingga meningkatkan keamanan. dan efektifitas obat (8,10,49).

Pemeriksaan ukuran nanopartikel fucoidan dilakukan dengan DLS yang menunjukkan bahwa distribusi ukuran Nanopartikel Fucoidan adalah 201.8 ± 14.6 nm yang sebelumnya distribusi ukuran bubuk Fucoidan adalah 986.4 ± 54.6 nm.

Hasil ini sesuai dengan standard pembuatan sediaan obat dalam bentuk nano yaitu ukurannya antara 100-300 nm yang digunakan untuk pengobatan (8). Morfologi permukaan mempengaruhi kemampuan nanopartikel untuk menembus membran sel target. Pada pemeriksaan dengan SEM, permukaan Nanopartikel Fucoidan cenderung bulat dan permukaannya tidak rata. Telah dilaporkan bahawa nanopartikel yg bentuk bulat lebih mudah memasuki sel. Berdasarkan distribusi ukuran dan morfologinya maka Nanopartikel Fucoidan dianggap sebagai solusi alternatif untuk meningkatkan kelarutan, penyerapan, bioavailabilitas, dan untuk meningkatkan efek protektifnya pada komplikasi diabetes melitus terutama pada gangguan fungsi dan kerusakan pembuluh darah aorta.

6.1.2. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Kadar Insulin dan Kadar Glukosa Darah pada Tikus yang diinduksi Streptozotocin

Diabetes melitus merupakan suatu penyakit atau gangguan metabolisme dengan multi etiologi yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein sebagai akibat insufisiensi fungsi insulin. Insufisiensi fungsi insulin dapat disebabkan oleh gangguan atau defisiensi produksi insulin oleh sel-sel beta Langerhans kelenjar pankreas, atau disebabkan oleh kurang responsifnya sel-sel tubuh terhadap insulin (6,13,106). Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian streptozotocin secara intraperitoneal dapat menurunkan kadar insulin dan meningkatkan kadar gula darah yang berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok Kontrol Normal pada $p < 0.05$. Streptozotocin (STZ, 2-deoxy-2-(3- (methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) merupakan senyawa kimia yang diisolasi dari

Streptomyces achromogenes dan digunakan untuk menginduksi baik diabetes mellitus tipe 1 maupun tipe 2 (6). Streptozotocin secara selektif masuk dan terakumulasi dalam sel beta pankreas melalui transporter glukosa 2 (GLUT 2) di membran sel yang dapat menyebabkan alkilasi/kerusakan DNA dan dapat mengaktivasi poli ADP ribosilasi, yang selanjutnya dapat mengakibatkan hambatan *Nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD⁺) seluler dan dapat menyebabkan penurunan jumlah ATP di mitokondria. Penurunan ATP ini dapat meningkatkan konsentrasi ADP intraseluler dan dapat meningkatkan substrat *Xantin Oksidase* (XOD) yang aktivitasnya sangat tinggi dalam sel beta. XOD akan mengkatalisa perubahan hipoxanthin menjadi xanthin yang akhirnya dapat merubah xanthin menjadi asam urat dan radikal bebas superoksida (3,107). Disamping itu STZ secara langsung juga dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas superoksida dan radikal hidroksil sehingga akan terjadi stress oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan sel beta pankreas dan dapat menurunkan kadar insulin. Menurunnya kadar insulin akan menghambat *Glucosa Transporter 4* (Glut 4) yang menyebabkan hambatan masuknya glukosa kedalam sel jaringan yang akhirnya akan mengakibatkan terjadinya peningkatan kadar glukosa dalam darah (100,108).

Pemberian nanopartikel fucoidan, hanya pada dosis 300 mg/kg BB dapat menghambat penurunan kadar insulin dan menghambat peningkatan kadar gula darah yang berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol Negatif pada $p < 0.05$. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa Fucoidan merupakan polisakarida sulfat yang diisolasi dari rumput laut coklat memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang sangat kuat secara *in vitro* maupun *in vivo* (25,28,52). Telah dilakukan pemeriksaan aktivitas antioksidan fucoidan yang hasilnya menunjukkan

bahwa fucoidan mempunyai aktivitas penangkapan radikal bebas yang efek antioksidannya lebih kuat pada radikal hidroksil dibandingkan dengan radikal lain (29,35). Fucoidan dapat menghambat pembentukan ROS dan apoptosis pada sel vero yg di induksi dengan H₂O₂ secara invitro. Pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan empat metode antara lain metode 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), *Hydroxyl Radical Scavenging Activity* (HRSA) dan Total antioksidan, yang hasilnya menunjukkan bahwa fucoidan mempunyai aktivitas sebagai antioksidan yang kuat (47,54,55,109). Aktivitas fucoidan sebagai antioksidan penangkap radikal bebas dapat dikaitkan dengan adanya gugus OH dalam unit polisakarida yang dapat bereaksi dengan radikal bebas hidroksil (*OH) dalam uji radikal hidroksil (10,24,80).

Dalam dekade terakhir, potensi anti diabetes fucoidan sebagai senyawa baru telah mendapatkan perhatian terutama efek terapeutiknya yang dilaporkan pada berbagai tingkat metabolisme glukosa (26). Fucoidan juga terlibat dalam menghambat dipeptidyl peptidase IV, sehingga dapat meningkatkan hormon incretin yang diketahui dapat mencegah hiperglikemia dan meningkatkan produksi insulin. Fucoidan dilaporkan juga dapat menghambat Xanthine Oxidase sehingga dapat menyebabkan hambatan pembentukan radikal bebas terutama radikal superoksida, yang selanjutnya akan menghambat kerusakan sel β pancreas dan dapat menghambat penurunan sekresi insulin serta dapat menghambat peningkatan kadar gula darah (110–112).

Juga telah dilaporkan bahwa Fucoidan juga dapat menstimulasi sekresi insulin dan memproteksi pancreas melalui peningkatan pembentukan cAMP.

cAMP berfungsi untuk menghambat K^+ channel yang sensitive terhadap ATP yang dapat meningkatkan Ca sitosolik karena terbukanya L- type voltage-sensitive Ca^{2+} channel sehingga dapat terjadi pelepasan insulin dari sel β pancreas dan penurunan kadar gula darah (113).

Polisakarida terutama yang berasal dari sumber alami, termasuk tanaman obat, biji-bijian, buah-buahan, sayuran, jamur merang, dan rumput laut memiliki potensi sebagai antidiabetes, yang dilaporkan dapat memproteksi kerusakan sel β pankreas sehingga dapat menghambat penurunan sekresi insulin dan memiliki potensi sebagai antidiabetes (2,50,110).

6.1.3. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Kadar MDA Aorta pada Tikus yang diinduksi Streptozotocin

Malondialdehida (MDA) merupakan salah satu produk akhir dari peroksidasi lipid yang terbentuk akibat degradasi radikal bebas $*OH$ terhadap asam lemak tak jenuh yang nantinya menjadi radikal yang sangat reaktif (2,47). Kadar MDA yang tinggi menunjukkan tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh yang dapat menyebabkan peningkatan oksidasi dalam membrane sel. MDA merupakan salah satu marker untuk mengetahui adanya stres oksidatif dalam sel (18,21). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian streptozocin secara intraperitoneal dapat meningkatkan kadar MDA jaringan aorta yang berbeda bermakna, bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol pada $p < 0.05$. Jumlah ROS yang semakin meningkat dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Reaksi ROS pada peroksidasi lipid akan terjadi oksidasi pada asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) yang banyak ditemukan dalam membran sel, yang akan menghasilkan

produk MDA (Malondialdehyde). MDA ini menjadi tolak ukur banyaknya jumlah radikal bebas dan adanya kerusakan sel maupun jaringan. Semakin tinggi kadar MDA dalam jaringan, maka tingkat keparahan kerusakan jaringan semakin tinggi pula. Peningkatan MDA jaringan aorta pada kondisi hiperglikemia akibat pemberian streptozotocin dapat melalui mekanisme molekuler penting yaitu aktivasi protein kinase C (PKC), peningkatan jalur heksosamin, peningkatan produk akhir glikasi, dan peningkatan jalur poliol yang dapat meningkatkan pembentukan ROS dan menurunkan produksi antioksidan sehingga dapat terjadi stress oksidatif (27,37). Apabila terjadi hiperglikemia maka akan merangsang aktivitas enzim *aldose reductase* (AR) untuk mengkatalisasi glukosa menjadi sorbitol melalui jalur polyol. Tahap selanjutnya adalah terjadi proses oksidasi oleh enzim *sorbitol dehydrogenase* (SDH) membentuk fruktosa. Juga dapat mengosongkan NAD⁺ yang berkontribusi terhadap terjadinya peningkatan ROS dan peningkatan kadar MDA. Pada jalur heksosamin, peningkatan glukosa intraseluler akan mengalami proses metabolisme melalui glikolisis menghasilkan glukosa-6-fosfat yang dibantu oleh enzim hexokinase atau glukokinase. Proses selanjutnya adalah terbentuknya fruktosa-6-fosfat dari glukosa-6-fosfat. Tingginya kadar glukosa intraseluler menyebabkan sebagian dari senyawa fruktosa-6-fosfat akan dikonversi menjadi *glucosamine-6-phosphate*, *uridine diphosphate* (UDP), dan *N-acetyl glucosamine* (GlcNAc) oleh enzim *glucosamine fructose-6-phosphate amidotransferase* (GFAT) melalui jalur heksosamin (62,65). *N-acetyl glucosamine* yang terbentuk selanjutnya akan berikatan dengan faktor transkripsi *serine-threonine residues critical activating cofactor*, sehingga dapat menginduksi ekspresi gen seperti *transforming growth factor-β1* (TGF-1), dan *plasminogen*

activator inhibitor-1 (PAI-1). Peningkatan kadar TGF-1 dan PAI-1 berperan penting terhadap mekanisme terjadinya hipoperfusi seluler sehingga memicu terjadinya peningkatan ROS dan peningkatan MDA (86). Pada jalur *diacyl glycerol* (DAG)/*protein kinase C* (PKC), tingginya kadar glukosa intraseluler meningkatkan sintesa molekul *diacyl glycerol*. Molekul ini merupakan bentuk klasik dari senyawa protein kinase-C, $-\beta$, $-\alpha$, dan $-\delta$. Aktivasi PKC menyebabkan ekspresi berbagai gen seperti endothelin-1, VEGF, TGF- β , PAI-1, NF- κ B, NAD(P)H oksidase meningkat sehingga produksi ROS dan MDA juga meningkat (16,102). *Advanced glycation end products* (AGEs) merupakan produk proses glikasi non-enzimatis dari protein heterogen, lipid, dan asam nukleat pada penderita diabetes mellitus melalui jalur *glyoxylation*. Terbentuknya AGEs karena tingginya kadar gula darah pada penderita diabetes. Pada tahap awal reaksi reduksi gula (aldosa) dengan protein secara non-enzimatis akan terbentuk basa Schiff dan produk Amadori (senyawa ketoamin) yang bersifat *reversible*. Pemaparan dalam jangka waktu panjang mengakibatkan terbentuknya AGEs yang bersifat *irreversible*. AGEs yang terbentuk akan terakumulasi pada berbagai jaringan tubuh dan pembuluh darah, dan menjadi penyebab munculnya berbagai komplikasi penyakit diabetes. Produk glikasi ini akan berikatan dengan reseptornya (RAGE). Meningkatnya ikatan antara RAGE dan AGEs pada penyakit diabetes memicu meningkatnya produksi ROS dan MDA (1,19).

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel fucoidan secara oral pada tikus yang diinduksi dengan streptozotocin secara intraperitoneal, dapat menghambat peningkatan kadar MDA jaringan aorta yang berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok streptozotocin pada

$p < 0.05$. Senyawa antioksidan dari fucoidan mampu menangkap dan menetralkan radikal bebas sehingga reaksi lanjutan yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif dapat berhenti dan kerusakan sel dapat dihindari atau induksi suatu penyakit dapat dihentikan. Reaksi terminasi antioksidan dari fucoidan dapat terjadi dengan cara menangkap radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$) pada tahap reaksi peroksidasi lemak, protein atau molekul lainnya pada membran sel normal sehingga peningkatan kadar MDA dapat dihambat dan kerusakan sel dapat dihindari. Fucoidan mampu menghambat peningkatan kadar MDA pada jaringan aorta tikus diabetes yang diinduksi dengan streptozotocin. Hal ini terjadi karena fucoidan mempunyai efek antioksidan yang bekerja sebagai *scavenger* radikal bebas sehingga tidak terjadi proses peroksidasi lipid dan tidak terjadi peningkatan kadar MDA (93,114). Fucoidan juga dapat menginaktivasi PKC menyebabkan ekspresi berbagai gen seperti TGF- β , PAI-1, NF- κ B, NAD(P)H oksidase menurun sehingga produksi ROS dan MDA juga menurun (27,115). Hasil ini sesuai dengan laporan sebelumnya yaitu pemberian bahan natural produk yang mempunyai khasiat antioksidan dapat menghambat peningkatan ROS dan kadar MDA pada jaringan aorta. Babu *et al.* (2006) melakukan penelitian efek terapi dari ekstrak *green tea* dapat menghambat stress oksidatif melalui hambatan peningkatan kadar MDA pada aorta dan jantung tikus diabetes. Pari *et al* (2012) menunjukkan bahwa pemberian diosgenin dapat menghambat stress oksidatif pada jaringan aorta melalui hambatannya pada produksi MDA tikus yang diinduksi dengan streptozotocin. Badalzadeh *et al* (2015) melaporkan bahwa pemberian antioksidan troxerutin dapat menghambat kenaikan kadar MDA jaringan aorta pada tikus diabetes akibat pemberian streptozotocin yang diinjeksikan secara intraperitoneal. Antioksidan ekstrak

Cinnamomum cassia juga telah dibuktikan dapat menghambat kenaikan kadar MDA jaringan aorta pada tikus diabetes akibat pemberian streptozotocin (75). Juga telah dilaporkan bahwa pemberian bahan natural produk yang mempunyai khasiat antioksidan dapat menghambat peningkatan ROS dan kadar MDA pada jaringan paru (92), jaringan hati (111), jaringan ginjal (5,93), jaringan jantung (92) pada tikus diabetes.

6.1.4. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucooidan terhadap Ekspresi Nrf2 pada Aorta Tikus yang diinduksi Streptozotocin

Pada kondisi fisiologis, stres oksidatif akan memicu *up regulation* dari antioksidan endogen dan protein sitoprotektif untuk mencegah atau membatasi kerusakan jaringan. Proses ini diperantarai oleh aktivasi Nrf2 yang akan mengaktifasi laju transkripsi berbagai gen antioksidan dan enzim detoksifikasi (66,76,116). Regulasi antioksidan seluler dan antiinflamasi oleh Nrf2 berperan dalam pertahanan melawan stres oksidatif. Aktivitas dan ekspresi Nrf2 akan mengalami penurunan pada diabetes yang disebabkan oleh stress oksidatif yang dapat melemahkan induksi gen yang mengkode antioksidan sehingga terjadi penurunan produksi antioksidan endogen seperti SOD, GPx dan Catalase (29,59,93)

Pada tikus model diabetes yang diinduksi dengan streptozotocin secara intraperitoneal menunjukkan penurunan ekspresi Nrf2 pada jaringan aorta yang berbeda bermakna, bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol pada $p < 0.05$. Beberapa peneliti melaporkan bahwa streptozotocin dapat menginaktivasi Nrf2, sehingga terjadi penurunan ekspresi Nrf2. Streptozotocin dapat menyebabkan

stress oksidatif yang terjadi akibat ketidakseimbangan antara peningkatan produksi ROS dan penurunan kapasitas dari antioksidan. Peningkatan ROS ini akan menimbulkan kerusakan sistein di Keap1, mengganggu mekanisme ubiquitinasi Keap1-Cul3 dan memediasi degradasi Nrf2 oleh proteasome 26S sehingga Nrf2 memiliki waktu paruh pendek yang dapat mengakibatkan terjadinya penurunan ekspresi Nrf2 (59,117).

Banyak peneliti klinis yang tertarik untuk melakukan penelitian terhadap regulasi Nrf2 dan/atau gen antioksidan akibat adanya hiperglikemia. Nrf2 adalah regulator utama untuk proteksi kerusakan sel pada keadaan stres oksidatif yang terlibat dalam mekanisme molekuler pada komplikasi diabetes (72,118). Nrf2 memainkan peran penting dalam menjelaskan jalur molekuler dan dalam mengembangkan strategi untuk penyakit makro dan mikrovaskular, termasuk pencegahan, terapi, dan manajemen pada komplikasi diabetes (29).

Pada rat yang diinduksi dengan streptozotocin, pemberian nanopartikel fucoidan hanya pada dosis 300 mg/kg BB secara oral dapat menghambat penurunan ekspresi Nrf2 di jaringan ginjal dan aorta yang berbeda bermakna, bila dibandingkan dengan kelompok tikus yang diinjeksi dengan streptozotocin pada $p < 0.05$. Hal ini karena fucoidan mempunyai efek antioksidan yang kuat dan merupakan polisakarida yang memiliki gugus OH yang dapat bereaksi dengan radikal bebas hidroksil (*OH), akibatnya akan terjadi hambatan stress oksidatif sehingga dapat menyebabkan peningkatan ekspresi Nrf2. Disamping itu efek antioksidan dari fucoidan yang kuat mampu meredam ROS sehingga tidak terjadi kerusakan sistein di Keap1, yang selanjutnya tidak terjadi hambatan mekanisme ubiquitinasi Keap1-Cul3 dan degradasi Nrf2, yang dapat menyebabkan

peningkatan ekspresi Nrf2. Hasil yang sama dilaporkan bahwa pemberian antioksidan Fucoidan dapat menghambat stress oksidatif dan menghambat penurunan ekspresi Nrf2 jaringan hati yang diinduksi dengan Asetaminofen (47). Pemberian antioksidan nanopartikel chitosan secara oral pada tikus diabetes juga dapat menghambat stress oksidatif dan menghambat penurunan ekspresi Nrf2 pada jaringan jantung (92). Pemberian antioksidan eksogen dapat meredam peningkatan ROS dan dapat meningkatkan ekspresi Nrf2. Oleh karena itu antioksidan dapat digunakan untuk preventif dan terapeutik dalam memperbaiki gangguan metabolisme dan menghambat kerusakan sel pada diabetes. Nrf2 berasosiasi dengan protein yang disebut Maf yang ada dalam nukleus untuk membuat heterodimer dan memulai transkripsi pada beberapa gen sitoprotektif yang meliputi pengkode antioksidan dan enzim detoksifikasi fase-II seperti superoksida dismutase (SODs), katalase (CAT), NAD(P)H dehidrogenase, γ -glutamyl cysteine synthase (γ -GCS), NQO-1, hemeoxygenase-1 (HO-1), glutathione peroksidase (GPx), dan glutathione S-transferase (GST). Respon antioksidan terhadap jalur pensinyalan Nrf2 dianggap sebagai target yang menjanjikan terhadap komplikasi diabetes pada paru, hati, pencernaan, saraf, dan kardiovaskular serta nefropati diabetic (47,66,92).

Penelitian pada hewan coba telah menunjukkan bahwa sistem Nrf2/Keap1 adalah jalur pertahanan penting untuk melindungi kerusakan sel pada kondisi stress oksidatif. Penurunan ekspresi Nrf2 dapat mengurangi ekspresi antioksidan sitoprotektif pada tikus transgenik sel dan memperburuk kerusakan sel oksidatif. Hal ini karena induksi Nrf2 dapat meningkatkan pembentukan antioksidan yang sangat penting untuk meredam radikal bebas dalam menekan akumulasi ROS,

fragmentasi DNA, dan apoptosis sel (45,119). Telah dilaporkan bahwa pemberian fucoidan secara signifikan dapat menghambat stress oksidatif melalui peningkatan antioksidan heme oksigenase-1 (HO-1) dan superoksida dismutase-1 (SOD-1) melalui peningkatan ekspresi Nrf2. Hasil dari peneliti lain juga menunjukkan bahwa fucoidan dapat menghambat apoptosis melalui hambatan penurunan ekspresi Nrf2 yang dapat menyebabkan hambatan penurunan enzim antioksidan endogen (116). Juga dilaporkan bahwa aktivasi jalur PI3K, JNK, ERK, dan Akt dapat meningkatkan ekspresi Nrf2. Beberapa peneliti menunjukkan bahwa Fucoidan dapat mengaktivasi jalur PI3K, ERK, dan Akt sehingga fucoidan juga dapat meningkatkan ekspresi Nrf2 (61).

6.1.5. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Ekspresi SOD dan GPx Aorta pada Tikus yang diinduksi Streptozotocin

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif. Tubuh hewan dan manusia mempunyai antioksidan endogen yang digunakan untuk bertahan terhadap radikal bebas (73,79). Pertahanan yang bervariasi saling melengkapi satu dengan yang lain karena bekerja pada radikal bebas yang berbeda atau dalam bagian seluler yang berbeda. Sehubungan dengan potensi toksisitas senyawa radikal bebas, tubuh memiliki mekanisme sistem pertahanan alami berupa enzim antioksidan endogen berfungsi menetralkan dan

mempercepat degradasi senyawa radikal bebas untuk mencegah kerusakan sel. Sistem ini dibagi dalam dua kelompok besar yaitu: sistem pertahanan preventif seperti enzim superoksida dismutase, katalase, dan glutathion peroksidase dan sistem pertahanan melalui pemutusan reaksi radikal seperti isoflavon, vitamin A, vitamin C, dan vitamin E (85,120,121).

SOD dan GPx merupakan antioksidan yang memainkan peranan penting dalam menanggulangi radikal bebas, yaitu anion superoksida dan gugus hidroksil. SOD dianggap sebagai lini pertama pertahanan terhadap ROS dan terdapat di hampir semua sel. SOD mengubah ion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Karena H_2O_2 masih dapat bereaksi dengan ROS lain, maka perlu terdegradasi oleh antioksidan lainnya yaitu GPx. GPx mendetoksifikasi H_2O_2 dengan merubah menjadi air dan molekul oksigen. SOD dan GPx bekerja sinergis untuk saling mendukung pertahanan terhadap ROS, Enzim ini menghambat terjadinya stres oksidatif yang merupakan salah satu biomarker diabetes yang banyak dilakukan pemeriksaan terhadap kadarnya dalam berbagai penelitian komplikasi diabetes (2,85). Hiperglikemia akan menyebabkan stres oksidatif, karena mampu menghasilkan radikal bebas lebih banyak, dan menurunkan kerja antioksidan dalam tubuh sehingga dapat merusak sel pada komplikasi diabetes. Oleh karena itu, diperlukan adanya upaya untuk meningkatkan kadar SOD dan GPx dengan cara mengkonsumsi bahan alam yang mengandung antioksidan (47).

Pada kondisi stress oksidatif terjadi produksi radikal bebas yang berlebihan di dalam tubuh yang dapat menurunkan enzim antioksidan endogen dan menyebabkan kerusakan sel (7,122). Penurunan antioksidan terutama disebabkan oleh gangguan aktivasi dari *nuclear factor-erythroid-2 related factor 2* (Nrf2),

faktor transkripsi yang mengatur gen yang mengkode antioksidan dan enzim detoksifikasi (90). Pada kondisi fisiologis, stres oksidatif akan memicu *up regulation* dari antioksidan endogen dan protein sitoprotektif untuk mencegah atau membatasi kerusakan jaringan. Proses ini diperantarai oleh aktivasi Nrf2 yang akan mengaktifasi laju transkripsi berbagai gen antioksidan dan enzim detoksifikasi. Regulasi antioksidan seluler dan antiinflamasi oleh Nrf2 berperan dalam pertahanan melawan stres oksidatif. Gangguan aktivasi Nrf2 pada hewan coba dapat melemahkan induksi gen yang mengkode antioksidan (82,93,96).

Stres oksidatif merupakan faktor penyebab dari banyak komplikasi diabetes, oleh karena itu para peneliti telah melakukan penelitian ekstensif tentang efek antioksidan dari berbagai zat, termasuk antioksidan dari natural produk untuk digunakan sebagai obat alternatif dalam mencegah kerusakan sel akibat stress oksidatif pada komplikasi diabetes (19,47,73). Untuk membuat komplikasi pada aorta tikus diabetes dapat dilakukan oleh banyak peneliti dengan menggunakan streptozotocin (57)

Pada hasil penelitian ini pemberian streptozocin secara intraperitoneal dapat menghambat ekspresi SOD dan GPx pada jaringan aorta yang berbeda bermakna, bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol pada $p < 0.05$. Hasil penelitian ini sesuai dengan laporan dari peneliti lain yang menunjukkan bahwa pemberian streptozotocin dapat menyebabkan hiperglikemia yang akan mengaktifasi *Protein kinase C* (PKC), peningkatan jalur heksosamin, peningkatan produk akhir glikasi (AGE), dan peningkatan jalur poliol, yang selanjutnya dapat meningkatkan pembentukan ROS dan menurunkan produksi antioksidan seperti SOD dan GPx sehingga dapat terjadi stress oksidatif (37,113). Streptozotocin melalui peningkatan

pembentukan ROS juga dapat menginaktivasi Nrf2 yang merupakan faktor transkripsi yang mengatur gen yang mengkode antioksidan dan enzim detoksifikasi sehingga dapat menyebabkan terjadinya penurunan antioksidan SOD dan GPx (93,95).

Pemberian nanopartikel fucoidan dosis 300 mg/kg BB secara oral pada model tikus diabetes dapat menghambat penurunan ekspresi SOD dan GPx jaringan ginjal dan aorta yang berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok tikus yang diinjeksi dengan streptozotocin pada $p < 0.05$. Fucoidan merupakan suatu substansi polisakarida yang dapat menghambat oksidasi molekul penting seperti protein, lemak, dan DNA yang diakibatkan oleh radikal bebas, yaitu dengan cara mendonorkan elektronnya sehingga bisa menghambat pembentukan radikal bebas dan menghambat terjadinya stres oksidatif, yang pada akhirnya dapat menghambat kerusakan pembuluh darah aorta terutama pada sel endothelium dalam keadaan diabetes (29,57,93). Hasil yang sama telah dibuktikan oleh Badalzadeh et al (2015) yang melaporkan bahwa pemberian troxerutin yang mempunyai efek antioksidan dapat menghambat penurunan kadar SOD dan GPx jaringan aorta pada tikus yang diinjeksi secara intraperitoneal dengan streptozotocin. Uslu et al (2018) membuktikan bahwa pemberian antioksidan ekstrak *Cinnamomum cassia* dapat menghambat penurunan kadar SOD dan GPx pada jaringan aorta dari tikus diabetes. Pemberian antioksidan chitosan juga dilaporkan oleh Wardani et al (2022) dapat menghambat penurunan kadar SOD dan GPx pada jaringan jantung tikus diabetes.

Bahan yang mempunyai efek antioksidan dapat menghambat terjadinya stres oksidatif melalui hambatannya pada pembentukan ROS sehingga terjadi

aktivasi Nrf2, dan dapat mengakibatkan peningkatan ekspresi SOD dan GPX. Zhang *et al* (2017) juga membuktikan bahwa pemberian antioksidan ekstrak proanthocyanidin dari biji anggur dapat menghambat penurunan kadar SOD dan GPx melalui hambatannya pada penurunan ekspresi Nrf2 jaringan urethra dari tikus diabetes.

6.1.6. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Ekspresi eNOS dan Kadar NO aorta pada rat yang diinduksi Streptozotocin

Endotelial Nitric oxid sintase (eNOS) dan nitric oxid (NO) mempunyai peran yang sangat penting sebagai regulator untuk mempertahankan fungsi dan kelangsungan hidup sel endothelium. Enzim eNOS diekspresikan oleh Gen NOS3 (nitrit oksida sintase-3). Enzim ini berperan pada produksi NO yang menimbulkan efek vasodilatasi pada pembuluh darah (123). Gen NOS3 adalah gen yang mengekspresikan senyawa Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS). Senyawa ini merupakan suatu enzim yang tersebar pada otot polos pembuluh darah. Enzim tersebut mengkatalisis reaksi asam amino L-arginin menjadi sitrulin dan *nitric oxide*. Senyawa NO merupakan suatu endothelium derived relaxing factor (EDRF) yang dalam kondisi fisiologis dilepaskan dari sel endothelium sebagai respon terhadap rangsangan mekanik, asetilkolin dan peningkatan kalsium intraseluler. Senyawa NO dapat menyebabkan vasodilatasi dan berperan sebagai regulator tonus otot polos pembuluh darah melalui aktivasi soluble guanylate cyclase (124–126).

Pada rat yang di injeksi secara intraperitoneal dengan streptozotocin menunjukkan adanya penurunan ekspresi eNOS dan kadar NO pada jaringan aorta yang berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol pada $p < 0.05$.

Hal ini karena penurunan sekresi insulin dan peningkatan kadar gula darah akibat pemberian streptozotocin dapat mengaktifkan jalur protein kinase C (PKC), jalur heksosamin, peningkatan produk akhir glikasi (AGE), dan peningkatan jalur poliol sehingga dapat terjadi peningkatan radikal bebas superoksida dan radikal hidroksil yang melalui peroksidasi lipid dapat bereaksi dengan PUFA sehingga terjadi peningkatan kadar MDA dan penurunan ekspresi SOD dan GPx melalui penurunan ekspresi NRF2 yang dapat menyebabkan kerusakan sel endothelium, yang selanjutnya dapat menginaktivasi eNOS dan menyebabkan turunnya produksi NO (64). Pada hiperglikemia dapat menyebabkan peningkatan radikal bebas anion superoksida yang berlebihan, yang dapat bereaksi dengan NO akan membentuk peroksinitrit yang toksik, dengan mengoksidasi kofaktor penting tetrahydrobiopterin (BH4) yang diperlukan untuk pembentukan eNOS, sehingga dapat menghambat pembentukan endothelial nitric oxide synthase (eNOS) dan dapat menurunkan produksi NO (34,124).

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel fucoidan secara oral dapat menghambat penurunan ekspresi eNOS dan kadar NO jaringan aorta pada tikus diabetes yang berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok streptozotocin pada $p < 0.05$. Telah dilaporkan bahwa antioksidan dapat digunakan untuk menghambat gangguan fungsi sel endothelium pembuluh darah pada diabetes melalui hambatannya pada peningkatan produksi ROS sehingga dapat menghambat peroksidasi lipid dan tidak terjadinya oksidasi pada lemak membran sel, yang dapat menghambat peningkatan kadar MDA dan menghambat penurunan ekspresi SOD dan GPx melalui hambatan penurunan ekspresi NRF2 yang selanjutnya dapat menghambat kerusakan sel endothelium.

Hal ini akan menyebabkan eNOS tetap aktif untuk menghasilkan NO dan vasodilatasi pembuluh darah (47,91). Efek antioksidan dari fucoidan yaitu dengan cara mendonorkan elektronnya pada radikal hidrosil sehingga bisa menghambat pembentukan radikal bebas dan menghambat terjadinya stres oksidatif. Hambatan stres oksidatif oleh fucoidan ikut berkontribusi terhadap hambatan disfungsi endotel melalui inaktivasi protein kinase C, hambatan jalur poliol, hexosamine dan jalur nuclear factor kappa B (NFkB), dan hambatan produk AGE yang dapat menyebabkan terjadi penurunan NADH/NADPH oxidase dan peningkatan ketersediaan tetrahydrobiopterin sehingga terjadi hambatan pembentukan radikal superoksida (O_2^-), yang pada akhirnya terjadi hambatan pembentukan oksidan peroxynitrite ($OONO^-$) dan tidak terjadi disfungsi endotel. Lebih lanjut eNOS tetap aktif untuk memproduksi NO (127).

Pemberian antioksidan merupakan usaha untuk menghambat produksi radikal bebas intraseluler atau meningkatkan kemampuan enzim pertahanan terhadap radikal bebas guna mencegah munculnya stres oksidatif dan komplikasi vaskular terkait diabetes. Berbagai macam suplemen yang mengandung antioksidan dan atau faktor yang dapat meningkatkan produksi NO berpotensi untuk memperbaiki disfungsi endotel dan fungsi mitokondria dalam sel, serta menurunkan aktifitas dari enzim NAD(P)H oksidase (35,127). Dalam kasus komplikasi makrovaskular/mikrovaskular pada penderita diabetes melitus, antioksidan dapat digunakan untuk menghambat pembentukan ROS dan dapat mencegah gangguan fungsi endothelium melalui hambatan penurunan aktivitas eNOS dan hambatan penurunan produksi NO (87,125). Uslu *et al* (2018) telah membuktikan bahwa pemberian antioksidan ekstrak *Cinnamomum cassia* dapat

menghambat penurunan ekspresi eNOS dan kadar NO pada tikus diabetes akibat injeksi streptozotocin secara intraperitoneal.

6.1.7. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Ekspresi cGMP Aorta pada Rat yang diinduksi Streptozotocin

Sel endotel memproduksi NO yang akan berdiffusi kedalam sel-sel otot polos pembuluh darah aorta dan mengaktivasi enzim *soluble guanylate cyclase* (sGC) yang dapat menyebabkan peningkatan pembentukan cyclic GMP dari prekursornya GTP. Cyclic GMP akan merangsang relaksasi otot sehingga akan terjadi vasodilatasi (128,129).

Hasil pada penelitian ini menunjukkan bahwa tikus diabetes akibat injeksi streptozotocin secara intraperitoneal dapat menyebabkan penurunan produksi cGMP. Hal ini karena streptozotocin dapat meningkatkan produksi ROS dan menurunkan pembentukan SOD dan GPx sehingga dapat menyebabkan stress oksidatif, yang selanjutnya dapat menginaktivasi eNOS dan menurunkan produksi NO sel endothelium, yang pada akhirnya dapat menginaktivasi guanil siklase dan dapat menghambat pembentukan cGMP sel otot polos pembuluh darah aorta (130). Laporan penelitian sebelumnya yang ditunjukkan oleh Zhang *et al.*, (2018) yaitu injeksi streptozotocin secara intraperitoneal dapat menurunkan kadar cGMP pada jaringan urethra tikus. Kondisi stres oksidatif yang disebabkan oleh streptozotocin berkontribusi terhadap terjadinya disfungsi endotel melalui aktivasi *Protein Kinase C*, jalur poliol, jalur hexosamine dan jalur *Nuclear Factor kappa B* (NFkB), dan peningkatan produk AGE yang dapat menyebabkan terjadi peningkatan NADH/NADPH oxidase dan penurunan ketersediaan tetrahydrobiopterin sehingga terjadi peningkatan pembentukan radikal superoksida (O_2^-), yang bereaksi dengan eNOS dan akhirnya terjadi peningkatan pembentukan oksidan peroxynitrite

(OONO⁻) yang sangat toksik terhadap sel endothelium. Selanjutnya terjadi disfungsi endotel dan terjadi penurunan pembentukan NO yang dapat menyebabkan inaktivasi soluble guanil siklase sehingga terjadi hambatan pembentukan cGMP (31,97,131).

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel fucoidan secara oral dapat menghambat penurunan ekspresi cGMP jaringan aorta pada tikus diabetes yang berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol streptozotocin pada $p < 0.05$. Telah dilaporkan bahwa pemberian antioksidan eksogen dapat menghambat penurunan pembentukan NO dan penurunan produksi c GMP sehingga dapat terjadi vasodilatasi aorta (88,132). Pada hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa pemberian antioksidan nanopartikel fucoidan dengan donor elektronnya dapat menghambat pembentukan radikal bebas anion superoksida dan menghambat reaksi superoksida dengan NO yang akan menghambat pembentukan peroksinitrit yang toksik terhadap sel endothelium. Disamping itu juga tidak terjadi oksidasi kofaktor penting tetrahydrobiopterin yang diperlukan untuk pembentukan eNOS, sehingga pada akhirnya pembentukan *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) meningkat dan dapat meningkatkan produksi NO di sel endothelium. NO akan mengaktifasi solubel guanil siklase sehingga terjadi peningkatan pembentukan cGMP pada sel otot polos pembuluh darah aorta (97). Juga telah dilaporkan bahwa pemberian antioksidan ekstrak proanthocyanidin dari biji anggur dapat menghambat penurunan produksi cGMP melalui hambatannya terhadap penurunan kadar NO pada jaringan urethra tikus diabetes (47). Yeohi *et al* (2019) membuktikan bahwa pemberian antioksidan

Stingless Bees dapat meningkatkan relaksasi aorta yang tergantung endothelium melalui peningkatan pembentukan NO dan cGMP.

6.1.8. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Respon Relaksasi Ach terhadap Kontraksi Norepinefrin pada Aorta Rat yang diinduksi Streptozotocin

Sel endotel merupakan suatu struktur yang melapisi lumen internal semua pembuluh darah dan berfungsi sebagai penghubung antara darah dalam sirkulasi dan *Vascular Smooth Muscle Cells* (VSMC). Struktur dinamik ini dapat secara aktif mengatur relaksasi dan kontraksi otot polos pembuluh darah dalam kondisi fisiologis dan patologis. Ach dapat menyebabkan relaksasi otot polos pembuluh darah (Vasodilatasi) aorta tergantung dengan adanya sel endothelium, karena pemberian Ach dapat mengaktivasi eNOS sehingga terjadi peningkatan pembentukan NO pada sel endothelium, yang selanjutnya dapat mengaktivasi soluble guanil siklase dan terjadi peningkatan pembentukan cGMP yang dapat menyebabkan vasodilatasi (53,88). Ach dapat digunakan untuk membuktikan terjadinya disfungsi sel endothelium. Pada diabetes terjadi hambatan respon relaksasi Ach karena adanya disfungsi sel endothelium (133,134). Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian streptozotocin dapat menghambat respon relaksasi dari Ach terhadap kontraksi dari norepinefrin yang berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol pada $p < 0.05$. Hal ini karena streptozotocin dapat menimbulkan terjadinya stress oksidatif karena adanya peningkatan produksi ROS dan penurunan antioksidan. Selanjutnya dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel endothelium dan menurunnya produksi NO

sehingga dapat menghambat respon relaksasi Ach terhadap kontraksi Norepinephrin. Pada diabetes, hambatan respon relaksasi otot polos pembuluh darah (vasodilatasi) dari Ach dapat disebabkan oleh adanya peningkatan kadar radikal bebas superoksida melalui beberapa jalur seperti autooksidasi glukosa, peningkatan penggunaan jalur poliol dan glikasi protein (135,136) yang dapat menghambat respon relaksasi yang tergantung adanya sel endothelium. Peningkatan radikal bebas terutama superoksida dan hidroksil dapat menimbulkan kerusakan sel endothelium yang dapat menghambat pembentukan NO. Disamping itu superoksida juga dapat bereaksi dengan NO sehingga dapat mereduksi ketersediaan NO untuk respon relaksasi dan peningkatan ONOO⁻ adalah toksik terhadap endothelium yang dilaporkan dapat menginaktivasi eNOS dan dapat menghambat pembentukan NO. Selanjutnya dapat menginaktivasi soluble guanil siklase sehingga dapat menghambat pembentukan cGMP dan dapat menghambat vasodilatasi pembuluh darah (67).

Endotel berfungsi untuk memelihara homeostasis pembuluh darah melalui mediator nitric oxide atau EDRF yang menyebabkan relaksasi (vasodilatasi) dan EDCF yang dapat menyebabkan kontraksi (Vasokonstriksi) otot polos pembuluh darah. Pada hasil penelitian ini pemberian antioksidan nanopartikel fucoidan dapat menyebabkan peningkatan respon relaksasi dari Ach terhadap kontraksi dari norepinephrin pada pembuluh darah aorta tikus diabetes yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok Streptozotocin pada $p < 0.05$. Hal ini karena nanopartikel fucoidan bekerja dengan cara mendonorkan elektronnya sehingga bisa menghambat pembentukan radikal bebas, menghambat penurunan ekspresi SOD, menghambat penurunan ekspresi GPx dan menghambat terjadinya stres oksidatif,

yang berkontribusi terhadap hambatan kerusakan sel endothelium, disamping itu Nanopartikel Fucoidan juga dapat menghambat peningkatan kadar gula darah sehingga dapat menginaktivasi protein kinase C, hambatan jalur poliol, hexosamine dan jalur *Nuclear Factor kappa B* (NFkB), dan hambatan produk AGE yang dapat menyebabkan terjadi penurunan NADH/NADPH oxidase dan peningkatan ketersediaan tetrahydrobiopterin sehingga terjadi hambatan pembentukan radikal superoksida (O_2^-), yang pada akhirnya terjadi hambatan pembentukan oksidan peroxynitrite ($OONO^-$) dan tidak terjadi kerusakan sel endothelium (137). Lebih lanjut eNOS tetap aktif untuk memproduksi NO yang selanjutnya dapat mengaktivasi soluble guanil siklase sehingga dapat menghambat penurunan pembentukan cGMP dan dapat menghambat vasokonstriksi pembuluh darah. Uslu et al (2018) juga melaporkan bahwa pemberian antioksidan ekstrak *Cinnamomum cassia* juga dapat meningkatkan respon relaksasi dari Ach terhadap kontraksi dari phenylephrine pada jaringan aorta tikus diabetes akibat pemberian streptozotocin. Hasil yang sama juga terjadi pada pemberian antioksidatif propolis dari *Heterotrigona itama* pada rat diabetes dapat menghambat penurunan respon relaksasi dari acetylcholine yang tergantung adanya endothelium terhadap kontraksi dari phenylephrine pada pembuluh darah aorta yang bekerja dengan cara menghambat penurunan produksi NO dan cGMP (88). Ali and Woodman (2019) membuktikan bahwa pemberian antioksidan Tocomin dapat meningkatkan respon relaksasi Ach pada kontraksi norepinephrin melalui peningkatan ekspresi eNOS dan peningkatan bioavailabilitas NO pada aorta rat diabetes.

6.1.9. Pengaruh Pemberian Nanopartikel Fucoidan terhadap Diameter Lumen Aorta pada Rat yang diinduksi Streptozotocin

Dinding pembuluh darah aorta terdiri atas serat jaringan elastik. Serat ini memberi kelenturan dan daya regang sewaktu darah mengalir. Peningkatan atau penurunan diameter menunjukkan adanya vasokonstriksi atau vasodilatasi pembuluh darah aorta yang dapat menyebabkan penyempitan atau pelebaran diameter lumen aorta (29,39). Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rat yang di injeksi streptozotocin secara intraperitoneal dapat menyebabkan terjadinya penurunan (penyempitan) diameter pembuluh darah aorta (vasokonstriksi) yang bermaknan bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol pada $p < 0.05$. Hal ini dikarenakan streptozotocin dapat mengaktifkan jalur poliol, heksosamine, PKC dan peningkatan produk akhir glikasi (AGE), yang selanjutnya dapat meningkatkan pembentukan ROS dan menurunkan produksi antioksidan seperti SOD dan GPx sehingga dapat terjadi stress oksidatif. Meningkatnya ROS pada stress oksidatif dapat menyebabkan lipid peroksidasi pada membrane sel endothelium sehingga dapat terbentuk MDA dan terjadi nekrosis pada sel endothelium yang pada akhirnya dapat menghambat pembentukan NO. Menurunnya produksi NO akan mengakibatkan inaktivasi solibel guanil siklase dan terjadi hambatan perubahan guanosin trifosfat (GTP) menjadi guanosin siklik 3', 5' monofosfatn(cGMP), yang pada gilirannya menghambat langsung relaksasi otot polos pembuluh darah aorta sehingga terjadi penyempitan lumen diameter (vasokonstriksi) aorta (125). Sebaliknya pada pemberian nanopartikel fucoidan hanya pada dosis 300 mg/kg BB dapat meningkatkan (melebarkan) lumen aorta pada tikus yang diinjeksi Streptozotocin berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok Kontrol Streptozotocin

pada $p < 0.05$. Telah dilaporkan bahwa fucoidan mempunyai efek antioksidan yang kuat yang dapat menghambat terjadinya proses lipid peroksidasi karena dapat menangkap ROS pada tikus diabetes sehingga dapat mencegah kerusakan sel endothelium dan eNOS tetap aktif untuk merubah L arginin menjadi NO. NO yang tetap terbentuk ini dapat mengaktifkan soluble guanil siklase dalam memproduksi c GMP dan menyebabkan pelebaran lumen pembuluh darah (vasodilatasi) pada aorta tikus diabetes. Hasil ini didukung oleh hasil penelitian Ali and woodman (2019) yang melaporkan bahwa pemberian antioksidan tocomin pada rat diabetes dapat menghambat terjadinya disfungsi sel endothelium sehingga pembentukan NO tetap meningkat dan dapat mengaktifkan guanil siklase untuk menghasilkan cGMP, yang pada akhirnya dapat menyebabkan vasodilatasi (peningkatan diameter lumen aorta).

6.1.10. Temuan Baru

Temuan baru pada penelitian ini adalah Fucoidan dapat dibuat sediaan dalam bentuk nanopartikel dengan ukuran 201.8 ± 14.6 nm, yang sebelumnya distribusi ukuran serbuk fucoidan adalah 986.4 ± 54.6 nm. Hasil ini sesuai dengan standard pembuatan sediaan obat dalam bentuk nanopartikel yaitu ukurannya antara 100 - 300 nm yang dapat meningkatkan absorpsi, distribusi dan efektifitas obat.

Pemberian Nanopartikel Fucoidan yang berpengaruh signifikan dan yang paling efektif adalah dosis 300 mg/Kg BB dalam menghambat peningkatan kadar gula darah, kadar MDA, dan menghambat penurunan kadar insulin, ekspresi Nrf2, SOD, GPx, eNOS, kadar NO, ekspresi cGMP, respon relaksasi Ach pada kontraksi NE dan diameter aorta rat yang diinduksi dengan Streptozotocin.

Pada penelitian ini ditemukan jalur signal transduksi dari pemberian nanopartikel fucoidan dalam melindungi kerusakan aorta rat yang diinduksi dengan Streptozotocin yaitu Pemberian Nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar insulin dan menghambat peningkatan kadar gula darah. Hambatan peningkatan kadar glukosa darah ini dapat menghambat peningkatan kadar ROS dan MDA, yang dapat menghambat penurunan ekspresi Nrf2, selanjutnya dapat menghambat penurunan ekspresi SOD dan ekspresi GPx.. Hambatan peningkatan kadar MDA, hambatan penurunan ekspresi SOD dan hambatan penurunan ekspresi GPx akibat pemberian Nanopartikel Fucoidan ini dapat menyebabkan hambatan kerusakan sel endothelium aorta yang dapat menghambat penurunan ekspresi eNOS, sehingga eNOS tetap aktif untuk merubah citrulin menjadi NO, yang selanjutnya NO ini akan mengaktivasi siklik guanilsiklase untuk merubah GTP menjadi cGMP pada otot polos pembuluh darah aorta. Peningkatan produksi cGMP pada aorta akibat pemberian Nanopartikel Fucoidan ini ditandai dengan adanya hambatan penurunan respon relaksasi Ach terhadap kontraksi Norepinephrin pada aorta rat yang diinduksi dengan streptozotocin, yang juga menunjukkan adanya hambatan terjadinya kerusakan sel endothelium akibat pemberian streptozotocin. Pada akhirnya Nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan respon relaksasi Ach terhadap kontraksi Norepinephrin yang selanjutnya dapat menyebabkan hambatan penurunan diameter lumen aorta atau dapat menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia yang diinduksi dengan Streptozotocin.

6.1.11. Keterbatasan Penelitian

Untuk menyempurnakan signal transduksi nanopartikel fucoidan dalam melindungi pembuluh darah aorta akibat pemberian streptozotocin ini maka pada penelitian ini masih ada keterbatasan sehingga belum bisa dilaksanakan penelitian yang terkait dengan signal transduksi nanopartikel Fucoidan yang diantaranya adalah

1. Penelitian signal transduksi Nanopartikel Fucoidan dalam melindungi pembuluh darah aorta akibat pemberian streptozotocin melalui jalur inflamasi, karena jalur inflamasi melalui COX, IL-6, TNF- α , Nf κ B mempunyai peran penting pada kerusakan pembuluh darah aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia. Penelitian signal transduksi Nanopartikel Fucoidan fucoidan dalam melindungi pembuluh darah aorta akibat pemberian streptozotocin melalui jalur apoptosis dengan melakukan pemeriksaan fragmentasi DNA, p53, Bax, BC12, Caspase 3 yang berperan penting terjadinya apoptosis pada pembuluh darah aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
2. Penelitian signal transduksi Nanopartikel Fucoidan dalam melindungi aterosklerosis pada pembuluh darah aorta akibat pemberian streptozotocin dengan melakukan pemeriksaan L-selektin, integrin, platelet endothelial-cell adhesion molecule (PECAM)-1, intraceluler cell adhesion molecule (ICAM1) dan vascular-cell adhesion molecule (VCAM-1) yang berperan penting terjadinya aterosklerosis pada pembuluh darah aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemi

6.2 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian pada disertasi adalah sebagai berikut:

1. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar insulin pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
2. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat peningkatan kadar gula darah pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
3. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat peningkatan Kadar ROS pada endothelium aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
4. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat peningkatan Kadar MDA pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
5. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan ekspresi SOD pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
6. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan ekspresi GPx pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
7. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar eNOS pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
8. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar NO pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
9. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan kadar cGMP pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
10. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan respon Ach terhadap kontraksi Noerrefinefrin pada aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
11. Pemberian nanopartikel Fucoidan dapat menghambat penurunan diameter

lumen aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia

6.3. Saran

Saran dari penelitian pada disertasi adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian Nanopartikel Fucoidan dengan melakukan pemeriksaan COX, IL-6, TNF alfa, NFK beta pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
2. Perlu dilakukan penelitian Nanopartikel Fucoidan dengan melakukan pemeriksaan fragmentasi DNA, p53, Bax, Bcl2, Caspase 3 yang berperan pada apoptosis pembuluh darah aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia
3. Perlu dilakukan penelitian Nanopartikel Fucoidan dengan melakukan pemeriksaan L-selektin, integrin, platelet endothelial-cell adhesion molecule (PECAM)-1, intraceluler cell adhesion molecule (ICAM1) dan vascular-cell adhesion molecule (VCAM-1) yang berperan penting terjadinya atherosclerosis pada pembuluh darah aorta tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia

DAFTAR PUSTAKA

1. Bikkad MD, Somwanshi SD, Ghuge SH, Nagane NS. Oxidative stress in type II diabetes mellitus. *Biomed Res.* 2014;25(1):84–7.
2. Aouacheri O, Saka S, Krim M, Messaadia A, Maida I. The Investigation of the Oxidative Stress-Related Parameters in Type2 Diabetes Mellitus. *Can J Diabetes [Internet]*. 2015;39(1):44–9. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcjd.2014.03.002>
3. Busik J V., Mohr S, Grant MB. Hyperglycemia-Induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes.* 2008;57(7):1952–65.
4. Rogers SC, Ross JGC, D'Avignon A, Gibbons LB, Gazit V, Hassan MN, et al. Sickle hemoglobin disturbs normal coupling among erythrocyte O₂ content, glycolysis, and antioxidant capacity. *Blood [Internet]*. 2013;121(9):1651–62. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-02-414037>
5. Kumawat M, Sharma TK, Singh I, Singh N, Ghalaut VS, Vardey SK, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus patients with and without nephropathy. *N Am J Med Sci.* 2013;5(3):213–9.
6. Coppey LJ, Gallett JS, Davidson EP, Dunlap JA, Lund DD, Yorek MA. Effect of Antioxidant Treatment of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats on Endoneurial Blood Flow, Motor Nerve Conduction Velocity, and Vascular Reactivity of Epineurial Arterioles of the Sciatic Nerve. *Diabetes.* 2001;50(8):1927–37.

7. JP Y, S K. Characterization and Antibacterial Activity of Synthesized Silver and Iron Nanoparticles using Aloe vera. *J Nanomed Nanotechnol.* 2016;7(3).
8. Alyautdin R, Khalin I, Nafeeza MI, Haron MH, Kuznetsov D. Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine.* 2014;9(1):795–811.
9. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects 10 *Technology 1007 Nanotechnology 03 Chemical Sciences 0306 Physical Chemistry (incl. Structural) 03 Chemical Sciences 0303 Macromolecular and Materials Chemistry 11 Medical and He. J Nanobiotechnology [Internet].* 2018;16(1):1–33. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
10. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab J Chem [Internet].* 2019;12(7):908–31. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
11. Röhlig M, Stachs O, Schumann H. Detection of Diabetic Neuropathy - Can Visual Analytics Methods Really Help in Practice? *EuroRV3 2016 - EuroVis Work Reprod Verif Valid Vis.* 2016;19–21.
12. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharm J [Internet].* 2016;24(5):547–53. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>
13. Chandra K, Singh P, Dwivedi S, Jain S. Diabetes Mellitus and Oxidative Stress: A Co-relative and Therapeutic Approach. *J Clin Diagnostic Res.*

- 2019;(May).
14. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107(9):1058–70.
 15. Harding JL, Pavkov ME, Magliano DJ, Shaw JE, Gregg EW. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia*. 2019;62(1):3–16.
 16. Dzugkoeva FS, Mozhaeva I V., Dzugkoev SG, Margieva OI, Tedtoeva AI, Otiev MA. Oxidative stress and biochemical markers of endothelial dysfunction and organ damage under conditions of experimental nonferrous metal intoxication. *Bull Exp Biol Med*. 2016;162(2):199–202.
 17. Bigagli E, Lodovici M. Circulating oxidative stress biomarkers in clinical studies on type 2 diabetes and its complications. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.
 18. Ito S. High-intensity interval training for health benefits and care of cardiac diseases - The key to an efficient exercise protocol. *World J Cardiol*. 2019;11(7):171–88.
 19. Ghasemi-Dehnoo M, Amini-Khoei H, Lorigooini Z, Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and antioxidants in diabetes mellitus. *Asian Pac J Trop Med*. 2020;13(10):431–8.
 20. Apostolova LG, Di LJ, Duffy EL, Brook J, Elashoff D, Tseng CH, et al. Risk factors for behavioral abnormalities in mild cognitive impairment and mild alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2014;37(5–6):315–26.
 21. Sommerer C, Witzke O, Lehner F, Arns W, Reinke P, Eisenberger U, et al.

- Onset and progression of diabetes in kidney transplant patients receiving everolimus or cyclosporine therapy: An analysis of two randomized, multicenter trials. *BMC Nephrol.* 2018;19(1):1–13.
22. Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N. Potential applications of antioxidants – A review. *J Pharm Res.* 2013;7(9):828–35.
 23. Chikezie PC. Overview of Anti-Diabetic Medicinal Plants: The Nigerian Research Experience. *J Diabetes Metab.* 2015;06(06).
 24. Ceriello A, Testa R, Genovese S. Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis [Internet].* 2016;26(4):285–92. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2016.01.006>
 25. Atashrazm F, Lowenthal RM, Woods GM, Holloway AF, Dickinson JL. Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Mar Drugs.* 2015;13(4):2327–46.
 26. Shan X, Liu X, Hao J, Cai C, Fan F, Dun Y, et al. In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. *Int J Biol Macromol [Internet].* 2016;82(February 2021):249–55. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.036>
 27. Phull AR, Majid M, Haq I ul, Khan MR, Kim SJ. In vitro and in vivo evaluation of anti-arthritic, antioxidant efficacy of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. *Int J Biol Macromol.* 2017;97:468–80.
 28. Zayed A, Ulber R. Fucoidan production: Approval key challenges and opportunities. *Carbohydr Polym [Internet].* 2019;211:289–97. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.105>

29. Luthuli S, Wu S, Cheng Y, Zheng X, Wu M, Tong H. marine drugs Therapeutic Effects of Fucoidan : A Review on Recent Studies. Mdpi. 2019;
30. World Health Organization. Global Report on Diabetes. Isbn [Internet]. 2016;978:88. Tersedia pada:
http://www.who.int/about/licensing/%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf
31. Richardo B, Pengemanan D, Mayulu N. Kejadian Diabetes Mellitus Tipe II pada Lanjut Usia di Indonesia (Analisis Riskesdas 2018). J Kedokt dan Kesehatan. 2021;17(1):9–20.
32. Birben E, Sahiner U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense Mechanism in. Science (80-) [Internet]. 1997;22(96):161–8. Tersedia pada:
<https://waojournal.biomedcentral.com/track/pdf/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
33. Chukwuma IF, Nkwocha CC, Ezeanyika LUS, Ogugua VN. Phytochemical investigation and in vitro antioxidant potency of root bark of brenania brieyi fractions. Trop J Nat Prod Res. 2020;4(11):970–5.
34. Gerber PA, Rutter GA. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. Antioxidants Redox Signal. 2017;26(10):501–18.
35. Aleissa MS, Alkahtani S, Abd Eldaim MA, Ahmed AM, Bungău SG, Almutairi B, et al. Fucoidan Ameliorates Oxidative Stress, Inflammation, DNA Damage, and Hepatorenal Injuries in Diabetic Rats Intoxicated with

- Aflatoxin B1. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020.
36. Dizdaroglu M, Coskun E, Jaruga P. Measurement of oxidatively induced DNA damage and its repair, by mass spectrometric techniques. *Free Radic Res* [Internet]. 2015;49(5):525–48. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2015.1014814>
 37. Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications review-Article. *Cell Death Dis*. 2018;9(2).
 38. Mistry RJ, Klamt F, Ramsden DB, Parsons RB. Nicotinamide N-methyltransferase expression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells decreases oxidative stress. *J Biochem Mol Toxicol*. 2020;34(3).
 39. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(3):140–62.
 40. Noyman I, Marikovsky M, Sasson S, Stark AH, Bernath K, Seger R, et al. Hyperglycemia reduces nitric oxide synthase and glycogen synthase activity in endothelial cells. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2002;7(3):187–93.
 41. Cohen S, Janicki-Deverts D, Miller GE. Psychological stress and disease. *Jama*. 2007;298(14):1685–7.
 42. Mandal S, Mallick N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;84(2):281–91.
 43. Sellamuthu PS, Arulselvan P, Muniappan BP, Fakurazi S, Kandasamy M. Mangiferin from *Salacia chinensis* prevents oxidative stress and protects

- pancreatic β -cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food*. 2013;16(8):719–27.
44. Wongeakin N, Sridulyakul P, Jariyapongskul A, Suksamrarn A, Patumraj S. Effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on diabetes induced endothelial dysfunction. 2009;3(5):259–65.
45. Mannucci C, Casciaro M, Sorbara EE, Calapai F, Di Salvo E, Pioggia G, et al. Nutraceuticals against oxidative stress in autoimmune disorders. *Antioxidants*. 2021;10(2):1–25.
46. Wardani WW, Alimuddin A, Zairin M, Setiawati M, Nuryati S, Suprayudi MA. Evaluation of cysteamine supplementation in red tilapia (*Oreochromis sp.*) diet: Serum insulin and somatostatin, IGF-1 and GLUT4 genes expression, growth performance, and robustness against stress. *Aquaculture* [Internet]. 2020;528:735514. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735514>
47. Zhang J, Zheng S, Wang S, Liu Q, Xu S. Cadmium-induced oxidative stress promotes apoptosis and necrosis through the regulation of the miR-216a-PI3K/AKT axis in common carp lymphocytes and antagonized by selenium. *Chemosphere* [Internet]. 2020;258:127341. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127341>
48. Salazar-García DC, Power RC, Rudaya N, Kolobova K, Markin S, Krivoshapkin A, et al. Dietary evidence from Central Asian Neanderthals: A combined isotope and plant microremains approach at Chagyrskaya Cave (Altai, Russia). *J Hum Evol* [Internet]. 2021;156:102985. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2021.102985>

49. Gupta S, Abu-Ghannam N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2011;22(6):315–26. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.011>
50. Maneesh A, Chakraborty K, Makkar F. Pharmacological activities of brown seaweed *Sargassum wightii* (Family Sargassaceae) using different in vitro models. *Int J Food Prop* [Internet]. 2017;20(4):931–45. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2016.1189434>
51. Shannon E, Abu-Ghannam N. Seaweeds as nutraceuticals for health and nutrition. *Phycologia* [Internet]. 2019;58(5):563–77. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1080/00318884.2019.1640533>
52. Ajisaka K, Yokoyama T, Matsuo K. Structural Characteristics and Antioxidant Activities of Fucoidans from Five Brown Seaweeds. *J Appl Glycosci*. 2016;63(2):31–7.
53. Kordjazi M, Shabanpour B, Zabihi E, Faramarzi MA, Ahmadi Gavlighi H, Feghhi SMA, et al. Investigation of effects of fucoidan polysaccharides extracted from two species of *Padina* on the wound-healing process in the rat. *Turkish J Vet Anim Sci*. 2017;41(1):106–17.
54. Yong H, Wang X, Zhang X, Liu Y, Qin Y, Liu J. Effects of anthocyanin-rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film. *Food Hydrocoll*. 2019;94:93–104.
55. Wolfe KL, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, Liu RH. Cellular antioxidant activity of common fruits. *J Agric Food Chem*. 2008;56(18):8418–26.
56. Atashrazm F, Lowenthal RM, Woods GM, Holloway AF, Dickinson JL,

- Luthuli S, et al. Senyawa-Senyawa Bioaktif Pada Rumput Laut Cokelat *Sargassum Sp.* : Ulasan Ilmiah. *J Teknol Pertan* [Internet]. 2019;97(2):2327–46. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.051>
57. Luo P, Wang MH. Eicosanoids, β -cell function, and diabetes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* [Internet]. 2011;95(1–4):1–10. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2011.06.001>
58. Raad Shakir B, Mohamed Ibrahim S, Ibrahim Jessim A. Detection and determination of Butylated Hydroxyl Toluene (BHT) in imported milk for adults and infants at Baghdad city. *Int J Adv Res* [Internet]. 2015;3(4):1178–85. Tersedia pada: <http://www.journalijar.com>
59. Kim HJ, Vaziri ND. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2010;298(3):662–71.
60. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(AUG):1–12.
61. Chen J, Wang W, Tang Y, Huang XR, Yu X, Lan HY. Inflammatory stress in sars-cov-2 associated acute kidney injury. *Int J Biol Sci*. 2021;17(6):1497–506.
62. Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: Current status. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2006;290(1).
63. Wang-Gillam A, Li CP, Bodoky G, Dean A, Shan YS, Jameson G, et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic

- pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): A global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2016;387(10018):545–57.
64. Lee KP, Sudjarwo GW, Jung SH, Lee D, Lee DY, Lee GB, et al. Carvacrol inhibits atherosclerotic neointima formation by downregulating reactive oxygen species production in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* [Internet]. 2015;240(2):367–73. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.038>
65. Mizukami H, Osonoi S. Pathogenesis and molecular treatment strategies of diabetic neuropathy collateral glucose-utilizing pathways in diabetic polyneuropathy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(1):1–13.
66. Aminzadeh MA, Nicholas SB, Norris KC, Vaziri ND. Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(8):2038–45.
67. Brahmanaidu P, Uddandrao VVS, Sasikumar V, Naik RR, Pothani S, Begum MS, et al. Reversal of endothelial dysfunction in aorta of streptozotocin-nicotinamide-induced type-2 diabetic rats by S-Allylcysteine. *Mol Cell Biochem*. 2017;432(1–2):25–32.
68. Wardani G, Eraiko K, Koerniasari, Sudjarwo SA. Protective activity of chitosan nanoparticle against cadmium chloride induced gastric toxicity in rat. *J Young Pharm*. 2018;10(3):303–7.
69. Aryantini D, Sari F, Juleha. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Aktif Terstandar Flavonoid dari Daun Belimbing

- WULUH (*Averrhoa bilimbi* L .). J Wiyata. 2017;4(2):143–50.
70. Delie F, Blanco-Príeto MJ. Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules*. 2005;10(1):65–80.
71. Kotsuchibashi Y, Nakagawa Y, Ebara M. Nanoparticles. *Biomater Nanoarchitectonics*. 2016;5(June):7–23.
72. Behl M, Lendlein A. Shape-memory polymers. *Mater Today* [Internet]. 2007;10(4):20–8. Tersedia pada: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(07\)70047-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(07)70047-0)
73. Sharifi-Rad M, Anil Kumar N V., Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol*. 2020;11(July):1–21.
74. Rollando. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi Hasil Fermentasi Fungi Endofit Genus *Cephalosporium* sp . Diisolasi Dari Daun Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn .). J Wiyata. 2016;3(1):5–10.
75. Uslu S, Kebapçı N, Kara M, Bal C. Relationship between adipocytokines and cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Exp Ther Med*. 2012;4(1):113–20.
76. Ruiz-Ramos M, Escolar-Pujolar A, Mayoral-Sánchez E, Laureano FCS, Fernández-Fernández I. La diabetes mellitus en España: Mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades. *Gac Sanit* [Internet]. 2006;20(SUPPL. 1):15–24. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1157/13086022>
77. Yaribeygi H, Sathyapalan T, Atkin SL, Sahebkar A. Molecular

- Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020.
78. Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018;108(August):656–62. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.058>
79. Jebur A, Mokhamer M, El-Demerdash F. A Review on Oxidative Stress and Role of Antioxidants in Diabetes Mellitus. *Austin Endocrinol Diabetes Case Reports*. 2016;1(1):1006.
80. Sibero MT, Siswanto AP, Pribadi R, Sabdono A, Radjasa OK, Trianto A, et al. The effect of drying treatment to metabolite profile and cytotoxic potential of rhizophora apiculata leaves. *Biodiversitas*. 2020;21(5):2180–7.
81. Bien J, Sokolova O, Bozko P, Lutfia A, Munir E, Yurnaliza Y, et al. Thermostability of a marine polyphenolic antioxidant dieckol, derived from the brown seaweed *Ecklonia cava*. *Biodiversitas*. 2020;52(6):1–13.
82. Friedmann Angeli JP, Meierjohann S. NRF2-dependent stress defense in tumor antioxidant control and immune evasion. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2021;34(2):268–79.
83. Deng L, Du C, Song P, Chen T, Rui S, Armstrong DG, et al. Molecular Mechanisms of Dietary Bioactive Compounds in Redox Balance and Metabolic Disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021(Figure 1):1–11.
84. Fern D, Mielgo-ayuso J. Supplementation in a Physically Active Population :
85. Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2019;178:687–704.

- Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
86. Sonta T, Inoguchi T, Tsubouchi H, Sekiguchi N, Kobayashi K, Matsumoto S, et al. Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(1):115–23.
 87. Mishra R, Singh Bisht S. Antioxidants and their charecterization. *J Pharm Res [Internet]*. 2011;4(8):2744–6. Tersedia pada: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/antioxidants.html>
 88. Yeoh E, Choudhary P, Nwokolo M, Ayis S, Amiel SA. Interventions that restore awareness of hypoglycemia in adults with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2015;38(8):1592–609.
 89. Wardani G, Ernawati, Eraiko K, Sudjarwo SA. The role of antioxidant activity of chitosan- pinus merkusii extract nanoparticle in against lead acetate-induced toxicity in rat pancreas. *Vet Med Int*. 2019;2019.
 90. Paunkov A, Chartoumpekis D V., Ziros PG, Sykiotis GP. A bibliometric review of the Keap1/Nrf2 pathway and its related antioxidant compounds. *Antioxidants*. 2019;8(9):1–16.
 91. Keskin O, Gursoy A, Ma B, Nussinov R, Aviv T. Cr040409X.Pdf. 2008;(301).
 92. Wardani G, Nugraha J, Mustafa MR, Kurnijasanti R, Sudjarwo SA. Antioxidative Stress and Antiapoptosis Effect of Chitosan Nanoparticles to Protect Cardiac Cell Damage on Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022.
 93. Wardani G, Nugraha J, Mustafa MR, Sudjarwo SA. Antioxidative Stress

- and Anti-Inflammatory Activity of Fucoidan Nanoparticles against Nephropathy of Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. Evidence-based Complement Altern Med. 2022;2022.
94. Ho E, Karimi Galouhahi K, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol* [Internet]. 2013;1(1):483–91. Tersedia pada: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.006>
 95. Alaofi AL. Sinapic Acid Ameliorates the Progression of Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetic Nephropathy in Rats via NRF2/HO-1 Mediated Pathways. *Front Pharmacol*. 2020;11(July):1–11.
 96. Vargas-Mendoza N, Morales-González Á, Madrigal-Santillán EO, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, García-Melo LF, et al. Antioxidant and adaptative response mediated by Nrf2 during physical exercise. *Antioxidants*. 2019;8(6).
 97. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. 2017;120(4):713–35.
 98. Sudjarwo GW, Farida N. EFEKTIFITAS NEPHROPROTEKTOR EKSTRAK RUMPUT LAUT MERAH (*Eucheuma cottonii*) PADA MENCIT YANG DIINDUKSI DENGAN LOGAM BERAT TIMBAL. *J Pharm Sci Technol*. 2021;1(1):59–67.
 99. Lemeshow S, Hosmer DW, Klar J, Lwanga SK. Adequacy of Sample Size in Health Studies. World Health Organization. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 1990.
 100. Comhaire F, Zalata A, Mahmoud A, Depuydt C, Dhooghe W, Christophe

- A. The role of reactive oxygen species and antioxidants in male infertility. *Tijdschr Geneeskd.* 2000;56(6):433–7.
101. Vassalle L, Passos F, Rosa-Machado AT, Moreira C, Reis M, Pascoal de Freitas M, et al. The use of solar pre-treatment as a strategy to improve the anaerobic biodegradability of microalgal biomass in co-digestion with sewage. *Chemosphere.* 2022;286.
102. Unnikrishnan B, Lien CW, Chu HW, Huang CC. A review on metal nanozyme-based sensing of heavy metal ions: Challenges and future perspectives. *J Hazard Mater [Internet].* 2021;401:123397. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123397>
103. Badalzadeh R, Mokhtari B, Yavari R. Contribution of apoptosis in myocardial reperfusion injury and loss of cardioprotection in diabetes mellitus. *J Physiol Sci.* 2015;65(3):201–15.
104. Mohebbati R, Khazdair MR, Karimi S, Abbasnezhad A. Hepatoprotective Effects of Combination Hydroalcoholic Extracts of *Nigella Sativa* and *Curcuma Longa* on Adriamycin-Induced Oxidative Stress in Ratpolyamines Improve Anti-Blood Lactate Accumulation in an Acidosis Rat Model. *J Reports Pharm Sci.* 2017;6(2):105–14.
105. Ohiagu FO, Chikezie PC, Chikezie CM, Enyoh CE. Anticancer activity of Nigerian medicinal plants: a review. *Futur J Pharm Sci.* 2021;7(1).
106. R. O, L. N, O. O. Oxidative Stress and Diabetic Complications: The Role of Antioxidant Vitamins and Flavonoids. *Antioxidant-Antidiabetic Agents Hum Heal.* 2014;
107. Aiswarya Lakshmi A.G, Rakesh Kumar Jat, Siju E.N. Antioxidant activity

- of silver nanoparticles synthesized by hydroalcoholic extract of Triphala. *World J Adv Res Rev.* 2022;16(2):383–8.
108. Tahmasebi S, El-Esawi MA, Mahmoud ZH, Timoshin A, Valizadeh H, Roshangar L, et al. Immunomodulatory effects of nanocurcumin on Th17 cell responses in mild and severe COVID-19 patients. *J Cell Physiol.* 2021;236(7):5325–38.
109. Hanin NNF, Pratiwi R. Kandungan Fenolik, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Paku Laut (*Acrostichum aureum* L.) Fertil dan Steril di Kawasan Mangrove Kulon Progo, Yogyakarta. *J Trop Biodivers Biotechnol.* 2017;2(2):51.
110. Rajpal G. Proinsulin Trafficking through the Secretory Pathway. 2012;142. Tersedia pada:
http://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/2027.42/91500/1/grajpal_1.pdf
111. Somanath PR, Razorenova O V., Chen J, Byzova T V. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle.* 2006;5(5):512–8.
112. Silva TH, Alves A, Ferreira BM, Oliveira JM, Reys LL, Ferreira RJF, et al. Materials of marine origin: A review on polymers and ceramics of biomedical interest. *Int Mater Rev.* 2012;57(5):276–307.
113. Jiang J, Xiong YL. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Sci.* 2016;120:107–17.
114. ULUIŞIK D, Keskin E, Hatipoğlu D. A Study on Effect of Melatonin in Dyslipidemia Caused by Experimentally Diabetes. *Turkish J Sport Exerc.* 2019;6:117–21.

115. Xu X, So JS, Park JG, Lee AH. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin Liver Dis.* 2013;33(4):301–11.
116. Ryu CH, Park SH, Kim DH, Jhang KY, Kim HS. Nondestructive evaluation of hidden multi-delamination in a glass-fiber-reinforced plastic composite using terahertz spectroscopy. *Compos Struct* [Internet]. 2016;156:338–47. Tersedia pada:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.compstruct.2015.09.055>
117. Tanase DM, Gosav EM, Costea CF, Ciocoiu M, Lacatusu CM, Maranduca MA, et al. The Intricate Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Insulin Resistance (IR), and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *J Diabetes Res.* 2020;2020.
118. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer’s Disease. *Cell* [Internet]. 2017;169(7):1276-1290.e17. Tersedia pada:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>
119. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR Mutation and Resistance of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib . *N Engl J Med.* 2005;352(8):786–92.
120. Koekkoek WAC, Van Zanten ARH. Antioxidant Vitamins and Trace Elements in Critical Illness. *Nutr Clin Pract.* 2016;31(4):457–74.
121. Mohammed AA, Al-Musawi TJ, Kareem SL, Zarrabi M, Al-Ma’abreh AM. Simultaneous adsorption of tetracycline, amoxicillin, and ciprofloxacin by

- pistachio shell powder coated with zinc oxide nanoparticles. Arab J Chem [Internet]. 2020;13(3):4629–43. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.10.010>
122. Elsayed Azab A, A Adwas Almokhtar, Ibrahim Elsayed AS, A Adwas A, Ibrahim Elsayed Ata Sedik, Quwaydir FA. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. J Appl Biotechnol Bioeng. 2019;6(1):43–7.
 123. Steven S, Frenis K, Oelze M, Kalinovic S, Kuntic M, Jimenez MTB, et al. Vascular inflammation and oxidative stress: Major triggers for cardiovascular disease. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019.
 124. Garcia V, Sessa WC. Endothelial NOS: perspective and recent developments. Br J Pharmacol. 2019;176(2):189–96.
 125. Gerardi G, Cavia-Saiz M, del Pino-García R, Rivero-Pérez MD, González-SanJosé ML, Muñiz P. Wine pomace product ameliorates hypertensive and diabetic aorta vascular remodeling through antioxidant and anti-inflammatory actions. J Funct Foods [Internet]. 2020;66(January):103794. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103794>
 126. Robertson RP, Harmon J, Tran POT, Poitout V. Oxidative Stress in Type 2 Diabetes. (9).
 127. Maruhashi T, Higashi Y. Pathophysiological association between diabetes mellitus and endothelial dysfunction. Antioxidants. 2021;10(8):1–13.
 128. García-Pérez LE, Álvarez M, Dilla T, Gil-Guillén V, Orozco-Beltrán D. Adherence to therapies in patients with type 2 diabetes. Diabetes Ther. 2013;4(2):175–94.

129. Ataei Ataabadi E, Golshiri K, Jüttner A, Krenning G, Danser AHJ, Roks AJM. Nitric Oxide-cGMP Signaling in Hypertension: Current and Future Options for Pharmacotherapy. *Hypertension*. 2020;76(4):1055–68.
130. El-Missiry MA, Fekri A, Kesar LA, Othman AI. Polyphenols are potential nutritional adjuvants for targeting COVID-19. *Phyther Res*. 2021;35(6):2879–89.
131. Akbay EÖ, Altiokka MR. Kinetics of esterification of acetic acid with n-amyl alcohol in the presence of Amberlyst-36. *Appl Catal A Gen*. 2011;396(1–2):14–9.
132. Pari L, Umamaheswari J. Antihyperglycaemic activity of *Musa sapientum* flowers: Effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *Phyther Res*. 2000;14(2):136–8.
133. Yakubu MT, Ogunro OB. Effects of aqueous extract of *Fadogia agrestis* stem in alloxan-induced diabetic rats. *Bangladesh J Pharmacol*. 2014;9(3):356–63.
134. Mustapha S, Mohammed M, Azemi AK, Jatau AI, Shehu A, Mustapha L, et al. Current status of endoplasmic reticulum stress in type ii diabetes. *Molecules*. 2021;26(14):1–16.
135. Tripathi S, Jindal S, Chawla M, Gupta A, Jha S, Phadke U, et al. The Implication of Time-in-Range for the Management of Diabetes in India: A Narrative Review. *Clin Diabetol*. 2022;11(3):192–9.
136. Lesniewski LA, Donato AJ, Behnke BJ, Woodman CR, Laughlin MH, Ray CA, et al. Decreased NO signaling leads to enhanced vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle arterioles of the ZDF rat prior to overt

diabetes and hypertension. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*.

2008;294(4):1840–50.

137. Akther M, Haque ME, Park J, Kang TB, Lee KH. Nlrp3 ubiquitination—a new approach to target nlrp3 inflammasome activation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16).

LAMPIRAN

PUBLIKASI ILMIAH 1



Article

Molecular Mechanism of Fucoidan Nanoparticles as Protector on Endothelial Cell Dysfunction in Diabetic Rats' Aortas

Giftania Wardani ^{1,2}, Jusak Nugraha ³, Rochmah Kurnijasanti ⁴, Mohammad Rais Mustafa ⁵ and Sri Agus Sudjarwo ^{4*}

¹ Doctoral Program of Medical Science, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya 60115, Indonesia

² Program Study of Pharmacy, Faculty of Medicine, Hang Tuah University, Surabaya 28125, Indonesia

³ Department of Clinical Pathology, Dr. Soetomo Hospital, Universitas Airlangga, Surabaya 60115, Indonesia

⁴ Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya 60115, Indonesia

⁵ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Malaya, Kuala Lumpur 50603, Malaysia

* Correspondence: ags158@yahoo.com; Tel: +62-85-6450-00684

Abstract: Antioxidants have an important role in protecting against diabetes complications such as vascular endothelial cell damage. Fucoidan has strong antioxidant properties, therefore the aim of this study was to investigate the protective mechanism of fucoidan nanoparticles through the pathway of antioxidant activity against streptozotocin-induced diabetic aortic endothelial cell dysfunction in rats. Fucoidan nanoparticles are made utilizing high-energy ball milling. This research consists of five groups, namely: control rats, rats were administered aquadest; diabetic rats, rats were administered streptozotocin (STZ); fucoidan nanoparticle rats, rats were administered STZ and fucoidan nanoparticles. Aortic tissue was collected for the evaluation of ROS (reactive oxygen species), Malondialdehyde (MDA), superoxide Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx), Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2), Nitric Oxide (NO), cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP), relaxation response of acetylcholine (Ach), and the diameter of the aorta. The size distribution of the fucoidan nanoparticles was 267.2 ± 42.8 nm. Administration of fucoidan nanoparticles decreased the levels of ROS and MDA, and increased the levels of SOD, levels of GPx, Nrf2 expression, NO levels, cGMP expression, the relaxation response of Ach, and lumen diameter of the aorta, which are significantly different when compared with diabetic rats, $p < 0.05$. In this study, we concluded that the mechanism pathway of fucoidan nanoparticles prevents aortic endothelial cell dysfunction in diabetic rats through antioxidant activity by reducing ROS and MDA and incrementing SOD levels, GPx levels, and Nrf2 expression. All of these can lead to an elevated relaxation response effect of Ach and an increase in the lumen diameter of the aorta, which indicates a protective effect of fucoidan nanoparticles on aortic endothelial cells.

Keywords: fucoidan nanoparticle; antioxidant; endothelial cell; diabetes

Citation: Wardani, G.; Nugraha, J.; Kurnijasanti, R.; Mustafa, M.R.; Sudjarwo, S.A. Mechanism Pathway of Fucoidan Nanoparticles as Protector on Endothelial Cells Dysfunction in Diabetic Rats Aorta. *Nutrients* **2023**, *15*, 568. <https://doi.org/10.3390/nu15030568>

Academic Editor: Rosa Casas

Received: 1 January 2023

Revised: 14 January 2023

Accepted: 18 January 2023

Published: 21 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

One of the markers of diabetes mellitus is hyperglycemia, which can cause complications in various organs such as the liver, kidneys, nerves, eyes, and heart, as well as endothelial dysfunction of blood vessels. This is due to an impaired pancreas to secrete insulin or because of insulin resistance [1,2]. Diabetes mellitus is one of the major risk factors for cardiovascular disease, which is the most common cause of death in diabetic complications. In addition to the well-recognized microvascular diabetic complications, such as nephropathy, retinopathy, and neuropathy, there is a growing epidemic of macrovascular diabetic complications, including coronary artery disease, peripheral artery disease, and vascular endothelial cell dysfunction. Endothelial cell dysfunction can be due to

glycometabolic disorder, genetics, oxidative stress, inflammatory cytokines, and apoptosis, which are the main causes of cardiovascular diseases such as atherosclerosis. Oxidative stress plays a crucial role in causing endothelial cell dysfunction in diabetic complications [3–5]. Oxidative stress can be caused by the overproduction of reactive oxygen species such as hydroxyl radicals (OH⁻), superoxide anions (O₂⁻), and hydrogen peroxide (H₂O₂), and a lower antioxidant defense system such as SOD, GPx, and catalase. Excessive ROS formation occurs through the polyol pathway, increased production of advanced glycation end-products (AGEs), the hexosamine pathway, and protein kinase C activation, which can lead to diabetic complications [6–8]. Increased ROS levels in diabetes can lead to decreased production of SOD, GPx, and catalase. The ROS will oxidize polyunsaturated fatty acids (PUFA) that are abundant in cell membranes to form MDA. This MDA can be used as an indicator of the cell damage caused by free radicals under conditions of oxidative stress [9,10].

Increased ROS and decreased antioxidants can also occur in diabetic rat models injected with intraperitoneal streptozotocin. Previous studies revealed that administration of streptozotocin can reduce the expression of Nrf2, which is the main regulator for the formation of antioxidants; so lower SOD, GPx, catalase, and higher MDA in the aortic tissue of diabetic rats [11,12]. It has been reported that increasing ROS can inactivate Nrf2, resulting in a decrease in Nrf2 expression. This increase in ROS will cause cysteine damage in Keap1, disrupt the Keap1-Cul3 ubiquitination mechanism, and mediate Nrf2 degradation by the 26S proteasome so that Nrf2 has a short half-life, which can result in decreased expression of Nrf2 [13,14]. Animal experiments have shown that the Nrf2/Keap1 system is an important defense pathway for protecting against cell damage under conditions of oxidative stress. Decreased expression of Nrf2 can reduce the expression of cytoprotective antioxidants (SOD, GPx, and Cat) in transgenic mouse cells and exacerbate oxidative cell damage [15,16].

In a diabetic rat model, injection of STZ increased ROS and caused endothelial cell dysfunction, which resulted in decreased formation of NO and cGMP in aortic tissue. Therefore, natural products that have antioxidant effects can be used to prevent endothelial cell damage in diabetes [17–19]. The antioxidants from natural products such as *Cinnamomum cassia* and *Heterotrigona itama* could be used as protection against endothelial cell dysfunction in diabetic complications, as they are shown to decrease ROS and increase the NOS, NO, and cGMP in rat aortic tissue that was given streptozotocin intraperitoneally [20,21]. Fucoïdan derived from seaweed is reported to have strong antioxidant activity. Recently, many researchers have conducted studies on the potential and pharmacological activities of fucoïdan, such as anti-inflammatory, antibacterial, anti-apoptotic, immunostimulant, anti-atherosclerotic, anti-diabetic, and antioxidant [22–25].

In recent times, there have been many studies using nanotechnology to make nanoparticles of natural materials. Natural-product nanoparticles are considered to have an important role in treating and preventing diseases, both in humans and animals. Natural-product nanoparticles based on the nanoparticle size scale are more beneficial for increasing solubility, absorption, bioavailability, stability, distribution, and effectiveness in prevention and treatment [26,27].

Fucoïdan has anti-diabetic and antioxidant effects, therefore, this study aims to make preparations of fucoïdan nanoparticles that are used to prove the molecular mechanisms of fucoïdan nanoparticles, to protect against endothelial cell dysfunction in rats induced by streptozotocin.

2. Materials and Methods

2.1. Fucoïdan Nanoparticles Preparation

Fucoïdan nanoparticles are made utilizing the high-energy ball milling method, which was carried out according to the instructions of the nanomachine manufacturer

[28]. Furthermore, size of fucoidan nanoparticles was characterized by dynamic light scattering (Horiba LA 900, Kyoto, Japan).

2.2. Experimental Methods of Animals

Body weight of Wistar rats was 280–300 g; rats were obtained from LPPT, Universitas Gajah Mada, Indonesia. Prior to the experiment, rats were acclimatized for one week in plastic cages with a 12 h light/dark cycle at 26 ± 2 °C. All rats were given commercial pellets and drinking water ad libitum. All procedural experiments were approved by the Medical Ethics for Research in Preclinical trials of Hang Tuah University of Medical Sciences (approval number: No.283/FK. UHT/II/2022).

2.3. Model of Diabetic Rat

After the rats fasted for 12 h, then the rats were given intraperitoneally a single dose of streptozotocin of 55 mg/kg BW. Streptozotocin was dissolved in citrate buffer 0.1 M (pH 4,5). The rat blood was checked for blood sugar levels with Accu-check glucometer (Roche Diagnostic) 3 days after the injection of streptozotocin. Rats with blood sugar levels >200 mg/dl were used in the experiment.

2.4. Experimental Design

The rats were randomly divided into five groups ($n = 10$ in each group): control rats, rats were administered aquadest; diabetic rats, rats were injected intraperitoneally with a single dose of streptozotocin of 55 mg/kg BW; fucoidan nanoparticles rats, rats were injected with streptozotocin 55 mg/kg BW intraperitoneally and then after 3 days rats were administered fucoidan nanoparticles at doses of 75, 150, and 300 mg/kg BW, orally, once a day, for 75 days. At the end of the research, all rat aortas from various treatments were collected to evaluate MDA, SOD, GPx, Nrf2, NO, cGMP, relaxation response of Ach, and diameter of the aortic lumen.

2.5. Measurement of ROS in Aortic Endothelial Cells

Rats is anesthetized with ketamine intraperitoneally and the chest was opened to remove the aorta with dissection scissors. Then, the aorta was inserted into cold (sterile) PBS, and the container was moved to laminar airflow. A 1 mL syringe, equipped with a 25 G needle, was inserted into one end of the aorta, and the aorta was gently flushed with cold PBS to remove blood. The aorta was transferred to 20% fetal bovine serum (FBS)-DMEM medium. The aorta was cut into 1 mm rings and opened using sterile micro-dissection scissors to harvest endothelial cells of approximately 8–10 rings per aorta.

The using fluorescent probe, DCFH-DA was used to examine the levels of ROS in aortic endothelial cells (Sigma Aldrich; Merck, Germany). Endothelial cells were rinsed with PBS and added to $10 \mu\text{M}$ DCHF-DA for 30 min at 37 °C in darkness. The fluorescent signal of DCHF-DA was analyzed by flow cytometry (BD Vioscience, USA) with Cell Quest Software version 5.1.

2.6. Measurement of SOD and GPx Levels of Aortic Tissue

Fifty milligrams of aortic tissue was washed five times with phosphate buffer saline (PBS) until clean. Then, sample was added to 0.5 mL of PBS and crushed with a mortar. Next, it was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. SOD levels in the supernatant were measured with a rat SOD ELISA kit (Bio-Vision K335–100, Milpitas, USA); GPx was measured with a rat GPx ELISA kit (Bio-Vision K 762–100, Milpitas, USA), according to the manufacturer's protocol. Sample was put into a microplate and incubated for 90 min at 37 °C. Afterward, it was incubated with the biotinylated antibody at 37 °C for 60 min. Then, rinsed with PBS three times and incubated at 37 °C for 30 min with working solution of avidin–biotin complex with PBS. Next, the sample was incubated with TMB color development at 37 °C for 30 min. Finally, the TMB stop solution was added and the OD value

was read by microplate reader at 450 nm. SOD and GPx levels were expressed in U/mg protein.

2.7. Extraction of RNA and RT-PCR Analysis for Nrf2 Detection

Trizol solution was used in isolating total RNA from rat kidneys, in addition, it was re-suspended in 50 L of water with pyrocarbonate and at 80 °C it was stored. Furthermore, Promega reverse transcription was used to synthesize cDNA for Nrf2 detection (5)-TTGTAGATGACCATGAGTCGC-3 for forward and 5-TGTCCTGCTGTATGCTGCTT-3 for reverse are the specific primers used in this case. This is because mouse-actin mRNA amplification controls in each sample use a primer, the primer used for forward is 5-GAGGCTCAGAGCAAGAGAGG -3, while for retreat they use 5 TGACATCTCC-CACAATCTCC-3. All polymerase chain reactions were brought out by tagging DNA polymerase (Life Technology Inc, Monza, Italy) with 200 ng cDNA, which were for 30 amplification cycles each; consisting of one minute for the denatured phase at 94 °C, 30 °C; seconds for phase annealing at 65 °C; and the elongation in 1 min at 72 °C. Furthermore, on the 2% agarose gel, the polymerase chain reaction product was amplified and then separated and the band was visualized using ethidium bromide. Scion Image software was used with densitometry to measure the density of the Nrf2 expression band (Scion Corporation Frederick, MD, USA).

2.8. Measurement of NO Levels in Aortic Tissue

Griess reagent was used to evaluate NO levels in aortic tissue. For this, 100 µL homogenate of aortic tissue was mixed with 100 µL Griess reagent (1% Sulfanilamide and 0.1% Naphthylethylenediamine Dihydrochloride in 5 % phosphoric acid) and incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was measured by microplate reader at 540 nm. NO levels were expressed in terms of µg equivalence of NANO/mg protein.

2.9. Immunohistochemical Staining of MDA and cGMP in Aortic Tissues.

The cGMP was determined by immunohistochemistry. To suppress endogenous peroxide, 4 µm aorta tissue slices were deparaffinized and then exposed to hydrogen peroxide at 37 °C for 10 min. Furthermore, a tris-buffered salt solution was added, and temperature was maintained at 37 °C for 30 min. They are then washed in 3× PBS and incubated with a secondary antibody from ThermoFisher Scientific for 30 minutes at room temperature. The immunostaining was visualised using 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich) for 4 minutes at room temperature for 30 minUTES. The sections were counterstained with hematoxylin. All slides were randomly scored in ten microscopic fields at 400× magnification. Score 0 indicates that there are no immunopositive cells; score 1 indicates that there are between 1 and 25% immunopositive cells; score 2 indicates that there are between 26 and 50% immunopositive cells; score 3 indicates that there are between 51 and 75% immunopositive cells; and score 4 indicates that there are more than 75% immunopositive cells.

2.10. Measurement of Endothelial Function (Responses to Acetylcholine on Contraction of Norepinephrine (NE))

Ring segment rat aortas were cut (3 mm long) and hung vertically in an organ bath (organ bath system-820, MO, USA) containing 10 mL Krebs solution (composition in mM: NaCl 118; KCl 4.7; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 1.18; NaHCO₃ 25; D-Glucose 5.5, and CaCl₂) at 37 °C and oxygenated with 95% O₂ and 5% CO₂. The ring of the aorta was equilibrated at a baseline of 1 g for 60 min and then exposed to Potassium Chloride 60 mM twice. Afterward, the ring of the aorta was exposed to Norepinephrine (1 µM), and, after a steady contraction, acetylcholine (1 µM) was added to assess endothelial cell function.

2.11. Histopathological Evaluation

Rat aortic tissue was fixed in 10% formalin buffer solution, dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin. Furthermore, it was sliced at 4 μm and stained with Hematoxylin Eosin. Then, tissue was evaluated under a microscope to assess the aortic lumen diameter.

2.12. Statistical Analysis

The results are expressed as mean and standard deviation. The difference between groups was compared using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test. The values are considered significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Dynamic Light Scattering Used to Characterize Fucoidan Nanoparticles

The particle size distribution of the Fucoidan nanoparticles was $267, 2 \pm 42.8$ nm, which was analyzed by DLS, as shown in Figure 1.

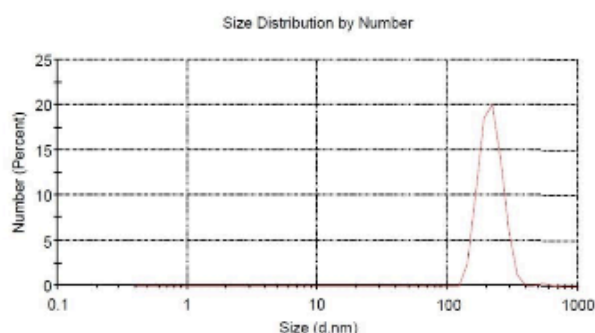


Figure 1. Fucoidan nanoparticle size distribution.

3.2. Effect of Fucoidan Nanoparticles on ROS in Aortic Endothelial Cells of Diabetic Rats

The levels of ROS can be utilized as a marker for the presence of oxidative stress in cell damage. ROS levels of aortic endothelial cells from various treatments can be seen in Figure 2. ROS levels in diabetic rats increased with a significant difference when compared with the control rats at $p < 0.05$. However, dose-dependent administration of fucoidan nanoparticles decreased the level of ROS in the aortic endothelial cells of diabetic rats. Only the administration of fucoidan nanoparticles at a dose of 300 mg/kg BW significantly decreased the levels of ROS in the aortic endothelial cells of diabetic rats.

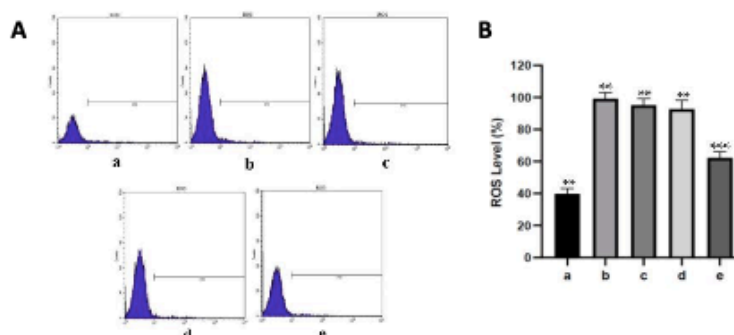


Figure 2. (A). Flow cytometry assay using DCFH-DA dye on fucoidan nanoparticles to assess effect on preventing oxidative stress. (B). The level of ROS in aortic endothelial cells was analyzed by flow cytometry. Control rats (a); diabetic rats (b); fucoidan nanoparticle rats, at doses of 75 (c), 150 (d), and 300 mg/kg BW (e). **–***The columns with different letters show significance between groups ($p < 0.05$).

3.3. Fucoidan Nanoparticles' Effects on the Levels of SOD and GPx in Diabetic Rats' Aortas

Table 1 shows the SOD and GPx levels in aorta tissue from the various treatments. SOD and GPx are endogenous antioxidant enzymes that scavenge free radicals resulting in the inhibition of oxidative stress. In rats injected with streptozotocin, levels of SOD and GPx in the aortic tissue were decreased, which was significantly different when compared with the control rats, $p < 0.05$. On the other hand, the administration of fucoidan nanoparticles, depending on the dose, increased SOD and GPx levels in the aortic tissue of diabetic rats. Administration of fucoidan nanoparticles, only at a dose of 300 mg/kg BW, was significantly able to increase levels of SOD and GPx in the aortic tissue of diabetic rats, $p < 0.05$.

Table 1. Fucoidan Nanoparticles Effect on SOD and GPx Levels in aortic tissue from various treatments.

Group	SOD Levels	GPx Levels
	(U/mg Protein)	(U/mg Protein)
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Control Rats	5.98 ± 0.43	49.0 ± 2.6
Diabetic Rats	$2.76^b \pm 0.29$	$29.0^b \pm 2.4$
Fucoidan nano 75 mg/kg bw	$2.70^b \pm 0.24$	$28.3^b \pm 1.7$
Fucoidan nano 150 mg/kg bw	$2.90^b \pm 0.25$	$30.8^b \pm 1.8$
Fucoidan nano 300 mg/kg bw	$3.88^c \pm 0.35$	$35.6^c \pm 2.1$

^{a-c}The different superscript in each column show significantly difference between the means ($p < 0.05$)

3.4. Effect of Fucoidan Nanoparticles on the Expression of Nrf2 in Diabetic Rats' Aortas

The regulation of cellular antioxidants by Nrf2 plays a role in the defense against oxidative stress. The Nrf2 expression in aortic tissue from the various treatments is shown in Figure 3. Diabetes can significantly decrease Nrf2 expression in aortic tissue when compared with the control rats, $p < 0.05$. Meanwhile, dose-dependent administration of fucoidan nanoparticles increased Nrf2 expression in the aortic tissue of diabetic rats, and

only a dose of 300 mg/kg BW significantly increased Nrf2 expression when compared to diabetic rats, $p < 0.05$.

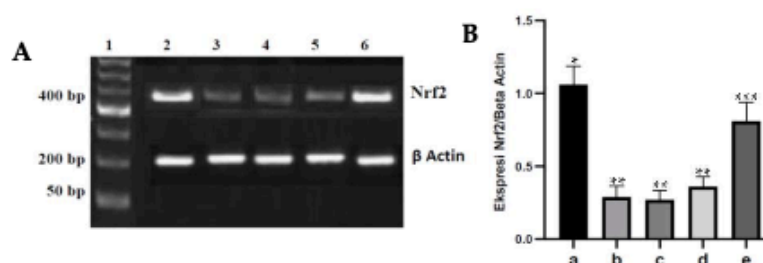


Figure 3. (A). Fucoidan nanoparticles' effect on Nrf2 expression in aortic tissue of various treatments. (A). Nrf2 expression in aortic tissue: marker (1); control rats (2); diabetic rats (3); fucoidan nanoparticles at doses of 75 (4), 150 (5), and 300 mg/kg BW (6). (B). Fucoidan nanoparticles' effect on Nrf2/ β actin in aortic tissue: control rats (a); diabetic rats (b), Fucoidan nanoparticles at doses of 75 (c), 150 (d), and 300 mg/kg BW (e). **** Columns with different letters statistically differ at $p < 0.05$.

3.5. Fucoidan Nanoparticles' Effect on NO Levels in Endothelial Cells of Diabetic Rats' Aortas

NO compounds can cause vasodilation and act as a regulator of vascular smooth muscle tone through the activation of soluble guanylate cyclase. The results of NO levels in aortic tissue from the various treatments are presented in Table 2. The diabetic rat group showed significantly decreased NO levels in the endothelial cells of the aorta when compared with the control rats, $p < 0.05$. However, depending on the dose, the administration of fucoidan nanoparticles increased the NO levels in the endothelial cell of the diabetic rats' aortas, and only at a dose of 300 mg/kg BW. This shows how fucoidan nanoparticles are significantly able to increase NO levels in the endothelial cells of diabetic rats' aortas, $p < 0.05$.

Table 2. Fucoidan nanoparticles effects on NO levels aortic tissue of various treatment.

Group	NO level Aorta (nmol/mg) $\bar{X} \pm SD$
Control Rats	1.47 ^a \pm 0.21
Diabetic Rats	0.41 ^b \pm 0.37
Fucoidan Nano Rats 75 mg/kg bw	0.39 ^b \pm 0.31
Fucoidan Nano Rats 150 mg/kg bw	0.42 ^b \pm 0.26
Fucoidan Nano Rats 300 mg/kg bw	0.94 ^c \pm 0.37

^{a-c}The different superscript in each column show significantly difference between the means ($p < 0.05$).

3.6. Effect of Fucoidan Nanoparticles on the Expression of cGMP in Diabetic Rats' Aortas

Cyclic GMP in vascular smooth muscle can cause vasodilation. The results of the immunohistochemistry testing of cGMP expression in aortic tissue from the various treatments are shown in Figure 4. In the diabetic rat group, cGMP production in aortic tissue decreased, which was significantly different when compared with the control rat group, $p < 0.05$. Meanwhile, diabetic rats administered with fucoidan nanoparticles increased cGMP production in the aortic tissue. Only a dose of 300 mg/kg BW significantly increased cGMP production when compared with diabetic rats, $p < 0.05$.

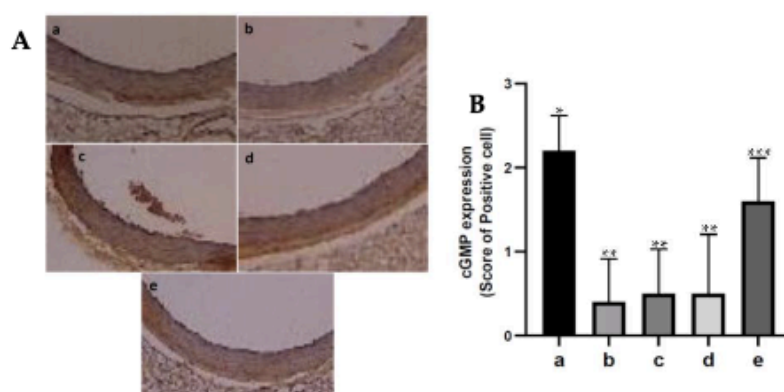


Figure 4. (A). Immunohistochemistry of the expression of cGMP in aortic tissue of diabetic rats: control rats (a); diabetic rats (b); fucoidan nanoparticles at doses of 75 (c), 150 (d), and 300 mg/kg BW (e). (400 \times). (B). The number of cGMP-expressing cells that are immunoreactive. ****The columns with different letters show significance between groups ($p < 0.05$).

3.7. Fucoidan Nanoparticles' Effect on Response Relaxation of Ach in Diabetic Rats' Aortas

The acetylcholine smooth muscle relaxation response (vasodilation) can be used as a marker for endothelial cell damage. Figure 5 shows the response of Ach relaxation to NE contractions from the various treatments in the rats' aortas. In the diabetic rat group, the inhibition of the relaxation response of 1 μ M Ach to 1 μ M NE contractions on the aorta within endothelial cells was significantly different, and the relaxation response was lower when compared to the control rats, $p < 0.05$. On the other hand, administration of fucoidan nanoparticles significantly increased the relaxation response of 1 μ M Ach to 1 μ M NE contractions on the aorta within endothelial cells of diabetic rats, $p < 0.05$. These results indicate that the administration of fucoidan nanoparticles can prevent aortic endothelial cell dysfunction in diabetic rats.

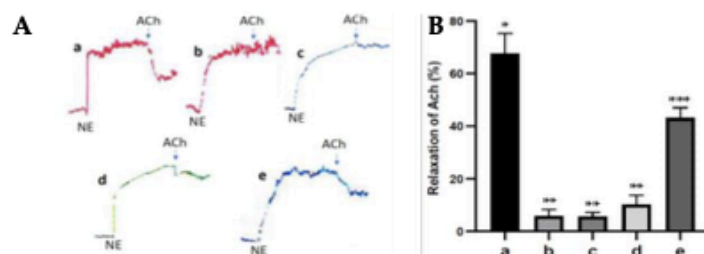


Figure 5. (A). The response of 1 μ M Ach relaxation to 1 μ M NE contractions from various treatments in rats' aortas: control rats (a); diabetic rats (b); fucoidan nanoparticles at doses of 75 (c), 150 (d), and 300 mg/kg BW (e). (B). The relaxation of Ach to NE contractions expressed in %. ****The columns with different letters show significance between groups ($p < 0.05$).

3.8. Fucoidan Nanoparticles' Effect on Diameter of Aortic Lumens of Diabetic Rats

An increase or decrease in the diameter of the aortic lumen indicates vasodilatation or vasoconstriction in the aortic vessels. The diameter of the aortic lumen from the various treatments can be seen in Figure 6. Narrowing of the aortic lumen (vasoconstriction)

occurred in the group of diabetic rats, which was significantly different and had a lower diameter than the control rats, $p < 0.05$. In diabetic rats, administering fucoidan nanoparticles increased the diameter of diabetic rats' aortic lumens, and only at a dose of 300 mg/kg BW. The fucoidan nanoparticles significantly increased the diameter of the diabetic rats' aortic lumens, $p < 0.05$. These results show that the administration of fucoidan nanoparticles can prevent the narrowing of the aortic lumen (vasoconstriction) in diabetic rats.

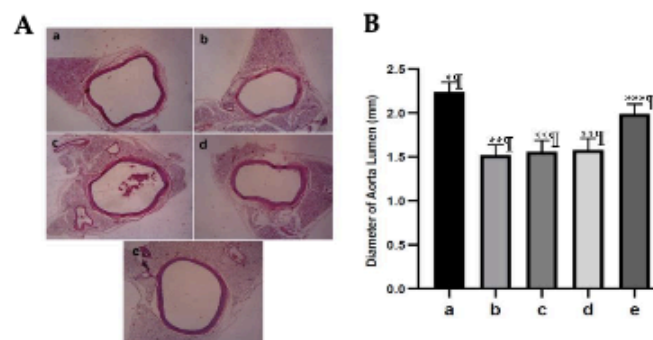


Figure 6. (A). The diameter of the aortic lumen from various treatments: control rats (a); diabetic rats (b); fucoidan nanoparticles at doses of 75 (c), 150 (d), and 300 mg/kg BW (e). (400 \times). (B). The diameter of aortic lumens expressed in mm. ****The columns with different letters show significance between groups ($p < 0.05$).

4. Discussion

The progress of nanotechnology is quite rapid and the effectiveness of nanomaterials is extraordinary, so much so that nanotechnology is a new solution for the treatment of diabetes complications. Fucoidan nanoparticles are made into nano-size by the ball milling method, a technique that is widely used recently [26–28]. Size characterization of fucoidan nanoparticles was carried out using DLS, which showed a size distribution of 201.8 ± 14.6 nm. Fucoidan nanoparticles are considered an alternative solution to increase solubility, absorption, and bioavailability, as well as to increase their protective effect on complications of diabetes mellitus, especially in the dysfunction and damage of aortic endothelial cells. Oxidative stress has a major role in causing diabetes complications. Oxidative stress can increase the expression of inflammatory cytokines, which are both a consequence and a trigger for diabetes complications. Oxidative stress can occur due to the excessive formation of ROS and lower endogenous antioxidant defense systems [2,6,15].

In the diabetic rat model, STZ increases ROS, and induces oxidative stress, which plays an important role in endothelial cell dysfunction. Therefore, it has been necessary to investigate several parameters of oxidative stress and endothelial cell dysfunction, such as MDA, SOD, GPx, Nrf2, NO, cGMP, and the relaxation response of Ach in diabetic rat tissue [9,20,21]. STZ inhibits the secretion of insulin in the Langerhans islet beta cell, which leads to hyperglycemia complications such as endothelial cell dysfunction. The purpose of this research was to prove the antioxidant activity of fucoidan nanoparticles is able to protect against aortic endothelial cell dysfunctions in diabetic rats.

An increase in the amount of ROS in the body can cause oxidative stress and lipid peroxidation, namely the reaction of ROS with polyunsaturated fatty acids (PUFA) in cell membranes, which will produce MDA (Malondialdehyde) products. MDA can be used as a marker for the presence of free radicals, which can cause cell or tissue damage. The higher the level of MDA in the tissue, the higher the degree of tissue damage [2,6,7]. Our

results showed that oral administration of fucoidan nanoparticles inhibited the increase in ROS levels in diabetic rat aortic tissue, which was significantly different when compared to the streptozotocin group at $p < 0.05$. Antioxidant compounds from fucoidan are able to scavenge and neutralize free radicals, thereby preventing an increase in MDA levels and the occurrence of oxidative stress. The antioxidant termination reaction of fucoidan can occur by capturing hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) in the peroxidation reactions of lipids, proteins, or other molecules in the cell membranes so that the increase in MDA levels can be inhibited and cell damage can be avoided [24,25]. Fucoidan can also inactivate protein kinase C (PKC), causing the expression of various genes such as TGF- β , PAI-1, NF- κ B, and NAD(P)H oxidase to decrease so that the production of ROS and MDA also decreases [29,30].

SOD and GPx are antioxidants that play an important role in tackling free radicals, namely superoxide anions and hydroxyl groups. SOD is present in almost all cells and is the first line of defense against ROS. SOD converts superoxide ions (O_2^-) to Hydrogen Peroxide (H_2O_2). Because Hydrogen Peroxide still reacts with other ROS, it needs to be degraded by other antioxidants, namely GPx. GPx detoxifies H_2O_2 by converting it into water and oxygen molecules. SOD and GPx work synergistically to support each other's defenses against ROS. In addition, SOD and GPx inhibit oxidative stress, which is one of the diabetes biomarkers, the levels of which have been extensively examined in various diabetes complication studies [31,32]. In the results of this study, administering fucoidan nanoparticles inhibited the reduction in SOD and GPx levels in the aortic tissue of diabetic rats. Fucoidan is a polysaccharide substance that can inhibit the oxidation of important molecules such as proteins, lipids, and DNA caused by free radicals; they do so by donating electrons, so that they can inhibit the formation of free radicals and prevent oxidative stress, which in turn can inhibit vascular aortic damage, especially in endothelial cell dysfunction in diabetic complications [22,33,34]. The same results have been proven by Uslu et al. (2018), who reported that the administration of the antioxidant Cinnamomum cassia extract can inhibit the decrease in SOD and GPx levels of aortic tissue in rats injected intraperitoneally with streptozotocin. Wardani et al. (2022) also reported that the administration of fucoidan nanoparticles displayed antioxidant activity and inhibited the decrease in SOD and GPx levels in the kidney tissue of diabetic rats.

Cellular antioxidant regulation by Nrf2 plays a role in defense against oxidative stress. Nrf2 activity and expression decrease in diabetes caused by oxidative stress, which can weaken the induction of genes encoding antioxidants, resulting in decreased production of endogenous antioxidants such as SOD, GPx, and catalase [12,35]. Several researchers reported that streptozotocin can cause oxidative stress that occurs due to an imbalance between increased ROS production and decreased antioxidant capacity. This increase in ROS will cause cysteine damage in Keap1, disrupt the Keap1-Cul3 ubiquitination mechanism and mediate Nrf2 degradation by the 26S proteasome so that Nrf2 has a short half-life, which can result in a decreased expression of Nrf2 [13,36]. In rats injected with streptozotocin, administration of fucoidan nanoparticles orally inhibited the decrease in Nrf2 expression in the aortic tissue of diabetic rats. This is because fucoidan has a strong antioxidant effect and is a polysaccharide that has an OH group that can react with hydroxyl free radicals ($\cdot\text{OH}$), resulting in the inhibition of oxidative stress that can lead to an increase in Nrf2 expression. In addition to that, the strong antioxidant effect of fucoidan is able to reduce ROS so that cysteine damage does not occur in Keap1, which further inhibits the Keap1-Cul3 ubiquitination mechanism and Nrf2 degradation and can cause an increase in Nrf2 expression. The same results were reported that administration of the antioxidant fucoidan could inhibit oxidative stress and inhibit the decrease in Nrf2 expression in liver tissue induced by acetaminophen [14]. Administering the antioxidant chitosan nanoparticles orally to diabetic rats can also inhibit oxidative stress and inhibit the decrease in Nrf2 expression in heart tissue [15].

Nitric oxide (NO) is an endothelium-derived relaxing factor (EDRF) that under physiological conditions is released from endothelial cells in response to mechanical

stimulation, acetylcholine, and increased intracellular calcium. NO compounds can cause vasodilation and act as a regulator of vascular smooth muscle tone through the activation of soluble guanylate cyclase [21,37]. The results of this study indicated that the administration of fucoidan nanoparticles orally increased eNOS expression and NO levels of aortic tissue in diabetic rats. It has been reported that antioxidants can be used to inhibit vascular endothelial cell dysfunction in diabetes by inhibiting ROS production so as to inhibit lipid peroxidation and prevent oxidation of cell membrane lipids, which can reduce MDA levels and increase SOD and GPx expression by inhibiting the reduction of Nrf2 expression, further inhibiting endothelial cell damage. This causes eNOS to remain active in producing NO, which causes vasodilation of the blood vessels [4,5]. Fucoidan has an activity to scavenge excessive superoxide anion free radicals, so that oxidation of the important cofactor tetrahydrobiopterin (BH4), which is required for the formation of eNOS, does not occur and can further increase NO production. Yeoh et al. (2021) reported the same results, which proved that giving the antioxidant propolis from Stingless Bees (*Heterotrigona itama*) could increase eNOS expression and NO levels in aortic endothelial cells of diabetic rats.

Endothelial cells produce NO which will diffuse into the blood vessels' smooth muscle cells and activate the soluble guanylate cyclase (sGC) enzyme, which can lead to increased formation of cyclic GMP from its GTP precursor. Cyclic GMP stimulates the relaxation of the smooth muscles of blood vessels so that vasodilation will occur [38]. Our results of this research show that oral administration of fucoidan nanoparticles increased cGMP expression in aortic tissue in diabetic rats. Administering exogenous antioxidants can increase NO formation and cGMP production so that aortic vasodilation can occur [20,21]. The results of this study indicate that the antioxidant activity of fucoidan nanoparticles with a scavenger can inhibit the reaction of superoxide ions with NO so that peroxynitrite which is toxic to endothelial cells is not formed, therefore, fucoidan can increase the formation of NO and cGMP. Yeohi et al. (2019) proved that administration of the antioxidant from Stingless Bees could increase endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscle by increasing the formation of NO and cGMP.

Endothelial cells actively regulate the relaxation and contraction of vascular smooth muscle under physiological and pathological conditions. Ach can cause relaxation of the smooth muscle of the aortic blood vessels (vasodilation) depending on the presence of endothelial cells because the administration of Ach can activate eNOS resulting in an increase in NO formation in endothelial cells, which in turn can activate soluble guanylate cyclase and increase the formation of cGMP that can cause vasodilation. Ach can be used to prove the occurrence of endothelial cell dysfunction. In diabetes, there is an inhibition of the Ach relaxation response due to endothelial cell dysfunction [19,20]. The results of this study show that the antioxidant activity of fucoidan nanoparticles increased the Ach relaxation response to norepinephrine contractions in the aortic blood vessels of diabetic rats. This is because the fucoidan nanoparticles work by donating their electrons so they can inhibit the formation of free radicals, increase the expression of SOD and GPx, and inhibit oxidative stress, which contributes to inhibiting the aortic endothelial cell dysfunction of diabetic rats. Furthermore, it can increase the production of NO and cGMP, so can cause aortic vasodilation and can increase the diameter of the aortic lumen. The same results also occur in the administration of propolis antioxidant from *Heterotrigona itama*, which can increase the relaxation response of acetylcholine to contraction of phenylephrine in the aorta of diabetic rats and works by increasing the production of NO and cGMP [20].

An increase or decrease in the diameter of the aortic lumen indicates vasoconstriction or vasodilation of the aortic blood vessels, which can cause narrowing or widening of the diameter of the aortic lumen [17,38]. Administration of fucoidan nanoparticles increased the diameter (dilation) of the diabetic rats' aortic lumen. It has been reported that fucoidan has a strong antioxidant effect that can inhibit the process of lipid peroxidation because it can capture ROS in diabetic rats, thereby preventing endothelial cell damage; in addition,

the eNOS remains active in converting L-arginine to NO. This NO can activate soluble guanylate cyclase in producing cGMP and cause an increase in the diameter (dilation) of the aortic lumen in diabetic rats.

Antioxidants are one option to prevent endothelial cell dysfunction in diabetes complications associated with oxidative stress. A number of studies have focused on the use of antioxidants to prevent diabetes complications such as neuropathy, retinopathy, nephropathy, hepatopathy, atherosclerosis, and vascular endothelial cell dysfunction. However, whether antioxidants have preventive and/or therapeutic value remains to be conducted in clinical trials on diabetics.

5. Conclusions

The results of this study can be concluded that fucoidan nanoparticles are natural-product antioxidants that can be used to prevent damage to aortic endothelial cells in the complications of diabetes, whose mechanism of action is through decreased levels of ROS and MDA, as well as increased expression of Nrf2, SOD, and GPx levels. This results in increased NO production and cGMP, which can increase the lumen diameter (vasodilation) of the diabetic rat aorta. Henceforth, it is necessary to study the antioxidant activity associated with inflammation and apoptosis in preventing endothelial cell dysfunction in diabetes complications.

Author Contributions: G.W., S.A.S., and J.N. conceptualization; G.W. and R.K. contributed to the animal study; G.W. analyzed data and draft preparation; S.A.S., and M.R.M. review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Ministry of Finance, Education Fund Management Institution (LPDP), the Republic of Indonesia, through the Doctoral Program of Medical Science, Faculty of Medicine, Airlangga University, Indonesia.

Institutional Review Board Statement: The research treatment on rats has been approved by Airlangga University and the Faculty of Veterinary Medicine by the Animal Care and Ethics Committee. All research is in accordance with the Association for Assessment and Accreditation of Animal Care International Laboratory.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are presented within the article.

Conflicts of Interest: All authors declare no conflict of interest.

References

- Ochiagu, F.O.; Chikezie, P.C.; Chikezie, C.M. Pathophysiology of diabetes mellitus and its complications: Metabolic events and control. *Biomed. Res. Ther.* **2021**, *8*, 4243–4257.
- Sing, A.; Kikreti, R.; Saso, L.; Kukreti, S. Mechanistic insight into oxidative stress-triggered signaling pathway and type 2 diabetes. *Molecules* **2022**, *27*, 950.
- Awad, E.M.; Ahmed, A.F.; El-Daly, M.; Wagdy, A.; Taye, A. Role of apoptosis and oxidative stress in high glucose-induced endothelial dysfunction in isolated aortic rings. *J. Adv. Biomed. Pharm. Sci.* **2022**, *5*, 23–28.
- Maruhashi, T.; Higashi, Y. Pathophysiological association between diabetes mellitus and endothelial dysfunction. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1306.
- Ozturk, Z. Diabetes, oxidative stress and endothelial dysfunction. *Bezmillem Sci.* **2019**, *7*, 52–57.
- Alkadi, H. A review on free radicals and antioxidants. *Infect. Disord. Drug Target.* **2020**, *20*, 16–26.
- Ghasemi-Dehnoo, M.; Amini-Khoei, H.; Lorigooini, Z.; Rafician-Kopael, M. Oxidative stress and antioxidants in diabetes mellitus. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2020**, *13*, 431–438.
- Vassalle, C.; Gaggini, M. Type 2 diabetes and oxidative stress and inflammation pathophysiological mechanism and possible therapeutic options. *Antioxidants* **2022**, *11*, 953.
- Yan, L.J. The Nicotamide/Streptozotocin rodent model type 2 diabetes: Renal Pathophysiology and redox imbalance features. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1225.
- Zhang, P.; Li, T.; Wu, X.; Nice, E.C.; Huang, C.; Zhang, Y. Oxidative stress and diabetes: Antioxidative strategies. *Font. Med.* **2020**, *14*, 583–600.
- Salazar-Garcia, M.; Corona, J.C. The use of natural compounds as a strategy to counteract oxidative stress in animal model of diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7009.

12. Wardani, G.; Ernawati.; Sudjarwo, S.A. The potency of fucoidan nanoparticles as antioxidant and anti-caspase 3 in against lung cell damage on wistar rat diabetic. *Intercientia J.* **2020**, *45*, 83–96.
13. Rampin, A.; Carrabba, M.; Mutoli, M.; Spineeti, G. Recent advances in KEAP1/NRF2-targeting strategies by phytochemical antioxidants, nanoparticles, and biocompatible scaffolds for the treatment of diabetic cardiovascular complications. *Antioxid. Redox. Signal.* **2022**, *36*, 10–12.
14. Wang, R.; Liu, L.; Liu, H.; Wu, K.; Qi, B.; Zhang, L. Nrf2 protects against diabetic dysfunction of endothelial progenitor cells by regulating cell senescence. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *42*, 1327–1340.
15. Wardani, G.; Jusak, N.; Mustafa, M.R.; Kurnijasanti, R.; Sudjarwo, S.A. Antioxidative Stress and Antiapoptosis Effect of Chitosan nanoparticles to protect cardiac cell damage on streptozotocin-induced diabetic rat. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2022**, *2022*, 3081397.
16. Wang, Y.Q.; Wei, J.G.; Tu, M.J.; Gu, J.G.; Zhang, W. Fucoidan alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity via oxidative stress inhibition and Nrf2 translocation. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 4050–4062.
17. Beck, L.; Comerma-Steffensen, S.; Pinilla, E.; Carlsson, R.; Simonsen, U. Endothelial dysfunction and passive changes in the aorta and coronary arteries of diabetic db/db mice. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 667.
18. Li, J.C.; Velagic, A.; Qin, C.X.; Li, M.; Ritchie, R.H.; Woodman, Q.L. Diabetes attenuates the contribution of endogenous nitric oxide but not nitroxyl to endothelium dependent relaxation of rat carotid arteries. *Front. Pharmacol.* **2021**, *11*, 585740.
19. Mustapha, S.; Azemi, A.K.; Wan Ahmad, W.A.N.; Mustafa, M.R.; Mokhtar, S.S. Inhibition of endoplasmic reticulum stress improve Acetylcholine-mediated relaxation in the aorta of type 2 diabetic rats. *Molecules* **2022**, *27*, 5107.
20. Yeoh, B.S.; Omar, N.; Mohammad, M.; Mokhtar, S.S.; Ahmad, R. Antioxidative propolis from stingless bees (*Heterotrigona itama*) preserves endothelium dependent aortic relaxation of diabetic rats: The role of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2021**, *57*, e19187.
21. Uslu, G.A.; Gelen, V.; Uslu, H.; Ozen, H. Effects of *Cinnamomum cassia* extract on oxidative stress, immunoreactivity of iNOS and impaired thoracic aortic reactivity induced by type II diabetes in rats. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2018**, *54*, 17785.
22. Wang, Y.; Xing, M.; Cao, Q. Biological activities of fucoidan and the factor mediating its therapeutic effect: A review of recent studies. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 183–201.
23. Aleissa, M.S.; Alkahtani, S.; Abd Eldaim, M.A.; Mohammed, A.M.; Abdel-Daim, M.M. Fucoidan ameliorates oxidative stress, inflammation, DNA damage, and hepatorenal injuries in diabetic rats intoxicated with aflatoxin B1. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 9316751.
24. Husni, M.A.; Izmi, N.; Ayunani, F.Z.; Kartini, A.; Husnayain, N.; Isnansetyo, A. Characteristic and antioxidant activity of fucoidan from *Sargassum hystrix*: Effect of extraction. *Int. J. Food. Sci.* **2022**, *2022*, 3689724.
25. Somanath, D.; Vijayakumar, J.; Suriyakumari, Vijayaraghavan, R. Effect of fucoidan on regulation of antioxidant enzymes in hepatorenal tissues of streptozotocin-induced diabetes rats. *Indian J. Pharm. Sci.* **2021**, *83*, 1164–1173.
26. Chenthamara, D.; Subramaniam, S.; Ramakrishnan, S.G.; Lin, F.; Qoronfleh, M.W. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomater. Res.* **2019**, *23*, 20–49.
27. Khan, I.; Saeed, K.; Idrees, K. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12*, 908–931.
28. Aman, K.; Singh, R.K.; Kumar, R.; Ghosh, A.K. Effect of high energy ball milling grinding on physicochemical, morphological, and optical properties of *Curcuma longa* nanoparticle powder. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2018**, *9*, 672–677.
29. Xu, J.; Wang, Y.; Wang, Z.; Guo, L.; Li, X. Fucoidan mitigated diabetic nephropathy through the downregulation of PKC and modulation of NF- κ B signaling pathway: In vitro and in vivo investigations. *Phytother. Res.* **2021**, *4*, 2133–2144.
30. Phull, A.R.; Kim, S.J. Fucoidan as bio-functional molecule: Insights into the anti-inflammatory potential and associated molecular mechanisms. *J. Funct. Foods* **2017**, *38*, 415–426.
31. Neha, K.; Haider, M.R.; Pathak, A.; Yar, M.S. Medicinal prospects of antioxidant: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *178*, 687–704.
32. Luthuli, S.; Wu, S.; Cheng, Y.; Zheng, X.; Tong, H. Therapeutic effects of fucoidan: A review on recent studies. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 487.
33. Wu, J.; Sun, X.C.; Jiang, Z.; Jiang, J.; Wu, H. Protective role of Nrf2 in macrovascular complication of diabetes. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *16*, 8903–8917.
34. Gerardi, G.; Cavia-Saiz, M.; Pino-García, R.; Pilar-Muniz, P. Wine pomace product ameliorates hypertensive and diabetic aorta vascular remodeling through antioxidant and anti-inflammatory action. *J. Funct. Foods* **2020**, *66*, 103794.
35. Tanase, D.M.; Gosav, E.M.; Anton, M.I.; Floria, M.; Rezus, C. Oxidative stress and Nrf2/Keap1/Are pathway in diabetic kidney disease (DKD): New perspectives. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1227.
36. Tran, N.; Garcia, T.; Aniq, M.; Ali, S.; Ally, A.; Nauli, S.M. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and the cardiovascular system: In physiology and in disease states. *Am. J. Biomed. Sci. Res.* **2022**, *15*, 153–177.
37. Ataabadi, E.A.; Golshiri, K.; Jan Danser, A.H.; Roks, A.J.M. Nitric oxide-cGMP signaling in hypertension, current and future options for pharmacotherapy. *Hypertension* **2020**, *76*, 1055–1068.
38. Chen, T.; Yang, X.; Fang, X.; Tang, L.; Mao, P.; Xu, B.; Chen, X. Potential influencing factors of aortic diameter at specific segments in population with cardiovascular risk. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2022**, *22*, 32.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.





PUBLIKASI ILMIAH 2

Hindawi
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2022, Article ID 3405871, 10 pages
<https://doi.org/10.1155/2022/3405871>



Research Article

Antioxidative Stress and Anti-Inflammatory Activity of Fucoidan Nanoparticles against Nephropathy of Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats

Giftania Wardani ^{1,2}, Jusak Nugraha ³, Mohd. Rais Mustafa ⁴,
and Sri Agus Sudjarwo ⁵

¹Doctoral Program of Medical Science, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

²Program Study of Pharmacy, Faculty of Medicine, Hang Tuah University, Surabaya, Indonesia

³Department of Clinical Pathology, Dr. Soetomo Hospital, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

⁴Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia

⁵Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Correspondence should be addressed to Sri Agus Sudjarwo; ags158@yahoo.com

Received 5 January 2022; Revised 16 April 2022; Accepted 25 April 2022; Published 31 May 2022

Academic Editor: Wen-Bin Shang

Copyright © 2022 Giftania Wardani et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Oxidative stress and inflammation have been shown to interact and have the role of importance in causing diabetic nephropathy complications. Fucoidan has a strong antioxidant and anti-inflammation effect, so the aim of this research was to evaluate the antioxidative stress and anti-inflammatory effect of fucoidan nanoparticles against nephropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats. Fucoidan nanoparticles are characterized using dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscope (SEM). The rats were randomized into the control group (were given with aquadest), streptozotocin group (were injected with streptozotocin at a dose of 55 mg/kg BW i.p.), and fucoidan nanoparticle group (were given orally with fucoidan at doses 75, 150, and 300 mg/kg BW and then injected streptozotocin at a dose of 55 mg/kg BW i.p.). The blood was taken to evaluate the level of blood urea nitrogen (BUN) and creatinine. The kidney tissues were collected to measure malondialdehyde (MDA), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor α (TNF- α) by ELISA; superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) by immunohistochemical staining and histological observation by Hematoxylin & Eosin (H&E) staining. The DLS demonstrated that the fucoidan nanoparticle size was 330.6 ± 58.8 nm, and the SEM showed an irregular shape with a rough surface image. The administration of streptozotocin significantly increased BUN, creatinine, MDA, IL-6, and TNF- α levels, whereas expression of SOD and GPx decreased as compared with the control group ($p < 0.05$). The administration of fucoidan nanoparticles only at a dose of 300 mg/kg BW significantly decreases BUN, creatinine, MDA, IL-6, and TNF- α levels. However, fucoidan nanoparticles at a dose of 300 mg/kg BW significantly increase SOD and GPx expression as compared with the streptozotocin group ($p < 0.05$). The administration of streptozotocin caused the loss of normal kidney cell structure and necrosis, while treatment with fucoidan nanoparticles improved renal cell necrosis. It can be concluded that fucoidan nanoparticles are promising agents in terms of the protection afforded against streptozotocin-induced nephropathy through antioxidative stress by decreasing MDA and increasing SOD and GPx and through anti-inflammatory effect by decreasing levels of IL-6 and TNF- α .

1. Introduction

Hyperglycemia is the sign of diabetes mellitus (DM) that it is a very high prevalence and can cause death due to complications in several organs of the body. Hyperglycemia that lasts a long time can cause tissue damage and can cause

various complications such as retinopathy, atherosclerosis, neuropathy, cardiomyopathy, and diabetic nephropathy [1, 2]. Diabetic nephropathy is a significant cause of chronic kidney disease and end-stage renal failure globally due to the presence of genetic susceptibility, glycometabolic disorders, changes in renal hemodynamics, oxidative stress, and

inflammatory cytokines [3, 4]. Oxidative stress and inflammation have been shown to interact and have a pivotal role in causing diabetic nephropathy complications [5, 6].

Oxidative stress is a condition that occurs during an imbalance between the production of reactive oxygen species ((ROS) increasing (superoxide anions (O_2^-), hydroxyl radical (OH^\cdot), hydrogen peroxide (H_2O_2)), and antioxidant defense system (SOD, GPx, and catalase) decreasing [7, 8]. The increasing formation of ROS can cause diabetic complications, through (a) increased production of advanced glycation end products (AGEs), (b) pathway flux of polyol, (c) the hexosamine pathway overactivity of (d) increasing expression of the receptor for AGEs, and (e) protein kinase C isoforms activation [9, 10]. It has been reported that oxidative stress is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. ROS can oxidize lipid components to produce MDA. The results of the MDA examination can be used as a biomarker for increased ROS production, which is an indicator of free radical damage under oxidative stress [11, 12].

On the other hand, cytokines of inflammatory such as IL-6 and TNF- α also cause impaired function and damaged kidneys in diabetes. In diabetes, renal cells (epithelial, mesangial, endothelial, and tubular cells) produce the cytokine of inflammatory IL-6 and TNF- α . Therefore, these inflammatory cytokines play a pivotal role and are involved in the progression of diabetic nephropathy complications [13]. It has been demonstrated that hyperglycemia causes the IL-6 and TNF- α increase; through the oxidative mechanism, research on diabetic patients has shown a significant association between IL-6, TNF- α , and diabetic nephropathy that can be used as indicators of diabetic nephropathy [5, 14, 15]. Thus, ingredients that can inhibit oxidative stress and inflammation are essential for the treatment and prevention of diabetic nephropathy.

The previous research showed that the presence of impaired function and a damaged kidney in a diabetic rat model of streptozotocin is the same as that of inhuman diabetic nephropathy [12, 16]. Streptozotocin also caused lower levels of SOD and GPx and higher MDA, IL-6, and TNF- α levels in the kidney tissues of a diabetic rat. Nephropathy in a diabetic rat model can be seen with an increase in BUN and creatinine in serum as a marker of impaired kidney function [17]. It was reported that streptozotocin can cause oxidative stress and inflammation, which can further damage the kidneys in diabetic rat model complications and eventually lead to nephropathy. Thus, agents that have antioxidant and anti-inflammation effects can be used to prevent nephropathy in diabetes [18, 19]. It has been reported that fucoidan is a natural product that has a strong antioxidant effect. Fucoidan derived from algae has been studied intensively during the last years regarding its antioxidant activities and therapeutic potential. Fucoidan also has pharmacological properties such as anti-inflammatory, anticancer, antibacterial, immunostimulant, antidiabetic, antiatherosclerosis, and antioxidant [20–22].

Recently, it has been demonstrated that nanobiotechnology has an essential role that is shown by the presence of synthesis of natural product nanoparticles. Therefore, natural product nanoparticles are seen as having

opportunities in preventing and treating diseases, both in humans and animals. The synthesis of natural products based on nanoparticles when it is compared to purely natural products offers more improvement in drug stability, treatment efficacy, and penetration power [23–25].

From the explanation above, the aim of this research was to evaluate the antioxidative stress and anti-inflammation effect of fucoidan nanoparticles to protect kidney cells damaged in streptozotocin-induced diabetic rats.

2. Materials and Methods

2.1. Manufacturing of Fucoidan Nanoparticles by Ball Milling Methodology. The powder of fucoidan was milled using a high-energy ball equipped with an insulating sheath and a cooling machine. The mixture ratio of steel balls and fucoidan powders was around 20:1 by weight percent. The container is filled about a third of its capacity. During milling, the flask was rotated at a constant milling speed at 500 rpm for up to 5 h. The direction of rotation of the ball mill is changed every 30 minutes. The process of ball milling is conducted at a temperature of 27°C, and the temperature has maintained with the air conditioning system to prevent overheating.

SEM was used to evaluate the characteristics of morphology of the surface, including the shape, size, and topography of the fucoidan nanoparticles and then also carried out the identification particle size of fucoidan nanoparticles by DLS (Horiba LA 900, Japan).

2.2. Ethical Approval. We conducted all animal experiments based on the guidelines approved by the Animal Use Committee (Approval number: No.200/FK. UHT/V/2021), and all procedures of experiments have been agreed upon by the Committee of the Ethical Clearance for Research of preclinical, Faculty of Medicine, Hang Tuah University, Surabaya, Indonesia.

2.3. Experiment and Animals. Wistar male rats, which were healthy weighed 200–250 g and aged 2.5 to 3 months, were used in the study. These rats were obtained from the University of Airlangga, Surabaya, Indonesia. In this experiment, the rats were put in a plastic cage and placed in an air-conditioned room with the temperature maintained at $26 \pm 2^\circ\text{C}$; in addition, the dark and light cycles were alternated for 12 hours. The rats for this experiment were given fed a standard commercial drinking water ad libitum.

2.4. Diabetic Model Rat. The rat fasted overnight and then was injected with streptozotocin at a dose of 55 mg/kg BW intraperitoneal (i.p.) that dissolved in citrate buffer (0.1 M; pH 4.5). Three days after streptozotocin injection, blood samples were taken through the lateral vein of the tail and tested for blood glucose levels by the glucometer (Accu-Check, Roche Diagnostics, Pvt., Ltd.). Rats with a level of glucose >250 mg/dL could be used as experimental animals.

2.5. Experimental Designs. Forty rats were randomized into the control group (rats were given aquadest), streptozotocin group (rats were injected with streptozotocin at a dose of 55 mg/kg BW i.p.), and fucoidan nanoparticles group (rats were injected with streptozotocin at a dose of 55 mg/kg BW and after 3 days and given fucoidan nanoparticles at doses of 75, 150, and 300 mg/kg BW orally once a day for 75 days). On day 75th of all groups of rats, blood was taken intracardially for examination of BUN and creatinine levels. The kidney was collected and fixed in 10% buffered formalin for observation of kidney damage in histological preparation. And the levels of MDA, IL-6, and TNF- α were measured by ELISA, and the expression of SOD and GPx were measured by immunohistochemical staining.

2.6. Measurement of Inflammatory Cytokines IL 6 and TNF in Diabetic Rat Kidneys. A total of 50 mg of kidney tissues were washed with 1% phosphate-buffered saline (PBS) five times until clean. The sample was pounded with a mortar and then was added 0.5 ml of sample buffer, and centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes. The supernatant was taken. Rat IL-6 ELISA kit PicoKine™ Boster was used to measure the IL-6 level. Similarly, TNF- α was also measured with Rat TNF- α ELISA kit PicoKine™ Boster, according to the manufacturer protocol. Place the sample in a standard microplate and then incubate at 37°C for 90 minutes. Add biotinylated antibody and incubate the plate at 37°C for 60 minutes and wash it three times with PBS 0.01 M. Add Avidin-Biotin Complex working solution and incubate the plate at 37°C for 30 minutes. Wash the plate with PBS 0.01 M. Add TMB color developing agent and incubate at 37°C for 20 minutes. Add 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) stop solution and read the OD value on a 450 nm microplate reader. Furthermore, a standard curve is made between the values of OD to concentration so that we get the IL-6 or TNF- α concentration levels in pg/ml.

2.7. Measurement of MDA in Diabetic Rat Kidney Tissues. MDA was measured in the supernatant of homogenized kidney tissues using the thiobarbituric acid (TBA) technique, which predicts MDA production using a TBARS assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). The absorbance coefficient of the MDA-TBA complex was used to assess the level of MDA, which was measured at 532 nm on a microplate reader. The extent of lipid peroxidation was quantified by estimating the MDA concentration. The results of MDA are expressed in nanomoles per milligram of tissue.

2.8. Immunohistochemical Staining of Antioxidant Enzymes in Kidney Tissues. Immunohistochemical staining was utilized to observe SOD and GPx expression. Kidney tissue slices of 4 μ m were deparaffinized and was added hydrogen peroxide at 37°C for 10 minutes to inhibit endogenous peroxide. Then, 10% normal sheep serum was given in Iris-buffered salt solution at 37°C for 30 minutes. Furthermore, incubated overnight at 4°C with anti-rat anti-SOD monoclonal (1:100; ab8376; Abcam, Cambridge, MA, USA) or anti-rat anti-GPx monoclonal (1:100; sc8008, Santa Cruz Biotechnology) antibodies. After that, We

washed three times with PBS and incubated with a secondary antibody from the UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 30 minutes at room temperature, and with 3.3' diaminobenzidine (DAB) color reagent. Immunohistochemical expressions were observed by microscopy and semiquantified by Image-Pro Plus 6.0 software. The integrated optical density (IOD) of each photo was collected. Images were measured by immunoreactive area (IA) in μ m² and IOD. The staining intensity (SI) for each image was calculated as SI = IOD/IA and the mean with standard deviation.

2.9. Histopathological Examination. Rats were sacrificed, and their kidneys were collected and fixed in 10% buffered formalin solution, dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin. Kidney tissue sectioned at 5 μ m was stained with hematoxylin and eosin. The sections were examined under a microscope for the presence of indicators of cellular damage such as tubular necrosis and renal tubular degeneration.

2.10. Biochemistry Evaluation of Creatinine and BUN. Blood samples were collected for the estimation of serum creatinine and BUN using commercial enzymatic kits (Reckon Diagnostics) according to the supplier's specifications and were determined by spectrophotometry (ILab Aries; Instrumentation Laboratory, Milan, Italy) using commercial kits (Instrumentation Laboratory).

2.11. Statistical Analysis. The data were presented in the form of means \pm standard deviation. The one-way analysis of variance (ANOVA) is used to analyze the data and will be continued with the LSD test through the application of SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

3. Results

3.1. Scanning Electron Microscope for Characterization of Fucoidan Nanoparticles. The ball milling was used in the preparation of fucoidan. SEM images showing the morphology of fucoidan nanoparticles, rough surface, and shape irregular is presented in Figure 1.

3.2. Dynamic Light Scattering Is Used in the Characterization of Fucoidan Nanoparticles. As shown in Figure 2, the average particle size of the fucoidan nanoparticles produced by DLS was 330.6 \pm 58.8 nm.

3.3. Effects of Fucoidan Nanoparticles on MDA Level of the Kidney Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. The MDA production can be used as a biomarker for increased ROS production, which is an indicator of kidney cell damage under oxidative stress. The results of the study of kidney MDA levels are presented in Table 1. MDA is the production of lipid peroxidation whose levels increase in oxidative stress. The administration of streptozotocin significantly increased MDA levels in kidney tissue compared to the control group ($p < 0.05$). In diabetic nephropathy, rats

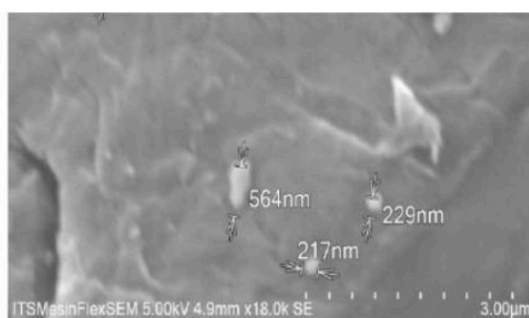


FIGURE 1: Scanning electron microscope images of fucoidan nanoparticles.

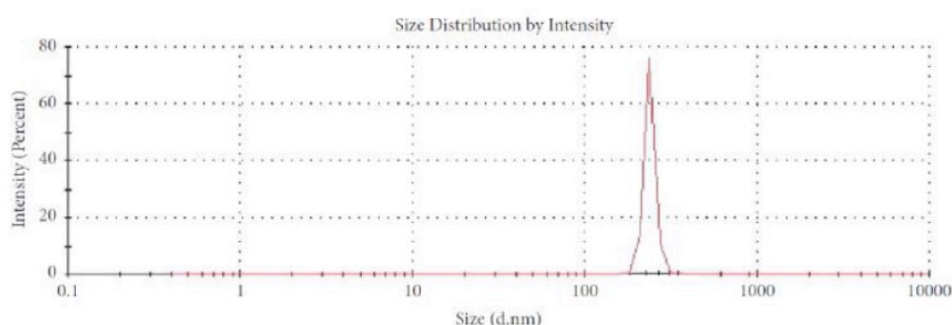


FIGURE 2: Size distribution of fucoidan nanoparticles by dynamic light scattering.

treated with fucoidan nanoparticles significantly reduced MDA levels at a dose of 300 mg/kg BW but not at a dose of 75 mg/kg BW and 150 mg/kg BW ($p < 0.05$).

3.4. Effect of Fucoidan Nanoparticles on SOD Expression of the Kidney Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. The role of SOD as a first-line antioxidant defense is important and indispensable to prevent kidney cell damage due to ROS. The expression of SOD in kidney tissue is presented in Figure 3. The administration of streptozotocin significantly decreased the expression of SOD in kidney tissue compared to the control group ($p < 0.05$). However, dose-dependent treatment with fucoidan nanoparticles could increase SOD expression in kidney tissue and only at a dose of 300 mg/kg BW could significantly increase SOD (Figure 3) expression compared to the streptozotocin group ($p < 0.05$).

3.5. Effect of Fucoidan Nanoparticles on GPx Expression of the Kidney Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Antioxidant enzymes such as GPx have a pivotal role in protecting oxidative cell injury caused by ROS. The expression of GPx in kidney tissue is presented in Figure 4. The administration of streptozotocin significantly decreased the expression of GPx in kidney tissue compared to the control group ($p < 0.05$). However, dose-dependent treatment with fucoidan nanoparticles could increase GPx expression in kidney tissue and only at a dose of 300 mg/kg BW could

TABLE 1: Effect of fucoidan nanoparticle on MDA levels of kidney tissues of streptozotocin-induced diabetic rat.

Group	Means \pm SD MDA (nmol/mg)
Control group	2.24 ^a \pm 0.28
Streptozotocin group	6.09 ^b \pm 0.46
Fucoidan nano, 75 mg/kg BW	5.78 ^b \pm 0.65
Fucoidan nano, 150 mg/kg BW	4.61 ^{bc} \pm 0.53
Fucoidan nano, 300 mg/kg BW	3.82 ^{cd} \pm 0.39

The different superscripts in each column show significant difference between the means ($p < 0.05$).

significantly increase GPx (Figure 4) expression compared to the streptozotocin group ($p < 0.05$).

3.6. Effect of Fucoidan Nanoparticles on Inflammatory Cytokines of the Kidney Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Cytokines of inflammatory such as IL-6 and TNF- α play a pivotal role in kidney damage that can be used as indicators of diabetic nephropathy. To prove that fucoidan nanoparticles are involved in regulating inflammatory cytokines in streptozotocin-induced kidney damage in diabetic rats, we measured the inflammatory cytokines level of IL-6 and TNF- α . As presented in Table 2, the administration of streptozotocin significantly increased the level of IL-6 and TNF- α in kidney tissue compared to the control group ($p < 0.05$). However, dose-dependent treatment with fucoidan nanoparticles could decrease the levels of IL-6 and TNF- α in kidney tissue and only at a dose of 300 mg/kg BW

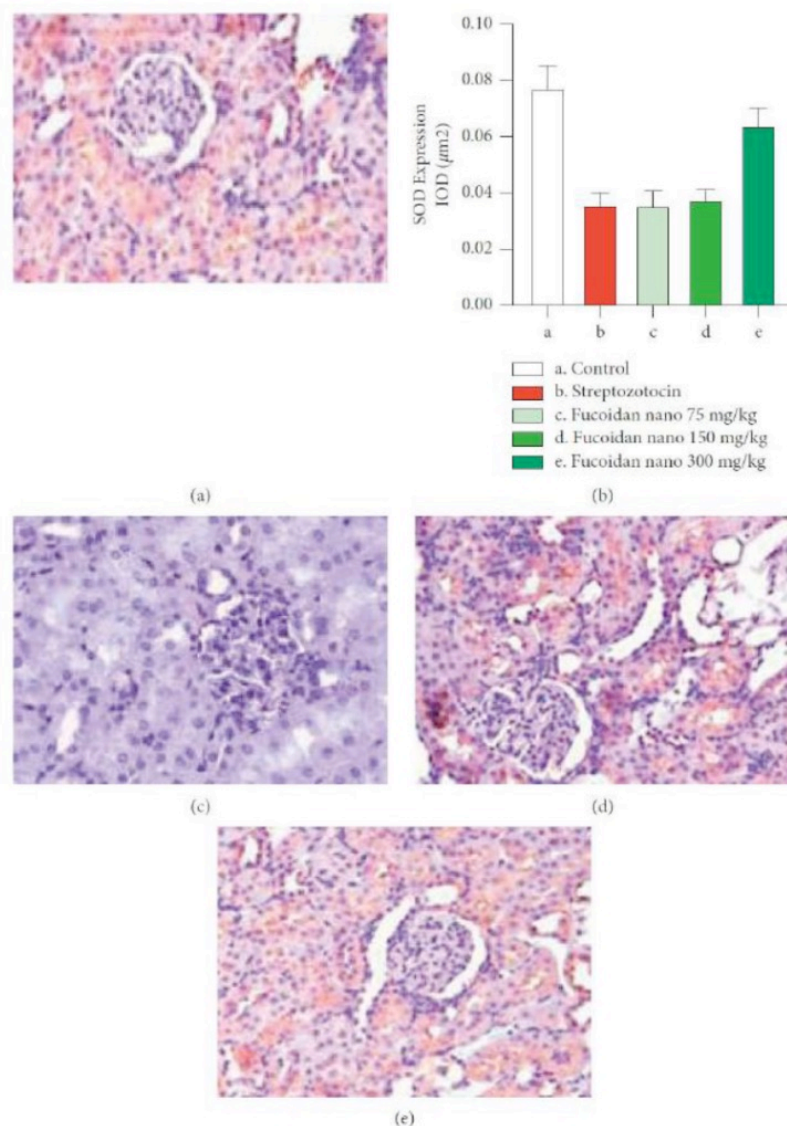


FIGURE 3: Photomicrographs of immunohistochemical staining of SOD expression of rat kidney tissue: (a) SOD expression in rat kidneys from the control group (A), streptozotocin group (B), and the fucoidan nanoparticle group with a dose of 75 mg/kg BW (C), 150 mg/kg BW (D), and 300 mg/kg BW (E) and (b) IOD/ μm^2 shows SOD expression in semiquantitative evaluation (400x).

could significantly decrease the level of IL-6 and TNF- α compared to the streptozotocin group ($p < 0.05$).

3.7. Effect of Fucoidan Nanoparticles on BUN and Creatinine Levels in the Serum of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.

The diagnosis of kidney damage is usually based on measurements of BUN and serum creatinine. The effects of fucoidan nanoparticles on the level of BUN and Creatinine in the serum of diabetic rats are presented in Table 3. The administration of streptozotocin significantly increased BUN and creatinine levels in serum compared with the control group

($p < 0.05$). This result indicates that streptozotocin could cause kidney cells damaged in rats. However, dose-dependent treatment with fucoidan nanoparticles could decrease the level of BUN and creatinine in kidney tissue and only at a dose of 300 mg/kg BW could significantly decrease the level of IL-6 and TNF- α compared to the streptozotocin group ($p < 0.05$).

3.8. Effect of Fucoidan Nanoparticles on the Structural Changes of the Kidney Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.

To prove the nephroprotective of fucoidan nanoparticles, we conducted histopathological examination

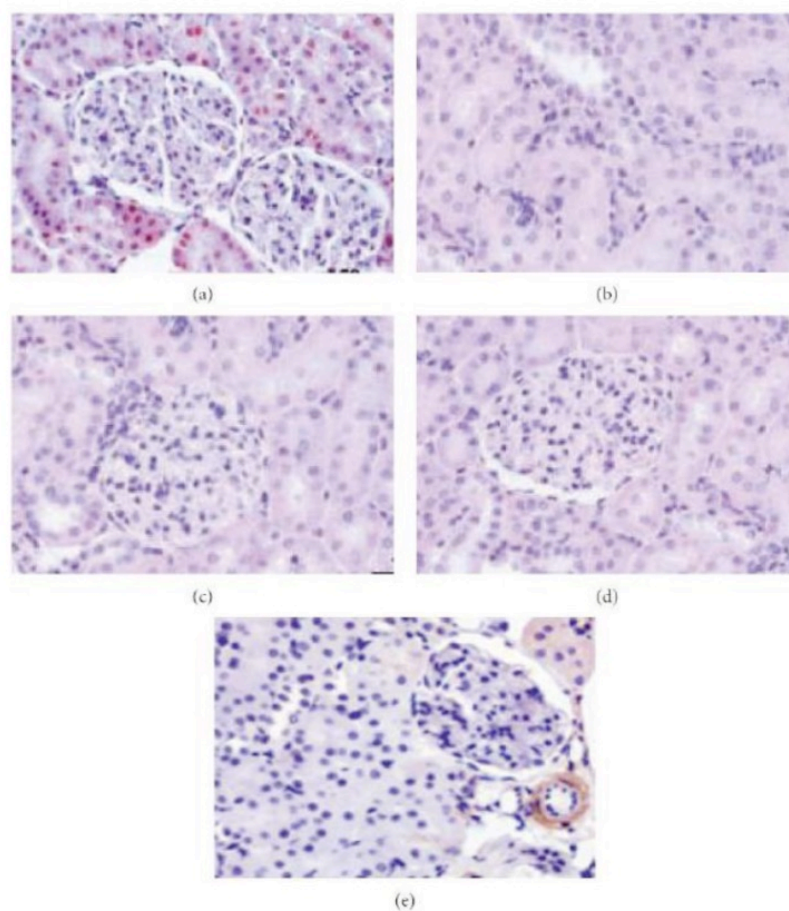


FIGURE 4: Photomicrographs of immunohistochemical staining of GPx expression of rat kidney tissue: (a) GPx expression in the rat kidney from the control group (A), streptozotocin group (B), and the fucoidan nanoparticle group with a dose of 75 mg/kg BW (C), 150 mg/kg BW (D), and 300 mg/kg BW (E) and (b) IOD/ μm^2 shows GPx expression for semiquantitative evaluation (400x).

TABLE 2: Effect of fucoidan nanoparticles on IL-6 and TNF- α levels in the kidney tissue of streptozotocin-induced diabetic rats.

Group	Means \pm SD	
	IL-6 (pg/mg protein)	TNF- α (pg/mg protein)
Control group	35.4 ^a \pm 4.2	41.2 ^a \pm 5.3
Streptozotocin group	89.3 ^b \pm 7.3	107.6 ^b \pm 9.2
Fucoidan nano, 75 mg/kg BW	92.8 ^b \pm 8.5	104.3 ^b \pm 7.8
Fucoidan nano, 150 mg/kg BW	83.6 ^b \pm 6.9	98.7 ^b \pm 6.2
Fucoidan nano, 300 mg/kg BW	48.1 ^c \pm 4.3	65.8 ^c \pm 6.7

The different superscripts in each column show significant difference between the means ($p < 0.05$).

of streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats. Light microscopic examination revealed that the control group exhibited normal structure of the kidney. The administration of streptozotocin can cause morphological irregularities, several tubular degenerations, and tubular necrosis (Figure 5). The treatment with fucoidan nanoparticles could inhibit tubular necrosis and protect the normal structure of the kidney.

4. Discussion

Hyperglycemia is one of the signs of diabetes mellitus (DM), which can produce excessive ROS in the body and lead to the production of inflammatory cytokines increasing and accelerating kidney cell damage in diabetes. Interaction of oxidative stress and inflammation has a very pivotal role in the pathogenesis and progress of

TABLE 3: Effect of fucoidan nanoparticle on BUN and creatinine level in the serum of streptozotocin-induced diabetic rats.

Group	Means \pm SD	
	BUN (mmol/L)	Creatinine (mmol/L)
Control group	9.3 ^a \pm 3.21	32.1 ^a \pm 4.18
Streptozotocin group	21.2 ^b \pm 5.32	51.4 ^b \pm 6.24
Fucoidan nano, 75 mg/kg BW	22.4 ^b \pm 4.62	54.7 ^b \pm 5.99
Fucoidan nano, 150 mg/kg BW	18.5 ^b \pm 4.76	49.5 ^b \pm 6.81
Fucoidan nano, 300 mg/kg BW	12.1 ^c \pm 3.58	39.3 ^c \pm 4.73

The different superscripts in each column show significant difference between the means ($p < 0.05$).

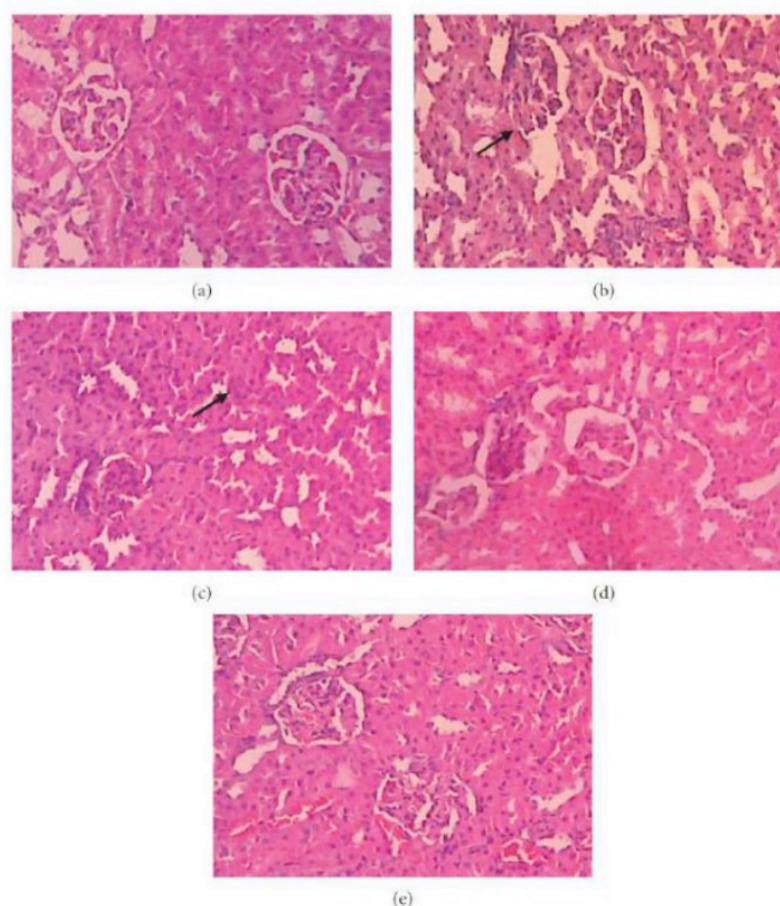


FIGURE 5: Photomicrographs of H&E staining of rat kidney tissue. The control group showed normal morphology in the kidney (a). The necrosis (black arrows) is found in the streptozotocin group (b). The treatment of fucoidan nanoparticles with 75 mg/kg BW and 150 mg/kg BW given to rats still indicated the presence of mild necrotic (c, d), while the treatment of nanoparticles of fucoidan 300 mg/kg showed the presence of regeneration in damaged kidney cells (e) (H&E, 400x).

kidney damage in diabetes, which is called nephropathy [3, 4].

In diabetes, excessive ROS production can reduce antioxidant defenses, leading to the oxidation of proteins, DNA, and lipids, resulting in diabetic nephropathy [2, 26]. In addition, hyperglycemia is vulnerable to oxidative stress-induced

cell damage due to inhibited antioxidant ability through glycation of scavenging enzymes, such as SOD and GPx. It is also due to the interaction of glucose with proteins that AGEs are formed, which block receptors and inactivate enzymes [1, 2].

Since oxidative stress and inflammation in the rat model of diabetes caused by streptozotocin have an important role

in the progress of diabetic nephropathy, so it is necessary to evaluate several oxidative stress and inflammatory cytokine parameters such as MDA, SOD, GPx, IL-6, and TNF- α [3, 4]. Streptozotocin can interfere with the function of the beta cells of the islets of Langerhans resulting in inhibition of insulin release, which in turn leads to hyperglycemia and diabetes complications such as diabetic nephropathy. The aim of the research was to evaluate the potency of anti-oxidative stress and anti-inflammatory effect of fucoidan nanoparticles to protect from STZ-induced diabetic nephropathy in rats.

Drug nanotechnology can be used to improve bio-distribution, specificity, sensitivity, and reduce pharmacological toxicity [23, 24]. Furthermore, the milling process is carried out to make fucoidan nanoparticles. And the results of fucoidan nanoparticles from this study indicate that the particle size of 330.6 ± 58.8 nm is expected to the effectiveness of its antioxidative stress and anti-inflammatory increase.

In the present research, streptozotocin-induced diabetic nephropathy showed that MDA levels increased; however, SOD and GPx expression reduced significantly ($p < 0.05$) compared to the control group. The administration of fucoidan nanoparticles was only at a dose of 300 mg/kg b.w. decreased MDA levels and increased SOD and GPx expression significantly ($p < 0.05$) as compared with the streptozotocin-induced diabetic nephropathy. MDA is a lipid peroxidation product that can be used as a marker of increased ROS formation in tissue damage. Streptozotocin is known to increase MDA levels in tissues of various organs including kidneys [27]. These results suggest that the administration of fucoidan nanoparticles in a dose-dependent manner inhibits oxidative stress that may protect the development of nephropathy in diabetic rats. These results are in agreement with the previous report that the scavenging of ROS by fucoidan may be partially related to the increased activity of antioxidant enzymes. The free radical scavenging activity of fucoidan can be attributed to the presence of OH groups in the polysaccharide unit of fucoidan that can react with hydroxyl free radicals (OH) in the test of hydroxyl radical assay. Cell possesses an intricate network of defense mechanisms, including antioxidant compounds such as GSH and antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase to neutralize excessive ROS accumulation. Oxidative stress in hyperglycemia is a key role in the progression of kidney injury, which relates to diabetic nephropathy. Hyperglycemia is recognized to induce oxidative stress with an imbalance between decreased antioxidant defense and increased ROS production. The administration of antioxidants fucoidan nanoparticles can improve kidney function by preventing oxidative tissue damage in diabetic nephropathy. The same result, the administration of exogenous antioxidants such as *Syzygium aromaticum*, *Black mulberry* fruit, and *Heteroxenia ghardaqensis* can inhibit ROS formation by scavenging the intracellular ROS that has been formed [17, 18, 28].

On the other hand, inflammatory cytokines have also been associated with nephropathy in diabetic patients. Our research describes that inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α levels in kidney tissue are significantly increased in

streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats, indicating that these rats have kidney damage. We demonstrated that fucoidan nanoparticles at a dose of 300 mg/kg BW but not at a dose of 75 mg/kg BW and 150 mg/Kg BW significantly reduced IL-6 and TNF- α levels in the kidney tissue of diabetic rats. This result suggested that fucoidan nanoparticles inhibit the inflammation effect in protecting kidney damage in diabetic rats. The most discussed possible mechanism of anti-inflammatory effect of fucoidan is the downregulation of MAPK and NF- κ B signaling pathway and the following decrease in the production of inflammatory cytokine IL-6 and TNF- α . Inflammation has also an important role in the occurrence of nephropathy in diabetes. Hyperglycemia may also cause diabetic nephropathy through ROS activation, further accelerating the production of inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α , leading to diabetic nephropathy [4, 5]. Previous studies have also shown that administration of exogenous antioxidants can inhibit diabetic nephropathy due to inhibition of oxidative stress, resulting in a decrease in the production of inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α [3, 6].

In the results, we also showed that kidney functional impairment in streptozotocin-induced diabetic nephropathy was evidenced by the increased levels of biochemical markers such as BUN and creatinine, which were significantly higher as compared with the control group. The administration of fucoidan nanoparticles at a dose of 300 mg/kg BW but not at doses of 75 mg/kg BW and 150 mg/Kg BW significantly reduced BUN and creatinine levels in the kidney cell damage of diabetic rats. Streptozotocin-induced nephropathy is characterized by elevated serum BUN and creatinine levels that are associated with increased ROS formation in oxidative stress [15]. The ability of antioxidants to remove ROS has been demonstrated to be an important role in contributing to nephroprotective efficacy. The administration of fucoidan nanoparticle significantly decreases streptozotocin-induced kidney cell damage, which is related to reduced creatinine and BUN serum levels, suggesting that fucoidan nanoparticles have the ability to inhibit kidney cell damage caused by streptozotocin. These results are in agreement with previous research that the antioxidant enzyme has the ability to inhibit streptozotocin-induced nephropathy as shown by decreased levels of BUN and creatinine in serum [17]. In the present research, the fucoidan nanoparticles can protect against streptozotocin-induced kidney damage. This result is the first research to report the inhibition of streptozotocin-induced kidney injury by fucoidan nanoparticles in rats significantly. Kidney function was also increased, demonstrated by a decrease in BUN and creatinine, and accompanied by inhibition of kidney oxidative stress, which was indicated by a decrease in kidney MDA levels, an increase in antioxidants expression (SOD and GPx activities), and an increase in inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α). Fucoidan nanoparticles inhibit kidney cell damage induced by streptozotocin, as evidenced by reduced BUN and creatinine levels in kidney tissue; furthermore, the histological observation clearly indicates that necrosis in the tubular induced by streptozotocin was remarkably decreased by the administration of fucoidan

nanoparticle. This study shows that fucoidan nanoparticles have nephroprotective activity through antioxidants and anti-inflammatory. Therefore, it is hoped that fucoidan nanoparticles can be used to help people with diabetes prevent complications such as retinopathy, nephropathy, atherosclerosis, and cardiomyopathy. Furthermore, it is necessary to investigate the antiapoptotic role of fucoidan nanoparticles in diabetic nephropathy.

5. Conclusion

The nephroprotection of fucoidan nanoparticles appears to be related to the antioxidative stress that suppresses MDA and increases SOD and GPx expression and the anti-inflammatory effect that decreases IL-6 and TNF- α , which can further decrease BUN and creatinine levels in diabetic nephropathy.

Data Availability

The data used to support the findings of this research are included within the article.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This research was supported by a grant from the Finance Ministry Educational Fund Management Institution (LPDP), the Republic of Indonesia, through the Doctoral Program, Faculty of Medicine Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

References

- [1] C. M. O. Volpe, P. H. Villar-Delfino, P. M. F. dos Anjos, and J. A. Nogueira-Machado, "Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications," *Cell Death & Disease*, vol. 9, no. 2, pp. 119–131, 2018.
- [2] O. M. Ighodaro, "Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 108, pp. 656–662, 2018.
- [3] O. O. Oguntibeju, "Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links," *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, vol. 11, no. 3, pp. 45–63, 2019.
- [4] K. Luc, A. Schramm-Luc, T. J. Guzik, and T. P. Mikolajczyk, "Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes," *Journal of Physiology & Pharmacology*, vol. 70, no. 6, pp. 809–824, 2019.
- [5] J. C. Jha, F. Ho, C. Dan, and K. Jandeleit-Dahm, "A causal link between oxidative stress and inflammation in cardiovascular and renal complications of diabetes," *Clinical Science*, vol. 132, no. 16, pp. 1811–1836, 2018.
- [6] S. F. Rapa, B. R. Di Iorio, P. Campiglia, A. Heidland, and S. Marzocco, "Inflammation and oxidative stress in chronic kidney disease-potential therapeutic role of minerals, vitamins and plant-derived metabolites," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 1, pp. 263–285, 2019.
- [7] U. Asmat, K. Abad, and K. K. Ismail, "Diabetes mellitus and oxidative stress-a concise review," *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 24, no. 5, pp. 547–553, 2016.
- [8] S. A. Sudjarwo, K. Eraiko, G. W. Sudjarwo, and Koerniasari, "The potency of chitosan-Pinus merkusii extract nanoparticle as the antioxidant and anti-caspase 3 on lead acetate-induced nephrotoxicity in rat," *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, vol. 10, pp. 27–32, 2019.
- [9] R. Z. Alicic, M. T. Rooney, and K. R. Tuttle, "Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 12, pp. 2032–2045, 2017.
- [10] S. M. Fernandes, P. M. Cordeiro, M. Watanabe, C. D. d. Fonseca, and M. d. F. F. Vattimo, "The role of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats," *Archive of Endocrinology and Metabolism*, vol. 60, no. 5, pp. 443–449, 2016.
- [11] S. T. Chou and S. T. Tseng, "Oxidative stress markers in type 2 diabetes patients with diabetic nephropathy," *Clinical and Experimental Nephrology*, vol. 21, pp. 283–292, 2017.
- [12] M. Bigagli and M. Lodovici, "Circulating oxidative stress biomarkers in clinical studies on type 2 diabetes and its complications," *Oxidative Medicine of Cellular Longevity*, vol. 2019, Article ID 5953685, 9 pages, 2019.
- [13] J. A. Moreno, C. Gomez-Guerrero, S. Mas et al., "Targeting inflammation in diabetic nephropathy: a tale of hope," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 27, no. 11, pp. 917–930, 2018.
- [14] S. Rayego-Mateos, J. L. Morgado-Pascual, L. Opazo-Ríos et al., "Pathogenic pathways and therapeutic approaches targeting inflammation in diabetic nephropathy," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 11, pp. 3798–3818, 2020.
- [15] R. E. Pérez-Morales, M. D. Del Pino, J. M. Valdivielso, A. Ortiz, C. Mora-Fernández, and J. F. Navarro-González, "Inflammation in diabetic kidney disease," *Nephron*, vol. 143, no. 1, pp. 12–16, 2019.
- [16] N. M. Al-Rasheed, M. Nouf, N. M. Al-Rasheed et al., "Simvastatin ameliorates diabetic nephropathy by attenuating oxidative stress and apoptosis in a rat model of streptozotocin induced type 1 diabetes," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 105, pp. 290–298, 2018.
- [17] S. Abtahi-Eivari, M. Shokoohi, M. Ghorbani et al., "Effects of hydroalcoholic extracts of cloves (*Syzygium aromaticum*) on the serum biomarkers, antioxidant status, and histopathological changes of kidneys in diabetic rats," *Crescent Journal of Medical and Biological Sciences*, vol. 8, no. 4, pp. 269–275, 2021.
- [18] T. K. Abouzed, K. M. Sadek, E. W. Ghazy et al., "Black mulberry fruit extract alleviates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: targeting TNF- α inflammatory pathway," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 72, no. 11, pp. 1615–1628, 2020.
- [19] L. Guo, B. Jiang, D. Li, and X. Xiao, "Nephroprotective effect of adropinin against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: inflammatory mechanism and YAP/TAZ factor," *Drug Design and Development*, vol. 15, pp. 589–600, 2021.
- [20] S. Luthuli, S. Wu, Y. Cheng, X. Zheng, M. Wu, and H. Tong, "Therapeutic effects of fucoidan: a review on recent studies," *Marine Drugs*, vol. 17, no. 9, pp. 487–502, 2019.
- [21] Y. Wang, M. Xing, Q. Cao, A. Ji, H. Liang, and S. Song, "Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: a review of recent studies," *Marine Drugs*, vol. 17, no. 3, pp. 183–201, 2019.

- [22] F. Atashrazm, R. Lowenthal, G. Woods, A. Holloway, and J. Dickinson, "Fucoïdan and cancer: a multifunctional molecule with anti-tumor potential," *Marine Drugs*, vol. 13, no. 4, pp. 2327–2346, 2015.
- [23] R. Saini, S. Saini, and S. Sharma, "Nanotechnology: the future medicine," *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, vol. 3, pp. 32–33, 2010.
- [24] S. Yadav and V. Kumar, "Nanotechnology: a tool to enhance therapeutic values of natural plant products," *Trends in Medical Research*, vol. 7, no. 2, pp. 34–42, 2012.
- [25] S. A. Sudjarwo, C. Anwar, G. Wardani, K. Eraiko, and Koerniasari, "Antioxidant and anticaspase 3 effect of chitosan-*Pinus merkusii* extract nanoparticle against lead acetate-induced testicular toxicity in rat," *Asian Pacific Journal of Reproduction*, vol. 8, no. 1, pp. 13–19, 2019.
- [26] S. Sifuentes-Franco, D. E. Padilla-Tejeda, S. Carrillo-Ibarra, and A. G. Miranda-Díaz, "Oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial function in diabetic nephropathy," *International Journal of Endocrinology*, vol. 2018, Article ID 1875870, 13 pages, 2018.
- [27] M. Radenković, M. Stojanović, and M. Prostran, "Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: the current state of the art," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 78, pp. 13–31, 2016.
- [28] A. R. Farrag, M. Nassar, and Z. El-Khayat, "Heteroxenia ghardaqensis extract protects against DNA damage in streptozotocin-induced experimental diabetes," *Biomedical and Pharmacology Journal*, vol. 12, no. 1, pp. 24–39, 2019.

Research Article

Antioxidative Stress and Antiapoptosis Effect of Chitosan Nanoparticles to Protect Cardiac Cell Damage on Streptozotocin-Induced Diabetic Rat

Giftania Wardani ^{1,2}, Jusak Nugraha ³, Mohd. Rais Mustafa ⁴, Rochmah Kurnijasanti,⁵ and Sri Agus Sudjarwo ⁵

¹Doctoral Program of Medical Science, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

²Study Program of Pharmacy, Hang Tuah University, Surabaya, Indonesia

³Department of Clinical Pathology, Dr Soetomo Hospital, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

⁴Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia

⁵Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Correspondence should be addressed to Sri Agus Sudjarwo; ags158@yahoo.com

Received 26 January 2022; Revised 22 March 2022; Accepted 1 April 2022; Published 25 April 2022

Academic Editor: Massimo Lucarini

Copyright © 2022 Giftania Wardani et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The antioxidant can inhibit oxidative stress and apoptosis, which has a role in an important mechanism on diabetic-induced cardiac cell damage. The research goal was to prove the antioxidative stress and antiapoptosis effect of chitosan nanoparticles as a cardioprotector in streptozotocin-induced diabetic rats. Scanning electron microscope (SEM) and dynamic light scattering (DLS) characterize the chitosan nanoparticles. This research is a laboratory experiment which consists of the control group (rats were given distilled water), the streptozotocin group (rats were injected streptozotocin at dose of 55 mg/kg BW i.p), and the chitosan nanoparticle group (rats were given streptozotocin at dose 55 mg/kg BW i.p, and then given chitosan nanoparticles at dose 75 mg/kg BW, 150 mg/kg BW, and 300 mg/kg BW peroral). Creatine kinase-myoglobin (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured from the blood sample. Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) from cardiac tissue were examined by ELISA; nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) was evaluated by western blotting; B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and Caspase-3 expression were investigated by immunohistochemical staining and also were evaluated histological preparation by hematoxylin & eosin (H&E) staining. The chitosan nanoparticles have a rough surface and an irregular shape. Its size is $247.3 \pm 38.1 \mu\text{m}$. Streptozotocin injection significantly increased the levels of CK-MB, LDH, MDA, and expression of caspase-3. In contrast, the levels of SOD, GPx, Nrf2, and expression of Bcl-2 decreased as compared with the control group ($p < 0.05$). This is accompanied by the loss of normal cardiac cell structure and necrosis. The administration of chitosan nanoparticles significantly reduced levels of CK-MB, LDH, MDA, and expression of Caspase-3. However, the levels of SOD, GPx, Nrf2, and expression of Bcl-2 increased as compared with the streptozotocin group ($p < 0.05$). And also, chitosan nanoparticles inhibited cell necrosis in diabetic rats. This study suggests that the administration of chitosan nanoparticles can protect cardiac cell damage in diabetic rats through antioxidative stress by decreasing ROS and increasing Nrf2 expression, level of SOD, and GPx and through antiapoptosis by increasing expression of Bcl-2 and decreasing expression of Caspase-3.

1. Introduction

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by hyperglycemia due to insulin deficiency or resistance to insulin action or both, which can be accompanied by

long-term microvascular and macrovascular complications, leading to morbidity and mortality [1, 2].

Many studies report that diabetic complications that result in cardiac cell damage are associated with oxidative stress and apoptosis. The molecular mechanism of diabetes

complications seems to be multifactorial, with various consequences for cellular function. It has been reported that apoptosis occurs after oxidative stress and is enhanced during diabetes complications-induced cardiac cell damage [3–5]. Hyperglycemia in diabetes can increase advanced glycosylated end products (AGEs), and increased Protein Kinase C activity results in an increase in the production of superoxide in the mitochondria. This effect causes an increase in oxidative stress due to the excessive production of free radicals [6]. Prolonged hyperglycemia can lead to oxidative stress due to the overproduction of reactive oxygen species (ROS) such as O_2^- , OH^- , and H_2O_2 , which counteract cellular redox balance and cause decreased antioxidants such as SOD, GPx, and Cat. Oxidative stress causes significant damage to several cellular biomolecules, including proteins, lipids, and DNA [7–9]. The resulting dysregulated expression of many genes and proteins leads to cell apoptosis and necrosis, contributing to the progression of diabetes complications such as retinopathy, neuropathy, nephropathy, and cardiomyopathy [3, 10]. Preclinical and human research has found a relation between hyperglycemia, ROS overproduction, and the occurrence of myocyte apoptosis [11, 12].

Apoptosis has an essential role in the pathogenesis of cardiac cell damage due to complications of diabetes. Caspase-3 is one of the main executors of apoptosis, and increased caspase-3 activity indicates the presence of cell apoptosis. Bax and Bcl-2 are apoptotic and antiapoptotic proteins, with the ratio of these two proteins determining the occurrence of cell apoptosis. Bcl-2 is an antiapoptotic regulator. Bcl-2 inhibits the release of cytochrome c and the formation of the apoptosome with Apaf1, which leads to the inhibition of caspase 9 and subsequently of caspase-3 [13, 14]. New studies show that Bcl2 decreases and caspase-3 increases cardiac cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Excessive ROS formation accelerates the process of apoptosis by inhibiting Bcl-2 expression and increasing caspase-3 activity, which shows that a relationship exists between oxidative stress and apoptosis [15, 16].

In addition, induction with streptozotocin in a diabetic rat model can enhance ROS and lower antioxidant enzyme effects [17, 18]. A previous study revealed that Nrf2 is a primary antioxidant regulator, and streptozotocin-induced decreased expression of Nrf2 is associated with decreased antioxidant linkage, as demonstrated by various investigators [15, 19]. Furthermore, ROS will oxidize cell membrane lipid that produces malondialdehyde (MDA) and may be used as a marker of tissue damage. The increase in MDA level indicates enhanced lipid peroxidation, causing cell necrosis or apoptosis in cardiac cell damage in diabetics. CK-MB and LDH levels in serum are used as marker enzymes of cardiac cell damage. This enzyme passes through the injured tissue and is the most effective sign of cardiomyopathy [3, 16, 20].

Several studies have shown that antioxidants can both prevent and cure cell injury induced by an increase in free radicals in the body. Exogen antioxidants like natural products have been used to avoid free radical production in streptozotocin-induced cardiac cell damage in diabetic rats [16, 21]. The crude product is used as an alternative product

to antioxidants because of its cheap cost and few side effects. One of the antioxidants found in natural products is chitosan, which is used in this research to inhibit oxidative stress and apoptosis in the cardiac cell damage of diabetic rats. Researchers have extensively reported chitosan for its antioxidant activity and are utilized for studies in both in vivo and in vitro [22, 23]. This indicates that chitosan regulates the activity of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation. Recently, chitosan has attracted much attention due to various biological activities associated with its antioxidant activity. Chitosan also has pharmacological properties such as hepatoprotective, nephroprotective, antiulcer, anticancer, immunostimulant, and antioxidant [24, 25]. It has been reported that chitosan is broadly used in pharmaceutical, industrial, and medical applications.

Recently, the production of natural medicine nanoparticles has played an important role in nanotechnology. The natural medicine nanoparticle has been given attention for prevention and therapeutic disease in both animals and humans. Compared to pure natural medicine, the nanoparticle-based natural treatment improved drug stability, delivery system, effectiveness, and penetration ability [26, 27]. Therefore, it is necessary to make chitosan preparations in the form of nanoparticles so the absorption, distribution, activity, and effectiveness of chitosan are improved as an antioxidant and antiapoptotic and can protect heart cell damage in diabetics.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Chitosan Nanoparticles by Ball Milling Methodology. The chitosan powder (Sigma-Aldrich, Co, USA) was milled using a high-energy ball equipped with an insulating sheath and a cooling machine. The weight ratio of chitosan powder to the ball (1:20) in stainless steel bottles (50 ml). The container is filled to about a third of its capacity. During milling, the flask was rotated at a constant milling speed of 500 rpm for 5 h. The direction of rotation of the ball mill is changed every 30 minutes. The ball milling process is conducted at a temperature of 27°C, and the temperature is maintained with the air conditioning system to prevent overheating.

Scanning electron microscopy was used to evaluate the characteristics of the surface morphology, including the shape, size, and topography of the chitosan nanoparticles as follows: 0.1 g of chitosan nanoparticle powder was suspended in 10 ml of ethanol. Then, the suspension was sonicated for 20 minutes and dripped onto carbon tape, which stuck and dried. Furthermore, it is coated with gold and placed on a ready SEM tool so that the results of the character and size of the chitosan nanoparticles can be obtained.

And also carried out the identification particle size of chitosan nanoparticles by dynamic light scattering (DLS) (Horiba LA, Japan) as follows: to another particle, the nanoparticles must be filtered. Then, put chitosan nanoparticles in a clean cuvette until 2/3 of the cuvette is filled. After that, the cuvette containing the chitosan nanoparticle solution is inserted into the tool and closed with a sensor. Before measuring, the temperature is first set at 25°C by pressing the

“Temp. Panel” menu. Standard starts counting by pressing the “Auto1” menu. Then, the tool will automatically measure the amount the particle size has been measured six times.

2.2. Ethical Approval. This research has been conducted through an ethical feasibility test, and all procedure experiments have been agreed upon by the Committee of the Ethical Clearance for Research in Preclinical, Faculty of Medicine, Hang Tuah University, Surabaya, Indonesia.

2.3. The Animal Experimental. In this experiment, we used male Wistar rats weighing about 225-250 g and aged between 2.5 and 3 months. The rat was obtained from Gajah Mada University in Yogyakarta, Indonesia. Rats were placed in a plastic cage in an air-conditioned room with a temperature maintained at 26°C. In addition, the dark and light cycles were alternated for 12 hours. The rat was given free feed, a standard commercial, and drinking water ad libitum.

2.4. A Diabetic Model Rat. The rat fasted overnight and then was injected with streptozotocin (Sigma Aldrich, Co, USA) at a dose of 55 mg/kg BW intraperitoneal (i.p) that was dissolved in citrate buffer (0.1 M; pH 4.5). Three days after the streptozotocin injection, blood samples were taken through the lateral vein of the tail and tested for blood glucose levels by the glucometer (Accu-Check, Roche Diagnostics, Pvt. Ltd.). Rats with a glucose level of >250 mg/dL could be used as experimental animals.

2.5. Experimental Designs. Forty rats were randomized into the control group (rats were given aqua dest), the streptozotocin group (rats were injected at a dose of 55 mg/kg BW i.p), and the chitosan nanoparticle group (rats were injected with streptozotocin at a dose of 55 mg/kg BW, and after 3 days, rats were given chitosan nanoparticles at doses of 75 mg, 150 mg, and 300 mg/kg BW orally once a day for 75 days). After 75 days of treatment, all the rats were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of 100 mg/kg ketamine (Ketalar, Pfizer, USA), and all groups were taken blood by intracardial to measure the level of CK-MB and LDH. The heart was collected and fixed in 10% buffered formalin for observation of heart damage in histopathological preparation. We measured the levels of MDA, SOD, and GPx by ELISA, Nrf2 expression by western blotting, expression of Bcl-2, and caspase-3 by immunohistochemical staining.

2.6. Measurement of MDA in Heart Tissue. MDA was measured in the supernatant of homogenized heart tissue using the thiobarbituric acid (TBA) technique, which predicts MDA production. The absorbance coefficient of the MDA-TBA complex was used to assess the level of MDA, which was measured at 532 nm. The Lipid Peroxidation Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BiovisionK739-100; Milpitas, CA95035, USA) was used to determine MDA levels. The results were expressed as nanomole MDA per milligram of tissue (nmol/mg tissue).

2.7. Measurement of Antioxidant Enzymes (SOD and GPx) in Heart Tissue. A total of 50 mg of heart tissue was washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 137 mM

NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 1.8 mM KH₂PO₄ five times until clean. The sample was pounded with a mortar, then 0.5 ml of sample buffer was added, and it was centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes. The supernatant was taken. Rat SOD ELISA kits (Biovision-K335-100; Milpitas, CA95035, USA) were used to measure the SOD level. Similarly, GPx was also measured with the rat GPx ELISA kit t (Biovision-K762-100; Milpitas, CA95035, USA) according to the manufacturer’s protocol. Enter the sample into a standard microplate incubate at 37°C for 90 minutes. Incubate the biotinylated antibody for 60 minutes at 37°C before washing three times with PBS 0.01 M. Incubate the plate at 37°C for 30 minutes with the Avidin-Biotin Complex working solution. Dish with PBS, 0.01 M. Incubates the TMB color developing agent for 30 minutes at 37°C. TMB stop solution and read the OD value on a 450 nm microplate reader. Furthermore, a standard curve is made between the value of OD and concentration so that we get the concentration SOD and GPx levels in pg/ml.

2.8. Immunohistochemical Staining of Bcl-2 and Caspase-3 Expression. Immunohistochemical staining was utilized to observe Bcl-2 and Caspase-3 expression. Heart tissue slices 4 μm were deparaffinized and were added hydrogen peroxide at 37°C for 10 minutes to inhibit endogenous peroxide. Then, 10% normal sheep serum was given in Tris-buffered salt solution at 37°C for 30 minutes and, furthermore, incubated overnight at 4°C with anti-Bcl-2 monoclonal (1:100; Santa Cruz Biotechnology, USA) or anti-rat anti-caspase3 monoclonal (1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA) antibodies. After that, they were washed three times with PBS and incubated with a secondary antibody from the Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 30 minutes at room temperature and with 3.3’ diaminobenzidine (DAB) color reagent. Immunohistochemical expressions were observed by microscopy and semiquantified by Image-Pro Plus 6.0 software. The integrated optical density (IOD) of each photo was collected. Images were measured by immunoreactive area (IA) in μm² and IOD. The staining intensity (SI) for each image was calculated as SI = IOD/IA and the mean with a standard deviation.

2.9. Western Blotting Analysis of Nrf2 Protein. A total of 50 mg protein from heart tissue was subjected to electrophoresis on 12% SDS-PAGE and transferred to the nitrocellulose membrane. The membrane was blocked in 5% skim milk at room temperature for 30 minutes and then probed with rat anti Nrf2 antibody (Invitrogen, ThermoFisher, Scientific, USA) at 4°C overnight; the membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibody for 1 hour at 37°C. Beta-actin was used for control. Bands were visualized and analyzed by densitometry with the Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

2.10. Measurement of CKMB and LDH. The enzymes CK-MB and LDH, which are linked to heart cell damage, were tested in the serum. The experiments were carried out using

commercially available test kits (Sigma-Aldrich Corp., MO, USA) and following the manufacturer's instructions.

2.11. Histopathological Examination. Rat's heart tissue was collected and fixed in 10% buffered formalin solution, dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin. Heart tissue sectioned at $4\ \mu\text{m}$ was stained with hematoxylin and eosin. The photomicrographs of each tissue section were observed using cell imaging software for life science microscopy (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Munster, Germany).

2.12. Statistical Analysis. The data were presented in the form of mean \pm standard deviation. The one-way analysis of variance (ANOVA) is used to analyze the data and will be continued with the LSD test through the application of SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, USA).

3. Results

3.1. Characterization of Chitosan Nanoparticles. Chitosan nanoparticle in scanning electron microscopy (SEM) shows a rough surface morphology and an uneven shape (Figure 1).

DLS shows that the chitosan nanoparticles particle size is approximately $247.3 \pm 38.1\ \mu\text{m}$ (Figure 2).

3.2. The Effect of Chitosan Nanoparticles on MDA, SOD, and GPx of Diabetic Rat Heart. The results of the ELISA assay demonstrated that the streptozotocin-induced cardiac cell damage significantly increased in the level of MDA and decreased in the level of SOD and GPx as compared with the control group ($p < 0.05$). However, we found that dose-dependent the administration of chitosan nanoparticles and only at dose $300\ \text{mg/kg BW}$ significantly reduced the level of MDA and enhanced the level of SOD and GPx as compared with the streptozotocin group ($p < 0.05$) (Table 1).

3.3. The Effect of Chitosan Nanoparticles on Nrf2 Protein Expression of Diabetic Rat Heart. Western blot analysis revealed that Nrf2 protein expression was significantly decreased in heart of the streptozotocin-induced diabetic rat ($p < 0.05$) as compared with the control group (Figure 3). However, dose-dependent administration of chitosan nanoparticles and only at dose $300\ \text{mg/kg BW}$ significantly increased Nrf2 protein expression as compared with streptozotocin-induced diabetic rats.

3.4. Effect of Chitosan Nanoparticle on Bcl-2 of Diabetic Rat Heart. To prove that chitosan nanoparticles are involved in apoptosis on streptozotocin-induced diabetic rats, we measured antiapoptosis Bcl-2 expression by immunohistochemical staining. The administration of streptozotocin significantly decrease Bcl-2 expression compared to the control group ($p < 0.05$). However, dose-dependent administration of chitosan nanoparticles could increase the expression of Bcl2 (Figure 4).

3.5. Effect of Chitosan Nanoparticle on Caspase-3 of Diabetic Rat Heart. To prove that chitosan nanoparticles are involved in apoptosis on streptozotocin-induced diabetic rats, we measured executioner Caspase-3 expression by immunohistochemical staining. The administration of streptozotocin

significantly increase Caspase-3 expression compared to the control group ($p < 0.05$). However, dose-dependent administration of chitosan nanoparticles could decrease caspase-3 (Figure 5) ($p < 0.05$).

3.6. The Effect of Nanoparticle Chitosan on the Serum Level of CK-MB and LDH of Diabetic Rat. As a marker of cardiac cell injury, the serum level of CK-MB and LDH was significantly increased in the streptozotocin-induced diabetic rat ($p < 0.05$). Following administration of chitosan nanoparticles only at a dose of $300\ \text{mg/kg BW}$ significantly decreased level of the CK-MB and LDH ($p < 0.05$) (Table 2).

3.7. The Effect of Chitosan Nanoparticles on the Structural Change of Diabetic Rat Heart. To evaluate the nephroprotective effect of chitosan nanoparticles, we conducted a histopathological examination of streptozotocin-induced cardiac cell injury in diabetic rats. Light microscope investigation revealed that the control group is the normal structure of the heart. The administration of streptozotocin can cause morphological irregularities, several cardiac cell degeneration, and necrosis (Figure 6). The treatment with chitosan nanoparticles could inhibit cardiac cell necrosis and protect the normal structure of the heart.

4. Discussion

Many researchers have developed an interest in synthesizing nanoparticles to enhance their biological activity, especially those used as antioxidant agents. A natural product of nanotechnology can increase bioavailability, biodistribution, sensitivity, and reduce pharmacological toxicity [26, 27]. The milling process is conducted to make chitosan nanoparticles. This research shows that the particle size of chitosan nanoparticles is $247.3 \pm 38.1\ \mu\text{m}$, which is expected to increase the effectiveness of antioxidative stress and antiapoptosis.

Oxidative stress and apoptosis often coexist in hyperglycemia and have been reported to have a role in multiorgan complications in diabetes mellitus. Overproduction of ROS leads to oxidative stress due to increased glucose autooxidation in hyperglycemia. Furthermore, ROS can trigger apoptosis signals, leading to cell damage [3, 4, 6, 11].

Streptozotocin-induced hyperglycemia in rats has been described as a useful experimental diabetes model for studying diabetic complications. Streptozotocin can interfere with the function of the beta cells of the islets of Langerhans, resulting in inhibition of insulin release, which in turn leads to hyperglycemia and diabetic complications like diabetic cardiomyopathy [6, 16]. The aim of the study was to evaluate the potency of antioxidative stress and antiapoptosis of chitosan nanoparticles to protect against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats.

The present study has revealed that when compared to the control group of rats, those injected with streptozotocin significantly exhibited elevated malondialdehyde and reduced endogenous antioxidant enzymes the SOD and GPx levels in cardiac tissue. Several investigators reported that the MDA level marker of lipid peroxidation was increased in hyperglycemia rats due to increased free radical

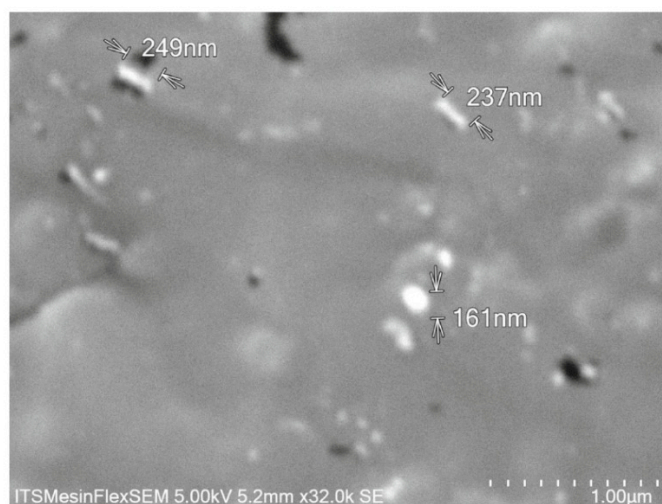


FIGURE 1: Chitosan nanoparticles in scanning electron microscope.

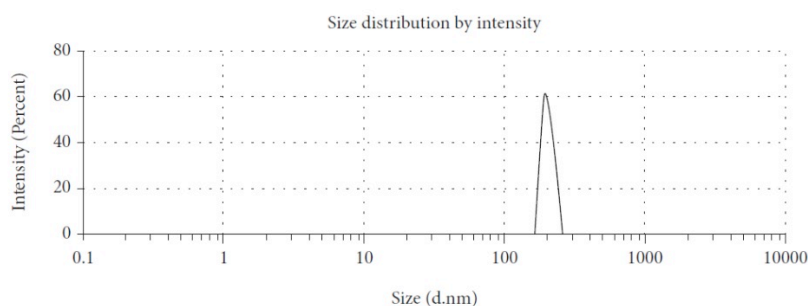


FIGURE 2: Size distribution of chitosan nanoparticles by dynamic light scattering.

TABLE 1: Effects of chitosan nanoparticle on in the level of MDA, SOD, and GPx of diabetic rat heart.

Group	MDA (nmol/mg tissue)	Means \pm standard deviation		GPx (U/mg tissue)
		SOD (U/mg tissue)		
Control group	58.9 ^a \pm 4.2	11.3 ^a \pm 1.01		1.56 ^a \pm 0.10
Streptozotocin group	82.4 ^b \pm 6.4	7.17 ^b \pm 0.83		0.94 ^b \pm 0.09
Chitosan nano 75 mg/kg BW	78.5 ^b \pm 4.3	8.42 ^b \pm 1.13		0.87 ^b \pm 0.13
Chitosan nano 150 mg/kg BW	72.8 ^b \pm 4.6	5.12 ^b \pm 0.81		0.91 ^b \pm 0.15
Chitosan nano 300 mg/kg BW	64.6 ^c \pm 3.7	7.17 ^c \pm 1.07		1.09 ^c \pm 0.09

^{a,b,c}Different superscript within each column indicate a significant difference between the mean ($p < 0.05$).

production. Streptozotocin increases the intensity of oxidative stress through autooxidation of monosaccharides leading to excessive production of superoxide and hydroxyl radicals, which can decrease the level of SOD and GPx. These radical species can oxidize polyunsaturated fatty acid membrane lipids to increase malondialdehyde, which results in necrosis in cardiac tissue [7, 20]. Various researchers have shown that streptozotocin can decrease the expression of the antioxidant responsive protein, Nrf2, thereby reducing the formation of antioxidants such as SOD and GPx [6, 15,

21]. In the diabetic rat, the oral administration of chitosan nanoparticles only at a dose of 300 mg/kg BW decreases MDA level and increases SOD and GPx levels significantly compared with the streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. In recent years, chitosan has attracted much attention because of various biological activities related to its antioxidant activity and are utilized for studies in both in vivo and in vitro. This finding is supported by previous researchers who stated that chitosan has extreme antioxidant activity and can scavenge free radicals. The antioxidant

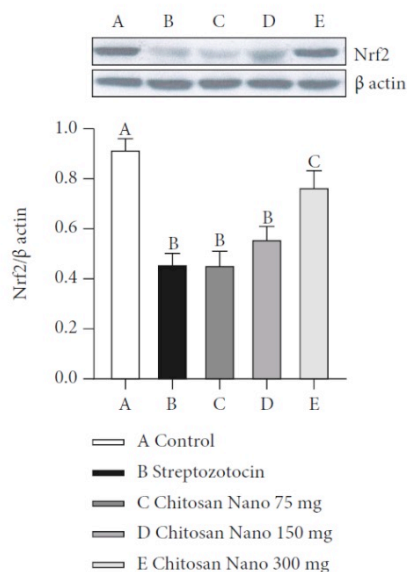


FIGURE 3: Western blot analysis of Nrf 2 protein expression of rat heart tissue. Nrf2 expression in rat heart control group (a); streptozotocin group (b); and chitosan nanoparticle group at dose 75 mg/kg BW (c), 150 mg/kg BW (d), and 300 mg/kg BW (e). ^{a-c}Columns that have different letters statistically differ ($p < 0.05$).

activity of chitosan as a free radical scavenger can be due to the OH group in the polysaccharide unit of chitosan that can react with hydroxyl free radicals ($\cdot\text{OH}$) in the test of the hydroxyl radical assay. Also, the $-\text{NH}_2$ groups of the chitosan can form ammonium groups (NH_3^+) by absorbing H^+ ions and reacting with the $\cdot\text{OH}$ radical through addition reaction to form stable macromolecules. As the intramolecular and intermolecular hydrogen bonds in chitosan molecules are solid (high bond dissociation energy), the OH and $-\text{NH}_2$ groups are difficult to separate and react with hydroxyl free radicals, in agreement with previous reports that the scavenging of ROS by chitosan may in part be related to increased activities of antioxidant enzymes and decreased levels of MDA. The cells possess an intricate network of defense mechanisms, including antioxidant compounds such as SOD and GPx, to neutralize excessive ROS accumulation [24, 27, 28]. In addition, Nrf2 is considered a master regulator of the antioxidant response, and various researchers have shown increased expression of Nrf2 by chitosan. The reason for this enhanced Nrf2 expression in the cardiac cells could be the chitosan-caused decreased intracellular ROS, which can increase antioxidant [28].

On the other hand, antiapoptosis has also been associated with cardiomyopathy in diabetic patients. This study showed that induction with streptozotocin could reduce the expression of Bcl-2, whereas the expression of caspase-3 increased in the heart of rats. Several researchers have proven that overproduction of ROS in oxidative stress could decrease expression of the antiapoptosis protein, Bcl-2, and increase expression of caspase-3, which lead to the fragmentation of DNA and apoptosis in the heart of rats after strep-

tozotocin administration [6, 7]. This could be due to the reduced expression of Nrf2 by streptozotocin. Nrf2 is considered a master regulator of the antioxidant response, and decreased expression of Nrf2 by streptozotocin has been shown by various researchers [19]. However, dose-dependent oral administration of chitosan nanoparticles could increase the expression of Bcl-2 and decrease the expression of caspase-3 in the heart of diabetic rats. This study demonstrated that chitosan nanoparticles with free radical scavenging ability to decrease ROS generation and enhance endogenous antioxidant activity such as SOD and GPx, leading to decreased oxidative stress and apoptosis that play an important role in the pathogenesis of various diabetes complications such as cardiomyopathy [29, 30]. The scavenging mechanism of chitosan is related to their hydrogen donating ability to free radicals to form stable molecules. Here, we clearly show that administration of chitosan nanoparticles on diabetic rats can reduce ROS formation and increase the level of antioxidant enzyme (SOD and GPx), resulting in an increase in Bcl-2 expression and a decrease caspase-3 expression, which has a vital role in cardiac cell apoptosis. Animal and human studies have found a correlation between hyperglycemia, ROS overproduction, and frequency of cardiac cell apoptosis. ROS inhibition with an antioxidant pretreatment reduced the intensity of oxidative stress and cardiac cell apoptosis [4, 6]. Recent studies have demonstrated that chitosan induced nuclear factor erythroid-derived2-like2 (Nrf2) activation. Nrf2, encoded by the gene NFE2L2, is a master regulator of phase II antioxidant enzyme that plays an essential role in the cellular protection against free radical damage and reduces the incidence of extremely derived degenerative diseases such as diabetic complications [31]. This result suggested that chitosan nanoparticles on diabetic rats can increase the level of antioxidant enzyme (SOD and GPx), resulting in an increase in Bcl-2 expression and a decrease in caspase-3 expression through Nrf2 activation.

In the results, we also showed that functional heart impairment in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy was evidenced by the increased levels of biochemical markers such as CK-MB and LDH, which were significantly higher than the control group. The administration of chitosan nanoparticles at a dose of 300 mg/kg BW but not at a dose of 75 mg/kg BW and 150 mg/kg BW significantly reduced CK-MB and LDH levels in the heart cell damage of diabetic rats. Streptozotocin-induced cardiomyopathy is characterized by elevated serum CK-MB and LDH levels that are associated with increased ROS formation in oxidative stress. The ability of antioxidants to remove ROS has been demonstrated to play an important role in contributing to cardioprotective efficacy [5, 16]. The administration of chitosan nanoparticles significantly inhibits streptozotocin-induced heart cell damage, which is related to reduced CK-MB and LDH levels, suggesting that scavenger free radical of chitosan nanoparticles has the effect ability to inhibit heart cell damage caused by streptozotocin. These results agree with previous research that the antioxidant enzymes can interfere with streptozotocin-induced cardiomyopathy, as shown by decreased CK-MB and LDH levels. The reduced

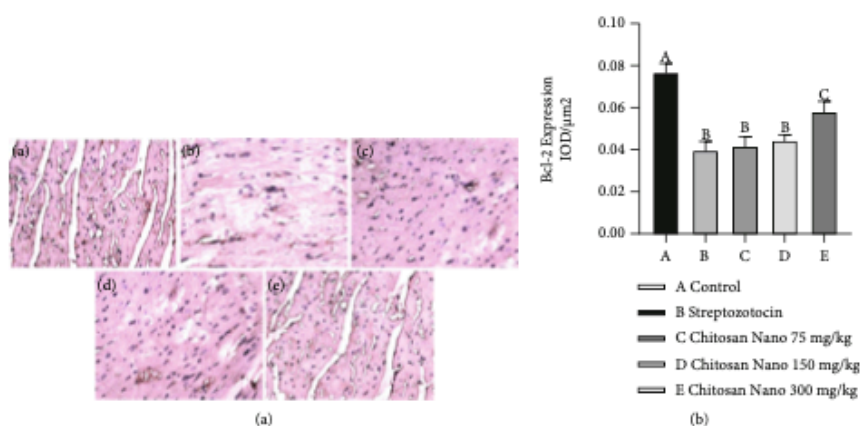


FIGURE 4: Photomicrographs of immunohistochemical staining of Bcl-2 expression of rat heart tissue. (4A) Bcl-2 expression in rat heart (black arrow) from the control group (a); streptozotocin group (b); and chitosan nanoparticles group at a dose 75 mg/kg BW (c), 150 mg/kg BW (d), and 300 mg/kg BW; (4B) IOD/ μm^2 shows Bcl-2 expression from semiquantitative evaluation (400 \times).

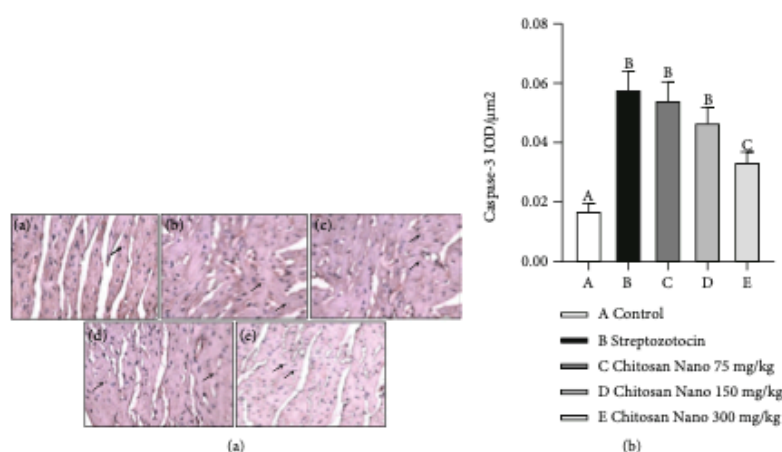


FIGURE 5: Photomicrograph of immunohistochemical staining of Caspase-3 expression of rat heart tissue. (A) Caspase-3 expression in rat heart (black arrow) from the control group (a); streptozotocin group (b); and chitosan nanoparticles group at dose 75 mg/kg Bw (c), 150 mg/kg/BW (d), and 300 mg/kg BW. B. IOD/ μm^2 shows Caspase-3 expression from semiquantitative evaluation (400 \times).

release of CK-MB and LDH in the treatment groups demonstrated the protective effects of chitosan nanoparticles through antioxidants [24, 25].

In the present research, the histological investigation showed that the administration of streptozotocin caused necrosis in the cardiac cells. Recently, has been the realization that ROS-mediated peroxidation of membrane lipids and ROS-induced fragmentation of DNA is associated with necrosis and apoptosis [6, 17]. Therefore, inhibition of oxidative damage by supplementation of antioxidants becomes an attractive therapeutic strategy to reduce the risk of dia-

betic complications such as cardiomyopathy. The administration of the chitosan nanoparticles can protect against streptozotocin-induced heart damage. The histological observation clearly indicates that the administration of chitosan nanoparticles remarkably decreased necrosis in the cardiac cells induced by streptozotocin. This study shows that chitosan nanoparticles have cardioprotective activity through antioxidants and antiapoptosis. Therefore, it is hoped that chitosan nanoparticles can be used to help people with diabetes to prevent complications such as retinopathy, nephropathy, atherosclerosis, and cardiomyopathy.

TABLE 2: The effect of chitosan nanoparticle on the serum level of CK-MB and LDH of diabetic rat.

Group	Means \pm standard deviation	
	CK-MB (IU/L)	LDH (IU/L)
Control Group	70.4 ^a \pm 6.8	101.4 ^a \pm 8.4
Streptozotocin group	106.7 ^b \pm 8.6	152.6 ^b \pm 13.6
Chitosan nano 75 mg/kg BW	101.4 ^b \pm 6.9	147.3 ^b \pm 10.8
Chitosan nano 150 mg/kg BW	93.8 ^b \pm 7.1	139.7 ^b \pm 9.9
Chitosan nano 300 mg/kg BW	79.5 ^c \pm 5.7	124.5 ^c \pm 8.7

^{a,b,c}Different superscript within each column indicate a significant difference between the means ($p < 0.05$).

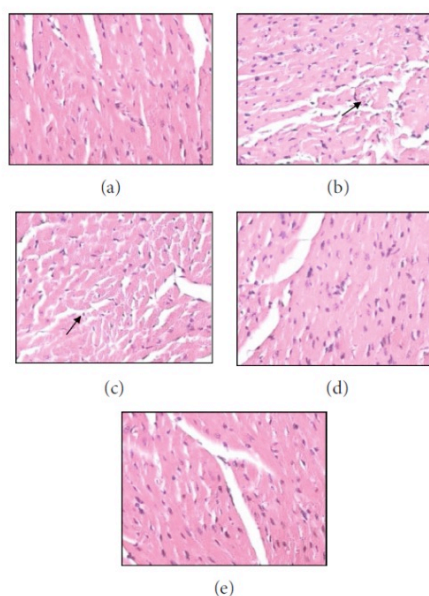


FIGURE 6: Histological study of administration of chitosan nanoparticle on streptozotocin-induced cardiac cell damage. The controls group showed normal morphology of the heart (a). The treatment streptozotocin group showed necrosis (indicated by black arrows) (b). Administration of chitosan nanoparticle 75 mg/kg BW and 150 mg/kg BW showed necrotic changes (c and d). However, administration of chitosan nanoparticle 300 mg/kg showed regeneration on cardiac cells damage (e) H and E, $\times 400$.

5. Conclusion

In conclusion, this study suggests that the administration of chitosan nanoparticles can protect cardiac cell damage in diabetic rats through antioxidative stress by decreasing ROS and increasing Nrf2 expression, level of SOD, and GPx and through antiapoptosis by increasing expression of Bcl-2 and decreasing expression of Caspase-3.

Data Availability

The data used to support the findings of this research are included within the article.

Conflicts of Interest

There are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This research was supported by a grant from the Finance Ministry Educational Fund Management Institution (LPDP), the Republic of Indonesia, through Doctoral Program, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

References

- [1] O. M. Ighodaro, "Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 108, pp. 656–662, 2018.
- [2] U. Asmat, K. Abad, and K. Ismail, "Diabetes mellitus and oxidative stress—a concise review," *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 24, no. 5, pp. 547–553, 2016.
- [3] C. M. O. Volpe, P. H. Villar-Delfino, P. M. F. dos Anjos, and J. A. Nogueira-Machado, "Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications," *Cell Death Disease*, vol. 9, no. 2, pp. 119–131, 2018.

- [4] S. Sifuentes-Franco, D. E. Padilla-Tejeda, S. Carrillo-Ibarra, and A. G. Miranda-Díaz, "Oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial function in diabetic nephropathy," *International Journal of Endocrinology*, vol. 2018, Article ID 1875870, 13 pages, 2018.
- [5] M. H. Abukhalil, O. Y. Althunibat, S. H. Aladaileh, A. I. Algefare, F. K. Al-Swailmi, and A. M. Mahmoud, "Galangin attenuates diabetic cardiomyopathy through modulating oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 138, article 111410, 2021.
- [6] F. Shokri, M. Shokoohi, H. R. Niazkar, A. R. Abadi, H. Kalarestaghi, and M. Ahin, "Investigation the spermatogenesis and testis structure in diabetic rats after treatment with galega officinalis extract," *Crescent Journal of Medical and Biological Sciences*, vol. 6, no. 1, pp. 31–36, 2019.
- [7] M. A. Storz, "The role of vegan diets in lipotoxicity-induced beta-cell dysfunction in type-2-diabetes," *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, vol. 27, pp. e22–e38, 2020.
- [8] A. M. T. Al Nahdi, A. John, and H. Raza, "Elucidation of molecular mechanisms of streptozotocin-induced oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in Rin-5F pancreatic β -cells," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, Article ID 7054272, 15 pages, 2017.
- [9] A. R. Farrag, M. Nassar, and Z. El-Khayat, "Heteroxenia ghardaensis extract protects against DNA damage in streptozotocin-induced experimental diabetes," *Biomedical and Pharmacology Journal*, vol. 12, no. 1, pp. 71–78, 2019.
- [10] J. C. Jha, F. Ho, C. Dan, and K. Jandeleit-Dahm, "A causal link between oxidative stress and inflammation in cardiovascular and renal complications of diabetes," *Clinical Science*, vol. 132, 2018.
- [11] N. Matsumoto, D. Omagari, R. Ushikoshi-Nakayama, T. Yamazaki, H. Inoue, and I. Saito, "Hyperglycemia induces generation of reactive oxygen species and accelerates apoptotic cell death in salivary gland cells," *Pathobiology*, vol. 88, no. 3, pp. 234–241, 2021.
- [12] S. Kumar, S. Prasad, and S. L. Sitasawad, "Multiple antioxidants improve cardiac complications and inhibit cardiac cell death in streptozotocin-induced diabetic rats," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, 2013.
- [13] S. A. Sudjarwo, K. Eraiko, G. W. Sudjarwo, and Koerniasari, "The potency of chitosan-Pinus merkusii extract nanoparticle as the antioxidant and anti-caspase 3 on lead acetate-induced nephrotoxicity in rat," *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, vol. 10, no. 1, pp. 27–32, 2019.
- [14] S. R. M. Sangdehi, A. H. Moghaddam, and M. Ranjbar, "Anti-apoptotic effect of silymarin-loaded chitosan nanoparticles on hippocampal caspase-3 and Bcl-2 expression following cerebral ischemia/reperfusion injury," *International Journal of Neuroscience*, vol. 21, pp. 1–8, 2021.
- [15] Z. Tang, P. Wang, C. Dong, J. Zhang, X. Wang, and H. Pei, "Oxidative stress signaling mediated pathogenesis of diabetic cardiomyopathy," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2022, Article ID 5913374, 8 pages, 2022.
- [16] L. Y. Yu, W. L. Shi, and G. X. Guo, "Cardio-protective role of gingerol along with prominent anti-diabetic cardiomyopathy action in a streptozotocin-induced diabetes mellitus rat model," *Cell Journal*, vol. 19, 2017.
- [17] M. Radenković, M. Stojanović, and M. Prostran, "Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: the current state of the art," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 78, pp. 13–31, 2016.
- [18] I. A. Bukhari, O. Y. Mohamed, and A. A. Almotrefi, "Cardio-protective effect of olive oil against ischemia reperfusion-induced cardiac arrhythmia in isolated diabetic rat heart," *Cureus*, vol. 12, 2020.
- [19] A. M. T. Al-Nahdi, A. John, and H. Raza, "Cytoprotective effects of N-acetylcysteine on streptozotocin-induced oxidative stress and apoptosis in RIN-5F pancreatic β -cells," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 51, no. 1, pp. 201–216, 2018.
- [20] M. Bigagli and M. Lodovici, "Circulating oxidative stress biomarkers in clinical studies on type 2 diabetes and its complications," *Oxidative Medicine of Cellular Longevity*, vol. 2019, article 5953685, 2019.
- [21] Y. Wang, H. Sunb, J. Zhang, Z. Xia, and W. Chend, "Streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats: ameliorative effect of piperine via Bcl 2, Bax/Bcl 2, and caspase-3 pathways," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 84, 2020.
- [22] L. Ruixia Lan, C. Qingqing, W. Linlin, and Z. Zhihui, "The protect effects of chitosan oligosaccharides on intestinal integrity by regulating oxidative status and inflammation under oxidative stress," *Marine Drugs*, vol. 19, no. 2, 2021.
- [23] S. A. Sudjarwo, C. Anwar, G. Wardani, K. Eraiko, and 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*, vol. 8, no. 1, pp. 13–19, 2019.
- [24] I. Aranaz, A. R. Alcántara, C. Civera et al., "Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications," *Polymers*, vol. 13, pp. 3256–3286, 2021.
- [25] S. Kim, "Competitive biological activities of chitosan and its derivatives: antimicrobial, antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory activities," *International Journal of Polymer Science*, vol. 2018, Article ID 1708172, 13 pages, 2018.
- [26] R. Saini, S. Saini, and S. Sharma, "Nanotechnology: the future medicine," *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, vol. 3, no. 1, p. 32, 2010.
- [27] A. Kumari, V. Kumar, and S. K. Yadav, "Nanotechnology: a tool to enhance therapeutic values of natural plant products," *Research*, vol. 7, no. 2, pp. 34–42, 2012.
- [28] B. He, H. Tao, S. Liu, and A. Wei, "Protective effect of carboxymethylated chitosan on hydrogen peroxide-induced apoptosis in nucleus pulposus cells," *Molecular Medicine Reports*, vol. 11, no. 3, pp. 1629–1638, 2015.
- [29] I. M. Fang, C. H. Yang, C. M. Yang, and M. S. Chen, "Chitosan oligosaccharides attenuates oxidative-stress related retinal degeneration in rats," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, 2013.
- [30] H. Saleh and H. M. El-Shorbagy, "Chitosan protects liver against ischemia-reperfusion injury via regulating Bcl-2/Bax, TNF- α and TGF- β expression," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 164, pp. 1565–1574, 2020.
- [31] A. Chang-Bum, J. Jae-Young, K. Young-Sang, P. Sun-Joo, and I. K. Boo Il, "Induction of Nrf2-mediated phase II detoxifying/antioxidant enzymes in vitro by chitosan-cafeic acid against hydrogen peroxide-induced hepatotoxicity through JNK/ERK pathway," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 424, no. 1-2, pp. 79–86, 2017.

