

EFEK EKSTRAK ETANOL GANGGANG HIJAU (*Ulva lactuca*, L) TERHADAP EKSPRESI COX-2 MIOKARDIUM TIKUS YANG DIINDUKSI ISOPROTERENOL

THE EFFECT OF GREEN ALGAE ETHANOL EXTRACT IN REDUCING EXPRESSION OF COX-2 IN ISOPROTERENOL-INDUCED IMA RATS

Wahyu Widyaningsih^{1*}, Nina Salamah¹, Suwidjiyo Pramono³,
Sitarina Widyarini², Sugiyanto³

¹ Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Jl. Prof. Dr. Soepomo, Yogyakarta

² Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No. 2, Yogyakarta

³ Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Jl. Sekip Utara, Yogyakarta,

*Penulis Korespondensi, e-mail : widyaningsihwahyu@yahoo.com

ABSTRAK

Penyakit kardiovaskuler masih merupakan masalah di Indonesia salah satunya adalah Infark Miokardial Akut (IMA). Patofisiologis AMI karena *reactive oxygen spesies* (ROS) melibatkan stimulasi sitokin pro inflamasi salah satunya adalah interleukin-1 yang berakibat peningkatan ekspresi COX-2. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek ekstrak etanol ganggang hijau dalam menurunkan ekspresi COX-2 pada tikus IMA yang diinduksi isoproterenol (ISO). Ekstraksi ganggang hijau dengan maserasi menggunakan etanol 96%. Tikus berat 200-250 g dibagi menjadi 6 kelompok masing-masing 6 ekor. Kelompok I kontrol, tikus tidak diberi ISO hanya diberi CMC Na, kelompok II kelompok ISO, tikus diberi CMC Na dan ISO, kelompok III, IV dan V tikus diberi ekstrak etanol ganggang hijau dosis 250, 500 dan 750 mg/KgBB peroral dan kelompok VI diberi melatonin 10 mg/KgBB. Perlakuan ekstrak selama 28 hari. Pada hari ke 29 dan 30 tikus diberi isoproterenol dosis 85 mg/KgBB selama 2 kali pemberian secara subkutan kecuali kelompok I. Pada hari ke 31 tikus diambil organ jantung kemudian dibuat preparat histologis dan dilakukan analisis ekspresi COX-2 dengan metode imunohistokimia dengan antibodi anti COX-2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol ganggang hijau dosis 250, 500 dan 750 mg/KgBB dapat menurunkan ekspresi COX-2 pada tikus yang diinduksi isoproterenol.

Kata kunci: COX-2, *Ulva lactuca* L, isoproterenol, melatonin

ABSTRACT

Cardiovascular disease is still a problem in Indonesia, one of the problem is acute myocardial infarction (IMA). The pathophysiology of AMI due to reactive oxygen species (ROS) involves stimulation of pro-inflammatory cytokines one of which is interleukin-1 which results in increased COX-2 expression. This study aims to determine the effect of green algae ethanol extract in reducing expression of COX-2 in isoproterenol-induced IMA rats (ISO). Green algae extraction by maceration using 96% ethanol. Rats 200-250 gBW divided into 6 groups of 6 each. Group I control, mice not given (ISO) were given only CMC Na, group II group of ISO, mice were given CMC Na and ISO, group III was given melatonin 10 mg/KgBW, group IV, V and VI mice were given ethanol extract of green algae dose 250, 500 and 750 mg/Kg BW. Treat the extract for 28 days. On day 29 and 30 mice were given Isoproterenol dose 85mg/KgBW for 2 times subcutaneously except group I. On day 31 mouse was taken heart organ then made histological preparation and conducted analysis of expression of COX-2 with immunohistochemical method with anti-COX-2 antibody. The results

showed that ethanol extract of green algae dose 250, 500 and 750 mg/KgBW can decrease expression of COX-2 in isoproterenol-induced rats.

Keywords: COX-2, *Ulva lactuca* L, isoproterenol, melatonin

PENDAHULUAN

Menurut WHO sampai tahun 2020 penyakit kardiovaskuler merupakan penyebab kematian terbesar di dunia. Diperkirakan penyakit jantung dan stroke akan meningkat mencapai 23,3 juta pada 2030 (WHO, 2016). Salah satu penyakit kardiovaskuler adalah infark miokard akut (IMA). Pada IMA, *Reactive Oxygen species* (ROS) menyebabkan secara langsung luka pada membran yang dihubungkan dengan sitokin pro inflamasi antara lain interleukin (IL)-1 dan IL-6 (Rodrigo *et al.*, 2013). IMA dikaitkan dengan inflamasi pada jaringan. Ekspresi COX-2 yang berlebihan ditemukan berhubungan dengan peningkatan produksi PGE2 pada iskemia jantung. Ekspresi COX-2 memacu berbagai sel untuk meningkatkan produksi prostaglandin (PG) (Carnieto *et al.*, 2009). COX-2 memiliki sifat-sifat lainnya, termasuk penghambatan fibrosis, trombosis dan peradangan (Gimbrone *et al.*, 2000). Hal tersebut berkaitan dengan peran kardioprotektif dari COX-2.

Salah satu metode standar untuk induksi infark miokard pada tikus adalah dengan pemberian isoproterenol (ISO) yang merupakan agonis β adrenergik non-selektif (Grimm *et al.*, 1998; Rathore *et al.*, 1998). Stimulasi reseptor β -adrenergik menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) (Zhang *et al.*, 2005). Mekanisme infark miokard akibat pemberian ISO menyebabkan disfungsi jantung, peningkatan lipid peroksidasi, mempengaruhi aktivitas enzim dan antioksidan di otot jantung (Rathore *et al.*, 1998).

Organisme laut merupakan sumber metabolit sekunder yang penting dalam pengembangan agen farmasetik (El Gamal, 2010). Spesies ganggang (*Ulva* Sp) banyak terdapat di habitat pantai di seluruh dunia (Einav dan Israel, 2007). *Ulva sp* (ganggang hijau) merupakan sumber alam yang berpotensi dalam bidang kefarmasian (El Baky *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2005; Robic *et al.*, 2008). *Ulva lactuca* L merupakan salah satu spesies algae yang mempunyai komponen bioaktif seperti senyawa fenolik, polisakarida sulfat (Sathivel *et al.*, 2008), klorofil (0,5608 mg/g), karotenoid (0,785 mg/g), vitamin C (42,6 mg/g) dan polifenol (5,45 mg) (Abirami dan Kowsalya, 2011) dan melatonin (Hardeland dan Poeggeler, 2003; Pape dan Lüning, 2006; Paredes *et al.*, 2009). *U. lactuca* mengandung melatonin 12 pg/g berat basah (Pape and Lüning, 2006). Ekstrak etanol *U. Lactuca*

mengandung melatonin sebesar 0,74 mg melatonin dalam 100 mg ekstrak (Widyaningsih *et al.*, 2016). Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol *U.lactuca* dari pantai Drini mengandung flavonoid, alkaloid dan klorofil (Widyaningsih *et al.*, 2016).

Tanaman ganggang cukup efektif sebagai obat pada penyakit kardiovaskuler (Paredes *et al.*, 2009). Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol terstandar melatonin dari *U. lactuca* mempunyai efek kardioprotektif dengan memperbaiki gambaran EKG, mengurangi luas area infark dan menurunkan enzim penanda kerusakan jantung seperti kreatinin kinase (CK) dan laktat dehidrogenase (LDH) (Widyaningsih *et al.*, 2016), menghambat apoptosis dengan menurunkan ekspresi caspase-3 dan mempunyai aktivitas antioksidan endogen (Widyaningsih *et al.*, 2017) pada tikus yang diinduksi ISO. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek ekstrak etanol ganggang hijau (EEGH) terhadap ekspresi COX-2 miokardium tikus yang diinduksi ISO yang digunakan sebagai dasar mekanisme kardioprotektif pada proses inflamasi dengan parameter penghambatan ekspresi COX-2.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini sama dengan penelitian sebelumnya (Widyaningsih *et al.*, 2016; Widyaningsih *et al.*, 2017) yaitu ganggang hijau (*U. lactuca* L) yang diperoleh dari pantai Drini Kabupaten Gunung Kidul pada bulan Januari 2015 saat air laut surut. Identifikasi tanaman ganggang hijau dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada dengan nomer 0626/S.Tb/I/2015. Bahan kimia lainnya adalah etanol 96% sebagai bahan pengekstraksi, reagen kit untuk IHC dan melatonin standar (Sigma). Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah tikus jantan galur Wistar, umur 2-3 bulan berat 200-250 gram.

Jalannya Penelitian

Ekstraksi ganggang hijau. Ganggang hijau (*U. lactuca* L) didiamkan dalam air laut selama 7 jam dalam wadah tertutup. Ganggang kering kemudian diserbuk menggunakan *blender*. Serbuk ganggang hijau kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan

etanol 96% sebagai pelarutnya. Sari etanol ganggang hijau kemudian diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.

Perlakuan Hewan Uji. Hewan uji berupa tikus Wistar, jantan, umur 2 bulan, berat 200-250 g, dibagi menjadi 6 kelompok masing-masing 6 ekor. Semua perlakuan terhadap hewan uji sudah mendapat *ethical clearance* dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada dengan Nomor 205/KEC-LPPT/XII/2014. Sebelum mendapat perlakuan, tikus diadaptasikan selama 1 minggu dengan kondisi laboratorium pada suhu kamar. Hewan uji mendapatkan pakan dan minum *ad libitum*.

Pengelompokan hewan uji adalah sebagai berikut :

Kelompok I : Kelompok normal mendapatkan NaCl fisiologis tanpa induksi isoproterenol.

Kelompok II : Kelompok kontrol negatif mendapatkan CMC Na dan diinduksi isoproterenol dosis 85 mg/KgBB.

Kelompok III: Kelompok EEGH 250 mendapatkan ekstrak etanol ganggang hijau dosis 250 mg/KgBB dan induksi isoproterenol dosis 85 mg/KgBB

Kelompok IV: Kelompok EEGH 500 mendapatkan ekstrak etanol ganggang hijau dosis 500mg/KgBB dan induksi isoproterenol dosis 85 mg/KgBB

Kelompok V: Kelompok EEGH 750 mendapatkan ekstrak etanol ganggang hijau dosis 750mg/KgBB dan induksi isoproterenol dosis 85 mg/KgBB

Kelompok VI: Kelompok kontrol positif mendapatkan melatonin dosis 10 mg/KgBB dan induksi isoproterenol dosis 85 mg/KgBB.

Pada hari ke-31 tikus diambil organ jantungnya untuk pengamatan parameter histopatologi. Jantung pada bagian ventrikel kiri yang telah disimpan dalam formalin 10 % dibuat paraffin setebal 5 mikro meter dengan *microtome*. Pembuatan blok parafin jantung dilakukan di Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan UGM. Jantung dimasukkan dalam kain kasa, didehidrasi dan direndam dalam larutan etanol bertingkat yaitu 70, 80, 90, 100 dan 100% masing-masing selama 60 menit pada suhu kamar. Proses selanjutnya dilakukan penjernihan (*clearing*) menggunakan *xylol* selama 15 menit pada suhu kamar sebanyak tiga kali. Setelah proses *clearing* dilakukan proses infiltrasi dengan parafin cair sebanyak 3 kali pemindahan, masing-masing 60 menit dalam inkubator suhu 60°C. Jaringan

kemudian dibenamkan dalam parafin cair dan didinginkan dalam suhu kamar sehingga menjadi blok parafin. Blok parafin dipotong horisontal menggunakan mikrotom dengan ketebalan (t) 3 μm (Widyaningsih *et al*, 2016).

Prosedur pengecatan COX-2 dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Rumah Sakit Sardjito, Yogyakarta, menggunakan protokol Starr Trek *Universal Detection System* (Biocare Medical, Concord, California). Potongan horisontal (3 μm) blok parafin organ jantung dipilih dan diletakkan pada gelas obyek *poly-L-lysin*. *Slide* tersebut kemudian diinkubasi semalaman pada suhu 45°C. Kemudian dilakukan deparafinisasi dalam *xylene* dan dilanjutkan dengan rehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (99, 96, 70%). *Slide* diinkubasi dalam H₂O₂ 3% selama 15 menit dan dicuci dengan air kran. *Retrieving* dilakukan dalam *buffer* citrat pH 6 menggunakan *decloacking chamber* pada suhu 95°C selama 40 menit, kemudian ditempatkan pada suhu kamar selama 30 menit. *Protein blocking* dilakukan menggunakan *background sniper* dengan menginkubasi *slide* selama 15 menit. Antibodi primer (Rabbit Polyclonal Anti-COX-2 Antibody) dengan pengenceran 1:100 ditetaskan. Sebuah *slide* tanpa ditetesi antibodi primer juga dibuat untuk kontrol negatif. *Slide* tersebut kemudian ditempatkan pada suhu kamar selama 1 jam, selanjutnya dicuci dengan PBS selama 5 menit. *Trek* Universal Link, yang mengandung *biotinylated secondary antibody*, ditetaskan kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 20 menit. *Slide* kemudian dicuci dengan PBS. *Trek* Avidin-HRP ditetaskan dan dicuci dengan PBS. Selanjutnya ditetaskan larutan Benzoid DAB Chromogen dan dibiarkan 3 menit pada suhu ruangan. Diberi Haematoxylin sebagai *counter-stain*. *Slide* kemudian didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dan dijernihkan dengan *xylene*. Akhirnya dilakukan *mounting* dan *cover-slipped*, dilanjutkan pengamatan di bawah mikroskop. Sel yang mengalami inflamasi akan mengalami perubahan morfologi sel, yang dicirikan dengan adanya ekspresi protein COX-2 yang tercatat berwarna coklat pada sitoplasma, dan nukleus di sel jantung. Perhitungan ekspresi COX-2 dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Image J*. Persen ekspresi COX-2 dihitung dengan persamaan 1 (Kosik-Bogacka *et al*, 2016).

$$\% \text{ ekspresi protein COX} - 2 = \frac{\text{inti sel yang mengekspresikan COX-2}}{\text{total sel terhitung}} \times 100\% \dots\dots(1)$$

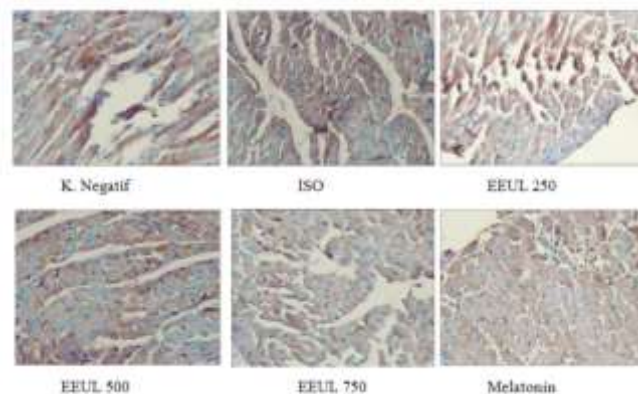
Analisis Data

Data ekspresi COX-2 yang diperoleh dianalisis distribusinya dengan uji Kolmogorof Smirnof dan diuji homogenitas datanya dengan uji Levene. Setelah didapatkan datanya terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji Anova dan uji beda antar kelompok dengan uji LSD.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemberian ISO dosis 85 mg/KgBB menyebabkan infark myokardial akut yang ditunjukkan dengan adanya inflamasi (Grimm *et al.*, 1998; Rathore *et al.*, 1998). Untuk mengidentifikasi adanya inflamasi pada myokardium diketahui dari ekspresi enzim COX-2. Enzim sikloosigenase (COX) merupakan enzim utama yang berperan di dalam terjadinya inflamasi. Enzim COX-2 hanya meningkat pada daerah yang mengalami inflamasi. Ekspresi COX-2 yang berlebihan ditemukan berhubungan dengan peningkatan produksi PGE₂, Interleukin-1 (IL-1) yang berhubungan dengan IMA telah menunjukkan peningkatan ekspresi COX-2 (Rishikesh dan Sadhana, 2003).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ISO dosis 85 mg/KgBB menyebabkan terjadinya inflamasi pada jantung ditandai dengan peningkatan ekspresi COX-2 secara signifikan. Pada kelompok yang diberi ISO terlihat jumlah sel yang mengespresikan COX-2 lebih banyak daripada kelompok tanpa ISO. Gambar hasil imunohistokimia kelompok yang diberi ISO dengan yang tanpa ISO tersaji pada Gambar 1.



Gambar 1. Gambaran mikroskopis ekspresi protein COX-2 jantung tikus yang diberi isoproterenol pada berbagai kelompok. Pengecatan dilakukan dengan imunohistokimia dengan perbesaran 400x

Induksi ISO menyebabkan gangguan keseimbangan antara pembentukan radikal bebas dan sistem pertahanan antioksidatif serta nekrosis otot jantung (Rathore *et al.*, 1998). Adanya nekrosis pada otot jantung ditandai dengan adanya infiltrasi sel radang. Adanya radang ditunjukkan dengan peningkatan ekspresi protein COX-2. Hasil ini diperkuat dengan perhitungan persen ekspresi COX-2 sekitar 2 kali lipat dibanding dengan kelompok tanpa perlakuan ISO. Data perhitungan ekspresi COX-2 tersaji pada Tabel I dan Gambar 2.

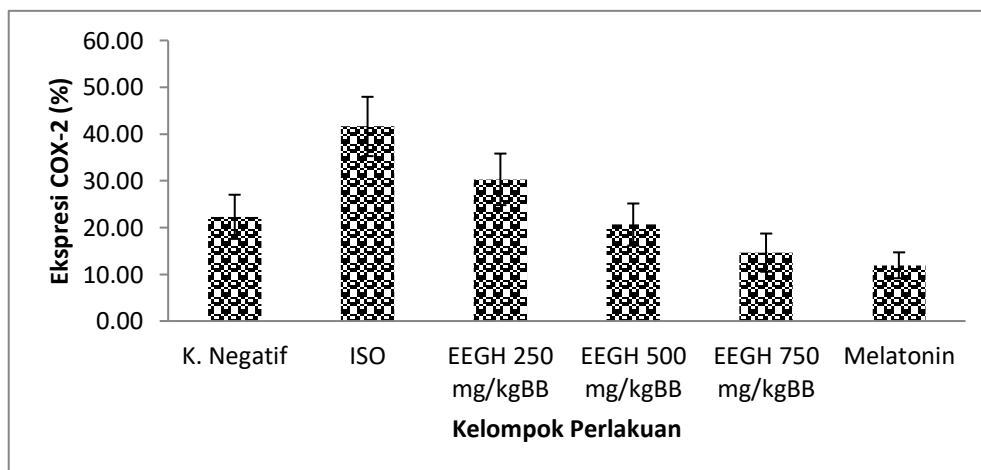
Tabel I. Efek ekstrak etanol ganggang hijau (*Ulva lactuca* L) terhadap ekspresi COX-2 jantung tikus yang diinduksi isoproterenol

Kelompok	Ekspresi COX-2 (%)
K. Negatif	22,29 (4,72)
ISO	41,61 (6,34) ^b
EEGH 250 mg/KgBB	30,30 (5,51) ^a
EEGH 500 mg/KgBB	20,64 (4,50) ^a
EEGH 750 mg/KgBB	14,63 (4,08) ^{ac}
Melatonin	11,92 (2,77) ^{abc}

Keterangan : ^ap<0,05 vs ISO

^bp < 0,05 vs control negatif

^cp<0,05 vs EEGH 250 mg/KgBB



Gambar 2. Persen ekspresi COX-2 pada berbagai kelompok yang diberi ekstrak etanol ganggang hijau berbagai dosis.

Pada kelompok yang diberi EEGH berbagai dosis dan melatonin menunjukkan adanya penurunan ekspresi COX-2 dibanding kelompok ISO secara signifikan. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian EEGH berbagai dosis dan melatonin dapat menurunkan

inflamasi pada otot jantung yang ditandai dengan penurunan ekspresi COX-2. Dalam proses inflamasi, COX-2 berperan pada proses inisiasi dan resolusi. Pada kondisi COX-2 yang terekspresi berlebih akan memicu pembentukan PGD₂, sementara hanya sedikit PGE₂ terbentuk, dimana PGD₂ merupakan mediator inflamasi dan PGE₂ berperan dalam homeostasis. Selain itu, pada kondisi ekspresi yang tidak berlebih, COX-2 melalui jalur asam arakidonat membentuk PGI₂ yang dapat menghambat terjadinya agregasi platelet. Penurunan ekspresi COX-2 dapat mengurangi inflamasi yang terjadi serta berperan sebagai kardioprotektif dengan menghambat agregasi platelet (Sudewa dan Budiarta, 2017).

Ganggang hijau telah diteliti mengandung melatonin ((Paredes *et al.*, 2009; Balzer dan Hardeland, 1996; Kolár dan Machácková, 2005; Tal *et al.*, 2011) demikian juga EEGH (Widyaningsih *et al.*, 2016). Melatonin telah diketahui mempunyai potensi sebagai antioksidan. Mekanisme antioksidan dapat menurunkan resiko terjadinya infark miokard pada otot jantung sehingga berpotensi melindungi otot jantung dari kerusakan akibat stress oksidatif. Aktivitas antioksidan dan kardioprotektif melatonin telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya (Tal *et al.*, 2011; Reiter and Tan, 2003). Melatonin dan metabolitnya (N₁-acetyl N₂-formil-5-metoxkyneuramine (AFMK) (Abd-Ellatef *et al.*, 2017) and N-acetyl-5-metoxkyneuramin (AMK) mencegah oksidatif stress serta meningkatkan antioksidan endogen seperti SOD, Cat dan GPx (Francis *et al.*, 2002).

EEGH tidak hanya mengandung melatonin. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa *U. lactuca L* mengandung klorofil, karetonoid, vitamin C, polifenol dan polisakarida sulfat yang berfungsi sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan dan antiapoptosis polisakarida sulfat yang berasal dari *U.lactuca* dapat mencegah kanker payudara dengan mekanisme antioksidan, antiapoptosis dan menekan inflamasi (He *et al.*, 2016). Aktivitas antioksidan dan aktivitas antiapoptosis dari EEGH diduga berperan pada aktivitas penekanan inflamasi sehingga melindungi sel jantung dari kerusakan. EEGH dalam penelitian sebelumnya mempunyai aktivitas kardioprotektif (Widyaningsih *et al.*, 2016) dengan mekanisme antioksidan dan antiapoptosis (Widyaningsih *et al.*, 2017). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa efek menurunkan ekspresi COX-2 pada penelitian ini bukan hanya karena kandungan melatonin tetapi kemungkinan karena kombinasi melatonin dengan senyawa lain dalam EEGH. Polisakarida sulfat dari *U.lactuca* mempunyai aktivitas antioksidan (de Araújo *et al.*,

2016) dan antiinflamasi melewati jalur bradikinin dan menurunkan ekspresi protein COX-2 (Ahmed *et al.*, 2017). Ekstrak etanol 70% dari *U. lactuca* mempunyai aktivitas antiartitis dengan mekanisme antiinflamasi dan antioksidan (Pietta, 2000). Penelitian terdahulu menunjukkan EEGH mengandung flavonoid yang bersifat antioksidan dan saponin (Liu dan Ng, 2000) dengan metabolit yang unik yaitu 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP), yang bersifat antioksidan sehingga mencegah kerusakan biomolekuler (Abd *et al.*, 2017). Mekanisme antioksidan dan antiapoptosis dari EEGH inilah yang dapat menekan inflamasi dan mengurangi IMA. Penurunan ekspresi COX-2 setelah pemberian EEGH yang menjadi parameter berkurangnya inflamasi. Dengan berkurangnya inflamasi tersebut, maka berkurangnya resiko IMA pada jantung.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol ganggang hijau mampu menurunkan ekspresi COX-2 pada tikus yang diinduksi isoproterenol. Dosis ekstrak etanol ganggang hijau yang dapat menurunkan ekspresi COX-2 adalah dosis 250, 500 dan 750 mg/kgBB.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Lembaga Penelitian UAD yang telah membiayai penelitian ini dengan hibah Fundamental LPP UAD dengan No Perjanjian Pelaksanaan Penelitian PF-025/SP3/LPP-UAD/IV/2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Abirami RG, Kowsalya S. 2011, Nutrient and Nutraceutical Potentials of Seaweed Biomass *Ulva lactuca* and *Kappaphycus alvarezii*. *J Agric Sci Technol*. 5(1):107–15.
- Abd-Ellatef G-EF, Ahmed OM, Abdel-Reheim ES, Abdel-Hamid A-HZ. 2017, *Ulva lactuca* polysaccharides prevent Wistar rat breast carcinogenesis through the augmentation of apoptosis, enhancement of antioxidant defense system, and suppression of inflammation. *Breast Cancer Dove Med Press*. 9:67–83.

- Ahmed OM, Soliman HA, Mahmoud B, Gheryany RR., 2017, *Ulva lactuca* hydroethanolic extract suppresses experimental arthritis via its anti-inflammatory and antioxidant activities. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci.* 6(4):394–408.
- Anonim. WHO, 2016, | *Cardiovascular diseases* (CVDs) [Internet]. WHO. [dikutip 26 Januari 2017]. Tersedia pada: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/
- Balzer I, Hardeland R., 1996, Melatonin in Algae and Higher Plants - Possible New Roles as a Phytohormone and Antioxidant. *Bot Acta.* 109(3):180–3.
- Carnieto A, Dourado PMM, da Luz PL, Chagas ACP. 2009, Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition Protects Against Myocardial Damage in Experimental Acute Ischemia. *Clin Sao Paulo Braz.* ;64(3):245–52.
- de Araújo IWF, Rodrigues JAG, Quinderé ALG, Silva J de FT, Maciel G de F, Ribeiro NA, 2016, Analgesic and anti-inflammatory actions on bradykinin route of a polysulfated fraction from alga *Ulva lactuca*. *Int J Biol Macromol.* 92:820–30.
- Einav R, Israel A. 2007, Seaweeds on the Abrasion Platforms of the Intertidal Zone of Eastern Mediterranean Shores. Dalam: Seckbach J, editor. *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; [dikutip 13 April 2016]. hlm. 193–207. Tersedia pada: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6112-7_10
- El Baky HHA, El Baz FK, El Baroty GS. 2009, Potential Biological Properties of Sulphated Polysaccharides Extracted from the Macroalgae *Ulva lactuca* L. *Acad J Cancer Res.* 2(1):01-11.
- El Gamal AA. 2010, Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm J SPJ.*;18(1):1–25.
- Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr.* 88(6):587–605.
- Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G., 2000, Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.*;902:230-239; discussion 239-240.
- Grimm D, Elsner D, Schunkert H, Pfeifer M, Griese D, Bruckschlegel G, 1998, Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res.* 37(1):91–100.
- Hardeland R, Poeggeler B. 2003, Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res.*;34(4):233–41.

- He J, Xu Y, Chen H, Sun P. 2016, Extraction, Structural Characterization, and Potential Antioxidant Activity of the Polysaccharides from Four Seaweeds. *Int J Mol Sci.* 28 17(12).
- Kolár J, Machácková I. 2005, Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. *J Pineal Res.* 39(4):333–41.
- Kosik-Bogacka DI, Baranowska-Bosiacka I, Kolasa-Wołoskiuk A, Lanocha-Arendarczyk N, Gutowska I, Korbecki J, 2016,. The inflammatory effect of infection with *Hymenolepis diminuta* via the increased expression and activity of COX-1 and COX-2 in the rat jejunum and colon. *Exp Parasitol.* 169:69–76.
- Liu F, Ng TB. 2000, Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues. *Biochim Biol Cell.* 78(4):447–53.
- Martinez MJA, Olmo LMBD, Benito PB. 2005, Antiviral Activities of Polysaccharides from Natural Sources. Dalam: Atta-ur-Rahman, editor. *Studies in Natural Products Chemistry* [Internet]. Elsevier; [dikutip 26 Januari 2017]. hlm. 393–418. (Bioactive Natural Products (Part K); vol. 30). Tersedia pada: [//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572599505800389](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572599505800389)
- Pape C, Lüning K. 2006, Quantification of melatonin in phototrophic organisms. *J Pineal Res.* 41(2):157–65.
- Paredes SD, Korkmaz A, Manchester LC, Tan D-X, Reiter RJ. 2009, Phytomelatonin: a review. *J Exp Bot.* 60(1):57–69.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. 2000, *J Nat Prod.* 63(7):1035–42.
- Rathore N, John S, Kale M, Bhatnagar D. 1998, Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc.*;38(4):297–303.
- Reiter RJ, Tan D-X. 2003, Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res.* 58(1):10–9.
- Rishikesh MK, Sadhana SS. 2003, Prostaglandins and cyclooxygenase: Their probable role in cancer. *Indian J Pharmacol.* 35(1):3.

- Robic A, Sassi J-F, Lahaye M. 2008, Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan. *Carbohydr Polym.* 74(3):344–52.
- Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D., 2013, Oxidative Stress-Related Biomarkers in Essential Hypertension and Ischemia-Reperfusion Myocardial Damage. *Dis Markers.*;35(6):773–90.
- Sathivel A, Raghavendran HRB, Srinivasan P, Devaki T. 2008, Anti-peroxidative and anti-hyperlipidemic nature of *Ulva lactuca* crude polysaccharide on D-galactosamine induced hepatitis in rats. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.*;46(10):3262–7.
- Tal O, Haim A, Harel O, Gerchman Y. 2011, Melatonin as an antioxidant and its semi-lunar rhythm in green macroalga *Ulva* sp. *J Exp Bot.*62(6):1903–10.
- Widyaningsih W, Pramono S, Widyarini S, Sugiyanto S. 2016, Skrining fitokimia ekstrak etanol *Ulva lactuca* l. dengan metode kromatografi lapis tipis. *Media Farm.*;13(2):199–211.
- Widyaningsih W, Pramono S, Widyarini S, Sugiyanto. 2016, Cardioprotective Effect of Melatonin-Standardized Ethanol Extract of *Ulva lactuca* L against Acute Myocardial Infarction in Rats Induced by Isoproterenol. *Trop J Pharm Res.* 15(8):1723–9.
- Widyaningsih W, Pramono S, Zulaela, Sugiyanto, Widyarini S. 2017, Protection by Ethanolic Extract from *Ulva lactuca* L Against Acute Myocardial Infarction: Antioxidant and Antiapoptotic Activities. *Malays J Med Sci.* 24(6):39–49.
- Zhang G-X, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Yao L, 2005,. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovasc Res.* 1;65(1):230–8.