

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
INTISARI	xi
ABSTRACT	xii
BAB 1	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
E. Ruang Lingkup Penelitia	4
BAB II	6
A. Aging	6
1. Mekanisme Respon Aging	6
2. Mediator Aging	9
3. Induksi Aging dengan H ₂ O ₂ pada Sel HDF	10
B. Senyawa Anti-Aging.....	13
C. Sel Human Dermal Fibroblas (HDF)	15
D. Agaro-Oligosaccharides (AOS).....	16
BAB III.....	19
A. Landasan Teori.....	19
B. Hipotesis	20
BAB IV	21
A. Waktu dan Tempat.....	21
B. Alat dan Bahan.....	21
1) Alat.....	21
2) Bahan.....	21
C. Diagram Alir Penelitian	22
D. Prosedur Kerja	22
1. <i>Ethical Clearence</i> (EC)	22
2. Persiapan sampel.....	23
3. Kultur sel HDF	23
a) Persiapan media kultur	23
b) Persiapan kultur sel	23

c) Perawatan sel kultur	24
4. MTT Assay	24
5. Pemberian Senyawa H ₂ O ₂ pada sel HDF	26
6. Analisis kadar ROS Intraseluler	26
7. Analisis Apoptosis sel	26
8. Isolasi RNA	27
9. Sintesis <i>Complementary DNA</i> (cDNA)	28
10. <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (RT-qPCR)	29
E. Analisis Data	30
BAB V	31
A. Uji Sitotoksitas Sampel AOS dan H ₂ O ₂ pada Sel HDF	31
B. Viabilitas Sel HDF	35
C. Uji ROS intraseluler menggunakan DCFH-DA pada Sel HDF	37
D. Uji Apoptosis dengan Double Staining pada Sel HDF	40
E. Ekspresi Gen <i>p53</i> dan <i>p21</i>	44
F. Regulasi Penghambatan Gen <i>p53</i> dan <i>p21</i>	46
BAB VI	48
A. Kesimpulan	48
B. Saran	48
RINGKASAN	50
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	70

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Mekanisme Respon Anti-Aging	7
Gambar 2. Skema dari mekanisme Mediator Anti-aging.....	9
Gambar 3. Patogenesis Penuaan Kulit Akibat Paparan Radiasi Matahari	11
Gambar 4. Sel Human Dermal Fibroblas.....	15
Gambar 5. Nilai tambah dari pemanfaatan alga merah.....	18
Gambar 6. Hasil Sitotoksik senyawa AOS.....	32
Gambar 7. Hasil Sitotoksik senyawa H ₂ O ₂	34
Gambar 8. Viabilitas sel HDF perlakuan AOS dan AOS+H ₂ O ₂	36
Gambar 9. ROS Intraseluler pada sel HDF	38
Gambar 10. Kadar ROS Intraseluler pada Sel HDF	39
Gambar 11. Annexin V dan PI pada sel HDF	41
Gambar 12. Intensitas Fluoresensi <i>Annexin</i> V-PI pada Sel HDF	42
Gambar 13. Ekspresi Gen <i>p53</i> (A) dan <i>p21</i> (B) pada sel HDF.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Sekuen Primer gen <i>p53</i> , <i>p21</i> , dan GAPDH	29
--	----

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Analisis Uji MTT AOS.....	70
Lampiran 2. Perhitungan Konsentrasi H ₂ O ₂	71
Lampiran 3. Hasil analisis statistika MTT menggunakan uji ANOVA dan uji posthoc Tukey	72
Lampiran 4. Pengamatan sel HDF perlakuan AOS setelah 4 jam diberi MTT.....	74
Lampiran 5. Hasil Analisis Uji MTT H ₂ O ₂	76
Lampiran 6. Hasil analisis statistika MTT H ₂ O ₂ menggunakan uji ANOVA dan uji posthoc Tukey	77
Lampiran 7. Pengamatan Sel HDF perlakuan H ₂ O ₂ setelah 4 jam MTT	78
Lampiran 8. Hasil Analisis Uji MTT H ₂ O ₂ +AOS	80
Lampiran 9. Hasil analisis statistika MTT H ₂ O ₂ + AOS menggunakan uji ANOVA dan uji posthoc Tukey	81
Lampiran 10. Pengamatan Sel HDF setelah diinduksi AOS dan H ₂ O ₂	83
Lampiran 11. Hasil Analisis Uji DCFH-DA	85
Lampiran 12. Hasil analisis statistika Uji DCFH-DA menggunakan uji ANOVA dan uji posthoc Tukey	86
Lampiran 13. Hasil Analisis Uji Apoptosis.....	87
Lampiran 14. Hasil analisis statistika Uji Apoptosis menggunakan uji ANOVA dan uji posthoc Tukey	89
Lampiran 15. Hasil Isolasi RNA.....	91
Lampiran 16. Optimasi suhu primer	92
Lampiran 17. Hasil Pengujian RT-qPCR	93
Lampiran 18. Hasil Analisis Livak PCR.....	95
Lampiran 19. Hasil analisis statistika RT-qPCR p53 menggunakan uji ANOVA dan uji posthoc Tukey	96
Lampiran 20. Hasil analisis statistika RT-qPCR p21 menggunakan uji ANOVA dan uji posthoc Tukey	97
Lampiran 21. Surat <i>Ethical Clearance</i>	98

ANALISIS POTENSI *CRUDE AGARO-OLIGOSACCHARIDES* (AOS) SEBAGAI PROTEKSI APOPTOSIS SEL HDF TERINDUKSI H₂O₂

Ratnaning Agustin Angelia
23/529534/PBI/01989
Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

INTISARI

Stres oksidatif akibat peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan salah satu faktor utama yang berperan dalam penuaan kulit dan induksi apoptosis sel. Hidrogen peroksida (H₂O₂) banyak digunakan sebagai agen penginduksi stres oksidatif secara *in vitro*. *Agaro-oligosaccharides* (AOS), hasil hidrolisis enzimatis agarosa dari alga merah, diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan berpotensi sebagai agen anti-aging. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek protektif AOS terhadap viabilitas sel, produksi ROS intraseluler, apoptosis, serta ekspresi gen p53 dan p21 pada sel *Human Dermal Fibroblast* (HDF) yang diinduksi H₂O₂. Penelitian dilakukan secara eksperimental *in vitro* menggunakan sel HDF. Uji sitotoksitas dan viabilitas sel dianalisis menggunakan metode MTT *assay*, kadar ROS intraseluler diukur dengan uji DCFH-DA, apoptosis dianalisis menggunakan pewarnaan *Annexin V*-PI, dan ekspresi gen p53 serta p21 dianalisis menggunakan RT-qPCR. Data dianalisis menggunakan uji ANOVA satu arah dengan uji lanjut Tukey. Hasil penelitian menunjukkan bahwa AOS memiliki nilai IC₅₀ sebesar 90,44 µg/mL dan tergolong toksik sedang terhadap sel HDF. Perlakuan AOS pada konsentrasi 5 µg/mL memberikan efek protektif optimal dengan meningkatkan viabilitas sel, menurunkan produksi ROS intraseluler, serta menghambat apoptosis pada sel HDF terinduksi H₂O₂. Selain itu, AOS mampu menurunkan ekspresi gen p53 dan p21 yang berperan dalam jalur respons kerusakan DNA akibat stres oksidatif. Berdasarkan hasil tersebut, AOS berpotensi dikembangkan sebagai agen anti-aging berbasis bahan alami.

Kata Kunci : Agaro-oligosakarida, Apoptosis, Anti-aging, H₂O₂, *Human Dermal Fibroblast*, p53, p21.