

TESIS

PENGARUH RESTRIKSI KALORI DAN OLAHRAGA TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 PADA HATI TIKUS YANG MENGONSUMSI ALKOHOL

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Biomedik (M. Biomed)**



RACHEL MAYA
04112622327003

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
2025**

HALAMAN PENGESAHAN

PENGARUH RESTRIKSI KALORI DAN OLAHRAGA TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 PADA HATI TIKUS YANG MENGONSUMSI ALKOHOL

TESIS

Diajukan untuk melengkapi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Biomedik (M. Biomed)

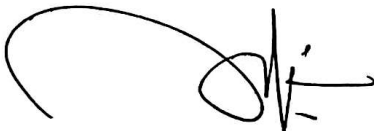
Oleh:

RACHEL MAYA

04112622327003

Pembimbing I

Palembang, 22 April 2025
Pembimbing II

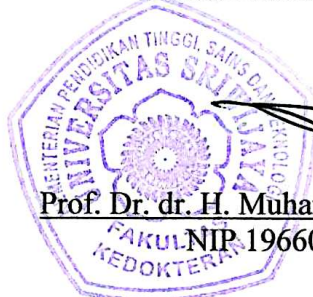


Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, M.Pd.Ked
NIP 197306131999031001



Dr. dr. Siti Sarahdeaz Fazzaura Putri, M.Biomed
NIP 198901122020122009

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran UNSRI



Prof. Dr. dr. H. Muhammad Irsan Saleh, M.Biomed
NIP 1966092919960110001

HALAMAN PERSETUJUAN

Karya tulis ilmiah berupa tesis dengan judul "Pengaruh Restriksi Kalori dan Olahraga terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Hati Tikus yang Mengonsumsi Alkohol" telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya pada tanggal 22 April 2025.

Palembang, 22 April 2025

Tim Penguji Karya Ilmiah berupa Laporan Akhir Tesis.

Ketua :

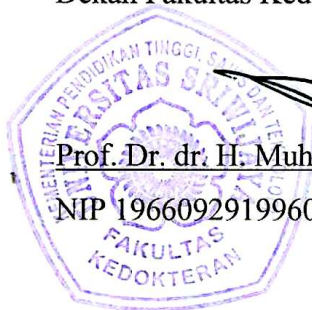
1. Dr. dr. Zen Hafy, M.Biomed
NIP 197212291998031002

Anggota :

2. Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO., M.Pd.Ked
NIP 197306131999031001
3. Dr. dr. Siti Sarahdeaz Fazzaura Putri, M.Biomed
NIP 198901122020122009
4. Dr. dr. Evi Lusiana, M.Biomed
NIP 198607112015042004
5. dr. Eka Febri Zulissetiana, M.Bmd
NIP 198802192010122001
6. Arwan Bin Laeto, S.Pd., M.Kes
NIP 198701292019031004

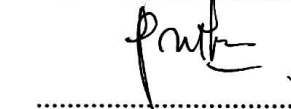
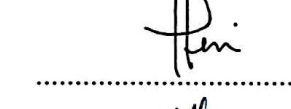
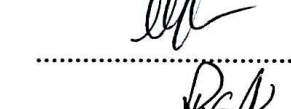
Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Unsri



Prof. Dr. dr. H. Muhammad Irsan Saleh, M.Biomed
NIP 1966092919960110001




Koordinator Program Studi


Dr. dr. Zen Hafy, M.Biomed
NIP 197212291998031002

HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

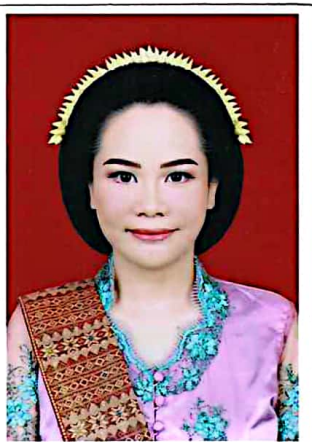
Nama : Rachel Maya

NIM : 04112622327003

Judul : Pengaruh Restriksi Kalori dan Olahraga terhadap Ekspresi
Caspase-3 pada Hati Tikus yang Mengonsumsi Alkohol

Menyatakan bahwa Tesis saya merupakan hasil karya sendiri didampingi tim pembimbing dan bukan hasil penjiplakan/*plagiat*. Apabila ditemukan unsur penjiplakan/*plagiat* dalam Tesis ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik dari Universitas Sriwijaya sesuai aturan yang berlaku.

Demikian, pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa ada paksaan dari siapa pun.



Palembang, 22 April 2025



Rachel Maya

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Rachel Maya

NIM : 04112622327003

Judul : Pengaruh Restriksi Kalori dan Olahraga terhadap Ekspresi
Caspase-3 pada Hati Tikus yang Mengonsumsi Alkohol

Memberikan izin kepada Pembimbing dan Universitas Sriwijaya untuk mempublikasikan hasil penelitian saya untuk kepentingan akademik apabila dalam waktu 1 (satu) tahun tidak mempublikasikan karya penelitian saya. Dalam kasus ini saya setuju untuk menempatkan Pembimbing sebagai penulis korespondensi (*corresponding author*).

Demikian pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa ada paksaan dari siapa pun.

Palembang, 22 April 2025



Rachel Maya

ABSTRAK

PENGARUH RESTRIKSI KALORI DAN OLAHRAGA TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 PADA HATI TIKUS YANG MENGONSUMSI ALKOHOL

Konsumsi alkohol global diprediksi meningkat 17% dalam 13 tahun ke depan, meningkatkan risiko penyakit hati melalui mekanisme stres oksidatif, inflamasi, dan caspase-3 sebagai eksekutor apoptosis. Restriksi kalori (RK) dan olahraga masing-masing diketahui dapat menekan stres oksidatif dan ekspresi caspase-3, namun bukti intervensi keduanya terhadap apoptosis hati dalam kondisi sedang terpapar alkohol masih terbatas. Penelitian ini dilakukan dengan desain eksperimental *in vivo posttest-only controlled group*, melibatkan 30 tikus Wistar jantan, namun hanya 25 tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan dianalisis. Kelompok percobaan terdiri dari kontrol, alkohol, alkohol+RK, alkohol+olahraga, dan alkohol+RK+olahraga. Alkohol diberikan secara oral (2,5 mL etanol 20%), RK sebesar 20% dari pakan standar, dan olahraga dengan *hurdle running wheel* dengan kecepatan 10–12 m/menit selama 30 menit per sesi. Setelah enam minggu, ekspresi caspase-3 dianalisis imunohistokimia dan dihitung menggunakan *ImageJ* lalu dianalisis secara statistik berdasarkan asumsi normalitas dan homogenitas data. Ekspresi caspase-3 meningkat signifikan pada kelompok alkohol dibanding kontrol ($p < 0,001$), dengan rerata ekspresi 14,07% (kontrol) versus 33,12% (alkohol). Penambahan RK, olahraga, maupun kombinasi keduanya tidak menurunkan ekspresi caspase-3 secara bermakna dibanding kelompok alkohol saja ($p > 0,05$), dengan rerata ekspresi berturut-turut 33,66%, 36,41%, dan 42,12%. Temuan ini menunjukkan bahwa efek protektif restriksi kalori maupun peningkatan kapasitas antioksidan melalui olahraga tidak efektif dalam menekan apoptosis selama paparan alkohol berlangsung. Kombinasi kedua intervensi tersebut juga tidak menghasilkan efek supresif terhadap ekspresi caspase-3. Alkohol mendominasi respons hepatosit, menyebabkan apoptosis berlanjut meskipun ada intervensi metabolik. Temuan ini mendukung teori bahwa alkohol memicu apoptosis melalui stres oksidatif dan disfungsi mitokondria.

Kata kunci: caspase-3, alkohol, restriksi kalori, olahraga, apoptosis hati

ABSTRACT

EFFECT OF CALORIC RESTRICTION AND EXERCISE ON HEPATIC CASPASE-3 EXPRESSION IN ALCOHOL- CONSUMING RATS

Global alcohol consumption is expected to rise by 17% over the next 13 years, which could increase the risk of liver disease due to oxidative stress, inflammation, and the activation of caspase-3, a key protein of apoptosis. While caloric restriction (CR) and exercise are known to reduce oxidative stress and caspase-3 levels, research on their effects on liver cell apoptosis during alcohol exposure is limited. This study utilized a post-test-only controlled group design with 30 male Wistar rats, of which 25 met the inclusion criteria for analysis. The groups included a control, an alcohol group, and groups receiving alcohol along with either CR, exercise, or both. Alcohol was administered at 2.5 mL of 20% ethanol, CR was set at 20% of the standard diet, and exercise involved using a hurdle running wheel at 10-12 m/min for 30 minutes each session. After six weeks, caspase-3 levels were assessed through immunohistochemical analysis and quantified using ImageJ, followed by statistical evaluation. Results showed a significant increase in caspase-3 expression in the alcohol group compared to the control ($p < 0.001$), with averages of 14.07% (control) versus 33.12% (alcohol). However, adding CR, exercise, or both did not significantly lower caspase-3 levels compared to the alcohol group alone ($p > 0.05$), with averages of 33.66%, 36.41%, and 42.12%, respectively. These results suggest that calorie restriction and exercise or combination of both do not effectively mitigate apoptosis induced by alcohol exposure. Alcohol appears to override any metabolic interventions, perpetuating apoptosis through oxidative stress and mitochondrial dysfunction.

Keywords: caspase-3, alcohol, calorie restriction, exercise, liver apoptosis

RINGKASAN

PENGARUH RESTRIKSI KALORI DAN OLAHRAGA TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 PADA HATI TIKUS YANG MENGONSUMSI ALKOHOL

Karya tulis ilmiah berupa Tesis, 22 April 2025

Rachel Maya; dibimbing oleh Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, M.Pd.Ked dan Dr. dr. Siti Sarahdeaz Fazzaura Putri, M.Biomed
Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
xxii + 82 halaman, 5 tabel, 6 gambar, 11 lampiran

Konsumsi alkohol secara global diperkirakan akan mengalami peningkatan yang signifikan dalam dekade mendatang. Alkohol merupakan salah satu faktor risiko utama dalam kerusakan hati, terutama melalui mekanisme stres oksidatif dan aktivasi jalur apoptosis. Salah satu penanda utama dalam proses apoptosis adalah caspase-3, yaitu protease eksekutor yang berperan penting dalam menjalankan program kematian sel. Aktivasi caspase-3 akibat konsumsi alkohol kronis dapat menyebabkan kerusakan sel hepatosit, memicu fibrosis, serta meningkatkan risiko terjadinya sirosis dan karsinoma hepatoseluler. Berdasarkan hal tersebut, intervensi gaya hidup seperti restriksi kalori dan olahraga dipertimbangkan sebagai strategi potensial untuk menurunkan kerusakan hati melalui modulasi ekspresi caspase-3.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh restriksi kalori dan olahraga terhadap ekspresi caspase-3 pada jaringan hati tikus yang mengonsumsi alkohol. Tujuan khusus mencakup penilaian terhadap efek alkohol, restriksi kalori, olahraga, serta kombinasi keduanya terhadap ekspresi caspase-3. Desain penelitian yang digunakan adalah posttest-only controlled group design dengan hewan coba berupa tikus jantan galur Wistar berusia 3–4 bulan. Sebanyak 30 ekor tikus dibagi ke dalam lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol (P1), kelompok alkohol (P2), kelompok alkohol dengan restriksi kalori (P3), kelompok alkohol dengan olahraga (P4), dan kelompok alkohol dengan kombinasi restriksi kalori dan olahraga (P5). Perlakuan diberikan selama enam minggu. Alkohol diberikan secara oral dalam bentuk larutan etanol 20% sebanyak 2,5 mL per hari. Restriksi kalori dilakukan dengan pengurangan 20% dari jumlah pakan standar, sedangkan olahraga diberikan melalui aktivitas fisik menggunakan hurdle running wheel dengan kecepatan 10–12 meter per menit selama 30 menit setiap hari. Setelah seluruh perlakuan selesai, dilakukan terminasi hewan coba dan pengambilan jaringan hati untuk pemeriksaan imunohistokimia terhadap ekspresi caspase-3.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok tikus yang hanya diberi alkohol (P2) mengalami peningkatan ekspresi caspase-3 secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol (P1) dengan nilai $p < 0,001$. Hal ini mengonfirmasi bahwa konsumsi alkohol menginduksi aktivasi jalur apoptosis melalui peningkatan ekspresi caspase-3 pada jaringan hati. Kelompok P3 (alkohol dengan restriksi kalori) juga menunjukkan ekspresi caspase-3 yang lebih tinggi secara signifikan

dibandingkan dengan kelompok kontrol, namun tidak berbeda secara signifikan dibandingkan kelompok P2. Demikian pula, kelompok P4 (alkohol dengan olahraga) memperlihatkan peningkatan ekspresi caspase-3 yang tidak berbeda signifikan dari kelompok alkohol maupun kelompok dengan restriksi kalori. Kelompok P5 (kombinasi alkohol, restriksi kalori, dan olahraga) juga menunjukkan ekspresi caspase-3 yang tinggi, tanpa perbedaan yang bermakna dibandingkan ketiga kelompok sebelumnya.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsumsi alkohol secara aktif dan berkelanjutan memicu peningkatan ekspresi caspase-3 pada jaringan hati tikus. Intervensi gaya hidup seperti restriksi kalori, olahraga, maupun kombinasi keduanya tidak memberikan penurunan yang signifikan terhadap ekspresi caspase-3 selama paparan alkohol masih berlangsung. Meskipun secara teoritis intervensi tersebut berpotensi mengurangi stres oksidatif dan menekan proses apoptosis, temuan ini menunjukkan bahwa efek toksik alkohol tetap menjadi faktor dominan dalam aktivasi jalur apoptosis.

Kata kunci: caspase-3, alkohol, restriksi kalori, olahraga, apoptosis hati

Kepustakaan: 119 (1994–2024)

SUMMARY

EFFECT OF CALORIC RESTRICTION AND EXERCISE ON HEPATIC CASPASE-3 EXPRESSION IN ALCOHOL-CONSUMING RATS

Scientific Paper in the form of Thesis, April 22nd 2025

Rachel Maya; supervised by Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, M.Pd.Ked dan Dr. dr. Siti Sarahdeaz Fazzaura Putri, M.Biomed
Master's Program in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Sriwijaya University
xxii + 82 pages, 5 tables, 6 figures, 11 appendices

Global alcohol consumption is projected to rise significantly in the coming decade. Alcohol is a major risk factor for liver injury, primarily through mechanisms involving oxidative stress and the activation of apoptotic pathways. One of the key markers of apoptosis is caspase-3, an executioner protease that plays a central role in the programmed cell death process. Chronic alcohol consumption may trigger caspase-3 activation, leading to hepatocyte damage, fibrosis, and an increased risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In light of these risks, lifestyle interventions such as caloric restriction and physical exercise are being explored as potential strategies to mitigate liver injury by modulating caspase-3 expression.

This study aimed to evaluate the effects of caloric restriction and exercise on caspase-3 expression in the liver tissue of alcohol-exposed rats. Specifically, the study assessed the individual and combined effects of alcohol, caloric restriction, and exercise on caspase-3 expression. A post-test-only controlled group design was employed using male Wistar rats aged 3–4 months. A total of 30 rats were randomly assigned into five groups: a control group (P1), an alcohol-only group (P2), an alcohol with caloric restriction group (P3), an alcohol with exercise group (P4), and an alcohol with combined caloric restriction and exercise group (P5).

Treatments were administered over six weeks. Alcohol was delivered orally in the form of a 20% ethanol solution at a dose of 2.5 mL per day. Caloric restriction involved a 20% reduction in standard feed intake, while the exercise intervention consisted of daily physical activity using a hurdle running wheel at a speed of 10–12 meters per minute for 30 minutes. Upon completion of the treatment period, the animals were euthanized, and liver tissues were collected for immunohistochemical analysis of caspase-3 expression.

The results showed a significant increase in caspase-3 expression in the alcohol-only group (P2) compared to the control group (P1), with a p-value of < 0.001 . This finding confirms that alcohol exposure induces the activation of apoptotic pathways via upregulation of caspase-3 in liver tissue. The P3 group (alcohol with caloric restriction) also exhibited significantly higher caspase-3 expression compared to the control, but there was no significant difference when compared to the alcohol-only group. Similarly, the P4 group (alcohol with exercise) showed increased caspase-3 expression that was not significantly different from either the alcohol-only or caloric restriction groups. The P5 group (alcohol with combined caloric

restriction and exercise) also demonstrated elevated caspase-3 expression, with no significant difference compared to the other alcohol-exposed groups.

Overall, the findings of this study indicate that chronic and sustained alcohol consumption leads to increased caspase-3 expression in rat liver tissue. Lifestyle interventions such as caloric restriction, exercise, or their combination do not significantly reduce caspase-3 expression in the presence of ongoing alcohol exposure. Although these interventions may theoretically reduce oxidative stress and inhibit apoptosis, the results suggest that the toxic effects of alcohol remain the predominant factor driving apoptotic activation.

Keywords: caspase-3, alcohol, calorie restriction, exercise, liver apoptosis

Citations: 119 (1994–2024)

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat, hidayah, serta karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan akhir berupa tesis yang berjudul "Pengaruh Restriksi Kalori dan Olahraga terhadap Ekspresi Caspase-3 di Hati Tikus yang Mengonsumsi Alkohol". Penelitian ini dilakukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Biomedik (M.Biomed) pada Universitas Sriwijaya.

Penyelesaian laporan ini tidak terlepas dari bantuan, bimbingan, dan arahan dari berbagai pihak, baik secara lisan maupun tulisan. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat, berkat, dan karunia-Nya yang senantiasa menyertai penulis dalam menyelesaikan tesis ini.
2. Suami terkasih, Victor M. N. Tjaprawira, orang tua, keluarga besar, serta kerabat lainnya yang senantiasa memberikan doa, dukungan, dan motivasi tanpa henti sehingga penulis dapat menyelesaikan studi ini dengan baik.
3. Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, M.Pd.Ked., selaku pembimbing pertama, dan Dr. dr. Siti Sarahdeaz Fazzaura Putri, M.Biomed., selaku pembimbing kedua, atas segala saran, masukan, dan dukungan yang diberikan selama proses penyusunan dan penyelesaian tesis ini.
4. Prof. Dr. Taufiq Marwa, S.E., M.Si., selaku Rektor Universitas Sriwijaya; dr. Syarif Husin, M.S., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya; dan Dr. dr. H. Zen Hafy, M.Biomed., selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, atas segala fasilitas, sarana, dan kesempatan yang diberikan kepada penulis selama masa studi.
5. Tim penguji tesis: dr. Eka Febri Zulissetiana, M.Bmd., Arwan Bin Laeto, S.Pd., M.Kes., dan Dr. dr. Evi Lusiana, M.Biomed., yang telah memberikan

kritik, saran, dan masukan yang sangat berharga selama tahap seminar proposal dan seminar hasil thesis.

6. Seluruh staf dan konsultan Laboratorium Patologi Klinik Barokah Palembang, khususnya Prof. dr. Krisna Murti, Sp.PA., M.Biotech.Stud., Ph.D., dan dr. Nyiayu Fauziah Kurniawati, Sp.PA., yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama proses analisis hasil penelitian.
7. Seluruh staf *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, serta Abduh Tikus, atas bantuan dalam penyediaan fasilitas dan dukungan teknis selama pelaksanaan penelitian.
8. Yayasan Universitas Advent Indonesia yang telah memberikan kesempatan untuk *upgrading* dan didukung secara finansial kepada penulis selama masa studi.
9. Seluruh pihak lainnya yang telah terlibat, baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penyelesaian tesis ini. Doa serta dukungan yang telah diberikan memiliki peran penting dalam keberhasilan penulis.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih memiliki kekurangan. Oleh karena itu, penulis sangat terbuka terhadap kritik dan saran yang membangun demi kesempurnaan karya ini. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca dan menjadi kontribusi yang berarti di bidang ilmu biomedik..

Palembang, April 2025

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DAN JUDUL TESIS.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
RINGKASAN.....	viii
SUMMARY.....	x
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
DAFTAR ISTILAH	xx
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Organ Hati	5
2.2 Peran Alkohol dalam Tubuh.....	8
2.2.1 Metabolisme Alkohol.....	8
2.2.2 Efek Alkohol Terhadap Kesehatan Hati.....	11
2.2.3 Mekanisme Alkohol dalam Memengaruhi Caspase-3.....	12
2.3 Restriksi Kalori	15
2.3.1 Definisi dan Penerapan Restriksi Kalori.....	15
2.3.2 Efek Restriksi Kalori Terhadap Kesehatan Hati.....	15

2.3.3 Efek Restriksi Kalori Terhadap Caspase-3.....	16
2.4 Olahraga	17
2.4.1 Definisi dan Penerapan Olahraga.....	17
2.4.2 Efek Olahraga Terhadap Kesehatan Hati.....	18
2.4.3 Efek Olahraga Terhadap Caspase-3.....	18
2.5 Hewan Coba (Tikus) Sebagai Subjek Penelitian.....	19
2.5.1 Profil dan Penanganan Tikus.....	20
2.5.2 Perlakuan Eksperimen Pada Tikus.....	23
2.5.3 Cara Memegang Tikus.....	23
2.5.4 Eutanasia dan Nekropsi Tikus.....	24
2.6 Kerangka Teori	26
2.7 Kerangka Konsep	26
BAB III METODE PENELITIAN	27
3.1 Jenis Penelitian	27
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	27
3.3 Populasi dan Sampel	27
3.3.1 Populasi	27
3.3.2 Sampel	27
3.3.2.1 Kriteria Inklusi	27
3.3.2.2 Kriteria Eksklusi	27
3.3.3 Besar Sampel Penelitian	28
3.3.4 Cara Pengambilan Sampel	28
3.4 Variabel Penelitian	29
3.5 Definisi Operasional	29
3.6 Alat dan Bahan	30
3.6.1 Alat dan Bahan Pemberian Alkohol.....	30
3.6.2 Alat dan Bahan Perlakuan Restriksi Kalori.....	30
3.6.3 Alat dan Bahan Perlakuan Olahraga.....	30
3.6.4 Alat dan Bahan Pengambilan Organ Hepar.....	31
3.6.5 Alat dan Bahan Pemeriksaan Imunohistokimia.....	31
3.7 Prosedur Penelitian	31
3.7.1 Persiapan Hewan Coba	31
3.7.2 Pengelompokan Hewan Coba	32
3.7.3 Pengambilan Organ Hepar.....	32
3.7.4 Pemeriksaan Imunohistokimia	33
3.7.5 Pengamatan Preparat IHK.....	34

3.8 Analisis Data	35
3.9 Alur Penelitian	36
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
4.1 Hasil Penelitian	37
4.1.1 Karakteristik Subjek Penelitian.....	37
4.1.2 Ekspresi Caspase-3 pada Hati Tikus yang Mengonsumsi Alkohol.....	37
4.1.3 Analisis Pengaruh Alkohol terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Hati Tikus.....	43
4.1.4 Analisis Pengaruh Restriksi Kalori terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Hati Tikus yang Mengonsumsi Alkohol.....	43
4.1.5 Analisis Pengaruh Olahraga terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Hati Tikus yang Mengonsumsi Alkohol.....	44
4.1.6 Analisis Pengaruh Kombinasi Restriksi Kalori dan Olahraga terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Hati Tikus yang Mengonsumsi Alkohol.....	44
4.2 Pembahasan	45
4.2.1 Pengaruh Alkohol terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Hati Tikus.....	45
4.2.2 Pengaruh Restriksi Kalori terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Hati Tikus yang Mengonsumsi Alkohol.....	46
4.2.3 Pengaruh Olahraga terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Hati Tikus yang Mengonsumsi Alkohol.....	48
4.2.4 Pengaruh Kombinasi Restriksi Kalori dan Olahraga terhadap Ekspresi Caspase-3 pada Hati Tikus yang Mengonsumsi Alkohol.....	49
4.3 Keterbatasan Penelitian.....	50
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	52
5.1 Kesimpulan.....	52
5.2 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN.....	63
RIWAYAT HIDUP.....	81

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil pengukuran persentase ekspresi caspase-3 di hati tikus yang mengonsumsi alkohol.....	39
Tabel 4.2 Uji normalitas densitas ekspresi caspase-3 pada setiap kelompok perlakuan pada hati tikus yang mengonsumsi alkohol.....	40
Tabel 4.3 Uji homogenitas variansi densitas ekspresi caspase-3 pada jaringan hati tikus yang mengonsumsi alkohol.....	41
Tabel 4.4 Hasil uji Welch ANOVA pada densitas ekspresi caspase-3 di jaringan hati tikus.....	42
Tabel 4.5 Tabel ringkasan hasil uji <i>post hoc</i> Games-Howell.....	43

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Zona lobulus hati dan komposisi sinusoid hati.....	6
Gambar 2.2 Metabolisme alkohol dalam hati.....	11
Gambar 2.3 Mekanisme molekuler apoptosis setelah diberi alkohol pada hepatosit.....	14
Gambar 2.4 Kerangka Teori.....	26
Gambar 2.5 Kerangka Konsep.....	26
Gambar 4.1 Ekspresi caspase-3 pada jaringan hati tikus berdasarkan hasil Imunohistokimia.....	38
Gambar 4.2 Perbedaan rata-rata persentase densitas caspase-3.....	40

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Tabel pengukuran berat badan tikus.....	60
Lampiran 2. Tabel statistik deskriptif berat badan tikus.....	60
Lampiran 3. Tabel perhitungan densitas caspase-3.....	61
Lampiran 4. Tabel post hoc Games-Howell.....	63
Lampiran 5. Sertifikat Persetujuan Etik.....	64
Lampiran 6. Surat Hewan Uji.....	65
Lampiran 7. Surat Perizinan Penggunaan <i>Animal House</i> FK Unsri.....	67
Lampiran 8. Surat Perizinan Penelitian di Lab. Patologi Anatomi Barokah..	68
Lampiran 9. Surat Keterangan Selesai Penelitian.....	69
Lampiran 10. <i>Data sheet</i> antibody caspase-3 (IHK).....	71
Lampiran 11. Dokumentasi Penelitian.....	74

DAFTAR ISTILAH

AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
ADH	<i>Alcohol Dehydrogenase</i>
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
ALD	<i>Alcoholic Liver Disease</i>
ALDH2	<i>Aldehyde Dehydrogenase 2</i>
ALT	<i>Alanine Aminotransferase</i>
AMPK	<i>AMP-activated Protein Kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor-1</i>
AST	<i>Aspartate Aminotransferase</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
Bak	<i>Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 Associated X Protein</i>
Bcl2	<i>B-cell Lymphoma 2</i>
Bid	<i>BH3-Interacting Domain Death Agonist</i>
CCl4	<i>Carbon Tetrachloride</i>
CHOP	<i>C/EBP Homologous Protein</i>
CYP2E1	<i>Cytochrome P450 2E1</i>
DAB	<i>Diaminobenzidine</i>
df.	<i>Degrees of Freedom</i>
Drp1	<i>Dynamin-Related Protein-1</i>
eIF2 α	<i>Eukaryotic Initiation Factor-2-alpha</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
ER	<i>Endoplasmic Reticulum</i>
ERK1/2	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2</i>
EtG	<i>Ethyl Glucuronide</i>
EtS	<i>Ethyl Sulphate</i>

FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
FAEE	<i>Fatty Acid Ethyl Ester</i>
Fas	<i>Fas Cell Surface Death Receptor</i>
FasL	<i>Fas Ligand</i>
FOXO	<i>Forkhead box O transcription factors</i>
GGT	<i>Gamma-Glutamyl Transferase</i>
GPx	<i>Glutathione Peroxidase</i>
GSK3 β	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta</i>
GSH	<i>Glutathione</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSC	<i>Hepatic Stellate Cell</i>
HSCs	<i>Hepatic Stellate Cells</i>
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IHK	<i>Imunohistokimia (Immunohistochemistry)</i>
IRE1	<i>Inositol-Requiring Enzyme 1</i>
JAK-STAT3	<i>Janus Kinase - Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
JNK/STAT	<i>c-Jun N-terminal Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MDA	<i>Malondialdehyde</i>
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
MicroRNA (miR-125a-5p)	<i>Small RNA that regulates gene expression</i>
mTORC1	<i>Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1</i>
NAFLD	<i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease</i>
NAD	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrate</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NRF1	<i>Nuclear Respiratory Factor 1</i>

NRF2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor 2</i>
PARP-1	<i>Poly ADP-ribose Polymerase 1</i>
PAP	<i>Peroxidase-Ant peroxidase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PEth	<i>Phosphatidyl ethanol</i>
PGC1 α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha</i>
PGC	<i>Proliferator-activated Receptor Gamma Coactivator</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PLD	<i>Phospholipase D</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>
RK	<i>Restriksi Kalori (Caloric Restriction)</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
S.D.	<i>Standard Deviation</i>
Sig.	<i>Significance</i>
SIRT1	<i>Silent Information Regulator 1</i>
SIRTUIN	<i>Family of NAD⁺-dependent Deacetylase Proteins</i>
SOD	<i>Superoxide Dismutase</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TFAM	<i>Transcription Factor A, Mitochondrial</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TNFR–1	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor-1</i>
TRS	<i>Target Retrieval Solution</i>
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling</i>
tBid	<i>Truncated BH3-Interacting Domain Death Agonist</i>
Vd	<i>Volume of Distribution</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Konsumsi alkohol secara global diperkirakan akan meningkat sebesar 17% dalam 13 tahun ke depan, mencapai 7,6 liter per orang dewasa per tahun pada tahun 2030. Di Asia, minuman keras dan bir memiliki dampak signifikan terhadap beban penyakit terkait alkohol.¹ Konsumsi alkohol yang berlebihan menimbulkan berbagai efek merugikan seperti peningkatan tingkat stres oksidatif dan inflamasi serta gangguan pada serangkaian proses metabolisme yang dapat mengganggu regenerasi sel tubuh.² Efek tersebut jika terjadi pada organ hati maka dapat timbul penumpukan lemak, hepatitis, fibrosis, sirosis, kanker hepatoseluler, serta meningkatkan angka kematian.³

Mekanisme yang memicu kerusakan hati oleh etanol melibatkan peningkatan stres oksidatif dan aktivasi caspase-3. Aktivasi ini menarik perhatian karena peningkatan ekspresi protease tersebut dapat menunjukkan tingkat keparahan penyakit serta menyebabkan disfungsi atau kegagalan organ.⁴ Caspase-3 berperan sebagai eksekutor dalam jalur intrinsik maupun ekstrinsik apoptosis sel. Apoptosis yang diinduksi oleh etanol sering melibatkan jalur sinyal Fas/Fas ligand (FasL) lalu memicu aktivasi caspase-8 dan kemudian caspase-3 yang mengarah pada kematian sel.⁵ Studi menunjukkan bahwa etanol meningkatkan ekspresi FasL dan aktivitas caspase-3 sehingga menekankan pentingnya jalur ini dalam apoptosis hati yang diberi etanol.⁶ Paparan etanol juga membuat sel hati lebih sensitif terhadap stres mitokondria yang menyebabkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria ke dalam sitosol. Pelepasan ini mengaktifkan caspase-9 yang kemudian mengaktifkan caspase-3 yang lebih lanjut mempromosikan apoptosis.^{6,7}

Seiring dengan proses apoptosis yang terjadi, sel-sel hati yang mengalami kematian melepaskan berbagai sinyal molekuler, termasuk *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β). TGF- β merangsang transformasi sel stroma hati menjadi

miofibroblas. Miofibroblas ini aktif memproduksi komponen matriks ekstraseluler seperti kolagen. Akumulasi kolagen dan komponen matriks lainnya menyebabkan penebalan jaringan hati dan pembentukan jaringan parut. Hal ini mempercepat terbentuknya fibrosis dan dapat berujung pada kegagalan organ.⁸

Telah diketahui bahwa konsumsi alkohol meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang berperan penting dalam proses apoptosis di hati. Stres oksidatif tinggi dapat menyebabkan disfungsi mitokondria yang pada gilirannya meningkatkan aktivitas eksekutor apoptosis seperti caspase-3.⁹ Mengubah gaya hidup menjadi lebih seimbang diimbangi dengan menghentikan konsumsi alkohol dapat mengurangi produksi ROS ini. Restriksi kalori (RK) adalah salah satu pola makan yang telah diusulkan sebagai mekanisme untuk memperpanjang masa hidup dengan mengurangi pengeluaran energi dan produksi ROS.^{10,11}

RK memengaruhi berbagai jalur metabolik serta proses apoptosis termasuk dalam mengurangi stress oksidatif dan regulasi aktivitas caspase-3.^{12,13} Pada individu sehat yang tidak mengalami obesitas, intervensi RK selama dua tahun menunjukkan peningkatan dalam beberapa biomarker hati, yang mengindikasikan potensi manfaat jangka panjang untuk kesehatan hati dan penurunan risiko penyakit metabolik. RK memengaruhi glikolisis, glukoneogenesis, dan degradasi asam lemak, yang sangat penting untuk mempertahankan fungsi hati optimal dan keseimbangan energi tubuh.^{14,15}

RK juga dapat mengubah keseimbangan antara faktor pro-apoptotik dan anti-apoptotik, seperti penurunan rasio Bcl-2/Bax serta peningkatan pelepasan sitokrom c yang kemudian memodulasi aktivitas caspase-8 dan caspase-9 sebagai pengatur awal dari caspase-3.¹⁶ RK terbukti mengurangi kejadian lesi preneoplastik di hati dengan meningkatkan apoptosis pada sel-sel yang berpotensi menjadi kanker, sehingga memberikan efek protektif terhadap perkembangan kanker hati.¹⁷ Tingkat restriksi kalori yang moderat, berkisar antara 8,5–25%, dapat memiliki efek yang menguntungkan termasuk penurunan modifikasi protein oksidatif dan sensitivitas membran terhadap peroksidasi lipid, yang berhubungan dengan reprogramasi kompleks rantai respirasi dan penurunan *apoptosis inducing factors* (AIF).¹⁸

Selain restriksi kalori, menyelaraskan pola makan dengan aktivitas fisik atau olahraga rutin telah terbukti mengatur jalur molekuler dan mengurangi stres

oksidatif yang memengaruhi ekspresi caspase-3 dan apoptosis dalam hati. Seperti halnya restriksi kalori, penurunan apoptosis selama olahraga disebabkan oleh penurunan faktor-faktor jalur apoptotik yang bergantung pada Fas, seperti protein Fas-ligand, reseptor kematian Fas, TNFR-1, FADD, caspase-8, dan caspase-3.^{19,20} Sebagai contoh jenis olahraga, latihan treadmill menurunkan tingkat ALT dan AST, penanda kerusakan hati, dan mengurangi jumlah ekspresi caspase-3 pada tikus yang terpapar etanol dikombinasikan dengan lipopolisakarida (LPS) dan tetraklorida karbon (CCl₄).²¹ Latihan aerobik dapat secara efektif mengurangi apoptosis hepatosit dengan mengatur jalur AKT/GSK3 β , yang pada gilirannya menurunkan ekspresi caspase-3.²² Berdasarkan rekomendasi WHO (*World Health Organization*), olahraga yang dianjurkan bagi seseorang adalah latihan kardiorespirasi intensitas sedang selama ≥ 30 menit setidaknya 5 hari dalam seminggu, atau latihan kardiorespirasi intensitas tinggi selama ≥ 20 menit pada 3 hari dalam seminggu, atau kombinasi keduanya dengan tujuan meningkatkan kesehatan, kebugaran, dan upaya pencegahan penyakit.²³

Restriksi kalori dan olahraga pada umumnya diteliti secara terpisah untuk menilai manfaatnya terhadap kesehatan hati. Data mengenai pengaruh kombinasi kedua faktor tersebut terhadap masalah kesehatan hati, termasuk dalam proses apoptosis, terutama pada peminum alkohol, masih terbatas. Oleh karena itu, menarik untuk mengeksplorasi lebih lanjut mengenai kombinasi ini. Penelitian ini akan dilakukan pada hewan coba, yaitu tikus untuk mendapatkan hasil yang objektif. Meskipun penelitian pada hewan coba memiliki berbagai keterbatasan, hasilnya dapat memberikan wawasan yang relevan karena tikus memiliki kemiripan filogenetik dengan manusia.²⁴ Dengan memperhatikan potensi manfaat dari kedua pendekatan ini sebagai upaya dalam mengurangi dampak negatif dari konsumsi alkohol pada hati, peneliti tertarik untuk menyelidiki pengaruh restriksi kalori dan olahraga terhadap ekspresi caspase-3 pada hati tikus yang mengonsumsi alkohol.

1.2 Rumusan Masalah

Belum diketahui pengaruh restriksi kalori dan olahraga terhadap ekspresi caspase-3 pada hati tikus yang mengonsumsi alkohol.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh restriksi kalori dan olahraga terhadap ekspresi caspase-3 pada hati tikus yang mengonsumsi alkohol.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh alkohol terhadap ekspresi caspase-3 pada hati tikus.
2. Untuk mengetahui pengaruh restriksi kalori terhadap ekspresi caspase-3 pada hati tikus yang mengonsumsi alkohol.
3. Untuk mengetahui pengaruh olahraga terhadap ekspresi caspase-3 pada hati tikus yang mengonsumsi alkohol.
4. Untuk mengetahui apakah kombinasi restriksi kalori dan olahraga memiliki pengaruh terhadap ekspresi caspase-3 pada hati tikus yang mengonsumsi alkohol.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah terdapat pengaruh restriksi kalori dan olahraga terhadap ekspresi caspase-3 pada hati tikus yang mengonsumsi alkohol.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini dapat menambah wawasan ilmiah serta literatur mengenai pengaruh restriksi kalori dan olahraga terhadap ekspresi caspase-3 pada hati tikus yang mengonsumsi alkohol.

1.5.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat menjadi landasan untuk mengembangkan terapi non-farmakologis yang lebih efektif dalam mengelola pengaruh alkohol bagi organ hati. Dengan mengevaluasi efek restriksi kalori dan olahraga, penelitian ini memperdalam pemahaman tentang mekanisme apoptotik dalam hati. Temuan ini membuka peluang untuk pengembangan strategi dalam meningkatkan kesehatan hati berbasis gaya hidup.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jayathilaka R, Athukorala O, Ishara S, Silva D, Pathirage T. Alcohol brings burdens: A global and continent wise study on alcohol consumption and global burden of diseases. *PloS One*. 2022 Jul 28;17(7):e0270998.
2. Molina PE, McClain C, Valla D, Guidot D, Diehl AM, Lang CH, Neuman M. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2002 Jan;26(1):120-8.
3. Gaitantzi H, Meyer C, Rakoczy P, Thomas M, Wahl K, Wandrer F, Bantel H, Alborzinia H, Wölfl S, Ehnert S, Nüssler A. Ethanol sensitizes hepatocytes for TGF- β -triggered apoptosis. *Cell death & disease*. 2018 Jan 19;9(2):51.
4. Menk M, Graw JA, Poyraz D, Möbius N, Spies CD, von Haefen C. Chronic alcohol consumption inhibits autophagy and promotes apoptosis in the liver. *International journal of medical sciences*. 2018 Apr 27;15(7):682.
5. McVicker BL, Tuma DJ, Kubik JL, Tuma PL, Casey CA. Ethanol-induced apoptosis in polarized hepatic cells possibly through regulation of the Fas pathway. *Alcoholism: clinical and experimental research*. 2006 Nov;30(11):1906-15.
6. Zhou Z, Sun X, Kang YJ. Ethanol-induced apoptosis in mouse liver: Fas-and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *The American journal of pathology*. 2001 Jul 1;159(1):329-38.
7. Blomdahl J, Nasr P, Ekstedt M, Kechagias S. Moderate alcohol consumption is associated with significant fibrosis progression in NAFLD. *Hepatology Communications*. 2023 Jan 1;7(1):e0003.
8. Gaitantzi H, Meyer C, Rakoczy P, Thomas M, Wahl K, Wandrer F, Bantel H, Alborzinia H, Wölfl S, Ehnert S, Nüssler A. Ethanol sensitizes hepatocytes for TGF- β -triggered apoptosis. *Cell death & disease*. 2018 Jan 19;9(2):51.
9. Rabelo AC, Andrade AK, Costa DC. The Role of Oxidative Stress in Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies. *Nutrients*. 2024 Apr 15;16(8):1174.
10. Giles EL, Brennan M. Trading between healthy food, alcohol and physical activity behaviours. *BMC public health*. 2014 Dec;14:1-1.
11. Mladenović D, Ninković M, Aleksić V, Šljivančanin T, Vučević D, Todorović V, Stanković M, Stanojlović O, Radosavljević T. The effect of calorie restriction on acute ethanol-induced oxidative and nitrosative liver injury in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013 Sep 1;36(2):296-302.
12. Habeos GI, Filippopoulou F, Habeos EE, Kalaitzopoulou E, Skipitari M, Papadea P, Lagoumintzis G, Niarchos A, Georgiou CD, Chartoumpekis DV. Maternal calorie restriction induces a transcriptional cytoprotective response in embryonic liver partially dependent on nrf2. *Antioxidants*. 2022 Nov 17;11(11):2274.
13. Park CY, Park S, Kim MS, Han SN. Effects of mild calorie restriction on hepatic lipid metabolism and inflammation in mice (1034.14). *The FASEB Journal*. 2014 Apr;28:1034-4.

14. Dorling JL, Ravussin E, Redman LM, Bhapkar M, Huffman KM, Racette SB, Das SK, Apolzan JW, Kraus WE, Höchsmann C, Martin CK. Effect of 2 years of calorie restriction on liver biomarkers: results from the CALERIE phase 2 randomized controlled trial. *European journal of nutrition*. 2021 Apr;60:1633-43.
15. Kostogrys RB, Franczyk-Zarów M, Manterys A, Wybranska I. Effect of caloric restriction on liver function in young and old ApoE/LDLr^{-/-} mice. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2018;69(1).
16. López-Domínguez JA, Khraiweh H, González-Reyes JA, López-Lluch G, Navas P, Ramsey JJ, de Cabo R, Burón MI, Villalba JM. Dietary fat and aging modulate apoptotic signaling in liver of calorie-restricted mice. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2015 Apr 1;70(4):399-409.
17. Wang L, Derous D, Huang X, Mitchell SE, Douglas A, Lusseau D, Wang Y, Speakman JR. The effects of graded levels of calorie restriction: XIX. impact of graded calorie restriction on protein expression in the liver. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2023 Jul 1;78(7):1125-34.
18. Gómez J, Caro P, Naudí A, Portero-Otin M, Pamplona R, Barja G. Effect of 8.5% and 25% caloric restriction on mitochondrial free radical production and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology*. 2007 Oct;8:555-66.
19. Niemelä O, Bloigu A, Bloigu R, Halkola AS, Niemelä M, Aalto M, Laatikainen T. Impact of physical activity on the characteristics and metabolic consequences of alcohol consumption: A cross-sectional population-based study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022 Nov 15;19(22):15048.
20. Pahlavani HA. Exercise-induced signaling pathways to counteracting cardiac apoptotic processes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022 Aug 11;10:950927.
21. Kim SH, Ko IG, Jin JJ, Hwang L, Yoon HS, Baek SS. Treadmill exercise ameliorates ethanol with lipopolysaccharide and carbon tetrachloride-mediated liver injury in mice. *Journal of exercise rehabilitation*. 2022 Feb 24;18(1):28.
22. Ruan L, Li F, Li S, Zhang M, Wang F, Lv X, Liu Q. Effect of Different Exercise Intensities on Hepatocyte Apoptosis in HFD-Induced NAFLD in Rats: The Possible Role of Endoplasmic Reticulum Stress through the Regulation of the IRE1/JNK and eIF2 α /CHOP Signal Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021(1):6378568.
23. Engelsman EL. The World Health Organization Global Recommendations on Physical Activity for Health and the Opportunities for the Sports World. Promoting Sport for All Benefits and Strategies for the 21st Century. 2010;93.
24. Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, Nandi SK. Role of animal models in biomedical research: a review. *Laboratory Animal Research*. 2022 Jul 1;38(1):18.
25. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, Tuma F. Physiology, Liver. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
26. Özkan A, Stolley D, Cressman ENK, McMillin M, DeMorrow S, Yankeelov TE, dkk. The influence of chronic liver diseases on hepatic vasculature: A liver-on-a-chip review. *Micromachines (Basel)*. 2020 May 1;11(5).

27. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017;27(21):R1147-R1151. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019
28. Hall JE, Hall ME. Chapter 41: Transport of oxygen and carbon dioxide in blood and tissue fluids. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 14th ed. Philadelphia, PA: Elsevier. 2021:521-30.
29. Sherwood L. *Sherwood Introduction to Human Physiology*. ECG. 2015.
30. Valeria Casotti and Lorenzo D'Antiga. Basic Principles of Liver Physiology. In: *Pediatric Hepatology and Liver Transplantation*. Switzerland: Springer; 2019. p. 21–39.
31. Rajendram R, Hunter RJ, Preedy VR. Alcohol: Absorption, metabolism, and physiological effects. *Encyclopedia of Human Nutrition: Volume 1-4, Fourth Edition*. 2023 Jan 1;1–4:250–65.
32. Teschke R. Alcoholic liver disease: alcohol metabolism, cascade of molecular mechanisms, cellular targets, and clinical aspects. *Biomedicines*. 2018 Nov 12;6(4):106.
33. Hyun J, Han J, Lee C, Yoon M, Jung Y. Pathophysiological aspects of alcohol metabolism in the liver. *International journal of molecular sciences*. 2021 May 27;22(11):5717.
34. Leung T, Rajendran R, Singh S, Garva R, Krstic-Demonacos M, Demonacos C. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) regulates the response to oxidative stress and migration of breast cancer cells. *Breast Cancer Research*. 2013 Dec;15:1-2.
35. Ghazali R, Patel VB. Alcohol metabolism: general aspects. In: Preedy VR, editor. *Molecular Aspects of Alcohol and Nutrition*. Amsterdam: Elsevier; 2016. p. 17-21.
36. Ha Y, Jeong I, Kim TH. Alcohol-related liver disease: an overview on pathophysiology, diagnosis and therapeutic perspectives. *Biomedicines*. 2022 Oct 10;10(10):2530.
37. Kubiak-Tomaszewska G, Tomaszewski P, Pachecka J, Struga M, Olejarz W, Mielczarek-Putka M, Nowicka G. Molecular mechanisms of ethanol biotransformation: enzymes of oxidative and nonoxidative metabolic pathways in human. *Xenobiotica*. 2020 Oct 2;50(10):1180-201.
38. Fuster D, Samet JH. Alcohol use in patients with chronic liver disease. *New England Journal of Medicine*. 2018 Sep 27;379(13):1251-61.
39. Seitz HK, Bataller R, Cortez-Pinto H, Gao B, Gual A, Lackner C, Mathurin P, Mueller S, Szabo G, Tsukamoto H. Alcoholic liver disease. *Nature reviews Disease primers*. 2018 Aug 16;4(1):16.
40. Miyata T, Nagy LE. Programmed cell death in alcohol-associated liver disease. *Clinical and molecular hepatology*. 2020 Sep 21;26(4):618.
41. Kim HH, Shim YR, Choi SE, Kim MH, Lee G, You HJ, Choi WM, Yang K, Ryu T, Kim K, Kim MJ. Catecholamine induces Kupffer cell apoptosis via growth differentiation factor 15 in alcohol-associated liver disease. *Experimental & Molecular Medicine*. 2023 Jan;55(1):158-70.
42. Boyadjieva, N. and Bocheva, G., 2011. Effect of chronic alcohol consumption on apoptosis of lymphocytes: role of caspase-3 and Fas ligands. *Acta Medica Bulgarica*, 38(2), pp.22-29.

43. Hao F, Hao F, Cubero FJ, Cubero FJ, Ramadori P, Liao L, dkk. Inhibition of Caspase-8 does not protect from alcohol-induced liver apoptosis but alleviates alcoholic hepatic steatosis in mice. *Cell Death Dis.* 2017 Oct; 8(10): e3152.
44. Lim JR, Lee HJ, Jung YH, Kim JS, Chae CW, Kim SY, Han HJ. Ethanol-activated CaMKII signaling induces neuronal apoptosis through Drp1-mediated excessive mitochondrial fission and JNK1-dependent NLRP3 inflammasome activation. *Cell Communication and Signaling.* 2020 Dec;18:1-9.
45. Ma J, Cao H, Rodrigues RM, Xu M, Ren T, He Y, Hwang S, Feng D, Ren R, Yang P, Liangpunsakul S. Chronic-plus-binge alcohol intake induces production of proinflammatory mtDNA-enriched extracellular vesicles and steatohepatitis via ASK1/p38MAPK α -dependent mechanisms. *JCI insight.* 2020 Jul 23;5(14):e136496.
46. Ali N, Ferrao K, Mehta KJ. Liver iron loading in alcohol-associated liver disease. *The American journal of pathology.* 2023 Oct 1;193(10):1427-39.
47. Muriel P, Ramos-Tovar E, Montes-Páez G, Buendía-Montaño LD. Experimental Models of Liver Damage Mediated by Oxidative Stress. *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants.* 2017 Jan 1;529-46.
48. Bertola A, Mathews S, Ki SH, Wang H, Gao B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nature protocols.* 2013 Mar;8(3):627-37.
49. Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, Vakili O, Taheri-Anganeh M, Tahamtan M, Savardashtaki A. Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 2022 Aug;69(4):1633-45.
50. Jang MH, Shin MC, Shin HS, Kim KH, Park HJ, Kim EH, Kim CJ. Alcohol induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells via bax-dependent caspase-3 activation. *European journal of pharmacology.* 2002 Aug 2;449(1-2):39-45.
51. Eskandari E, Eaves CJ. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *Journal of Cell Biology.* 2022 May 12;221(6):e202201159.
52. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999 Jan 28;6(2):99-104.
53. Das SK, Mukherjee S, Vasudevan DM. Effects of long term ethanol consumption on cell death in liver. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 2011 Jan;26(1):84-7.
54. Deaciuc IV, Fortunato F, D'Souza NB, Hill DB, Schmidt J, Lee EY, McClain CJ. Modulation of caspase-3 activity and Fas ligand mRNA expression in rat liver cells in vivo by alcohol and lipopolysaccharide. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 1999 Feb;23(2):349-56.
55. Castilla R, Gonzalez R, Fouad D, Fraga E, Muntane J. Dual effect of ethanol on cell death in primary culture of human and rat hepatocytes. *Alcohol and alcoholism.* 2004 Jul 1;39(4):290-6.
56. Thiele TE, Navarro M. "Drinking in the dark"(DID) procedures: a model of binge-like ethanol drinking in non-dependent mice. *Alcohol.* 2014 May 1;48(3):235-41.

57. Schiavoni VS, Silva JP, Lizarte Neto FS, Assis ML, Tazima MD, Carvalho CA, Tirapelli DP, Carlotti Jr CG, Colli BO, Tirapelli LF. Morphological and immunohistochemical analysis of proteins CASPASE 3 and XIAP in rats subjected to cerebral ischemia and chronic alcoholism. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2018;33:652-63.
58. Kong LZ, Chandimali N, Han YH, Lee DH, Kim JS, Kim SU, Kim TD, Jeong DK, Sun HN, Lee DS, Kwon T. Pathogenesis, early diagnosis, and therapeutic management of alcoholic liver disease. *International journal of molecular sciences*. 2019 Jun 2;20(11):2712.
59. Taormina G, Mirisola MG. Calorie restriction in mammals and simple model organisms. *BioMed research international*. 2014;2014(1):308690.
60. Lucas AM, Palacio PB, Cunha PL, Facundo HT. Effects of calorie restriction on reactive oxygen species production by mitochondrial reverse electron transport, mitochondrial permeability transition pore, and beta-adrenergic stimulation during cardiac hypertrophy. *bioRxiv*. 2022 Feb 2:2022-02.
61. White MJ, Beaver CM, Goodier MR, Bottomley C, Nielsen CM, Wolf AS, Boldrin L, Whitmore C, Morgan J, Pearce DJ, Riley EM. Calorie restriction attenuates terminal differentiation of immune cells. *Frontiers in immunology*. 2017 Jan 12;7:667.
62. Granado M, Amor S, Martín-Carro B, Guerra-Menéndez L, Tejera-Muñoz A, González-Hedström D, Rubio C, Carrascosa JM, García-Villalón ÁL. Caloric restriction attenuates aging-induced cardiac insulin resistance in male Wistar rats through activation of PI3K/Akt pathway. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2019 Jan 1;29(1):97-105.
63. Bales CW, Kraus WE. Caloric restriction: implications for human cardiometabolic health. *Journal of cardiopulmonary rehabilitation and prevention*. 2013 Jul 1;33(4):201-8.
64. Guo Z, Wang M, Ying X, Yuan J, Wang C, Zhang W, Tian S, Yan X. Caloric restriction increases the resistance of aged heart to myocardial ischemia/reperfusion injury via modulating AMPK–SIRT1–PGC1 α energy metabolism pathway. *Scientific Reports*. 2023 Feb 4;13(1):2045.
65. Mohammadi M, Ghaznavi R, Keyhanmanesh R, Sadeghipour HR, Naderi R, Mohammadi H. Caloric restriction prevents lead-induced oxidative stress and inflammation in rat liver. *The Scientific World Journal*. 2014;2014(1):821524.
66. Sanz A, Caro P, Barja G. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2004 Dec;36:545-52.
67. Hanjani NA, Vafa MR. Hints for therapeutic interventions through exploring the effects of calorie restriction on NAFLD by mechanistic approach. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research*. 2018 Aug 21;7(4):2649-57.
68. Gehrke N, Schattenberg JM. Metabolic inflammation—a role for hepatic inflammatory pathways as drivers of comorbidities in nonalcoholic fatty liver disease?. *Gastroenterology*. 2020 May 1;158(7):1929-47.
69. Fan Y, Qian H, Zhang M, Tao C, Li Z, Yan W, Huang Y, Zhang Y, Xu Q, Wang X, Wade PA. Caloric restriction remodels the hepatic chromatin landscape and

- bile acid metabolism by modulating the gut microbiota. *Genome Biology*. 2023 Apr 30;24(1):98.
70. Makwana K, Patel SA, Velingkaar N, Ebron JS, Shukla GC, Kondratov RV. Aging and calorie restriction regulate the expression of miR-125a-5p and its target genes Stat3, Casp2 and Stard13. *Aging (Albany NY)*. 2017 Jul 31;9(7):1825.
 71. Sabet N, Soltani Z, Khaksari M, Iranpour M, Afshar RM, Mehdiabadi FM, Raji-Amirhasani A. The effect of two types of diet on apoptosis indexes, lipid profile and histopathological outcome in acute kidney injury during exercise. *BMC nephrology*. 2022 Sep 19;23(1):315.
 72. Roychowdhury S, Chiang DJ, Mandal P, McMullen MR, Liu X, Cohen JI, Pollard J, Feldstein AE, Nagy LE. Inhibition of Apoptosis Protects Mice from Ethanol-Mediated Acceleration of Early Markers of CC 14-Induced Fibrosis but not Steatosis or Inflammation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2012 Jul;36(7):1139-47.
 73. Lambert JC, Zhou Z, Kang YJ. Suppression of Fas-mediated signaling pathway is involved in zinc inhibition of ethanol-induced liver apoptosis. *Experimental biology and medicine*. 2003 Apr;228(4):406-12.
 74. Dirks AJ, Leeuwenburgh C. Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004 Jan 1;36(1):27-39.
 75. Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxidants & redox signaling*. 2006 Jan 1;8(1-2):152-62.
 76. Marzetti E, Carter CS, Wohlgemuth SE, Lees HA, Giovannini S, Anderson B, Quinn LS, Leeuwenburgh C. Changes in IL-15 expression and death-receptor apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle with aging and life-long calorie restriction. *Mechanisms of ageing and development*. 2009 Apr 1;130(4):272-80.
 77. Wennman H, Borodulin K. Associations between physical activity types and reaching the physical activity guidelines: the FinHealth 2017 study. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2021 Feb;31(2):418-26.
 78. Spaulding HR, Yan Z. AMPK and the adaptation to exercise. *Annual review of physiology*. 2022 Feb 10;84(1):209-27.
 79. Stine JG, Xu D, Schmitz K, Sciamanna C, Kimball SR. Exercise attenuates ribosomal protein six phosphorylation in fatty liver disease. *Digestive diseases and sciences*. 2020 Nov;65:3238-43.
 80. Takahashi H, Kotani K, Tanaka K, Eguchi Y, Anzai K. Therapeutic approaches to nonalcoholic fatty liver disease: exercise intervention and related mechanisms. *Frontiers in endocrinology*. 2018 Oct 15;9:588.
 81. Hoene M, Kappler L, Kollipara L, Hu C, Irmeler M, Bleher D, Hoffmann C, Beckers J, de Angelis MH, Häring HU, Birkenfeld AL. Exercise prevents fatty liver by modifying the compensatory response of mitochondrial metabolism to excess substrate availability. *Molecular metabolism*. 2021 Dec 1;54:101359.

82. Hu Z, Zhang H, Wang Y, Li B, Liu K, Ran J, Li L. Exercise activates Sirt1-mediated Drp1 acetylation and inhibits hepatocyte apoptosis to improve nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids in Health and Disease*. 2023 Mar 7;22(1):33.
83. Fealy CE, Haus JM, Solomon TP, Pagadala M, Flask CA, McCullough AJ, Kirwan JP. Short-term exercise reduces markers of hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Applied Physiology*. 2012 Jul 1;113(1):1-6.
84. Huber Y, Gehrke N, Biedenbach J, Helmig S, Simon P, Straub BK, Bergheim I, Huber T, Schuppan D, Galle PR, Wörns MA. Voluntary distance running prevents TNF-mediated liver injury in mice through alterations of the intrahepatic immune milieu. *Cell death & disease*. 2017 Jun;8(6):e2893-.
85. Kurniawan SN, Raisa N. Penggunaan Hewan Coba pada Penelitian di Bidang Neurologi. Universitas Brawijaya Press; 2018 Nov 30.
86. Robinson NB, Krieger K, Khan FM, Huffman W, Chang M, Naik A, Yongle R, Hameed I, Krieger K, Girardi LN, Gaudino M. The current state of animal models in research: A review. *International Journal of Surgery*. 2019 Dec 1;72:9-13.
87. Phillips NL, Roth TL. Animal models and their contribution to our understanding of the relationship between environments, epigenetic modifications, and behavior. *Genes*. 2019 Jan 15;10(1):47.
88. Fitria L, Lukitowati F, Kristiawati D. Nilai rujukan untuk evaluasi fungsi hati dan ginjal pada tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar. *Jurnal Pendidikan Matematika dan IPA*. 2019 Aug;10(2):243-58.
89. Hogan MC, Norton JN, Reynolds RP. Environmental factors: macroenvironment versus microenvironment. *Management of animal care and use programs in research, education, and testing*. 2017 Sep 7:461-77.
90. Rejeki, P.S., Putri, E.A.C. and Prasetya, R.E., 2019. Ovariektomi pada tikus dan mencit.
91. Otto GM, Franklin CL, Clifford CB. Biology and diseases of rats. In *Laboratory animal medicine* 2015 Jan 1 (pp. 151-207). Academic Press.
92. Ridwan E. Etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan. *J Indon Med Assoc*. 2013;63(3):112–6.
93. Mutiarahmi CN, Hartady T, Lesmana R. Kajian Pustaka: Penggunaan Mencit sebagai hewan coba di laboratorium yang mengacu pada prinsip kesejahteraan hewan. *Jurnal Indonesia Medicus Veterinus*. 2021;10(1):134-45.
94. Shomer NH, Allen-Worthington KH, Hickman DL, Jonnalagadda M, Newsome JT, Slate AR, Valentine H, Williams AM, Wilkinson M. Review of rodent euthanasia methods. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2020 May 1;59(3):242-53.
95. Wang S, Pacher P, De Lisle RC, Huang H, Ding WX. A mechanistic review of cell death in alcohol-induced liver injury. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2016 Jun;40(6):1215-23.
96. Kasiyati, Tana S. Penanganan Hewan Coba. Semarang: Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro; 2020. p. 81-87.

97. Qin J, Zhou J, Dai X, Zhou H, Pan X, Wang X, Zhang F, Rao J, Lu L. Short-term starvation attenuates liver ischemia-reperfusion injury (IRI) by Sirt1-autophagy signaling in mice. *American journal of translational research*. 2016 Aug 15;8(8):3364.
98. Ulas M, Akbas E, Akbas S, Aktemur G, Durcanoglu N, Aksak K, Atalar AA, Yildirim S, Akalin I. Physiological aspect of apoptosis-regulating microRNAs expressions during fasting. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2023 Mar 15;27(6).
99. Grasl-Kraupp B, Bursch W, Ruttkay-Nedecky B, Wagner A, Lauer B, Schulte Hermann R. Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994 Oct 11;91(21):9995-9.
100. Wohlgemuth SE, Julian D, Akin DE, Fried J, Toscano K, Leeuwenburgh C, Dunn, Jr WA. Autophagy in the heart and liver during normal aging and calorie restriction. *Rejuvenation research*. 2007 Sep 1;10(3):281-92.
101. Karagöz MF, Celep AG. The effect of caloric restriction on genetical pathways. *Food Science and Human Wellness*. 2023 Sep 1;12(5):1450-7.
102. López-Domínguez JA, Khraiweh H, González-Reyes JA, López-Lluch G, Navas P, Ramsey JJ, de Cabo R, Burón MI, Villalba JM. Dietary fat and aging modulate apoptotic signaling in liver of calorie-restricted mice. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2015 Apr 1;70(4):399-409.
103. Ascensao A, Goncalves IO, Lumini-Oliveira J, Marques-Aleixo I, Dos Passos E, Rocha-Rodrigues S, Machado NG, Moreira AC, Oliveira PJ, Torrella JR, Magalhaes J. Endurance training and chronic intermittent hypoxia modulate in vitro salicylate-induced hepatic mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion*. 2012 Nov 1;12(6):607-16.
104. Hoene M, Irmeler M, Beckers J, Hrabě de Angelis M, Häring HU, Weigert C. A vitamin E-enriched antioxidant diet interferes with the acute adaptation of the liver to physical exercise in mice. *Nutrients*. 2018 Apr 28;10(5):547.
105. Hoene M, Weigert C. The stress response of the liver to physical exercise. *Exercise immunology review*. 2010 Jan 1;16.
106. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*. 2008 Oct;88(4):1243-76.
107. Pillon Barcelos R, Freire Royes LF, Gonzalez-Gallego J, Bresciani G. Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise. *Free radical research*. 2017 Feb 1;51(2):222-36.
108. Shephard RJ, Johnson N. Effects of physical activity upon the liver. *European journal of applied physiology*. 2015 Jan;115:1-46.
109. Trefts E, Williams AS, Wasserman DH. Exercise and the regulation of hepatic metabolism. *Progress in molecular biology and translational science*. 2015 Jan 1;135:203-25.
110. Zhang Y, Cao C, Li C, Witt RG, Huang H, Tsung A, Zhang H. Physical exercise in liver diseases. *Hepatology*. 2024 Jun 5:10-97.

111. Georgakouli K, Manthou E, Fatouros IG, Deli CK, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Kouretas D, Koutedakis Y, Theodorakis Y, Jamurtas AZ. Effects of acute exercise on liver function and blood redox status in heavy drinkers. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015 Dec 1;10(6).
112. Irfannuddin M. Pengaruh olahraga aerobik halang rintang terhadap fungsi kognitif ditinjau dari homeostasis oksidatif, angiogenesis, dan neuroplastisitas otak mencit dewasa [disertasi]. Jakarta: Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia; 2015.
113. Hofman FM, Taylor CR. Immunohistochemistry. *Current protocols in immunology*. 2013 Nov;103(1):21-4.
114. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue—a review. *Diagnostic pathology*. 2014 Dec;9:1-2.
115. Persad R, Liu C, Wu TT, Houlihan PS, Hamilton SR, Diehl AM, Rashid A. Overexpression of caspase-3 in hepatocellular carcinomas. *Modern pathology*. 2004 Jul;17(7):861-7.
116. Liu X, He Y, Li F, Huang Q, Kato TA, Hall RP, Li CY. Caspase-3 promotes genetic instability and carcinogenesis. *Molecular cell*. 2015 Apr 16;58(2):284-96.
117. Ma J, Cheng Y, Su Q, Ai W, Gong L, Wang Y, Li L, Ma Z, Pan Q, Qiao Z, Chen K. Effects of intermittent fasting on liver physiology and metabolism in mice. *Experimental and therapeutic medicine*. 2021 Sep 1;22(3):1-0.
118. Cantó C, Auwerx J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2009 Sep 1;20(7):325-31.
119. Zakhari S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol research: current reviews*. 2013;35(1):6.