

ISBN : 978-623-91085-6-4

Buku Monograf
MANFAAT EKSTRAK DAUN KARET MALAYSIA
(*Ficus elastica*) TERHADAP SEL Ea.hy926

Dr. Chrismis Novalinda, M.Kes., AIFO-K



Editor :
Dr. I Nyoman Ehrich Lister, dr., M.Kes., AIFM., AIFO-K



Penerbit :
UNPRI PRESS

MANFAAT EKSTRAK DAUN KARET MALAYSIA (*Ficus elastica*) TERHADAP SEL Ea.hy926

BIOGRAFIS PENULIS



Dr. Chrismis Novalinda Ginting, M.Kes., AIFO, sebagai dosen tetap (Lektor Kepala), di Fakultas Keperawatan dan Kebidanan Universitas Prima Indonesia di Medan. Lahir di Tigapanah (Kab. Karo), 15 Desember 1978. Mendapatkan gelar Doktor di Universitas Andalas Padang pada tahun 2017, Lulus Magister Kesehatan bidang ilmu Kesehatan Reproduksi di Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada tahun 2004.

Pada saat ini menjabat sebagai Rektor Universitas Prima Indonesia sejak tahun 2017. Mendapat sertifikat AIFO (Ahli Ilmu Faal Olahraga), pada tahun 2012. Sebagai Assisor Beban Kerja Dosen (BKD) di LLDIKTI wilayah I sejak tahun 2016.

Aktif di organisasi APTISI (Assosiasi Perguruan Tinggi Swasta Indonesia), wilayah Indonesia sejak tahun 2016, sebagai Sekretaris HPTKes (Himpunan Perguruan Tinggi Kesehatan), wilayah I sejak tahun 2016. Mengampu mata kuliah Keluarga Berencana dan Kesehatan Reproduksi di program studi DIII Kebidanan dan S1 Kesehatan Masyarakat, Metodologi Penelitian di Program Studi S2 Kesehatan Masyarakat.



Penerbit :
UNPRI PRESS



**MANFAAT EKSTRAK DAUN KARET
DAN QUERCITRIN TERHADAP
SEL Ea.hy926**

Penulis

Dr. Chrismis Novalinda, M.Kes., AIFO-K

Editor

Dr. I Nyoman Ehrich Lister, dr., M.Kes., AIFM., AIFO-K

ISBN

ISBN : 978-623-91085-6-4

Desain Cover

Johannes Bastira Ginting, M.K.M

Penerbit

Unpri Press

Universitas Prima Indonesia

Redaksi

Jl. Belanga No 1. Simp. Ayahanda, Medan

Cetakan Pertama

Hak Cipta di lindungi Undang-undang

**Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan cara apapun
tanpa ijin dari penerbit**

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala karunia dan rahmat yang telah diberikan, sehingga penulisan buku monograf ini dapat diselesaikan.

Buku monograf ini dengan judul Manfaat Ekstrak Daun Karet Dan Quercitrin Terhadap SEL Ea.hy926, berisi tentang pengaruh ekstrak daun karet Malaysia Terhadap SEL Ea.hy926.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan monograf ini, oleh karenanya kritik, saran dan masukan untuk penyempurnaan buku sangat penulis harapkan.

Penulis mengucapkan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada semua yang memberi dukungan, motivasi, dorongan dan semangat untuk dapat terbitnya monograf ini semoga Tuhan YME membalas dengan balasan yang lebih baik.

Penulis

Dr. Chrismis Novalinda, M.Kes., AIFO-K

DAFTAR ISI

	Halaman
Kata Pengantar	ii
Daftar Isi	iii
Daftar Gambar	vi
Pendahuluan	1
A. Uji Sitotoksik Sel Ea.hy926 yang diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitrin	4
I. Kultur Sel	6
1.1 Prinsip	6
1.2 Bahan dan Consumable	6
1.3 Alat dan Consumable.....	7
1.4 Prosedur	7
II. Uji Sitotoksik	8
2.1 Prinsip	8
2.2. Bahan	9
2.3 Alat dan Consumable	9
2.4 Konsentrasi Uji	10
2.5 Cara Kerja	10
2.6 Hasil Uji	10
2.7 Kesimpulan	11
B. Uji Kadar Antioksidan Sel Ea.hy926 yang diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitrin	12
I. Kultur Sel	12
1.1 Prinsip	12
1.2 Bahan dan Consumable	13
1.3 Alat dan Consumable.....	13
1.4 Prosedur	14
II. Induksi apap, ekstrak, dan senyawa	15
2.1 Prinsip	15
2.2. Bahan dan Consumable.....	15
2.3 Alat dan Consumable	16
2.4 Prosedur	16
III. Uji TNF- α	
3.1 Prinsip	17
3.2. Bahan dan Consumable.....	17

3.3	Alat dan Consumable	18
3.4	Konsentrasi Uji	18
3.5	Cara Kerja	18
3.6	Hasil Uji	19
IV.	UJI IL-10	20
4.1	Prinsip	20
4.2.	Bahan dan Consumable.....	21
4.3	Alat dan Consumable	21
4.4	Konsentrasi Uji	21
4.5	Cara Kerja	21
4.6	Hasil Uji	22
4.7	Kesimpulan	23

C. Uji Kadar Antioksidan Sel Ea.hy926 yang diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitrin 12

I.	Kultur Sel	24
1.1	Prinsip	24
1.2	Bahan dan Consumable	25
1.3	Alat dan Consumable.....	25
1.4	Prosedur	25
II.	Induksi Apap, Ekstrak, Dan Senyawa	27
2.1	Prinsip	27
2.2.	Bahan dan Consumable.....	27
2.3	Alat dan Consumable	27
2.4	Prosedur	27
III.	Isolasi RNA Dan Sintesa cDNA.....	28
3.1	Bahan	28
3.2.	Alat.....	28
3.3	Prosedur Isolasi RNA.....	29
3.4	Sintesa cDNA	29
IV.	qPCR CYP2E1, GPx, CYP1B1	20
4.1	Prinsip	30
4.2.	Bahan dan Consumable.....	31
4.3	Alat dan Consumable	32
4.4	Preparasi Reagen	32
4.6	Prosedur Kuantitatif Ekpresi Gen	32
4.6	Hasil Uji	34

4.7 Hasil Analisis	35
4.8 Kesimpulan	37
D. Uji Ekspresi gen EDN-1, THBS-1, FGF-2, VEGF-A, PIGF pada sel Ea.hy926 diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitri	
I. Kultur Sel	38
1.1 Prinsip	38
1.2 Bahan dan Consumable	38
1.3 Alat dan Consumable.....	25
1.4 Prosedur	25
II. Induksi Apap, Ekstrak, Dan Senyawa	27
2.1 Prinsip	27
2.2. Bahan dan Consumable.....	27
2.3 Alat dan Consumable	27
2.4 Prosedur	27
III. Isolasi RNA Dan Sintesa cDNA.....	28
3.1 Bahan	28
3.2. Alat.....	28
3.3 Prosedur Isolasi RNA.....	29
3.4 Sintesa cDNA	29
IV. qPCR CYP2E1, GPx, CYP1B1	20
4.1 Prinsip	30
4.2. Bahan dan Consumable.....	31
4.3 Alat dan Consumable	32
4.4 Preparasi Reagen	32
4.7 Prosedur Kuantitatif Ekpresi Gen	32
4.6 Hasil Uji	34
4.7 Hasil Analisis	35
4.8 Kesimpulan	37
E. Uji Antiinflamasi pada sel Ea.hy926 diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitri	50
I. Kultur Sel	50
1.1 Prinsip	50
1.2 Bahan dan Consumable	50
1.3 Alat dan Consumable.....	51
1.4 Prosedur	51

	1.5 Hasil Kultur Sel	52
II.	Uji Apoptosis.....	52
	2.1 Prinsip	52
	2.2. Bahan dan Consumable.....	53
	2.3 Alat dan Consumable	54
	2.4 Prosedur	54
	2.5 Hasil Uji	56
	2.6 Kesimpulan	57
F.	Uji Kadar <i>Reaktif Oxygen Spesies</i> (ROS) sel <i>Ea.hy926</i> diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitri	57
I.	Kultur Sel	57
	1.1 Prinsip	57
	1.2 Bahan dan Consumable	57
	1.3 Alat dan Consumable.....	58
	1.4 Prosedur	59
II.	Induksi Apap, Ekstrak, Dan Senyawa	60
	2.1 Prinsip	60
	2.2. Bahan dan Consumable.....	60
	2.3 Alat dan Consumable	60
	2.4 Prosedur	61
III.	Uji Total Protein (Braford).....	61
	3.1 Prinsip	61
	3.2. Bahan.....	62
	3.3 Alat dan Cosumable.....	62
	3.4 Konsentrasi Uji	62
	3.5 Sintesa cDNA	62
	3.6 Hasil Uji	64
IV.	Uji AST	65
	4.1 Prinsip	65
	4.2. Bahan	65
	4.3 Alat dan Consumable	66
	4.4 Preparasi Reagen	66
	4.5 Hasil Uji	67
V.	Uji ALT	68
	5.1 Prinsip	68
	5.2. Bahan	68
	5.3 Alat dan Consumable	69
	5.4 Preparasi Reagen	69

	4.5 Hasil Uji	70
VI.	Uji LDH	74
	6.1 Prinsip	77
	6.2. Bahan	80
	6.3 Alat dan Consumable	83
	6.4 Preparasi Reagen	86
	6.5 Hasil Uji	90
	6.6 Kesimpulan	94

DAFTAR PUSTAKA.....	vii
----------------------------	------------

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Morfologi Sel Ea.hyy926.....	8
Gambar 2 Viabilitas sel Ea.hyy926 setelah diinduksi Ekstrak Daun Karet dan Quercitrin.....	11
Gambar 3 Morfologi Sel Ea.hyy926.....	15
Gambar 4 Kurva Standart BSA.....	20
Gambar 5 Aktivitas MDA Sel Ea.hy926 yang diberi perlakuan dengan ekstrak daun karet dan Quercitrin.	23
Gambar 6. Aktivitas SOD Sel Ea.hy926 yang diberi perlakuan dengan ekstrak daun karet dan Quercitrin.....	26
Gambar 7. Morfologi Sel Ea.hyy926 pada perbesaran 400x.....	40
Gambar 8. Konsentrasi protein FGF-2 pada sel Ea.hy926 setelah diinduksi ekstrak daun karet dan Quercitrin.....	56
Gambar 9. Konsentrasi protein IL-10 pada sel Ea.hy926 setelah diinduksi ekstrak daun karet dan Quercitrin.....	67
Gambar 10. Konsentrasi TNF-a pada sel Ea.hy926 setelah diinduksi ekstrak daun karet dan Quercitrin.....	74
Gambar 11. Perlakuan pada sel Ea.hy926 setelah diinduksi ekstrak daun karet dan Quercitrin.....	88

UJI SITOTOKSIK SEL EA.HY926
YANG DIINDUKSI HYPOXIA
DAN DITREATMENT EKSTRAK DAUN KARET
DAN QUERCITRIN

A. Uji Sitotoksik Sel Ea.hy926 yang diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitrin

I. Kultur Sel

1.1 Prinsip

Kultur sel mengacu pada tahap kultur setelah sel-sel diisolasi dari jaringan dan berkembang biak di bawah kondisi yang sesuai sampai mereka menempati semua substrat yang tersedia (confluent). Pada tahap ini, sel-sel harus disubkultur dengan memindahkannya ke flask baru dengan media pertumbuhan baru untuk menyediakan lebih banyak ruang untuk pertumbuhan yang berkelanjutan.

Subkultur, juga disebut sebagai passaging, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan perbanyakan lebih lanjut dari cell line. Pertumbuhan sel dalam kultur berlangsung dari fase lag setelah penanaman sel ke fase log, di mana sel berproliferasi secara eksponensial. Ketika sel-sel dalam kultur menempati semua substrat yang tersedia dan tidak memiliki ruang tersisa untuk ekspansi, atau ketika sel-sel dalam kultur suspensi melebihi kapasitas media untuk mendukung pertumbuhan lebih lanjut, proliferasi sel sangat berkurang atau berhenti sepenuhnya. Untuk menjaga kultur pada kerapatan optimal untuk pertumbuhan sel lanjutan dan untuk merangsang proliferasi lebih lanjut, kultur harus dipindahkan ke flask yang baru dengan medium baru.

1.2 Bahan dan Consumable

- Dulbecco's modified Eagle's medium/ DMEM High-glucose (Biowest, L0104-500)
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S1810-5000)
- 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM) (Biowest, L0010-100)
- PBS 1x (Biowest X0515-500)
- Nanomycopultine (Biowest, LX16-100)
- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Amphotericine B (Biowest, L0009-050)
- Sel Ea.hy926 (ATCC CRL-2922)

1.3 Alat dan Consumable

- Pippet Gun (Thermo Scientific 9521)

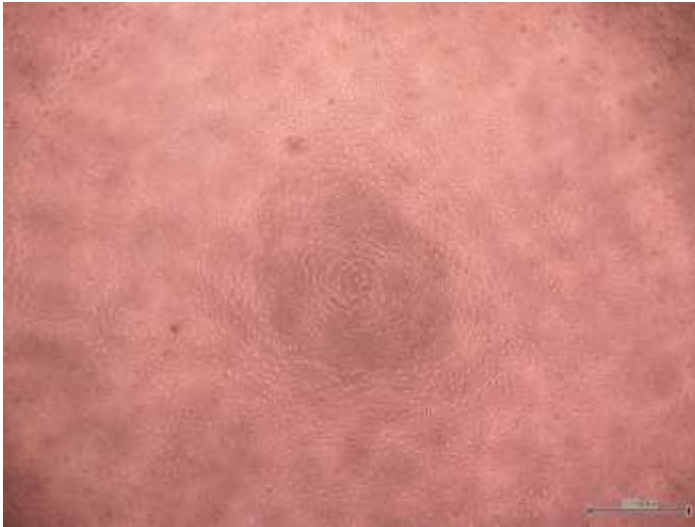
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO2 Incubator (Thermo IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)
- Ultrasonic cleaner (Digital Pro, JP-020S)
- Flask T25 (Corning 430168)
- Centrifuge Tube 15 ml (SPL 50015)
- Tube 50 ml (SPL 50015)
- Serological Pipette 5 ml (SPL 91005)
- Serological Pipette 10ml (SPL 91010)

1.4 Prosedur

Sel diambil dari tanki nitrogen cair (-196 oC), selanjutnya dicairkan di dalam Ultrasonic cleaner dengan suhu 37oC selama 2 menit hingga mencair. Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 ml yang berisi medium kultur 4 ml. Sel disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, kemudian pellet diresuspensi dengan 5 ml medium kultur. Suspensi sel dimasukkan pada flask T25. Sel diinkubasi dalam inkubator 5% CO2, bersuhu 37°C. Sel yang telah tumbuh pada flask 25 diamati di bawah mikroskop inverted hingga mencapai confluent sekitar 70-80%. Medium kultur dibuang kemudian ditambahkan medium kultur baru sebanyak 2 ml.

Sel yang menempel dilepaskan dengan bantuan scraper. Dilakukan pengecekan menggunakan mikroskop inverted guna memastikan sel sudah benar-benar terlepas dari dasar flask. Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 ml. Disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 1 ml medium kultur. Suspensi sel dibagi ke dalam 2 buah flask T25. Inkubasi sel dalam inkubator CO2 5%, suhu 37°C. Selama perawatan sel, medium pertumbuhan diganti atau ditambah setiap 2 – 3 hari sekali.

1.5 Hasil Kultur Sel



Gambar 1. Morfologi Sel Ea.hy926 yang diinduksi hypoxia.

II. Uji Sitotoksik

2.1 Prinsip

Uji MTS merupakan salah satu pengujian terhadap proliferasi melalui pengukuran viabilitas sel dengan melihat aktivitas metaboliknya. Prinsip pengujian MTS yaitu dengan pengukuran secara tidak langsung terhadap produk senyawa berwarna yang dihasilkan oleh sel viabel.

MTS merupakan komponen tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil) - 2 - (4 - sulfofenil) -2H - tetrazolium, bentuk garam, MTS], komponen tetrazolium MTS direduksi oleh sel membentuk produk formazan berwarna yang larut dalam medium kultur. Jumlah produk formazan diukur serapannya pada panjang gelombang 490 nm, dimana serapan yang dihasilkan ini setara dengan jumlah sel viabel

2.2. Bahan

- Dulbecco's modified Eagle's medium/ DMEM High-glucose (Biowest, L0104-500)
- MTS 3 - (4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 5 - (3 - carboxymethoxyphenyl) - 2 - (4 - sulfophenyl)-2 H -

tetrazolium) Cell Proliferation Assay Kit (Abcam, ab197010)

- DMSO 100% dan 10% (Merck, 1029521000)
- Sampel Ekstrak Daun Karet (0140718-C1017)
- Quercitrin (Chengdu, BP1192)

2.3 Alat dan Consumable

- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO2 Incubator (Thermo IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)
- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
- Hemacytometer (Neubauer)
- Syringe filter tissue culture 0,22 um (Sartorius, 17845)
- Syringe with needle 1 ml (Terumo, PS01T26)
- Microtube 1,5 ml (SPL, 62015)
- 96 well plate (Corning, 3596)
- Micropipette (Finnpipette F2)
- Tips Blue, yellow, white (Neptune)

2.4 Konsentrasi Uji

a. Ekstrak Daun Karet

- Working solution : 1000; 500; 250; 125; 62.5; 31,3 ($\mu\text{g/mL}$)
- Final concentration : 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.13 ($\mu\text{g/mL}$)

b. Quercitrin

- Working solution : 1000; 500; 250; 125; 62.5; 31,3 ($\mu\text{g/mL}$).
- Final concentration : 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.13 ($\mu\text{g/mL}$)

2.5 Cara Kerja

Sel dihitung dengan menggunakan haemocytometer. Sel ditanam dengan kepadatan 5×10^3 sel/well pada 96 well plate, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C ,

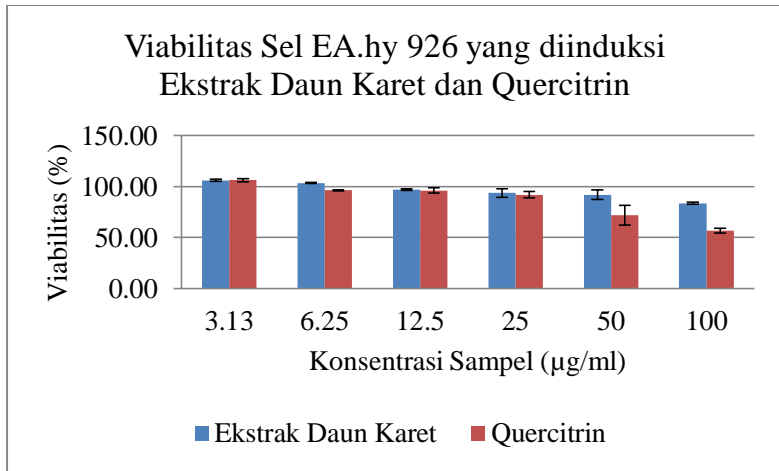
5% CO₂. Setelah inkubasi 24 jam, medium kultur diganti dengan medium kultur baru sebanyak 180 µl dan ditambahkan sampel (EDK dan Quercitrin) 20 µl pada setiap well, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂. Setelah perlakuan selama 24 jam, ditambahkan 20 µl MTS pada tiap well, diinkubasi selama 3jam pada suhu 37°C, 5% CO₂. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometri dibaca pada panjang gelombang 490 nm.

2.6 Hasil Uji

Tabel 2.1 Hasil uji sitotoksik ekstrak daun karet dan quercitrin pada sel Ea.hy926

Sampel	Rata-rata viabilitas sel (%)
Kontrol Negatif	100 ± 12.57
Ekstrak Daun Karet 3.13 µg/ml	106.03 ± 1.07 ^d
Ekstrak Daun Karet 6.25 µg/ml	103.62 ± 0.66 ^{cd}
Ekstrak Daun Karet 12.5 µg/ml	97.25 ± 0.73 ^b ^c
Ekstrak Daun Karet 25 µg/ml	93.70 ± 4.37 ^b
Ekstrak Daun Karet 50 µg/ml	91.95 ± 4.79 ^b
Ekstrak Daun Karet 100 µg/ml	83.56 ± 0.99 ^a
Quercitrin 3.13 µg/ml	106.29 ± 1.59 ^d
Quercitrin 6.25 µg/ml	96.40 ± 0.39 ^{cd}
Quercitrin 12.5 µg/ml	96.28 ± 2.46 ^{cd}
Quercitrin 25 µg/ml	92.03 ± 3.02 ^c
Quercitrin 50 µg/ml	71.91 ± 9.83 ^b
Quercitrin 100 µg/ml	56.82 ± 2.42 ^a

Data disajikan dalam rata-rata ± SD. Tanda superskrip yang berbeda (a,b,c,cd,d) menunjukkan perbedaan yang signifikan (p <0,05) Tukey HSD post hoc test.



Gambar 2.1 Viabilitas sel Ea.hy926 setelah diinduksi ekstrak daun karet dan quercitrin.

2.7 Kesimpulan

Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa ekstrak dan senyawa aman pada rentang konsentrasi 3.13-100 µg/mL. Rentang konsentrasi aman ditunjukkan dengan presentasi viabilitas sel yang lebih dari 80%.

**UJI KADAR ANTIOKSIDAN Sel
Ea.hy926 YANG DIINDUKSI HYPOXIA
DAN DITREATMENT EKSTRAK
DAUN KARET DAN QUERCITRIN.**

B. Uji Kadar Antioksidan Sel Ea.hy926 yang diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitrin.

I. Kultur Sel

1.1 Prinsip

Kultur sel mengacu pada tahap kultur setelah sel-sel diisolasi dari jaringan dan berkembang biak di bawah kondisi yang sesuai sampai mereka menempati semua substrat yang tersedia (confluent). Pada tahap ini, sel-sel harus disubkultur dengan memindahkannya ke flask baru dengan media pertumbuhan baru untuk menyediakan lebih banyak ruang untuk pertumbuhan yang berkelanjutan.

Subkultur, juga disebut sebagai passaging, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan perbanyakan lebih lanjut dari cell line. Pertumbuhan sel dalam kultur berlangsung dari fase lag setelah penanaman sel ke fase log, di mana sel berproliferasi secara eksponensial. Ketika sel-sel dalam kultur menempati semua substrat yang tersedia dan tidak memiliki ruang tersisa untuk ekspansi, atau ketika sel-sel dalam kultur suspensi melebihi kapasitas media untuk mendukung pertumbuhan lebih lanjut, proliferasi sel sangat berkurang atau berhenti sepenuhnya. Untuk menjaga kultur pada kerapatan optimal untuk pertumbuhan sel lanjutan dan untuk merangsang proliferasi lebih lanjut, kultur harus dipindahkan ke flask yang baru dengan medium baru.

1.2 Bahan dan Consumable

- Sel lini EA.hy926 (ATCC CRL-2922)
- Dulbecco's modified Eagle's medium/ DMEM High-glucose (Biowest, L0104-500)
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S1810-5000)
- 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM) (Biowest, L0010-100)
- PBS 1x (Biowest X0515-500)
- Nanomycopultine (Biowest, LX16-100)
- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Amphotericine B (Biowest, L0009-050)
- Sel Ea.hy926 (ATCC CRL-2922)

1.3 Alat dan Consumable

- Pippet Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO2 Incubator (Thermo IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)
- Ultrasonic cleaner (Digital Pro, JP-020S)
- Flask T25 (Corning 430168)
- Centrifuge Tube 15ml (SPL 50015)
- Tube 50 ml (SPL 50015)
- Serological Pippet 5ml (SPL 91005)
- Serological Pippet 10ml (SPL 91010)

1.4 Prosedur

Sel diambil dari tanki nitrogen cair (-196 oC), selanjutnya di-thowing di dalam ultrasonic cleaner dengan suhu 37 oC selama 2 menit hingga mencair. Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 ml yang berisi medium kultur 4 ml. Sel disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, kemudian pellet diresuspensi dengan 5 ml medium kultur. Suspensi sel dimasukkan pada flask T25. Sel diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂, bersuhu 37 °C. Sel yang telah tumbuh pada flask 25 diamati di bawah mikroskop inverted hingga mencapai confluent sekitar 70-80%. Medium kultur dibuang kemudian ditambahkan medium kultur baru sebanyak 2 ml. Sel yang menempel dilepaskan secara enzymatic menggunakan Trypsin 0.25%. Dilakukan pengecekan menggunakan mikroskop inverted guna memastikan sel sudah benar-benar terlepas dari dasar flask. Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 ml. Disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 1 ml medium kultur. Suspensi sel dibagi ke dalam 2 buah flask T25. Inkubasi sel dalam inkubator CO₂ 5%, suhu 37°C.

Selama perawatan sel, medium pertumbuhan diganti atau ditambah setiap 2 – 3 hari sekali.

1.5 Hasil Kultur Sel



Gambar 1. Morfologi Sel Ea.hy926 (Uji Kadar Antioksidan Sel Ea.hy926 yang diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitrin).

II. Induksi apap, ekstrak, dan senyawa

2.1 Prinsip

Sel yang sebelumnya telah dikultur kemudian diganti mediumnya dan dikultur dalam kondisi Hypoxia selama 24 jam sebagai model preeklamsia. Setelah dikultur dalam kondisi hypoxia sel diinduksi langsung dengan Ekstrak Daun Karet (EDK) dan Quercitrin. Induksi ini dilakukan untuk melihat pengaruh EDK terhadap sel Ea.hy926 model Preeklamsia.

2.2. Bahan dan Consumable

- Medium Kultur Sel Medium kultur sel Ea.hy926
- Sampel Ekstrak Daun Karet (0140718-C1017)
- Quercitrin (Chengdu, BP1192)

2.3 Alat dan Consumable

- Pippet Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO2 Incubator (Thermo IH3543) Kondisi Hypoxia
- Tube 50ml (SPL 50015)
- Serological Pippet 5ml (SPL 91005)
- Serological Pippet 10ml (SPL 91010)

2.4 Prosedur

Sel yang sudah mencapai konfluensi dibilas dengan PBS dan ditambahkan tripsin EDTA dan diinkubasi 37°C. Kemudian sel dihitung dengan hemositometer dan deseeding dalam 6 well plate. Sel dibagi kedalam 6 perlakuan sebagai berikut: 1) Control non-hypoxia; 2) Control hypoxia; 3) Control DMSO, 4) Hypoxia DMSO, 5) Hypoxia + EDK100, 6) Hypoxia + EDK25, 7) Hypoxia + Quer25, 8) Hypoxia + Quer6.25. Perlakuan control non hypoxia dan control DMSO diinkubasi dalam incubator 37°C, CO₂ 5% selama 2 hari.

Perlakuan hypoxia diinduksi diinkubasi dalam incubator 37°C, CO₂ 5% selama 2 hari dengan kadar O₂ 2%. Setelah diinduksi dengan hypoxia, sel diberi perlakuan dengan senyawa dan ekstrak sesuai perlakuan dan diinkubasi kembali dalam kondisi Hypoxia selama 24 jam. Setelah diinkubasi, CM dikoleksi dan sel diharvest menggunakan teknik tripsinasi.

III. UJI TNF- α

3.1 Prinsip

Uji Bradford adalah metode penentuan protein yang menggunakan prinsip pengikatan Coomassie Brilliant Blue (CMB) G-250 ke protein. Pewarna ada dalam tiga bentuk: kationik (merah), netral (hijau), dan anionik (biru). Dalam kondisi asam, pewarna didominasi dalam merah terprotonasi ganda dalam bentuk kationik (470 nm). Namun, ketika pewarna mengikat protein, maka akan berubah warna menjadi biru (595 nm). Larutan berwarna biru pada mikroplate inilah yang diukur menggunakan spektrofotometer atau mikroplate reader.

CMB G-250 mengikat residu asam amino (arginin) dan aromatik. Koefisien dye-albumin kompleks konstan dalam rentang konsentrasi 10 kali lipat. Dengan demikian, hukum Beer dapat diterapkan untuk mengukur kuantitas protein secara akurat menggunakan rasio volume pewarna untuk setiap konsentrasi sampel. Adanya beberapa deterjen, flavonoid, dan buffer protein dasar, menstabilkan spesies pewarna netral hijau dengan pengikatan langsung atau dengan merubah pH. Namun demikian, banyak reagen kimia yang tidak secara langsung mempengaruhi perubahan warna

ketika digunakan dalam protokol standar dan pereaksi. Karena setiap kombinasi reagen protein-kimia belum diuji, ada kemungkinan bahwa beberapa reagen yang terdaftar mengganggu dalam kombinasi dengan protein tertentu. Namun, protein seperti bovine serum albumin (BSA) dan bovine gamma-globulin, merupakan reagen yang sering digunakan karena tidak terdapat interferensi.

3.2. Bahan dan Consumable

- Protein Lysat Sel Ea.hy926
- BSA (bovine serum albumin) (Sigma, A9576)
- Aquabidest
- Quick Start Dye Reagent 1x (Biorad, 500-0205)
- Protease Inhibitor Cocktail (Bimake, B14011)
- Ripa Buffer pH 7.4 (Bioworld, 4202002)

3.3 Alat dan Consumable

- Micropipette (Finnpipette F2)
- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
- 96-well plate (Corning, 3596)
- Incubator (Esco)
- Tips Blue, yellow, white (Neptune)
- Microtube 1,5 ml (SPL, 62015)

3.4 Konsentrasi Uji

- Pembuatan seri larutan kerja (WS) reference standard BSA.
Konsentrasi: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 0 ($\mu\text{g/mL}$)
- BSA cair memiliki konsentrasi $300 \text{ mg/ml} = 300.000 \text{ } \mu\text{g/mL}$.
Ditambahkan $6,67 \text{ } \mu\text{l}$ BSA cair dan $993,33 \text{ } \mu\text{l}$ aquabidest ke dalam tube 1,5 ml. Campuran ini menghasilkan konsentrasi $2.000 \text{ } \mu\text{g/mL}$ (larutan stok).
 $100 \text{ } \mu\text{g/mL} : 50 \text{ } \mu\text{L}$ larutan stok + $950 \text{ } \mu\text{L}$ aquabidest (Larutan A)

50 µg/mL : 500 µL larutan A + 500 µL aquabidest (Larutan B)
 25 µg/mL : 500 µL larutan B + 500 µL aquabidest (Larutan C)
 12.5 µg/mL : 500 µL larutan C + 500 µL aquabidest (Larutan D)
 6.25 µg/mL : 500 µL larutan D + 500 µL aquabidest (Larutan E)
 3.125 µg/mL: 500 µL larutan E + 500 µL aquabidest
 0 µg/mL : 500 µL aquabidest.

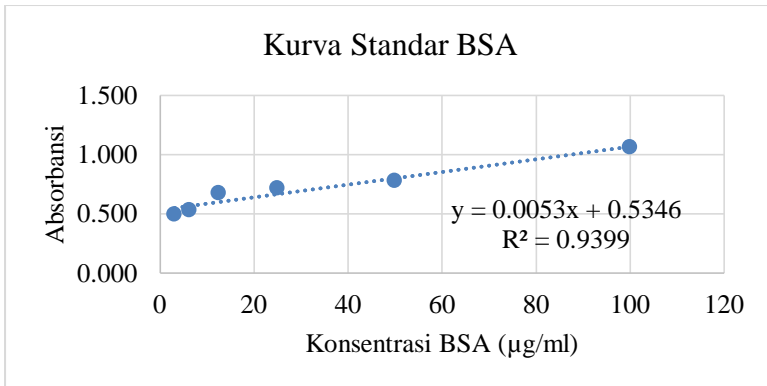
3.5 Cara Kerja

- Larutan standard dan sampel masing-masing dimasukkan ke dalam well sebanyak 20 µL.
- Ditambahkan Quick Start Dye Reagent 1x sebanyak 200 µL pada masing-masing well, di rekonstitusi hingga tercampur sempurna.
- Diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang.
- Perubahan warna menjadi warna biru menunjukkan adanya protein dalam standard atau sampel, absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm menggunakan spektrofotometer.

3.6 Hasil Uji

Tabel 3.1 Kurva standar BSA

Final Con. (µg/ml)	Absorbance			Average
	1	2	3	
100	1.011	0.998	1.172	1.060
50	0.778	0.768	0.783	0.776
25	0.747	0.806	0.589	0.714
12.5	0.511	1.074	0.437	0.674
6.25	0.420	0.560	0.614	0.531
3.125	0.318	0.323	0.849	0.497
0	0.297	0.332	1.213	0.614



Gambar 3.1 Kurva standar BSA

Tabel 3.2 Hasil uji Protein Total menggunakan metode Bradford

Sampel	Rata-rata ± SD
Control non-hypoxia	156.572 ± 7.16
Control hypoxia	154.987 ± 2.94
Control DMSO	154.981 ± 17.44
Hypoxia DMSO	150.830 ± 8.89
Hypoxia + EDK100	156.031 ± 16.89
Hypoxia + EDK25	146.327 ± 17.95
Hypoxia + Quer25	139.503 ± 10.38
Hypoxia + Quer6.25	147.440 ± 29.20

IV. UJI IL-10

4.1 Prinsip

MDA merupakan senyawa dialdehida produk akhir dari peroksidasi lipid. Salah satu biomarker terjadinya stres oksidatif adalah tingginya kadar malondialdehyde (MDA) dan menurunnya aktivitas SOD akibat proses peroksidasi lipid yang berlebihan di dalam sel.

Kit MDA digunakan untuk mengukur kadar MDA dalam sampel serum, plasma, jaringan, dan sel. Tubuh manusia menghasilkan ROS melalui sistem enzim dan sistem non-enzim, yang bisa menyerang asam lemak tak jenuh pada biofilm dan menyebabkan peroksidasi lipid dan membentuk lipid peroksida, seperti kelompok aldehida

(MDA), keto-, hidroksil, karbonil, dll. Radikal bebas oksigen menyebabkan kerusakan sel tidak hanya oleh peroksidasi asam lemak tak jenuh ganda dalam biofilm, tetapi juga oleh produk penguraian lipid hidroperoksida. Deteksi kadar MDA dapat mencerminkan tingkat peroksidasi lipid dalam sel berbanding lurus dengan tingkat kerusakan seluler secara tidak langsung. MDA dalam katabolit lipid peroksida dapat bereaksi dengan asam tiobarbiturat (TBA) dan menghasilkan warna merah senyawa, yang memiliki puncak penyerapan maksimum pada 532 nm.

4.2. Bahan dan Consumable

- CM dari sampel sel yang diinduksi hipoksia, ditambah EDK, Quercitrin
- Malondialdehyde (MDA) Assay Kit (Elabscience, E-BC-K142)
- Aquabidest

4.3 Alat dan Consumable

- Micropipette (Finnpipette F2)
- 96 well-plate (Costar, 3596)
- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
- Vortex mixer
- Water-Bath
- Centrifuge
- Incubator (Esco)
- Tips Blue, yellow, white (Neptune)
- Homogenizer

4.4 Konsentrasi Uji

- Sampel sel dimasukkan ke dalam tabung centrifuge, kemudian sentrifuge sampel dan buang supernatan.
- Tambahkan extract solution ke dalam pellet sel sesuai dengan rasio jumlah sel (10^4): Extract solution (mL) = 500 ~ 1000: 1 (disarankan untuk menambahkan 1 mL Larutan Ekstrak ke dalam 5×10^6 sel), kemudian tahan sampel dengan homogenizer pada es.

- Sentrifugasi pada 8000 g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Ambil supernatan dan simpan di es sebelum dideteksi.

4.5 Cara Kerja

Sampel sel dimasukkan ke dalam tabung centrifuge, kemudian sentrifuge sampel dan buang supernatan. Tambahkan extract solution ke dalam pellet sel sesuai dengan rasio jumlah sel (104): Extract solution (mL) = 500 ~ 1000: 1 (disarankan untuk menambahkan 1 mL Larutan Ekstrak ke dalam 5×10^6 sel), kemudian tahan sampel dengan sonikasi pada es (daya: 20% atau 200W, 3 detik/waktu, interval selama 10 detik, ulangi selama 30 kali). Sentrifugasi pada 8000 g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Ambil supernatan dan simpan di es sebelum dideteksi.

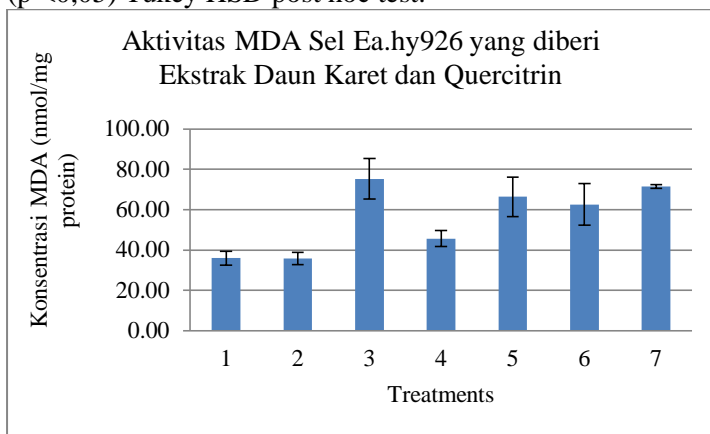
Tambahkan 0,3 mL Reagen 2 ke dalam tabung centrifuge 1,5 mL, lalu tambahkan 0,1 mL sampel, homogenkan. Inkubasi pada suhu 95 °C selama 30 menit (tutupi tutupnya) kemudian dinginkan tabungnya dalam rendaman es. Sentrifugasi pada 10000 g selama 10 menit pada suhu 25 °C, lalu ambil 200µL dari supernatan ke dalam micro quartz cuvette atau 96 wellplate. Ukur nilai absorbansi pada 532 nm dan 600 nm. $\Delta A = A_{532} - A_{600}$.

4.6 Hasil Uji

Tabel 2.1 Kadar MDA pada sel Ea.hy926 pada Ekstrak Daun Karet dan Quercitrin

Sampel	Konsentrasi MDA (ng/mL)	Konsentrasi MDA (ng/mg protein)
Kontrol sel	5.64 ± 0.55^a	35.92 ± 3.51^a
Kontrol DMSO	5.55 ± 0.48^a	35.78 ± 3.09^a
Kontrol		
Hypoxia	11.37 ± 1.52^c	75.27 ± 10.04^c
EDK 100	7.13 ± 0.60^{ab}	45.68 ± 3.87^{ab}
EDK 25	9.71 ± 1.44^{bc}	66.35 ± 9.87^c
Quercitrin 25	8.73 ± 1.44^{bc}	62.58 ± 10.36^{bc}
Quercitrin 6.25	10.53 ± 0.14^c	71.42 ± 0.96^c

*Data disajikan dalam rata-rata \pm SD. Tanda superskrip yang berbeda (a,ab,bc,c) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) Tukey HSD post hoc test.



Gambar 4.1 Aktivitas MDA Sel Ea.hy926 yang diberi Perlakuan dengan Ekstrak Daun Karet dan Quercitrin. Ket : 1. Kontrol sel; 2.Kontrol DMSO; 3. Kontrol Hypoxia; 4. EDK 100 μ g/ml; 5. EDK 25 μ g/ml; 6. Quercitrin 25 μ g/ml; 7. Quercitrin 6.25 μ g/ml.

V. UJI SOD

1.1 Prinsip

SOD adalah antioksidan enzimatis yang melindungi jaringan dari kerusakan oksidatif akibat radikal bebas. Aktivitas enzim SOD memiliki peran penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktivitas senyawa oksigen reaktif yang dapat menyebabkan stres oksidatif. Berdasarkan adanya logam yang berperan sebagai kofaktor pada sisi aktif enzim, dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu Cu/ZnSOD, MnSOD dan FeSOD.

Kit SOD digunakan untuk penentuan SOD dalam serum, plasma, cairan serebrospinal, efusi pleura, asites, cairan dialisis ginjal, urin, semen, sel darah merah, sel darah putih, trombosit, sel miokard, sel tumor dan berbagai jaringan dan sel tumbuhan dan hewan, tingkat subselular (mitokondria dan microsome) dapat diuji dengan kit ini.

Signifikansi deteksi SOD adalah enzim yang secara bergantian mengkatalisis pelepasan (atau partisi) dari

superoksida (O_2^-) radikal menjadi oksigen molekuler biasa (O_2) atau hidrogen peroksida (H_2O_2). Superoksida diproduksi sebagai metabolit sekunder dari metabolisme oksigen dan, jika tidak diatur, menyebabkan banyak jenis kerusakan sel. Hidrogen peroksida juga merusak dan terdegradasi oleh enzim lain seperti katalase. Dengan demikian, SOD merupakan pertahanan antioksidan penting di hampir semua sel hidup yang terpapar oksigen.

Aktivitas SOD diukur dengan metode WST-1 dalam kit ini dan prinsip-prinsip metode WST-1 Xanthine Oxidase (XO) dapat mengkatalisasi reaksi WST-1 dengan O_2^- untuk menghasilkan yang larut dalam air pewarna formazan. SOD dapat mengkatalisasi disproporsi anion superoksida, sehingga reaksi dapat terjadi dihambat oleh SOD, dan aktivitas SOD berkorelasi negatif dengan jumlah pewarna formazan. Oleh karena itu, aktivitas SOD dapat ditentukan dengan analisis kolorimetri produk WST-1.

1.2 Bahan

- Sel lini Ea.hy926 (ATCC CRL-2922)
- Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Elabscience, E-BC-K020)
- Yang berisi: Sample, ddH₂O, enzim working solution, enzim diluen dan substrat application Solution
- Aquabidest
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S1810-5000)
- 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM) (Biowest, L0010-100)
- PBS 1x (Biowest X0515-500)
- Nanomycopulitine (Biowest, LX16-100)
- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Trypsin-EDTA 0.25% (Biowest, L0931-500)
- Protease Inhibitor Cocktail (Bimake, B14011)
- Ripa Buffer pH 7.4 (Bioworld, 4202002)

1.3 Alat dan Consumable

- 96 well-plate (Costar, 3596)
- Multichannel pipettor
- Micropipette (Finnpipette F2)

- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
- Vortex (Wisemix)
- Tips Blue, yellow, white (Neptune)

1.4 Preparasi

- Sel
Sel-sel yang melekat harus dilepaskan dengan tripsin dan kemudian ambil supernatannya, sentrifugasi selama 10 menit pada 1000 rpm sentrifugasi selama 10 menit lalu buang supernatan. Resuspen sel adheren dalam 1 mL PBS dingin, sentrifugasi selama 10 menit pada 1000 rpm, buang supernatant. Resuspen sel dalam Ripa Buffer sebanyak 1 ml dan dihomogenkan. Sel dan Ripa buffer diinkubasi dalam es selama 15 menit. Sel dalam ripa buffer disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Supernatan kemudian diambil dan siap digunakan untuk uji SOD. Untuk penyimpanan supernatan protein, supernatan disimpan dalam -20°C.

- Komponen Kit

Persiapan penggunaan reagen substrat: Campurkan Reagen 1 dan Reagen 2 dengan perbandingan 200: 1 secara menyeluruh. Siapkan reagen segar sebelum digunakan dan reagen yang tidak digunakan dapat disimpan pada 2 ~ 8 °C selama 7 hari. Persiapan working solution enzim: Campurkan Reagen 3 dan Reagen 4 dengan perbandingan 1:10. Siapkan larutan segar sebelum digunakan dan larutan kerja enzim yang tidak digunakan dapat disimpan pada 2-8 °C selama 3 hari.

Catatan: Reagen 2 harus meleleh perlahan di es. Dianjurkan untuk aliquot Reagen 2 ke dalam volume yang lebih kecil untuk penyimpanan optimal. Hindari siklus pencairan berulang-ulang. Simpan reagen di suhu ruang sebelum digunakan.

1.5 Cara Kerja

Setelah sel di thawing, reagen dan wellplate sudah disiapkan, 20 µL aquabidest dan 20 µL larutan kerja enzim pada *well control*. Kemudian 20 µL aquabidest dan 20 µL diluent enzim ditambahkan ke *blank control well*. Pada well

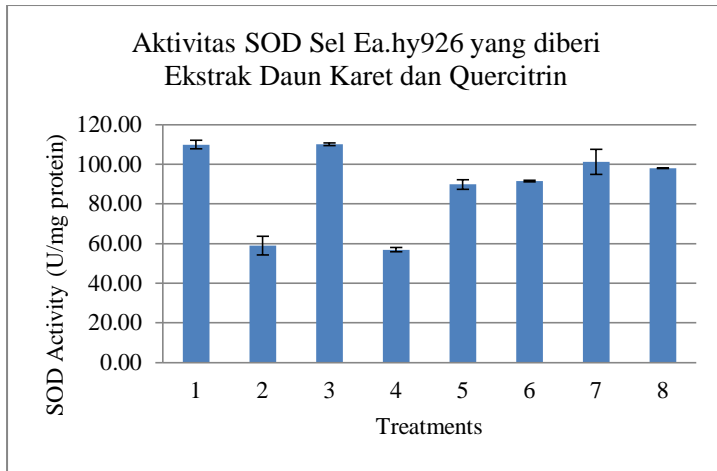
sample ditambahkan 20 μL sampel dan 20 μL larutan kerja enzim, lalu tambahkan 20 μL Sampel dan 20 μL diluent enzim pada *blank sample well*. Setelah itu sebanyak 200 μL *substrate application solution* ditambahkan dengan pipet multi-channel ke masing-masing well dan dihomogenkan. Inkubasi pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ selama 20 menit. Ukur nilai OD dari masing-masing well dengan Microplate Reader pada gelombang 450nm.

1.6 Hasil Uji

Tabel 3.1 Kadar SOD pada sel Ea.hy926 pada Ekstrak Daun Karet dan Quercitrin

Sampel	Rasio inhibisi (%)	SOD Activity (U/mL)	SOD Activity (U/mg prot)
Kontrol non-hypoxia	71.72 \pm 1.38 ^c	17.21 \pm 0.33 ^c	109.94 \pm 2.11 ^d
Kontrol Hypoxia	38.06 \pm 3.02 ^a	9.13 \pm 0.73 ^a	58.93 \pm 4.68 ^a
Kontrol DMSO	71.08 \pm 0.37 ^c	17.06 \pm 0.09 ^c	110.08 \pm 0.57 ^d
Hypoxia DMSO	35.73 \pm 0.69 ^a	8.58 \pm 0.17 ^a	56.86 \pm 1.10 ^a
EDK 100	58.41 \pm 1.54 ^b	14.02 \pm 0.37 ^b	89.84 \pm 2.37 ^b
EDK 25	55.81 \pm 0.20 ^b	13.39 \pm 0.05 ^b	91.54 \pm 0.33 ^b
Quercitrin 25	58.82 \pm 3.69 ^b	14.12 \pm 0.89 ^b	101.19 \pm 6.34 ^c
Quercitrin 6.25	60.28 \pm 0.09 ^b	14.47 \pm 0.02 ^b	98.12 \pm 0.14 ^{bc}

*Data disajikan dalam rata-rata \pm SD. Tanda superskrip yang berbeda (a,b,c,bc,d) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) Tukey HSD post hoc test.



Gambar 4.1 Aktivitas SOD Sel Ea.hy926 yang diberi Perlakuan dengan Ekstrak Daun Karet dan Quercitrin. Ket : 1. Kontrol non-hypoxia; 2. Kontrol hypoxia; 3. Kontrol DMSO; 4. Hypoxia DMSO; 5. EDK 100 $\mu\text{g/ml}$; 6. EDK 25 $\mu\text{g/ml}$; 7. Quercitrin 25 $\mu\text{g/ml}$; 8. Quercitrin 6.25 $\mu\text{g/ml}$.

1.7 Kesimpulan

Induksi hypoxia meningkatkan kadar MDA dengan konsentrasi 75.27 nmol/mg protein. Perlakuan EDK dan quercitrin pada konsentrasi tertinggi (100 $\mu\text{g/ml}$ dan 25 $\mu\text{g/ml}$) menurunkan kadar MDA sedangkan pada konsentrasi rendah (25 $\mu\text{g/ml}$ dan 6.25 $\mu\text{g/ml}$) meningkatkan kadar MDA tetapi lebih rendah dari induksi dengan hypoxia. Induksi hypoxia menurunkan kadar SOD. Konsentrasi EDK tertinggi (100 $\mu\text{g/ml}$) menurunkan kadar SOD dibandingkan dengan konsentrasi EDK yang rendah (25 $\mu\text{g/ml}$), sebaliknya konsentrasi tertinggi Quercitrin menaikkan kadar SOD dan konsentrasinya (6.25 $\mu\text{g/ml}$) menurunkan kadar SOD.

**UJI APOPTOSIS Sel Ea.hy926
YANG DIINDUKSI HYPOXIA DAN
DITREATMENT EKSTRAK DAUN
KARET DAN QUERCITRIN.**

C. Uji Apoptosis Sel Ea.hy926 yang diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitrin.

I. Kultur Sel

1.1 Prinsip

Kultur sel hewan mengacu pada tahap kultur setelah sel-sel diisolasi dari jaringan dan berkembang biak di bawah kondisi yang sesuai sampai mereka menempati semua substrat yang tersedia (confluent). Pada tahap ini, sel-sel harus disubkultur dengan memindahkannya ke flask baru dengan media pertumbuhan baru untuk menyediakan lebih banyak ruang untuk pertumbuhan yang berkelanjutan.

Subkultur, juga disebut sebagai passaging, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan perbanyakan lebih lanjut dari cell line. Pertumbuhan sel dalam kultur berlangsung dari fase lag setelah penanaman sel ke fase log, di mana sel berproliferasi secara eksponensial. Ketika sel-sel dalam kultur menempati semua substrat yang tersedia dan tidak memiliki ruang tersisa untuk ekspansi, atau ketika sel-sel dalam kultur suspensi melebihi kapasitas media untuk mendukung pertumbuhan lebih lanjut, proliferasi sel sangat berkurang atau berhenti sepenuhnya. Untuk menjaga kultur pada kerapatan optimal untuk pertumbuhan sel lanjutan dan untuk merangsang proliferasi lebih lanjut, kultur harus dipindahkan ke flask yang baru dengan medium baru.

1.2 Bahan dan Consumable

- Dulbecco's modified Eagle's medium/ DMEM High-glucose (Biowest, L0104-500)
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S1810-5000)
- 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM) (Biowest, L0010-100)
- PBS 1x (Biowest X0515-500)
- Nanomycopultine (Biowest, LX16-100)
- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Amphotericine B (Biowest, L0009-050)
- Sel Ea.hy926 (ATCC CRL-2922)

1.3 Alat dan Consumable

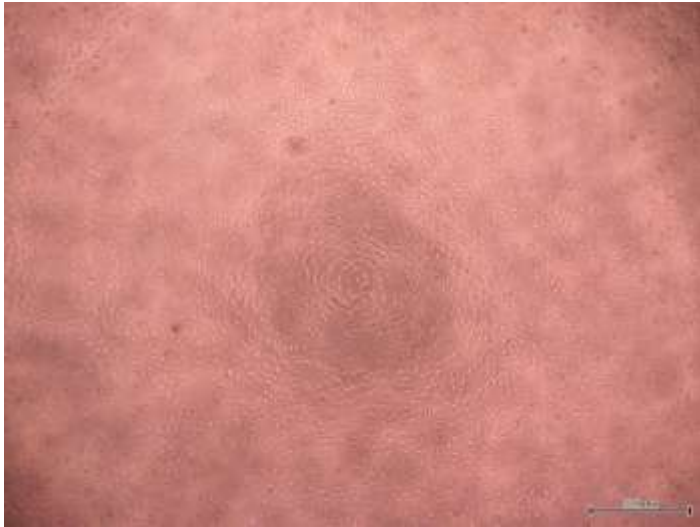
- Pippet Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO2 Incubator (Thermo IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)
- Ultrasonic cleaner (Digital Pro, JP-020S)
- Flask T25 (Corning 430168)
- Centrifuge Tube 15ml (SPL 50015)
- Tube 50ml (SPL 50015)
- Serological Pippet 5ml (SPL 91005)
- Serological Pippet 10ml (SPL 91010)

1.4 Prosedur

Sel diambil dari tanki nitrogen cair (-196oC), selanjutnya dicairkan di dalam Ultrasonic cleaner dengan suhu 37oC selama 2 menit hingga mencair. Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 ml yang berisi medium kultur 4 ml. Sel disentrifugasi pada kecepatan 1600rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, kemudian pellet diresuspensi dengan 5 ml medium kultur. Suspensi sel dimasukkan pada flask T25. Sel diinkubasi dalam inkubator 5% CO2, bersuhu 37°C. Sel yang telah tumbuh pada flask 25 diamati di bawah mikroskop inverted hingga mencapai confluent sekitar 70-80%.

Medium kultur dibuang kemudian ditambahkan medium kultur baru sebanyak 2 ml. Sel yang menempel dilepaskan dengan bantuan scrapper. Dilakukan pengecekan menggunakan mikroskop inverted guna memastikan sel sudah benar-benar terlepas dari dasar flask. Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 ml. Disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 1 ml medium kultur. Suspensi sel dibagi ke dalam 2 buah flask T25. Inkubasi sel dalam inkubator CO2 5%, suhu 37°C. Selama perawatan sel, medium pertumbuhan diganti atau ditambah setiap 2 – 3 hari sekali.

1.5 Hasil Kultur Sel



Gambar 1. Morfologi Sel Ea.hy926 C. Uji Apoptosis Sel Ea.hy926 yang diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitrin.

II. Induksi Apap, Ekstrak, Dan Senyawa

2.1 Prinsip Uji Apoptosis

Uji Apoptosis terhadap sel MCF7 dilakukan berdasarkan flowcytometry. Propidium iodida (PI) dan Annexin V banyak digunakan untuk menentukan apakah sel dalam keadaan hidup, apoptosis, atau nekrosis melalui perubahan yang terjadi pada membran plasma. PI mempunyai kemampuan untuk memberi warna inti sel. Kemampuan PI untuk menembus sel bergantung pada permeabilitas membran, PI tidak akan mewarnai inti sel yang masih hidup atau sel yang berada pada tahap awal apoptosis (early apoptotic) karena adanya membran plasma yang masih utuh.

Jika sel berada pada tahap akhir apoptosis dan nekrosis, permeabilitas membran plasma akan menurun dan memungkinkan PI untuk masuk melalui membran, menuju inti sel dan menghasilkan fluoresensi merah. Annexin V merupakan calcium dependant protein yang memiliki kemampuan untuk berikatan dengan phosphatidylserine

(PS). PS berada di bagian dalam membran plasma. Saat proses apoptosis berlangsung, PS akan berbalik sehingga berada di bagian luar membran yang menjadikannya sinyal fagositosis.

2.2. Bahan dan Consumable

- Sel EA.hy 926 (ATCC® CRL-2922™)
- Ekstrak Daun karet (0140718-C1017)
- Quercitrin (Chengdu, BP1192)
- Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BioLegend, Part 79998)
- Propidium Iodide Solution (BioLegend, Part 79997)
- Annexin V Binding Buffer (BioLegend, 640194)
- DMEM High Glucose (Biowest, L0104-500)
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S1810-5000)
- 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM) (Biowest, L0010-100)
- PBS 1x (Biowest X0515-500)
- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Trypsin-EDTA 0.25% (Gibco, 25200072)
- Nanomycopulitine (Biowest, LX16-100)
- Trypsin-EDTA 0.25% (Biowest, L0931-500)

2.3 Alat dan Consumable

- Pippet Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Esco Class II)
- CO2 Incubator (Thermo, IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)
- Ultrasonic cleaner (Digital Pro, JP-020S)
- Centrifuge Tube 15ml (TPP, 91015)
- Centrifuge Tube 50ml (TPP, 91050)
- Serological Pippet 5ml (SPL, 91005)
- Serological Pippet 10ml (SPL, 91010)
- Mikropippet (100-1000 μ L, 10-100 μ L, 1-10 μ L)
- Mikropippet Tips (100-1000 μ L, 10-100 μ L, 1-10 μ L)
- 5ml Falcon Round-Bottom Tube (Corning, 352024)
- Flowcytometer (Miltenyi Biotech)

2.4 Cara Kerja

a. Induksi Hypoxia, Ekstrak, dan Senyawa

- 1) Masing-masing sel lini Ea.hy926 yang telah mencapai confluent 80% ditripsin dengan 1-2 ml Trypsin-EDTA 0.25% lalu diinkubasi selama 2-3 menit pada suhu 37°C, 5% CO₂
- 2) Setelah sel terlepas dari flask (dettach), complete growth medium ditambahkan
- 3) Suspensi sel dipindahkan ke dalam Centrifuge tube 15 ml kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit
- 4) Supernatan dibuang dan pelet sel diresuspensi dengan complete growth medium.
- 5) Sel dihitung jumlahnya dengan haemocytometer dengan rumus penghitungan:

Rumus perhitungan sel:

$$\frac{\text{Jumlah sel terhitung}}{4} \times 20000 \text{ (konstanta pengenceran)} \times \text{volume suspensi sel}$$

- 6) Sel ditanam di 6-well-plate dengan kepadatan 150.000 sel/well lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂.
- 7) Setelah attachment sel diinduksi Hypoxia dengan dikultur pada incubator hypoxia (2% CO₂) selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂.
- 8) Setelah diinduksi Hypoxia, sel diinduksi dengan ekstrak daun karet dan quercetrin dengan perincian sebagai berikut:
 1. Control non-hypoxia;
 2. Control hypoxia;
 3. Control DMSO;
 4. Hypoxia DMSO;
 5. Hypoxia + EDK100;
 6. Hypoxia + EDK25;
 7. Hypoxia + Quer25;
 8. Hypoxia + Quer6.25.

Sel diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂ untuk kontrol normoxia dan

diinkubasi pada kondisi hypoxia untuk perlakuan hypoxia.

- b. Pengukuran Kadar Apoptosis dengan Flowcytometri
 1. Setelah diinkubasi, sel yang telah diberi perlakuan ditripsin dan dimasukkan ke dalam round bottom tube disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit.
 2. Supernatan dibuang dan pelet sel dicuci sebanyak 2x dengan cara diresuspensi menggunakan 500µl Annexin Binding Buffer 1x lalu disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit.
 3. Supernatan dibuang dan pelet sel diresuspensi dengan 100 ul Annexin Binding Buffer 1x.
 4. Sampel kemudian diwarnai menggunakan Annexin V-FITC dan PI-Per Cp. Cy5 dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 4°C (dark room).
 5. Setelah 30 menit, tambahkan 400µl Annexin binding buffer. Sampel dianalisis menggunakan flowcytometry.

2.5 Hasil Uji

SAMPLE	Live Cell (PI-/ANNEXIN V-)						Early Apoptosis Cells (PI-/ANNEXIN V+)						Late Apoptosis Cells (PI+/ANNEXIN V+)						Necrotic Cells (PI+/ANNEXIN V-)					
	1	2	3	1	2	3	avg	Std	rsd	avg	std	rsd	1	2	3	avg	std	rsd	1	2	3	avg	Std	rsd
CTRL	99.8	99.86	99.88	99.85	0.04	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0		0.2	0.1	0.2	0.2	0	0.2
CTRL DMSO	95.49	96.16	96.46	96.04	0.5	0.01	2.02	1.77	1.73	1.84	0.16	0.09	1.37	1.19	1.08	1.21	0.15	0.12	1.1	0.9	0.7	0.9	0.2	0.2
CTRL HYPOXIA	84.06	83.09	84.45	83.87	0.7	0.01	1.91	2.33	1.76	2	0.3	0.15	12.76	13.06	12.43	12.75	0.32	0.02	1.3	1.5	1.4	1.4	0.1	0.1
EDK100	94.36	93.62	93.89	93.96	0.37	0	0.92	1.1	1.04	1.02	0.09	0.09	3.38	3.32	2.96	3.22	0.23	0.07	1.3	1.9	2.1	1.8	0.4	0.2
EDK25	95.33	95.39	95.63	95.45	0.16	0	1.53	1.35	1.35	1.41	0.1	0.07	2.01	1.95	1.79	1.92	0.11	0.06	1.1	1.3	1.2	1.2	0.1	0.1
QUER25	95.29	95.21	95	95.17	0.15	0	1.9	1.61	1.95	1.82	0.18	0.1	1.39	1.3	1.26	1.32	0.07	0.05	1.4	1.9	1.8	1.7	0.2	0.1
QUER6.25	95.97	96.1	96.28	96.12	0.16	0	1.61	1.49	1.47	1.52	0.08	0.05	1.06	1.02	0.87	0.98	0.1	0.1	1.4	1.4	1.4	1.4	0	0

Tabel. Hasil Uji Apoptosis Sel EA.hy926 dengan Perlakuan Ekstrak Daun Karet dan Quercitrin

Sampel	Live Cells (%)	Early Apoptosis Cells (%)	Late Apoptosis Cells (%)	Necrotic Cells (%)
Kontrol Normal	99.85±0.04 ^d	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.17±0.03 ^a
Kontrol DMSO	96.04±0.50 ^c	1.84±0.16 ^c	1.21±0.15 ^b	0.90±0.22 ^b
Kontrol Hypoxia	83.87±0.70 ^a	2.00±0.30 ^d	12.75±0.32 ^e	1.39±0.13 ^{bc}
EDK 100	93.96±0.37 ^b	1.02±0.09 ^b	3.22±0.23 ^d	1.78±0.42 ^c
EDK 25	95.45±0.16 ^c	1.41±0.10 ^{bc}	1.92±0.11 ^c	1.22±0.09 ^{bc}
Quercitrin 25	95.17±0.15 ^c	1.82±0.18 ^{cd}	1.32±0.07 ^b	1.69±0.24 ^c
Quercitrin 6.25	96.12±0.16 ^c	1.52±0.08 ^c	0.98±0.10 ^b	1.38±0.02 ^{bc}

*Data disajikan dalam rata-rata ± SD. Perbedaan huruf pada rata-rata menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) berdasarkan analisis statistika ANOVA-Tukey.

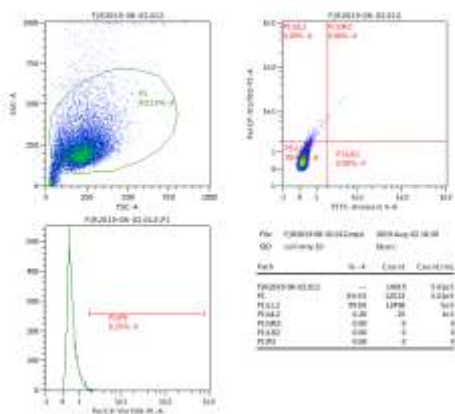
2.6 Kesimpulan

Hasil Uji Apoptosis menunjukkan bahwa kondisi Hypoxia pada sel EA.hy926 dapat meningkatkan jumlah sel yang mengalami late apoptosis (12.75±0.32). Treatment oleh EDK dan Quercitrin pada sel EA.hy926 dapat menurunkan jumlah sel apoptosis pada konsentrasi. Konsentrasi terbaik dari EDK adalah 25 mg/ml, sedangkan konsentrasi terbaik untuk Quercitrin adalah 6.25 mg/ml.

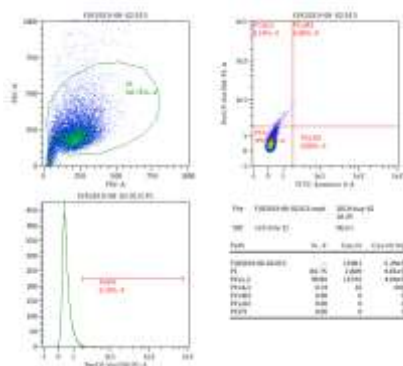
Gambar Hasil Uji Apoptosis menunjukkan bahwa kondisi Hypoxia pada sel EA.hy926 dapat meningkatkan jumlah sel yang mengalami late apoptosis (12.75 ± 0.32).

1. Kontrol

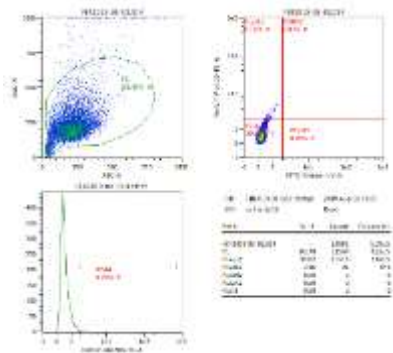
Pengulangan 1



Pengulangan 2

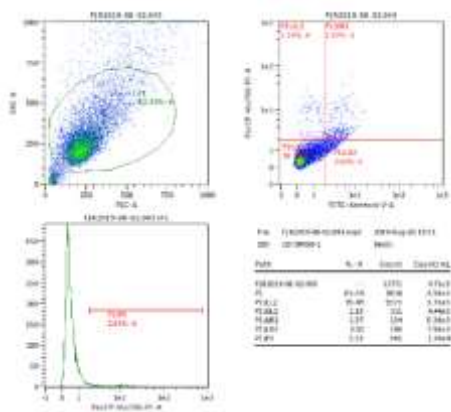


Pengulangan 3

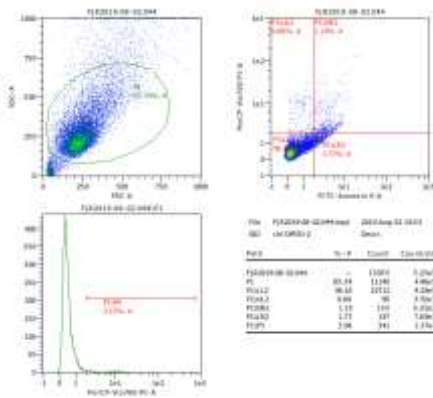


2. Kontrol DMSO

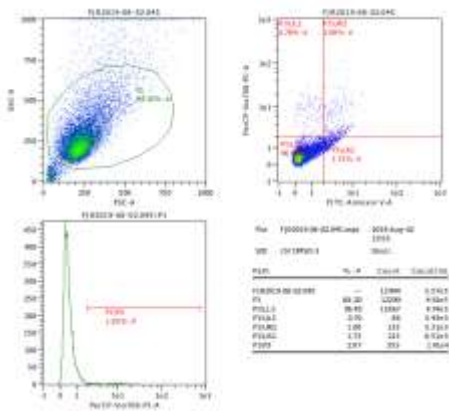
Pengulangan 1



Pengulangan 2

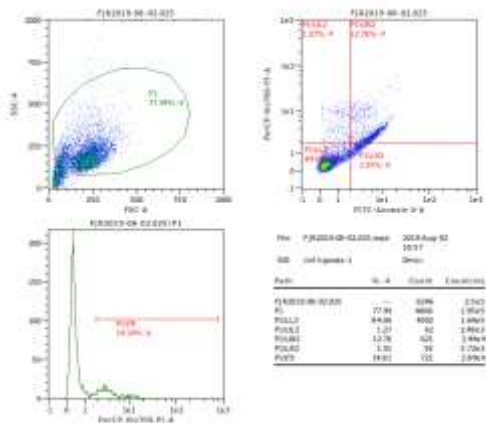


Pengulangan 3

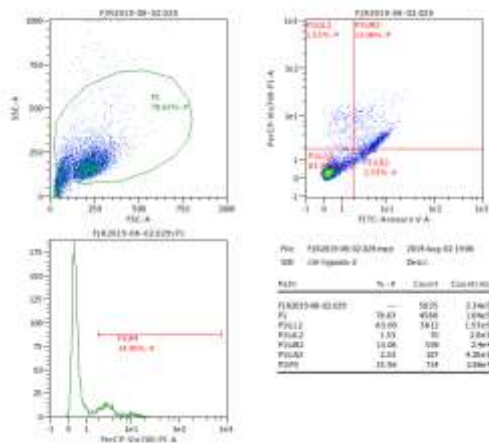


3. Kontrol Hypoxia

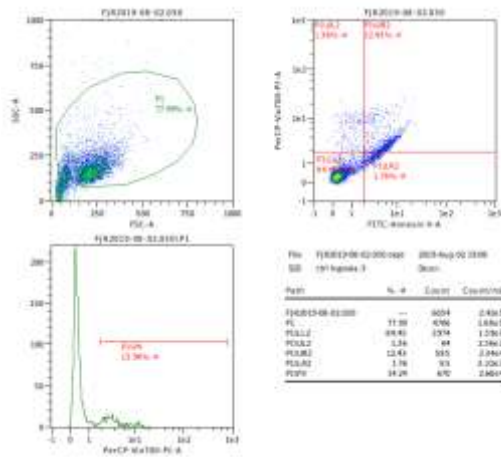
Pengulangan 1



Pengulangan 2

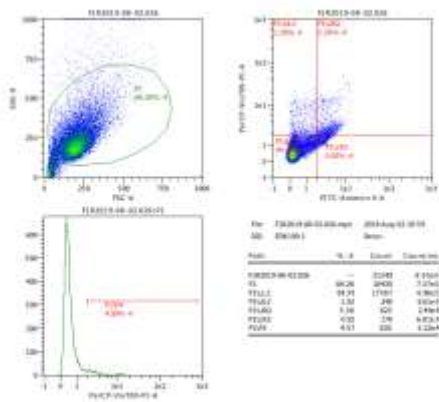


Pengulangan 3

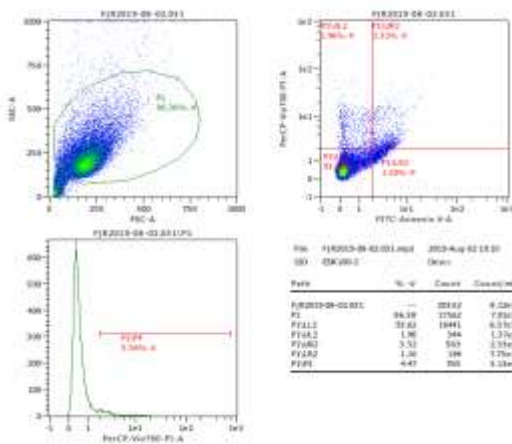


4. EDK100

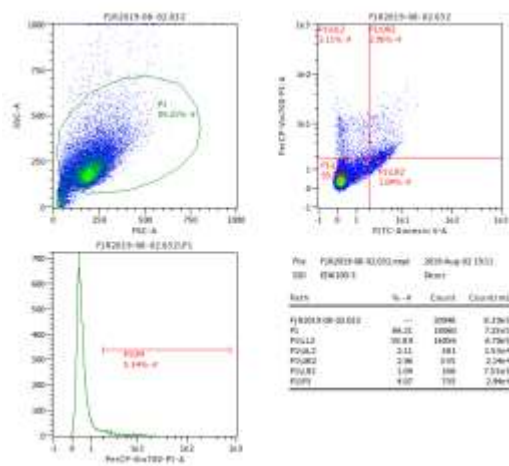
Pengulangan 1



Pengulangan 2

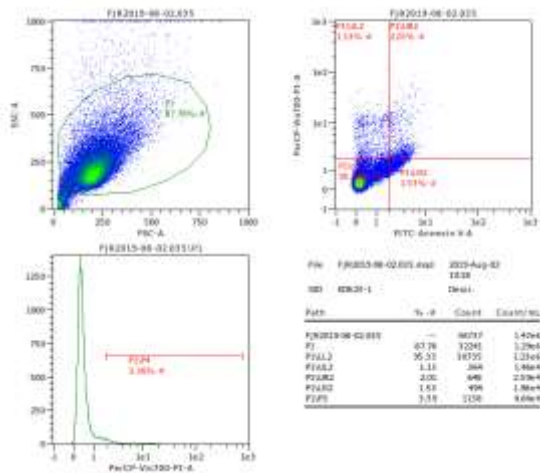


Pengulangan 3

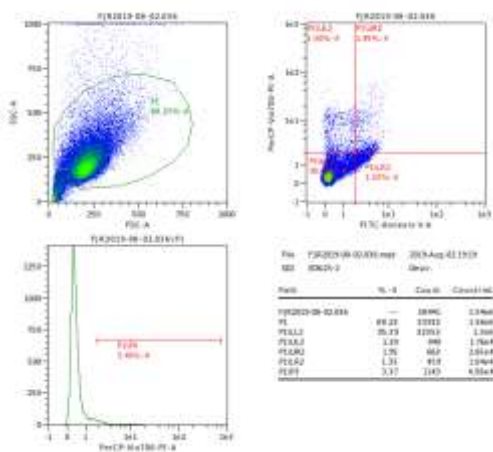


5. EDK25

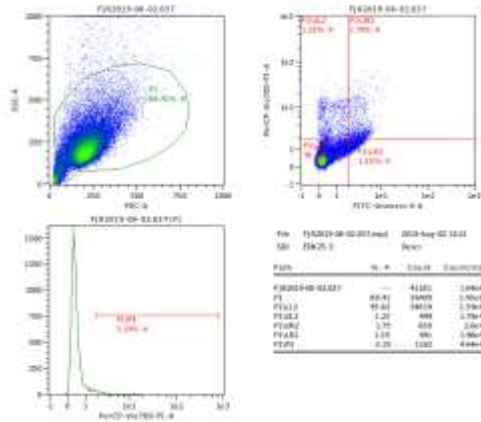
Pengulangan 1



Pengulangan 2

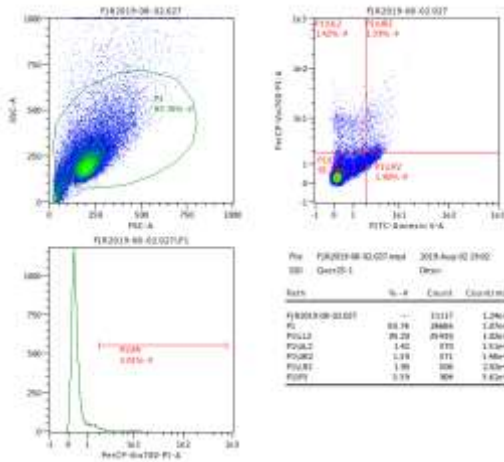


Pengulangan 3

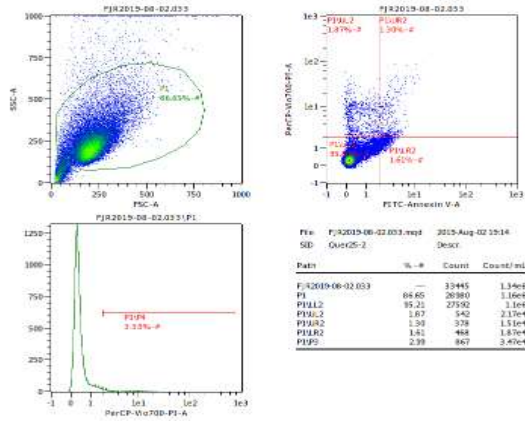


6. QUERCITRIN 25

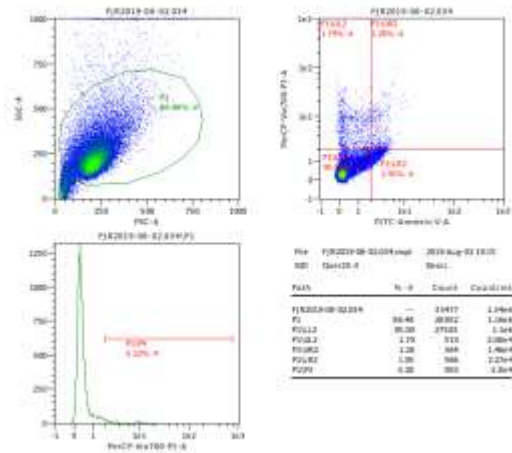
Pengulangan 1



Pengulangan 2

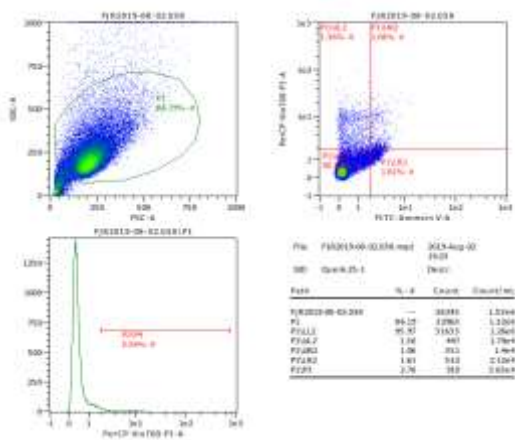


Pengulangan 3

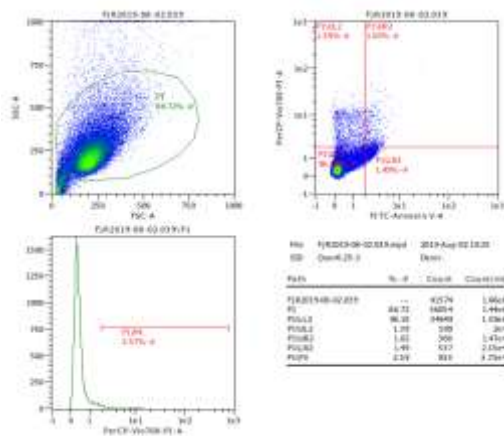


7. QUERCITRIN 6.25

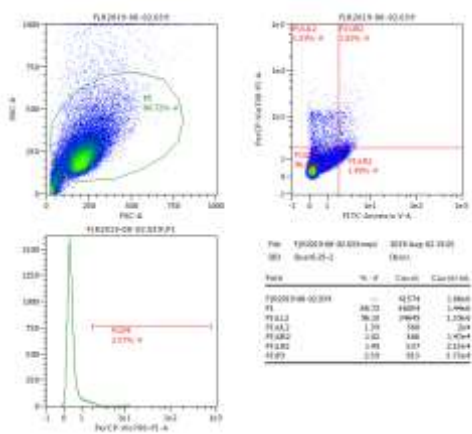
Pengulangan 1



Pengulangan 2



Pengulangan 3



**UJI EKSPRESI GEN EDN-1, THBS-1, FGF-2,
VEGF-A, PIGF PADA SEL Ea.hy926
DIINDUKSI HYPOXIA DAN DITREATMENT
EKSTRAK DAUN KARET DAN QUERCITRI**

D. Uji Ekspresi gen EDN-1, THBS-1, FGF-2, VEGF-A, PIGF pada sel Ea.hy926 diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitri

I. Kultur Sel

1.1 Prinsip

Kultur sel mengacu pada tahap kultur setelah sel-sel diisolasi dari jaringan dan berkembang biak di bawah kondisi yang sesuai sampai mereka menempati semua substrat yang tersedia (confluent). Pada tahap ini, sel-sel harus disubkultur dengan memindahkannya ke flask baru dengan media pertumbuhan baru untuk menyediakan lebih banyak ruang untuk pertumbuhan yang berkelanjutan.

Subkultur, juga disebut sebagai passaging, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan perbanyakan lebih lanjut dari cell line. Pertumbuhan sel dalam kultur berlangsung dari fase lag setelah penanaman sel ke fase log, di mana sel berproliferasi secara eksponensial. Ketika sel-sel dalam kultur menempati semua substrat yang tersedia dan tidak memiliki ruang tersisa untuk ekspansi, atau ketika sel-sel dalam kultur suspensi melebihi kapasitas media untuk mendukung pertumbuhan lebih lanjut, proliferasi sel sangat berkurang atau berhenti sepenuhnya. Untuk menjaga kultur pada kerapatan optimal untuk pertumbuhan sel lanjutan dan untuk merangsang proliferasi lebih lanjut, kultur harus dipindahkan ke flask yang baru dengan medium baru.

1.2 Bahan dan Consumable

- Dulbecco's modified Eagle's medium/ DMEM High-glucose (Biowest, L0104-500)
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S1810-5000)
- 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM) (Biowest, L0010-100)
- PBS 1x (Biowest X0515-500)
- Nanomycopultine (Biowest, LX16-100)
- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Amphotericine B (Biowest, L0009-050)
- Sel Ea.hy926 (ATCC CRL-2922)

1.3 Alat dan Consumable

- Pippet Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO2 Incubator (Thermo IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)
- Ultrasonic cleaner (Digital Pro, JP-020S)
- Flask T25 (Corning 430168)
- Centrifuge Tube 15ml (SPL 50015)
- Tube 50ml (SPL 50015)
- Serological Pippet 5ml (SPL 91005)
- Serological Pippet 10ml (SPL 91010)

1.4 Prosedur

Sel diambil dari tanki nitrogen cair (-196oC), selanjutnya di-thawing di dalam ultrasonic cleaner dengan suhu 37oC selama 2 menit hingga mencair. Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 ml yang berisi medium kultur 4 ml. Sel disentrifugasi pada kecepatan 1600rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, kemudian pellet diresuspensi dengan 5 ml medium kultur. Suspensi sel dimasukkan pada flask T25. Sel diinkubasi dalam inkubator 5% CO2, bersuhu 37°C. Sel yang telah tumbuh pada flask 25 diamati di bawah mikroskop inverted hingga mencapai confluent sekitar 70-80%.

Medium kultur dibuang kemudian ditambahkan medium kultur baru sebanyak 2 ml. Sel yang menempel dilepaskan secara enzymatic menggunakan Trypsin 0.25%. Dilakukan pengecekan menggunakan mikroskop inverted guna memastikan sel sudah benar-benar terlepas dari dasar flask. Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 ml. Disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 1 ml medium kultur. Suspensi sel dibagi ke dalam 2 buah flask T25. Inkubasi sel dalam inkubator CO2 5%, suhu 37°C. Selama perawatan sel, medium pertumbuhan diganti atau ditambah setiap 2 – 3 hari sekali.

1.5 Hasil Kultur Sel



Gambar 1. Morfologi Sel Ea.hy926 Uji Ekspresi gen EDN-1, THBS-1, FGF-2, VEGF-A, PIGF pada sel Ea.hy926 diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitri

II. Induksi Apap, Ekstrak, Dan Senyawa

2.1 Prinsip

Sel yang sebelumnya telah dikultur kemudian diganti mediumnya dan dikultur dalam kondisi Hypoxia selama 24 jam sebagai model preeklamsia. Setelah dikultur dalam kondisi hypoxia sel diinduksi langsung dengan Ekstrak Daun Karet (EDK) dan Quercettrin. Induksi ini dilakukan untuk melihat pengaruh EDK terhadap sel Ea.hy926 model Preeklamsia.

2.2. Bahan dan Consumable

- Medium Kultur Sel Medium kultur sel Ea.hy926
- Sampel Ekstrak Daun Karet (0140718-C1017)
- Quercitrin (Chengdu, BP1192)

2.3 Alat dan Consumable

- Pippet Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO2 Incubator (Thermo IH3543) Kondisi Hypoxia
- Tube 50ml (SPL 50015)

- Serological Pippet 5ml (SPL 91005)
- Serological Pippet 10ml (SPL 91010)

2.4 Prosedur

Sel yang sudah mencapai konfluensi dibilas dengan PBS dan ditambahkan tripsin EDTA dan diinkubasi 37°C. Kemudian sel dihitung dengan hemositometer dan deseeding dalam 6 well plate. Sel dibagi kedalam 6 perlakuan sebagai berikut: 1) Control non-hypoxia; 2) Control hypoxia; 3) Control DMSO, 4) Hypoxia DMSO, 5) Hypoxia + EDK100, 6) Hypoxia + EDK25, 7) Hypoxia + Quer25, 8) Hypoxia + Quer6.25. Perlakuan control non hypoxia dan control DMSO diinkubasi dalam incubator 37°C, CO2 5% selama 2 hari. Perlakuan hypoxia diinduksi diinkubasi dalam incubator 37°C, CO2 5% selama 2 hari dengan kadar O2 2%. Setelah diinduksi dengan hypoxia, sel diberi perlakuan dengan senyawa dan ekstrak sesuai perlakuan dan diinkubasi kembali dalam kondisi Hypoxia selama 24 jam. Setelah diinkubasi, CM dikoleksi dan sel dihoverst menggunakan teknik trypsinasi.

III. Ekspresi Gen EDN-1, THBS-1, FGF-2, VEGF-A, dan PIGF 3.1 Prinsip

Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) merupakan metode yang cepat dan sensitive untuk pengukuran ekspresi gen. Selain itu qRT-PCR adalah metode pengukuran tidak langsung yang mengalami variabilitas yang signifikan selama berbagai tahap protocol penelitian (contohnya pemasukan sampel, ekstraksi RNA, efisiensi reverse transcription dari RNA hingga komplementari DNA dan efisiensi PCR. Dengan menggunakan PCR, urutan spesifik dalam kerangka DNA atau cDNA dapat digandakan atau memperkuat, beberapa ribu sampai satu juta kali lipat menggunakan urutan oligonukleotida spesifik, heat stable DNA polymerase, dan siklus termal.

IV. Isolasi RNA

1. Bahan

- Ethanol 70% (Merck, 1,009,832,500)
- Aurum Total RNA mini kit (Biorad, 7326820)

- o lysis solution
 - o low stringency
 - o high stringency
 - o elution solution
 - DNase (Norgen)
 - DNase solution (Norgen)
2. Flask 25 (TPP, 90025)
- Spin column (Biorad)
 - Tube 1,5 ml (SPL)
 - Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
 - Pipette Gun (Thermo Scientific 9521)
 - Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
 - Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
 - Mikropipet finnippet 100-1000 μ L dan 10-100 μ L (Finnpipette F2)
 - Tips blue dan yellow (Neptune)

3.3 Cara Kerja

Sel dipanen hingga dihasilkan bentuk pelet. Ditambahkan 350 μ l lysis solution, diresuspensi. Ditambahkan 350 μ l etanol 70%, diresuspensi. Dipindahkan ke dalam RNA binding column 2 ml. Disentrifugasi 13000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang, ditambahkan 700 μ l low stringency wash solution. Disentrifugasi 13000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang, ditambahkan 15 μ l DNase dan 100 μ l DNase solution, diinkubasi 15 menit RT. Disentrifugasi 13000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang, ditambahkan 700 μ l high stringency wash solution.

Disentrifugasi 13000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang, ditambahkan 700 μ l low stringency wash solution. Disentrifugasi 13000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang, disentrifugasi 13000 rpm selama 2 menit. Tube 1,5 penampung diganti dengan tube baru. Ditambahkan 80 μ l elution solution, diinkubasi 1 menit. Disentrifugasi 13000 rpm selama 2 menit. Konsentrasi RNA diukur dengan nano drop.

V. Sintesa cDNA

1. Bahan

- Sampel RNA
- iScript reverse transcriptase (Biorad)
- 5x iScript mix (Biorad)
- Nuclease free water (Promega)

2. Alat dan Consumable

- Tube PCR (AXN)
- Spin down (Ohaus)
- Mikropipet finnippet 100-1000 μL dan 10-100 μL (Finnpipette F2)
- Tips blue dan yellow (Neptune)
- PCR cabinet (ESCO)
- RT-PCR (Clever GTC965)

3. Cara kerja

Sampel RNA sebanyak 1-15 μL dimasukkan ke dalam tube PCR. Ditambahkan 1 μL iScript reverse transcriptase. Ditambahkan 4 μL 5x iScript mix. Ditambahkan nuclease free water hingga menjadi 20 μL . Spin down. Diinkubasi di dalam RT-PCR dengan kondisi reaksi sebagai berikut; 1) Priming: 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 menit; 2) Reverse: 46 $^{\circ}\text{C}$, 20 menit; 3) RT Inactive: 95 $^{\circ}\text{C}$, 1 menit; 4) Hold: 4 $^{\circ}\text{C}$ infinite.

VI. Analisis qPCR

6.1 Bahan

- Sampel cDNA
- SsoFast Evergreen Supermix (Biorad)
- Forward dan reverse primer B-actin, PPAR-gamma, dan Glut-4 (Macrogen)
- Nuclease free water (Promega)

6.2. Alat dan Consumable

- Tube PCR (AXN)
- Spin down (Ohaus)
- Mikropipet finnippet 100-1000 μL dan 10-100 μL (Finnpipette F2)
- Tips blue dan yellow (Neptune)
- PCR cabinet (ESCO)
- qPCR (Thermo)

6.3 Cara Kerja

Sampel cDNA sebanyak 1-2 ul dimasukkan ke dalam tube PCR. Ditambahkan 10 ul SsoFast Evagreen Supermix. Ditambahkan 4 ul mix forward primer dan reverse primer. Ditambahkan nuclease free water hingga menjadi 20 ul, spin down. Sampel mix dimasukkan ke dalam Piko PCR Plate (Finnzymes) dan ditutup dengan seal ASF-0020 Diinkubasi di dalam qPCR dengan kondisi reaksi; 1) Predenaturasi: 95°C, 5 menit, 2) Denaturasi: 95°C, 1 menit, 3) Annealing: 59°C, 40 detik, 4) Preelongasi: 72°C 1 menit, 5) Elongasi: 72°C, 5 menit, 5) Melt curve: 55-90 °C Infinite hold 4°C.

VII. Mapping qPCR

a. Mapping qPCR EDN-1 dan THBS-1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	A1	A1	A1		A2	A2	A2		A3	A3	A3		B1	B1	B1	
B	B2	B2	B2		B3	B3	B3		C1	C1	C1		C2	C2	C2	
C	C3	C3	C3		D1	D1	D1		D2	D2	D2		D3	D3	D3	
D	E1	E1	E1		E2	E2	E2		E3	E3	E3		F1	F1	F1	
E	F2	F2	F2		F3	F3	F3		G1	G1	G1		G2	G2	G2	
F	G3	G3	G3													

Kode sampel:

- A1 : Kontrol sel normal Ea.hy926 + B-actin
- A2 : Kontrol DMSO + B-actin
- A3 : Kontrol Hypoxia + B-actin
- B1 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 100ug/mL+B-actin
- B2 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 25ug/mL+B-actin
- B3 : Ea.hy926 + quercitrin 25 ug/mL+B-actin
- C1 : Ea.hy926 + quercitrin 6.25 ug/mL+B-actin
- C2 : Kontrol sel normal Ea.hy926 + EDN-1
- C3 : Kontrol DMSO + EDN-1
- D1 : Kontrol Hypoxia + EDN-1
- D2 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 100ug/mL+EDN-1
- D3 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 25ug/mL+EDN-1

- E1 : Ea.hy926 + quercitrin 25 ug/mL+EDN-1
- E2 : Ea.hy926 + quercitrin 6.25 ug/mL+EDN-1
- E3 : Kontrol sel normal Ea.hy926 + THBS-1
- F1 : Kontrol DMSO + THBS-1
- F2 : Kontrol Hypoxia + THBS-1
- F3 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 100ug/mL+THBS-1
- G1 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 25ug/mL+THBS-1
- G2 : Ea.hy926 + quercitrin 25 ug/mL+THBS-1
- G3 : Ea.hy926 + quercitrin 6.25 ug/mL+THBS-1

b. Mapping qPCR FGF-2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	A 1	A 1	A 1		A 2	A 2	A 2		A 3	A 3	A 3		B 1	B 1	B 1	
B	B 2	B 2	B 2		B 3	B 3	B 3		C 1	C 1	C 1		C 2	C 2	C 2	
C	C 3	C 3	C 3		D 1	D 1	D 1		D 2	D 2	D 2		D 3	D 3	D 3	
D	E 1	E 1	E 1		E 2	E 2	E 2									
E																
F																

Kode sampel:

- A1 : Kontrol sel normal Ea.hy926 + B-actin
- A2 : Kontrol DMSO + B-actin
- A3 : Kontrol Hypoxia + B-actin
- B1 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 100ug/mL+B-actin
- B2 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 25ug/mL+B-actin
- B3 : Ea.hy926 + quercitrin 25 ug/mL+B-actin
- C1 : Ea.hy926 + quercitrin 6.25 ug/mL+B-actin
- C2 : Kontrol sel normal Ea.hy926 + FGF-2
- C3 : Kontrol DMSO + FGF-2
- D1 : Kontrol Hypoxia + FGF-2
- D2 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 100ug/mL+ FGF-2
- D3 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 25ug/mL+ FGF-2
- E1 : Ea.hy926 + quercitrin 25 ug/mL+ FGF-2
- E2 : Ea.hy926 + quercitrin 6.25 ug/mL+ FGF-2

c. Mapping qPCR VEGF-A dan PIGF

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	A1	A1	A1		A2	A2	A2		A3	A3	A3		B1	B1	B1	
B	B2	B2	B2		B3	B3	B3		C1	C1	C1		C2	C2	C2	
C	C3	C3	C3		D1	D1	D1		D2	D2	D2		D3	D3	D3	
D	E1	E1	E1		E2	E2	E2		E3	E3	E3		F1	F1	F1	
E	F2	F2	F2		F3	F3	F3		G1	G1	G1		G2	G2	G2	
F	G3	G3	G3													

Kode sampel:

- A1 : Kontrol sel normal Ea.hy926 + B-actin
- A2 : Kontrol DMSO + B-actin
- A3 : Kontrol Hypoxia + B-actin
- B1 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 100ug/mL+B-actin
- B2 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 25ug/mL+B-actin
- B3 : Ea.hy926 + quercitrin 25 ug/mL+B-actin
- C1 : Ea.hy926 + quercitrin 6.25 ug/mL+B-actin
- C2 : Kontrol sel normal Ea.hy926 + VEGF-A
- C3 : Kontrol DMSO + VEGF-A
- D1 : Kontrol Hypoxia + VEGF-A
- D2 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 100ug/mL+ VEGF-A
- D3 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 25ug/mL+ VEGF-A
- E1 : Ea.hy926 + quercitrin 25 ug/mL+ VEGF-A
- E2 : Ea.hy926 + quercitrin 6.25 ug/mL+ VEGF-A
- E3 : Kontrol sel normal Ea.hy926 + PIGF
- F1 : Kontrol DMSO + PIGF
- F2 : Kontrol Hypoxia + PIGF
- F3 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 100ug/mL+ PIGF
- G1 : Ea.hy926 + ekstrak daun karet 25ug/mL+ PIGF
- G2 : Ea.hy926 + quercitrin 25 ug/mL+ PIGF
- G3 : Ea.hy926 + quercitrin 6.25 ug/mL+ PIGF

VIII. Hasil Uji

a. Konsentrasi dan Kemurnian RNA

Sampel	Konsentrasi (ng/ul)		Rataan (ng/ul)	Kemurnian (E260/E280)		Rataan (E260/E280)
	1	2		1	2	
Normal cell Ea.hy926	619.80	635.80	627.80	2.38	2.38	2.38
Kontrol DMSO	676.60	658.60	667.60	2.37	2.38	2.37
Kontrol Hypoxia	619.20	535.30	577.25	2.40	2.40	2.40
Ea.hy926+ ekstrak daun karet 100 ug/ml	594.20	573.50	583.85	2.39	2.39	2.39
Ea.hy926+ ekstrak daun karet 25 ug/ml	343.80	341.00	342.40	2.38	2.37	2.37

Ea.hy926+ quercitrin 25 ug/ml	477.50	484.50	481.00	2.37	2.38	2.37
Ea.hy926+ quercitrin 6.25 ug/ml	572.00	571.10	571.55	2.38	2.38	2.38

b. Analisis qPCR EDN-1

Treatment	Ekspresi Gen EDN-1			Average	SD	RSD
	1	2	3			
Normal cell Ea.hy926	1	1	1	1.00	0	0
Kontrol DMSO	0.99	0.90	0.95	0.95	0.05	4.9
Kontrol Hypoxia	1.49	2.07	1.79	1.79	0.29	16.1
Ea.hy926+ ekstrak daun karet 100 ug/ml	2.06	2.06	1.80	1.97	0.15	7.4
Ea.hy926+ ekstrak daun karet 25 ug/ml	1.27	1.29	1.08	1.21	0.12	9.6
Ea.hy926+ quercitrin 25 ug/ml	1.83	1.35	1.43	1.54	0.26	16.7
Ea.hy926+ quercitrin 6.25 ug/ml	1.00	1.06	1.27	1.11	0.14	13.0

c. Analisis qPCR THBS-1

Treatment	Ekspresi Gen THBS-1			Average	SD	RSD
	1	2	3			
Normal cell Ea.hy926	1	1	1	1.00	0.00	0
Kontrol DMSO	1.11	0.83	1.24	1.06	0.21	19.5
Kontrol Hypoxia	0.66	0.49	0.56	0.57	0.09	14.9
Ea.hy926+ ekstrak daun karet 100 ug/ml	0.55	0.76	0.65	0.66	0.10	15.8
Ea.hy926+ ekstrak daun karet 25 ug/ml	0.88	0.74	0.66	0.76	0.11	14.6
Ea.hy926+ quercitrin 25 ug/ml	0.97	0.82	0.67	0.82	0.15	18.2
Ea.hy926+ quercitrin 6.25 ug/ml	0.98	0.80	1.08	0.96	0.14	15.1

d. Analisis qPCR FGF-2

Treatment	Ekspresi Gen FGF-2			Average	SD	RSD
	1	2	3			
Normal cell Ea.hy926	1	1	1	1.00	0	0
Kontrol DMSO	0.77	1.08	1.01	0.95	0.16	16.7
Kontrol Hypoxia	2.58	2.22	2.10	2.30	0.25	11.0
Ea.hy926+ ekstrak daun karet	1.61	1.26	1.36	1.41	0.18	13.0

100 ug/ml						
Ea.hy926+ ekstrak daun karet 25 ug/ml	1.39	1.13	1.46	1.33	0.17	13.1
Ea.hy926+ quercitrin 25 ug/ml	1.91	1.83	1.59	1.77	0.16	9.2
Ea.hy926+ quercitrin 6.25 ug/ml	1.75	1.69	2.17	1.87	0.26	14.0

e. Analisis qPCR VEGF-A

Treatment	Ekspresi Gen PIGF			Average	SD	RSD
	1	2	3			
Normal cell Ea.hy926	1	1	1	1.00	0.00	0.00
Kontrol DMSO	1.10	0.81	0.93	0.95	0.15	15.3
Kontrol Hypoxia	0.53	0.56	0.75	0.61	0.12	19.4
Ea.hy926+ ekstrak daun karet 100 ug/ml	0.68	0.81	0.67	0.72	0.08	10.9
Ea.hy926+ ekstrak daun karet 25 ug/ml	1.00	1.06	1.17	1.08	0.09	8.2
Ea.hy926+ quercitrin 25 ug/ml	0.74	0.58	0.59	0.64	0.09	13.9
Ea.hy926+ quercitrin 6.25 ug/ml	0.86	0.90	0.90	0.89	0.02	2.2

IX. Hasil Uji Statistik

Tabel 7. Ekspresi Gen EDN-1, THBS-1, FGF-2, VEGF-A dan PIGF (Rata-rata, Hasil Uji Post Hoc Tes Tukey HSD)

Treatment	Eskpresi gen EDN-1	Eskpresi gen THBS-1	Eskpresi gen FGF-2	Eskpresi gen VEGF-A	Eskpresi gen PIGF
Normal cell Ea.hy926	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00 ^d	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^d
Kontrol DMSO	0.95±0.05 ^a	1.06±0.21 ^{c,d}	0.95±0.16 ^a	0.96±0.06 ^a	0.95±0.15 ^{c,d}
Kontrol Hypoxia	1.79±0.29 ^c	0.57±0.09 ^a	2.30±0.25 ^d	0.50±0.08 ^a	0.61±0.12 ^a
Ea.hy926+ ekstrak daun karet 100 ug/ml	1.97±0.15 ^c	0.66±0.10 ^{a,b,c}	1.41±0.18 ^{a,b,c}	0.64±0.09 ^{a,b}	0.72±0.08 ^{a,b,c}
Ea.hy926+ ekstrak daun karet 25 ug/ml	1.21±0.12 ^{a,b}	0.76±0.11 ^d	1.33±0.17 ^{a,b}	0.87±0.03 ^{b,c}	1.08±0.09 ^d
Ea.hy926+ quercitrin 25 ug/ml	1.54±0.26 ^{b,c}	0.82±0.15 ^{a,b}	1.77±0.16 ^{b,c,d}	0.52±0.08 ^c	0.64±0.09 ^{a,b}

Treatment	Eskpresi gen EDN-1	Eskpresi gen THBS-1	Eskpresi gen FGF-2	Eskpresi gen VEGF-A	Eskpresi gen PIGF
Ea.hy926+ quercitrin 6.25 ug/ml	1.11±0.14 _{a,b}	0.96±0.14 _{b,c,d}	1.87±0.26 ^{c,d}	0.92±0.17 ^c	0.89±0.02 _{b,c,d}

*Data disajikan dalam rata-rata ± SD. Tanda superskrip yang berbeda (a,ab,bc,cd,abc,bcd,b,c,d) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) Tukey HSD post hoc test.

X. Kesimpulan

Berdasarkan hasil qPCR, Hypoxia menginduksi peningkatan ekspresi gen EDN-1, FGF-2, dan menurunkan ekspresi gen THBS-1, VEGF-A dan PIGF. Pemberian perlakuan menggunakan Ekstrak Daun Karet dan Quercitrin mampu menurunkan ekspresi gen EDN1, dan FGF-2 dan meningkatkan ekspresi gen THBS-1, VEGF-A dan PIGF. Quercitrin 25 ug/ml memiliki aktivitas yang lebih baik dalam menurunkan ekspresi gen EDN1 dan meningkatkan ekspresi gen THBS-1 dan VEGF-A dibandingkan perlakuan yang lain. EDK 25 ug/ml memiliki aktivitas yang lebih baik dalam menurunkan ekspresi gen FGF-2 dan meningkatkan ekspresi gen PIGF dibandingkan perlakuan yang lain.

**UJI ANTIINFLAMASI PADA SEL
Ea.hy926 DIINDUKSI HYPOXIA DAN
DITREATMENT EKSTRAK DAUN
KARET DAN QUERCITRI**

E. Uji Antiinflamasi pada sel Ea.hy926 diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitri

I. Kultur Sel

1.1 Prinsip

Kultur sel primer mengacu pada tahap kultur setelah sel-sel diisolasi dari jaringan dan berkembang biak di bawah kondisi yang sesuai sampai mereka menempati semua substrat yang tersedia (confluent). Pada tahap ini, sel-sel harus disubkultur dengan memindahkannya ke flask baru dengan media pertumbuhan baru untuk menyediakan lebih banyak ruang untuk pertumbuhan yang berkelanjutan.

Setelah subkultur pertama, kultur sel primer menjadi cell line. Cell line yang berasal dari kultur primer memiliki rentang hidup yang terbatas, pertumbuhan tinggi dan menghasilkan tingkat keseragaman genotipe dan fenotipik dalam populasi.

Subkultur, juga disebut sebagai passaging, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan perbanyakan lebih lanjut dari cell line. Pertumbuhan sel dalam kultur berlangsung dari fase lag setelah penanaman sel ke fase log, di mana sel berproliferasi secara eksponensial. Ketika sel-sel dalam kultur menempati semua substrat yang tersedia dan tidak memiliki ruang tersisa untuk ekspansi, atau ketika sel-sel dalam kultur suspensi melebihi kapasitas media untuk mendukung pertumbuhan lebih lanjut, proliferasi sel sangat berkurang atau berhenti sepenuhnya. Untuk menjaga kultur pada kerapatan optimal untuk pertumbuhan sel lanjutan dan untuk merangsang proliferasi lebih lanjut, kultur harus ganti dengan medium baru.

1.2 Bahan dan Consumable

- Dulbecco's modified Eagle's medium/DMEM High-glucose (Biowest, L0104-500)
- 10% Fetal bovine serum/FBS (Gibco, 10270106)
- 1% Antibiotic and Antimycotic/ABAM (Gibco 1772653)
- PBS 1x (Gibco, 1740576)
- Sel Ea.hy926 (ATCC CRL-2922)

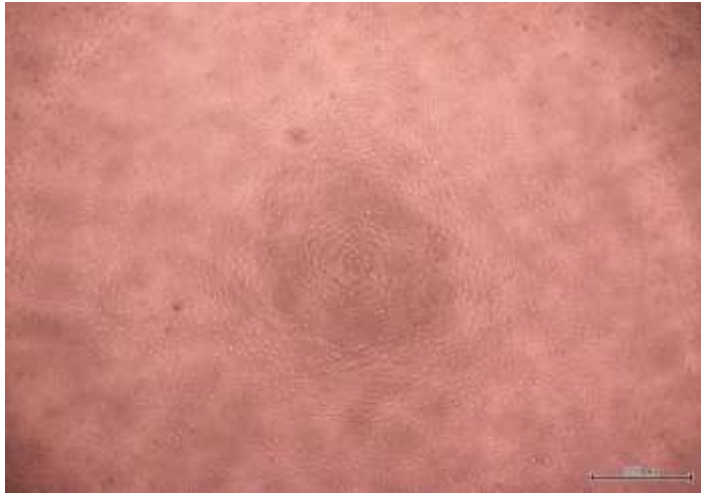
1.3 Alat dan Consumable

- Pippet Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO2 Incubator (Thermo IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)
- Ultrasonic cleaner (Digital Pro, JP-020S)
- Flask T25 (Corning 430168)
- Centrifuge Tube 15ml (SPL 50015)
- Tube 50ml (SPL 50015)
- Serological Pippet 5ml (SPL 91005)
- Serological Pippet 10ml (SPL 91010)

1.4 Prosedur

Sel diambil dari tanki nitrogen cair (-196oC), selanjutnya dicairkan di dalam Ultrasonic cleaner dengan suhu 37oC selama 2 menit hingga mencair. Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 ml yang berisi medium kultur 4 ml. Sel disentrifugasi pada kecepatan 1600rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, kemudian pellet diresuspensi dengan 5 ml medium kultur. Suspensi sel dimasukkan pada flask T25. Sel diinkubasi dalam inkubator 5% CO2, bersuhu 37°C. Sel yang telah tumbuh pada flask 25 diamati di bawah mikroskop inverted hingga mencapai confluent sekitar 70-80%. Medium kultur dibuang kemudian ditambahkan medium kultur baru sebanyak 2 ml. Sel yang menempel dilepaskan dengan bantuan scrapper. Dilakukan pengecekan menggunakan mikroskop inverted guna memastikan sel sudah benar-benar terlepas dari dasar flask. Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 ml. Disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 1 ml medium kultur. Suspensi sel dibagi ke dalam 2 buah flask T25. Inkubasi sel dalam inkubator CO2 5%, suhu 37°C. Selama perawatan sel, medium pertumbuhan diganti atau ditambah setiap 2 – 3 hari sekali.

1.5 Hasil Kultur Sel



Gambar 1. Morfologi Sel Ea.hy926 E. Uji antiinflamasi pada sel Ea.hy926 diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitri.

II. Induksi Hypoxia, Ekstrak, Dan Senyawa

2.1 Prinsip

Sel yang sebelumnya telah dikultur kemudian diganti mediumnya dan dikultur dalam kondisi Hypoxia selama 24 jam sebagai model preeklamsia. Setelah dikultur dalam kondisi hypoxia sel diinduksi langsung dengan Ekstrak Daun Karet (EDK) dan Quercetrin. Induksi ini dilakukan untuk melihat pengaruh EDK terhadap sel Ea.hy926 model Preeklamsia.

2.2. Bahan dan Consumable

- Medium Kultur Sel Medium kultur sel Ea.hy926
- Sampel Ekstrak Daun Karet (0140718-C1017)
- Quercitrin (Chengdu, BP1192)

2.3 Alat dan Consumable

- Pippet Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO2 Incubator (Thermo IH3543) Kondisi Hypoxia

- Tube 50ml (SPL 50015)
- Serological Pippet 5ml (SPL 91005)
- Serological Pippet 10ml (SPL 91010)

2.4 Prosedur

Sel yang sudah mencapai konfluensi dibilas dengan PBS dan ditambahkan tripsin EDTA dan diinkubasi 37°C. Kemudian sel dihitung dengan hemositometer dan deseeding dalam 6 well plate. Sel dibagi kedalam 6 perlakuan sebagai berikut: 1) Control non-hypoxia; 2) Control hypoxia; 3) Control DMSO, 4) Hypoxia DMSO, 5) Hypoxia + EDK100, 6) Hypoxia + EDK25, 7) Hypoxia + Quer25, 8) Hypoxia + Quer6.25. Perlakuan control non hypoxia dan control DMSO diinkubasi dalam incubator 37oC, CO2 5% selama 2 hari. Perlakuan hypoxia diinduksi diinkubasi dalam incubator 37oC, CO2 5% selama 2 hari dengan kadar O2 2%. Setelah diinduksi dengan hypoxia, sel diberi perlakuan dengan senyawa dan ekstrak sesuai perlakuan dan diinkubasi kembali dalam kondisi Hypoxia selama 24 jam. Setelah diinkubasi, CM dikoleksi dan sel dihoverst menggunakan teknik tripsinasi.

III. UJI ELISA FGF-2

3.1 Prinsip

Kit ELISA ini menggunakan prinsip Sandwich-ELISA. Mikroplate ELISA yang disediakan dalam kit ini telah dicoating dengan antibodi spesifik human bFGF/FGF2 ke dalam 96 well-plate. Standar dan sampel ditambahkan ke mikroplate ELISA dan dikombinasikan dengan antibodi spesifik. Kemudian antibodi spesifik deteksi biotinylated untuk konjugat bFGF/FGF2 dan Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) ditambahkan berturut-turut untuk setiap mikro plate lalu diinkubasi. Masing-masing tahapan dilakukan pencucian dengan washing buffer. Larutan substrat ditambahkan ke setiap well plate. Hanya well yang mengandung bFGF/FGF2, antibodi pendeteksi biotinylated dan konjugasi Avidin-HRP yang akan berwarna biru. Reaksi enzim-substrat diakhiri oleh penambahan stop solution dan berubah warnanya menjadi kuning. Optical Density (OD) diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 450

nm \pm 2 nm. Nilai OD sebanding dengan konsentrasi bFGF/FGF2. Anda dapat menghitung konsentrasi IL-10 dalam sampel dengan membandingkan OD sampel ke kurva standar.

3.2 Bahan dan Consumable

- Human bFGF/FGF2 ELISA Kit (E-EL-H0483)
Yang berisi: Micro ELISA plate, Reference standard, Biotinylated Detection Ab, HRP Conjugate solution, Biotinylated detection Ab Diluent, Wash Buffer, Substrate dan Stop solution
- Akuabides
- Sampel Ekstrak Daun Karet (0140718-C1017)
- Senyawa Quercitrin (Chengdu, BP1192)

3.3 Alat dan Consumable

- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
- Vortex (Wisemix)
- Incubator (Esco Class II)
- Tips Blue, yellow, white (Neptune)
- Mikropipet (100-1000 μ L, 10-100 μ L, 1-10 μ L)
- Mikropipet Tips (100-1000 μ L, 10-100 μ L, 1-10 μ L).

3.4 Konsentrasi Uji

Standart working solution : 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 0 (μ g/ml).

3.5 Cara Kerja

Larutan standart dimasukkan ke dalam well masing-masing dua kali sebanyak 100 μ L. Tutup dengan seal lalu inkubasi selama 90 menit pada 37 oC. Selanjutnya buang larutan lalu langsung tambahkan larutan Biotinylated Detection Ab sebanyak 100 μ L/well, tutup lalu inkubasi selama 1 jam pada 37 oC. Buang larutan lalu cuci dengan Wash Buffer, tunggu

1-2 menit lalu buang. Ulangi tiga kali. Setelah bersih, tambahkan 100 μL /well HRP Conjugate lalu tutup plate dan inkubasi pada 37 oC selama 30 menit. Cuci plate sebanyak lima kali. Lalu tambahkan 90 μL /well Substrat lalu inkubasi 15 menit pada 37 oC. Tunggu sampai berubah Larutan standart dimasukkan ke dalam well masing-masing dua kali sebanyak 100 μL . Tutup dengan *seal* lalu inkubasi selama 90 menit pada 37 °C. Selanjutnya buang larutan lalu langsung tambahkan larutan *Biotinylated Detection Ab* sebanyak 100 μL /well, tutup lalu inkubasi selama 1 jam pada 37 °C. Buang larutan lalu cuci dengan *Wash Buffer*, tunggu

1-2 menit lalu buang. Ulangi tiga kali. Setelah bersih, tambahkan 100 μL /well *HRP Conjugate* lalu tutup *plate* dan inkubasi pada 37 °C selama 30 menit. Cuci plate sebanyak lima kali. Lalu tambahkan 90 μL /well Substrat lalu inkubasi 15 menit pada 37 °C. Tunggu sampai berubah warna, jika belum tambahkan waktu inkubasi tetapi tidak sampai 30 menit.

Tambahkan 50 μL /well *stop solution* pada setiap well. Ukur *Optical Density* (OD) pada 450 nm menggunakan spektrofotometer. h warna, jika belum tambahkan waktu inkubasi tetapi tidak sampai 30 menit.

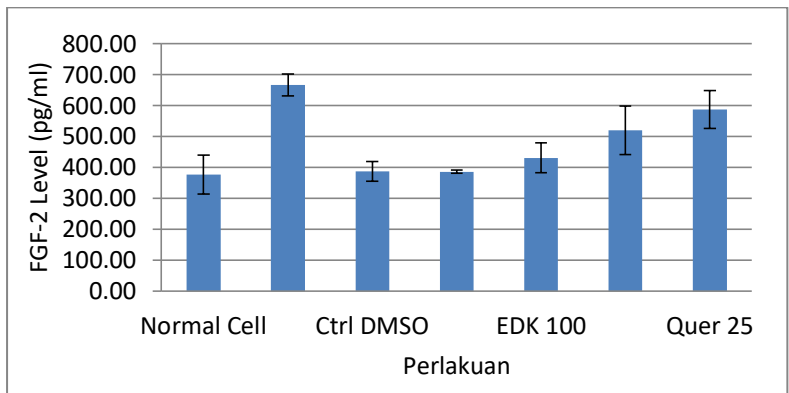
Tambahkan 50 μL /well *stop solution* pada setiap well. Ukur *Optical Density* (OD) pada 450 nm menggunakan spektrofotometer.

3.6 Hasil Uji

Tabel 3.1 Konsentrasi protein FGF-2 pada sel EA.hy 926 setelah diinduksi ekstrak daun karet dan quercitrin.

Sampel	Konsentrasi FGF-2 (pg/mL)	Konsentrasi FGF-2 (pg/mg protein)
Kontrol sel normal	376.52 ± 63.02a	2398.19 ± 401.38a
Kontrol Hypoxia	666.82 ± 36.10d	4302.05 ± 232.88c
Kontrol DMSO	387.91 ± 32.12ab	2502.64 ± 207.25a
EDK 25 µg/mL	386.48 ± 4.59ab	2647.16 ± 31.47ab
EDK 100 µg/mL	431.48 ± 49.11ab	2765.93 ± 314.82ab
Quercitrin 6.25 µg/mL	521.00 ± 78.46bc	3544.22 ± 533.71bc
Quercitrin 25 µg/mL	587.70 ± 61.86cd	4197.84 ± 441.88c

*Data disajikan dalam rata-rata ± SD. Tanda superskrip yang berbeda (a,b,c,d) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) Tukey HSD post hoc test.



Gambar 3.1 Konsentrasi protein FGF-2 pada sel EA.hy 926 setelah diinduksi ekstrak daun karet dan quercitrin.

IV. UJI ELISA IL-10

4.1 Prinsip

Kit ELISA ini menggunakan prinsip Sandwich-ELISA. Mikroplate ELISA yang disediakan dalam kit ini telah dicoating dengan antibodi spesifik human IL-10 ke dalam 96 well-plate. Standar dan sampel ditambahkan ke mikroplate ELISA dan dikombinasikan dengan antibodi spesifik. Kemudian antibodi spesifik deteksi biotinylated untuk konjugat IL-10 dan Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) ditambahkan berturut-turut untuk setiap mikro plate lalu diinkubasi. Masing-masing tahapan dilakukan pencucian dengan washing buffer. Larutan substrat ditambahkan ke setiap well plate. Hanya well yang mengandung TNF- α , antibodi pendeteksi biotinylated dan konjugasi Avidin-HRP yang akan berwarna biru. Reaksi enzim-substrat diakhiri oleh penambahan stop solution dan berubah warnanya menjadi kuning. Optical Density (OD) diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 450 nm \pm 2 nm. Nilai OD sebanding dengan konsentrasi IL-10. Anda dapat menghitung konsentrasi IL-10 dalam sampel dengan membandingkan OD sampel ke kurva standar.

4.2 Bahan

- Human IL-10 ELISA Kit (430601)
- Yang berisi: Washing Buffer, Standart solution, Biotinylated Detetion Ab, HRP Conjugate solution, Substrate dan Stop solution
-
- Akuabides
- Sampel Ekstrak Daun Karet (0140718-C1017)
- Senyawa Quercitrin (Chengdu, BP1192)

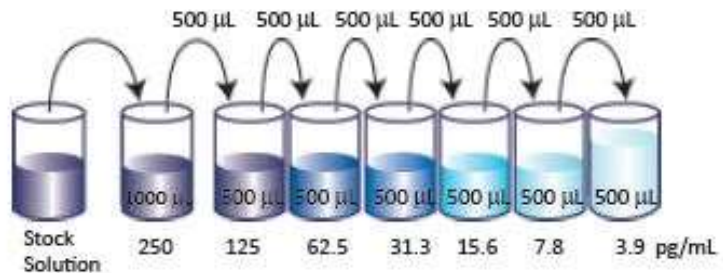
4.3 Alat dan Consumable

- Coated Microplate (E-EL-M0049)
- Microplate seal (E-EL-M0049)
- Micropipette (Finnpipette F2)

- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
- Tips Blue, yellow, white (Neptune)

4.4 Konsentrasi Uji

Standard working solution : 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 0 (pg/mL).



a. Preparasi Reagen

- Reference standard: vial reference standard disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 x g. Ditambahkan 1 ml reference standard & sample diluent. Dibiarkan selama 10 menit lalu rekonstitusi hingga tercampur sempurna. Rekonstitusi ini menghasilkan konsentrasi 250 µg/mL (larutan stok). Lalu buat seri pengenceran dari 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 0 pg/mL.
- Wash Buffer: Dilarutkan sebanyak 1,92 ml concentrated wash buffer dengan 46,08 ml aquabides untuk menghasilkan 48 ml wash buffer.
- *Biotinylated detection ab working solution*: Dilarutkan sebanyak 0,03 ml *concentrated biotinylated detection ab* dengan 2,97 ml *biotinylated detection ab diluent* untuk

menghasilkan 3 ml *biotinylated detection antibody working solution*.

- *Concentrated HRP conjugate working solution*: Dilarutkan sebanyak 0,03 ml *concentrated HRP conjugate* dengan 2,97 ml *concentrated HRP conjugate diluent* untuk menghasilkan 3 ml *concentrated HRP conjugate working solution*.

b. Cara Kerja

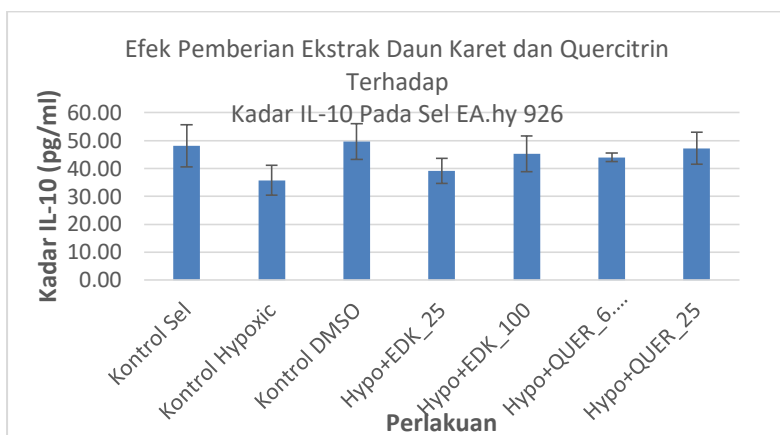
- Larutan standar dimasukkan ke dalam well masing-masing dua kali sebanyak 100 μ L. Tutup dengan seal lalu inkubasi selama 90 menit pada 37 oC. Selanjutnya buang larutan lalu langsung tambahkan larutan Biotinylated Detection Ab sebanyak 100 μ L/well, tutup lalu inkubasi selama 1 jam pada 37 oC. Buang larutan lalu cuci dengan Wash
- Buffer, tunggu 1-2 menit lalu buang. Ulangi tiga kali. Setelah bersih, tambahkan 100 μ L/well HRP Conjugate lalu tutup plate dan inkubasi pada 37 oC selama 30 menit. Cuci plate sebanyak lima kali. Lalu tambahkan 90 μ L/well Substrat lalu inkubasi 15 menit pada 37 oC. Tunggu sampai berubah warna, jika belum tambahkan waktu inkubasi tetapi tidak sampai 30 menit. Tambahkan 50 μ L/well stop solution pada setiap well. Ukur Optical Density (OD) pada 450 nm menggunakan spektrofotometer.

4.5 Hasil Uji

Tabel 4.1 Konsentrasi protein IL-10 pada sel EA.hy 926 setelah diinduksi ekstrak daun karet dan quercitrin.

Sampel	Konsentrasi IL-10 (pg/mL)	Konsentrasi IL-10 (pg/mg protein)
Kontrol sel	48.11 ± 7.57 ^a	306.41 ± 48.19 ^a
Kontrol Hypoxic	35.76 ± 5.35 ^a	227.76 ± 34.08 ^a
Kontrol DMSO	49.64 ± 6.37 ^a	316.16 ± 40.55 ^a
Hypo+EDK 25 µg/mL	39.15 ± 4.46 ^a	249.34 ± 28.43 ^a
Hypo+EDK 100 µg/mL	45.22 ± 6.40 ^a	288.02 ± 40.75 ^a
Hypo+Quer 6.25 µg/mL	43.96 ± 1.50 ^a	279.97 ± 9.56 ^a
Hypo+Quer 25 µg/mL	47.18 ± 5.74 ^a	300.51 ± 36.54 ^a

Data disajikan dalam rata-rata ± SD. Tanda superskrip yang berbeda (a,b, c, d) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) Tukey HSD post hoc test.



Gambar 4.1 Konsentrasi protein IL-10 pada Sel EA.hy 926 setelah diinduksi ekstrak daun karet dan quercitrin.

V. UJI ELISA TNF-a

6.1 Prinsip

Kit ELISA ini menggunakan prinsip Sandwich-ELISA. Mikroplate ELISA yang disediakan dalam kit ini telah dicoating sebelumnya dengan antibodi khusus untuk human TNF-a. Standar atau sampel ditambahkan ke mikroplate ELISA dan dikombinasikan dengan antibodi spesifik. Kemudian antibodi deteksi biotinylated spesifik untuk konjugasi Mouse IL-1 β dan Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) ditambahkan berturut-turut untuk setiap well dalam

mikroplatelalu diinkubasi. Komponen yang tidak terikat dicuci menggunakan washing buffer. Solusi substrat ditambahkan ke setiap well mikroplate. Hanya well-plate yang mengandung Mouse IL-1 β , antibodi pendeteksi biotinylated dan konjugat Avidin-HRP yang akan berwarna biru. Reaksi enzim-substrat diakhiri oleh penambahan stop solution dan warnanya menjadi kuning. Optical Density (OD) diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 450 nm \pm 2 nm. Nilai OD sebanding dengan konsentrasi TNF-a. Konsentrasi Mouse IL-1 β dalam sampel dihitung dengan membandingkan OD sampel ke kurva standar.

6.2 Bahan dan Consumable

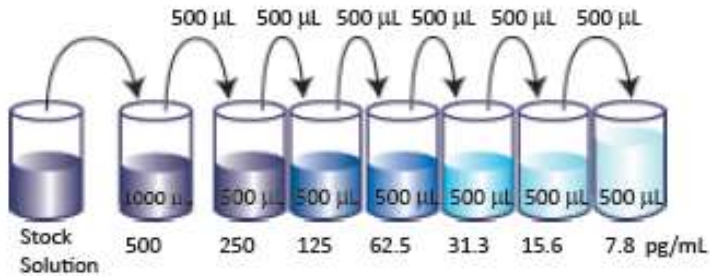
- Human TNF-a ELISA Kit (430204)
- Yang berisi: Washing Buffer, Standart solution, Biotinylated Detetion Ab, HRP Conjugate solution, Substrat dan Stop solution
- Akuabides
- Sampel Ekstrak Daun Karet (0140718-C1017)
- Senyawa Quercitrin (Chengdu, BP1192)

6.3 Alat dan Consumable

- Coated Microplate (E-EL-M0037)
- Microplate seal (E-EL-M0037)
- Micropipette (Finnpipette F2)
- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
- Tips Blue, yellow, white (Neptune)

6.4 Konsentrasi Uji

Working solution : 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 , 7.81 dan 0 ($\mu\text{g/mL}$).



6.5 Cara Kerja

a. Preparasi Reagen

- Reference standard: vial reference standard disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 x g. Ditambahkan 1 ml reference standard & sample diluent. Dibiarkan selama 10 menit lalu rekonstitusi hingga tercampur sempurna. Rekonstitusi ini menghasilkan konsentrasi 500 µg/mL (larutan stok). Lalu buat seri pengenceran dari 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 , 7.81 dan 0 pg/mL.
- Wash Buffer: Dilarutkan sebanyak 1,92 ml concentrated wash buffer dengan 46,08 ml aquabides untuk menghasilkan 48 ml wash buffer.
- Biotinylated detection ab working solution: Dilarutkan sebanyak 0,03 ml concentrated biotinylated detection ab dengan 2,97 ml biotinylated detection ab diluent untuk menghasilkan 3 ml biotinylated detection ab working solution.
- Concentrated HRP conjugate working solution: Dilarutkan sebanyak 0,03 ml concentrated HRP conjugate dengan 2,97 ml concentrated HRP conjugate diluent untuk menghasilkan 3 ml concentrated HRP conjugate working solution.

a.

6.6 Cara Kerja

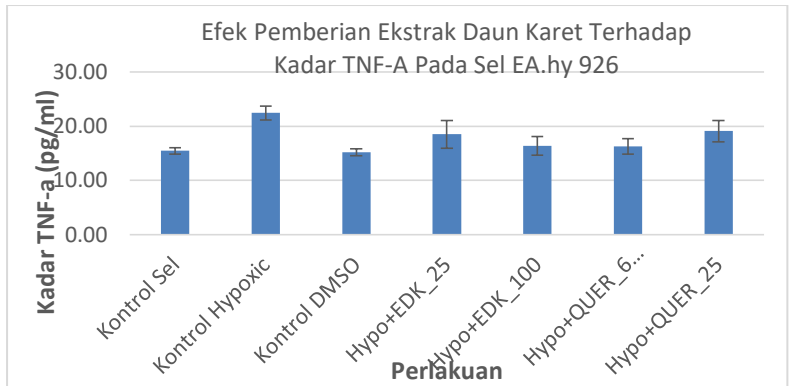
Larutan standar dimasukkan ke dalam well masing-masing dua kali sebanyak 100 μL . Tutup dengan seal lalu inkubasi selama 90 menit pada 37 oC. Selanjutnya buang larutan lalu langsung tambahkan larutan Biotinylated Detection Ab sebanyak 100 $\mu\text{L}/\text{well}$, tutup lalu inkubasi selama 1 jam pada 37 oC. Buang larutan lalu cuci dengan Wash Buffer, tunggu 1-2 menit lalu buang. Ulangi tiga kali. Setelah bersih, tambahkan 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ HRP Conjugate lalu tutup plate dan inkubasi pada 37 oC selama 30 menit. Cuci plate sebanyak lima kali. Lalu tambahkan 90 $\mu\text{L}/\text{well}$ Substrat lalu inkubasi 15 menit pada 37 oC. Tunggu sampai berubah warna, jika belum tambahkan waktu inkubasi tetapi tidak sampai 30 menit. Tambahkan 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ stop solution pada setiap well. Ukur Optical Density (OD) pada 450 nm menggunakan spektrofotometer.

6.7 Hasil Uji

Tabel 5.1 Konsentrasi protein TNF-a pada sel EA.hy 926 setelah diinduksi ekstrak daun karet dan quercitrin.

Sampel	Konsentrasi TNF-a (pg/mL)	Konsentrasi TNF-a (pg/mg protein)
Kontrol sel	15.47 \pm 0.59 ^a	98.51 \pm 3.73 ^a
Kontrol Hypoxic	22.43 \pm 1.27 ^b	144.73 \pm 8.17 ^c
Kontrol DMSO	15.17 \pm 0.65 ^a	97.85 \pm 4.20 ^a
Hypo+EDK 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	18.50 \pm 2.55 ^{ab}	126.71 \pm 17.49 ^{abc}
Hypo+EDK 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	16.40 \pm 1.74 ^a	105.13 \pm 11.18 ^a
Hypo+Quer 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	16.27 \pm 1.39 ^a	110.66 \pm 9.43 ^{ab}
Hypo+Quer 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	19.10 \pm 1.95 ^{ab}	136.43 \pm 13.94 ^{bc}

*Data disajikan dalam rata-rata \pm SD. Tanda superskrip yang berbeda (a, ab, bc, abc, b, c) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) Tukey HSD post hoc test.



Gambar 5.1 Konsentrasi TNF-a pada sel EA.hy 926 yang diinduksi ekstrak daun karet dan quercitrin.

6.8 Kesimpulan

Hasil uji inflamasi menunjukkan bahwa efek EDK dan Quercitrin terhadap sel EA.hy926 pada protein FGF-2 yang baik yaitu EDK pada konsentrasi 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan Quercitrin 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pada TNF- α yang baik yaitu EDK pada konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan Quercitrin 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sedangkan efek EDK dan Quercitrin terhadap protein IL-10 tidak mengalami penurunan marker.

**UJI KADAR *Reactive Oxygen Spesies*
(ROS) SEL Ea.hy926 DIINDUKSI
HYPOXIA DAN DITREATMENT
EKSTRAK DAUN KARET DAN
QUERCITRI**

F. Uji Kadar *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) sel Ea.hy926 diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitri

I. Kultur Sel

1.1 Prinsip

Kultur sel primer mengacu pada tahap kultur setelah sel-sel diisolasi dari jaringan dan berkembang biak di bawah kondisi yang sesuai sampai mereka menempati semua substrat yang tersedia (confluent). Pada tahap ini, sel-sel harus disubkultur dengan memindahkannya ke flask baru dengan media pertumbuhan baru untuk menyediakan lebih banyak ruang untuk pertumbuhan yang berkelanjutan.

Setelah subkultur pertama, kultur sel primer menjadi cell line. Cell line yang berasal dari kultur primer memiliki rentang hidup yang terbatas, pertumbuhan tinggi dan menghasilkan tingkat keseragaman genotipe dan fenotipik dalam populasi.

Subkultur, juga disebut sebagai passaging, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan perbanyakannya lebih lanjut dari cell line. Pertumbuhan sel dalam kultur berlangsung dari fase lag setelah penanaman sel ke fase log, di mana sel berproliferasi secara eksponensial. Ketika sel-sel dalam kultur menempati semua substrat yang tersedia dan tidak memiliki ruang tersisa untuk ekspansi, atau ketika sel-sel dalam kultur suspensi melebihi kapasitas media untuk mendukung pertumbuhan lebih lanjut, proliferasi sel sangat berkurang atau berhenti sepenuhnya. Untuk menjaga kultur pada kerapatan optimal untuk pertumbuhan sel lanjutan dan untuk merangsang proliferasi lebih lanjut, kultur harus ganti dengan medium baru.

1.2 Bahan dan Consumable

- Dulbecco's modified Eagle's medium/DMEM High-glucose (Biowest, L0104-500)
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S1810-5000)
- 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM) (Biowest, L0010-100)
- PBS 1x (Biowest X0515-500)
- Nanomycopolitine (Biowest, LX16-100)

- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Amphotericine B (Biowest, L0009-050)
- Sel Ea.hy926 (ATCC CRL-2922)

1.3 Alat dan Consumable

- Pippet Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO2 Incubator (Thermo IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)
- Ultrasonic cleaner (Digital Pro, JP-020S)
- Flask T25 (Corning 430168)
- Centrifuge Tube 15ml (SPL 50015)
- Tube 50ml (SPL 50015)
- Serological Pippet 5ml (SPL 91005)
- Serological Pippet 10ml (SPL 91010)

1.4 Prosedur

Sel diambil dari tanki nitrogen cair (-196oC), selanjutnya dicairkan di dalam Ultrasonic cleaner dengan suhu 37oC selama 2 menit hingga mencair. Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 ml yang berisi medium kultur 4 ml. Sel disentrifugasi pada kecepatan 1600rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, kemudian pellet diresuspensi dengan 5 ml medium kultur. Suspensi sel dimasukkan pada flask T25. Sel diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂, bersuhu 37°C. Sel yang telah tumbuh pada flask 25 diamati di bawah mikroskop inverted hingga mencapai confluent sekitar 70-80%. Medium kultur dibuang kemudian ditambahkan medium kultur baru sebanyak 2 ml. Sel yang menempel dilepaskan dengan bantuan scrapper. Dilakukan pengecekan menggunakan mikroskop inverted guna memastikan sel sudah benar-benar terlepas dari dasar flask. Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 ml. Disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit.

Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 1 ml medium kultur. Suspensi sel dibagi ke dalam 2 buah flask T25. Inkubasi sel dalam inkubator CO₂ 5%, suhu 37°C. Selama

perawatan sel, medium pertumbuhan diganti atau ditambah setiap 2 – 3 hari sekali.

1.5 Hasil Kultur Sel



Gambar 1. Morfologi Sel Ea.hy926 F. Uji Kadar Reactive Oxygen Spesies (ROS) sel Ea.hy926 diinduksi hypoxia dan ditreatment ekstrak daun karet dan quercitri.

II. Uji Kadar ROS-DCFDA

2.1 Prinsip

DCFDA – Cellular Reaction Oxygen Species Detection Assay Kit (ab113851) merupakan reagent permanen 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, juga dikenal sebagai H2DCFDA), dikenal juga sebagai pewarna fluorogenik yang menghitung hidroksil, peroksid, dan reactive oxygen species lainnya (ROS) di dalam aktivitas sel. Setelah didifusi ke dalam sel, DCFDA/H2DCFDA di-deasetilasi oleh esterase selular menjadi senyawa non-flourosensi, yang kemudian dioksidasi oleh ROS menjadi 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF). DCF merupakan senyawa pedaran yang dapat dideteksi dengan spektroskopi fluoresensi dengan spectrum eksitasi dan emisi maksimum masing-masing 495nm dan 529nm.

2.2 Bahan

- DCFDA Cellular ROS Detection Kit (Abcam, ab113851) terdiri dari TBHP, H2DCFDA dan buffer DCFDA

- DMEM High Glucose (Biowest, L0104-500)
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S1810-5000)
- 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM) (Biowest, L0010-100)
- PBS 1x (Biowest X0515-500)
- Nanomycopulitine (Biowest, LX16-100)
- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Amphotericine B (Biowest, L0009-050)
- Ekstrak Daun karet (0140718-C1017)
- Quercitrin (Chengdu, BP1192)

2.3 Alat dan Consumable

- Pippet Gun
- Biosafety Cabinet (Esco Class II)
- CO2 Incubator (Thermo, IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)
- Waterbath (Hanyang)
- Centrifuge Tube 15ml (TPP, 91015)
- Centrifuge Tube 50ml (TPP, 91050)
- Serological Pippet 5ml (SPL, 91005)
- Serological Pippet 10ml (SPL, 91010)
- Mikropippet (100-1000 μ L, 10-100 μ L, 1-10 μ L)
- Mikropippet Tips (100-1000 μ L, 10-100 μ L, 1-10 μ L)
- 5ml Falcon Round-Bottom Tube (Corning, 352024)
- Flowcytometer (Miltenyi Biotec).

2.4 Konsentrasi Uji

Sampel: Ekstrak Daun Karet, Quercitrin

Konsentrasi uji: Sampel ekstrak daun karet, Quercitrin

a. Working Solution : 1000; 250; 62.5; (μ g/mL)

b. Final Concentration : 100; 25; 6.25; (μ g/mL)

2.5 Cara Kerja

a. Induksi APAP dan EDSM

- a. Masing-masing sel lini EA.hy926 yang telah mencapai confluent 80% ditripsin dengan 1-2 ml Trypsin-EDTA 0.25% lalu diinkubasi selama 2-3 menit pada suhu 37°C, 5% CO₂.

- b. Setelah sel terlepas dari flask (dettach), complete growth medium ditambahkan
- c. Suspensi sel dipindahkan ke dalam Centrifuge tube 15 ml kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit
- d. Supernatan dibuang dan pelet sel diresuspensi dengan complete growth medium.
- e. Sel dihitung jumlahnya dengan haemocytometer dengan rumus penghitungan:

Rumus perhitungan sel:

$$\frac{\text{Jumlah sel terhitung}}{4} \times 20000 \text{ (konstanta pengenceran)} \times \text{volume suspensi sel}$$

- f. Sel ditanam di 6-well-plate dengan kepadatan 150.000 sel/well lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂.
- g. Setelah diinkubasi, medium dibuang dan diinduksi Hypoxia. Sel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂ dengan konsentrasi O₂ 2%.
- h. Setelah diinduksi APAP, sel diinduksi dengan ekstrak sirih merah dan eugenol dengan perincian sebagai berikut:
- i. Setelah diinduksi Hypoxia, sel diinduksi dengan ekstrak daun karet dan quercetrin dengan perincian sebagai berikut:
 - 1) Control non-hypoxia;
 - 2) Control hypoxia;
 - 3) Control DMSO;
 - 4) Hypoxia DMSO;
 - 5) Hypoxia + EDK100;
 - 6) Hypoxia + EDK25;
 - 7) Hypoxia + Quer25;
 - 8) Hypoxia + Quer6.25.

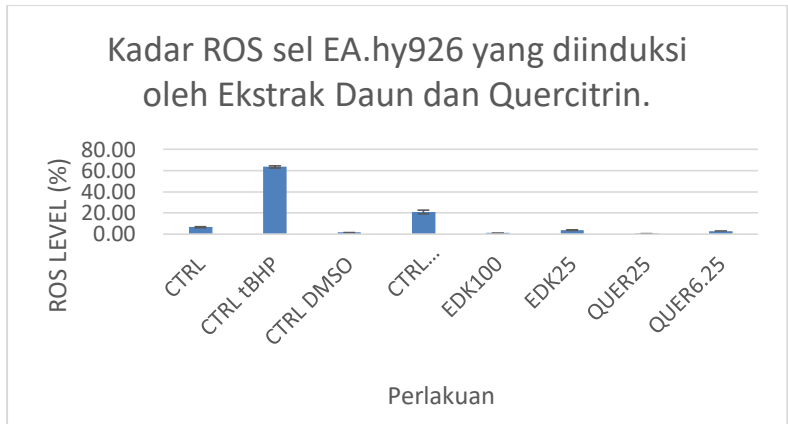
Sel diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂ untuk kontrol normoxia dan diinkubasi pada kondisi hypoxia untuk perlakuan hypoxia.

- b. Pengukuran kadar ROS.
 - a. Sel dimasukkan kedalam FACS round tube sebanyak 250000 sel/0.5ml.
 - b. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit.
 - c. Supernatant dibuang, pelet sel diresuspensi menggunakan buffer DCFDA 1x + 10% FBS.
 - d. 20 μ M DCFDA dimasukkan kedalam suspensi sel kemudian diinkubasi selama 45 menit di dalam ruang gelap, pada suhu 37°C, 5% CO₂.
 - e. Untuk kontrol positif sel diinkubasi dengan 50uM TBHP, untuk perlakuan ekstrak dan senyawa, sel diinduksi dengan EDK dan Quercetrin sesuai dengan konsentrasi perlakuan selama 4 Jam.
 - f. Kadar ROS diukur menggunakan flowcytometri.

2.6 Hasil Uji

Sampel	Kadar ROS-DCFDA (%)
Kontrol	6.61 \pm 0.44 ^d
Kontrol tBHP	63.56 \pm 1.08 ^f
Kontrol DMSO	1.60 \pm 0.01 ^{ab}
Kontrol Hypoxia	20.97 \pm 1.69 ^e
EDK 100 μ g/mL	1.01 \pm 0.04 ^{ab}
EDK 25 μ g/mL	3.79 \pm 0.19 ^c
Quer 25 μ g/mL	0.48 \pm 0.05 ^a
Quer 6.25 μ g/mL	2.91 \pm 0.10 ^{bc}

*Data disajikan dalam rata-rata \pm SD. Tanda superskrip yang berbeda (a, b, c, d) menunjukkan perbedaan yang signifikan (p <0,05) Tukey HSD post hoc test.



Gambar 7.1 Perlakuan pada sel EA.hy 926 yang diinduksi ekstrak daun karet dan quercitrin.

2.7 Kesimpulan.

Hasil uji ROS menunjukkan bahwa Hypoxia meningkatkan kadar ROS. EDK dan Quercitrin pada konsentrasi EDK 25 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ dan Quercitrin 25 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ dapat menurunkan kadar ROS pada sel EA.hy926 yang diberi perlakuan hypoxia.

DAFTAR PUSTAKA

Laksmiawati DR, Prasanti AP, Larasinta N, Syauta GA, Hilda R, Ramadaniati HU, Widyastuti A, Karami N, Afni M, Rihibiha DD, Kusuma HSW, Widowati W. Anti-Inflammatory Potential of Gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and Soursoup (*Annona muricata* L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). *J Nat Remedies* 2016;16(2):73-81

Novilla A, Djamhuri DS, Nurhayati B, Rihibiha DD, Afifah E, Widowati W. Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechingallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7(11): 1005–1009.

Cell Titer 96 Aqueous One solution cell proliferation assay Technical Bulletin. MTS Cell Proliferation Assay Kit (Colorimetric). Abcam Discover More. 2009.

Laksmiawati DR, Prasanti AP, Larasinta N, Syauta GA, Hilda R, Ramadaniati HU, Widyastuti A, Karami N, Afni M, Rihibiha DD, Kusuma HSW, Widowati W. Anti-Inflammatory Potential of Gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and Soursoup (*Annona muricata* L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). *J Nat Remedies* 2016;16(2):73-81

Novilla A, Djamhuri DS, Nurhayati B, Rihibiha DD, Afifah E, Widowati W. Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechingallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7(11): 1005–1009.

Laksmiawati DR, Prasanti AP, Larasinta N, Syauta GA, Hilda R, Ramadaniati HU, Widyastuti A, Karami N, Afni M, Rihibiha DD, Kusuma HSW, Widowati W. Anti-Inflammatory Potential of Gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and Soursoup (*Annona*

muricata L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). *J Nat Remedies* 2016;16(2):73-81

Novilla A, Djamhuri DS, Nurhayati B, Rihibiha DD, Afifah E, Widowati W. Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechingallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7(11): 1005–1009.

Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 1976;72: 248–254.

Compton SJ, Jones CG, Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Anal Biochem* 1985;151:369–374

Fanger B, Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents, *Anal Biochem* 1987;162:11–17

Fazekas de St. Groth S et al., Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips, *Biochim Biophys Acta* 1963;71:377–391

Sedmak JJ, Grossberg SE, A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250, *Anal Biochem* 1977; 79:544–552.

Spector T. Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 micrograms of protein, *Anal Biochem* 1978;86:142–146

Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Rev Food Sci Food Safety* 2004;3(1):21-33.

Pryor WA, Stanley JP, Blair E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids*. 1976;11(5):370-9.

Winarsi H. *Antioksidan alami dan radikal*. Kanisius; 2005

Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry*. 1987 Jan 1;22(2):111-80.

Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2004 Jan;3(1):21-33.

Muchtadi D. *Antioksidan dan Kiat Sehat di Usia Produktif*. Bandung: Alfabeta. 2013;83.

Laksmiawati DR, Prasanti AP, Larasinta N, Syauta GA, Hilda R, Ramadaniati HU, Widyastuti A, Karami N, Afni M, Rihibiha DD, Kusuma HSW, Widowati W. Anti-Inflammatory potential of gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and soursoup (*Annona muricata* L) extracts in LPS stimulated-macrophage cell (RAW264.7). *J Nat Remedies* 2016;16(2):73-81

Novilla A, Djamhuri DS, Nurhayati B, Rihibiha DD, Afifah E, Widowati W. Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechingallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7(11): 1005–1009.

Rusmana D, Elisabeth M, Widowati W, Fauziah N, Maesaroh M. Inhibition of inflammatory agent production by ethanol extract and eugenol of *Syzygium aromaticum* (L.) flower bud (Clove) in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. *Res J Med Plant* 2015;9(6): 264-274.

Widowati W, Darsono L, Suherman J, Fauziah N, Maesaroh M, Erawijantari PE. Anti-inflammatory effect of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) peel extract and its compounds in LPS-induced RAW264.7 cells. *Nat Product Sci* 2016; 22(3):147-153

Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp* 2011;(50): 2597.

Vermes, I., Hannen, C., and Reutelingsperger, C. Flowcytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*, 2000;243:167 -190.

Laksmiawati DR, Prasanti AP, Larasinta N, Syauta GA, Hilda R, Ramadaniati HU, Widyastuti A, Karami N, Afni M, Rihibiha DD, Kusuma HSW, Widowati W. Anti-Inflammatory Potential of Gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and Soursoup (*Annona muricata* L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). *J Nat Remedies* 2016;16(2):73-81

Laksmiawati DR, Widyastuti A, Karami N, Afifah E, Rihibiha DD, Nufus H, Widowati W. Anti-inflammatory effects of *Anredera cordifolia* and *Piper crocatum* extracts on lipopolysaccharide-stimulated macrophage cell line. *Bangladesh J Pharmacol* 2017; 12: 35-40.

Novilla A, Djamhuri DS, Nurhayati B, Rihibiha DD, Afifah E, Widowati W. Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechin gallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7(11): 1005–1009.

Rusmana D, Elisabeth M, Widowati W, Fauziah N, Maesaroh M. Inhibition of Inflammatory Agent Production by Ethanol Extract and Eugenol of *Syzygium aromaticum* (L.) Flower Bud (Clove) in LPS-Stimulated Raw 264.7 Cells. *Res J Med Plant* 2015. 9 (6): 264-274.

Hidayat M, Prahastuti S, Maesaroh M, Fauziah N, Balqis B, Widowati W. Modulation of adipogenesis-related gene expression by ethanol extracts of Detam 1 soybean and Jati belanda leaf in 3T3-L1 cells. *Bangladesh J Pharmacol* 2016; 11:697-702.

Lahrita L, Kato E, Kawabata J. Uncovering potential of Indonesian medicinal plants on glucose uptake enhancement and lipid suppression in 3T3-L1 adipocytes. *J Ethnopharmacol* 2015;168:229-236.

Khattak MMAK, Taher M, Ichwan SJA, Azahari N. Selected herbal extracts improve diabetes associated factors in 3T3-L1 adipocytes. *Proc -Soc Behavioral Sci* 2013;91:357 – 375

Laksmitawati DR, Prasanti AP, Larasinta N, Syauta GA, Hilda R, Ramadaniati HU, Widyastuti A, Karami N, Afni M, Rihibiha DD, Kusuma HSW, Widowati W. Anti-Inflammatory Potential of Gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and Soursoup (*Annona muricata* L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). *J Nat Remedies* 2016;16(2):73-81

Novilla A, Djamhuri DS, Nurhayati B, Rihibiha DD, Afifah E, Widowati W. Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechingallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7(11): 1005–1009.

zhang z, li x f, huang h, et al. cross-coupling effects of silencing of cyclooxygenase-2 (cox-2)/aggrecanase-1 and over-expressed insulin-like growth factor 1 (igf-1) in an osteoarthritis animal model. *Medical Science Monitor: Int Med J Experiment Clin Res* 2017; 23: 5302-5310.

Zhou F, Zhang W, Zhou J, et al. involvement of endoplasmic reticulum stress in formalin-induced pain is attenuated by 4-phenylbutyric acid. *J Pain Res* 2017;10: 653-662.

Zhu S Y, Li J, Bing Y T, et al. Diet induced hyperhomocysteinemia increases intestinal inflammation in an animal model of colitis. *J Crohn's Colitis* 2015.

Chen L, Shen X, Chen G, et al. A comparative study of the effects upon Lps induced macrophage RAW264.7 inflammation in vitro of the lipids of hippocampus trimaculatus leach. *J Oleo Sci* 2015; 64(12): 1273-1281.

Cheng J, Zhang L, Dai W, et al. Ghrelin ameliorates intestinal barrier dysfunction in experimental colitis by inhibiting the activation of Nuclear Factor-Kappa B. *Biochem Biophys Res Comm* 2015;458(1):140-147.

Abdel-Hafeez E H, Ahmad A K, Abdelgelil N H, et al. Immunopathological assessments of human blastocystis spp. in experimentally infected immunocompetent and immunosuppressed mice. *Parasitolog Res* 2016.

Yan Q, Xiang Y, Shuyu W, et al. PGC-1 α silencing compounds the perturbation of mitochondrial function caused by mutant SOD1 in skeletal muscle of ALS mouse model. *Frontiers Aging Neurosci* 2015.

Widowati W, Darsono L, Suherman J, Fauziah N, Maesaroh M, Erawijantari PE. Anti-inflammatory Effect of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Peel Extract and its Compounds in LPS-induced RAW264.7 Cells. *Nat Product Sci* 2016; 22(3):147-153.

Wang J, Ge B, Du C, et al. Sulfated Modification Promotes The Immunomodulatory Bioactivities Of Lyciumbarbarum Polysaccharides In Vitro[J]. *Int J Clinical Experiment Med* 2015;8(11): 20380-20390.

Zhili M, Tao H, Wen S, et al. Inhibition of hepatocyte apoptosis: an important mechanism of corn peptides attenuating liver injury induced by ethanol [J]. *Int J Mol Sci* 2015; 16(9): 22062-22080.

Laksmitawati DR, Prasanti AP, Larasinta N, Syauta GA, Hilda R, Ramadaniati HU, Widyastuti A, Karami N, Afni M, Rihibiha DD, Kusuma HSW, Widowati W. Anti-Inflammatory Potential of Gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and Soursoup (*Annona muricata* L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). *J Nat Remedies* 2016;16(2):73-81

Laksmitawati DR, Widyastuti A, Karami N, Afifah E, Rihibiha DD, Nufus H, Widowati W. Anti-inflammatory effects of *Anrederacordifolia* and *Piper crocatum* extracts on lipopolysaccharide-stimulated macrophage cell line. *Bangladesh J Pharmacol* 2017; 12: 35-40.

Novilla A, Djamhuri DS, Nurhayati B, Rihibiha DD, Afifah E, Widowati W. Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechingallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7(11): 1005–1009.

Rusmana D, Elisabeth M, Widowati W, Fauziah N, Maesaroh M. Inhibition of Inflammatory Agent Production by Ethanol Extract and Eugenol of *Syzygium aromaticum* (L.) Flower Bud (Clove) in LPS-Stimulated Raw 264.7 Cells. *Res J Med Plant* 2015. 9 (6): 264-274.

Sandhiutami NMD, Moordiani M, Laksmitawati DR, Fauziah N, Maesaroh M, Widowati W. In vitro assesment of anti-inflammatory activities of coumarin and Indonesian cassia extract in RAW264.7 murine macrophage cell line. *Iran J Basic Med Sci* 2017; 20:99-106.

Abcam, 2016. DCFDA – Cellular Reaction Oxygen Species Detection Assay Kit (ab113851) Protocol.

Widowati W, Wijaya L, Wargasetia TL, Bachtiar I, Yellianty Y, Laksmiawati DR. Antioxidant, anticancer, and apoptosis-inducing effects of Piper extracts in HeLa cells. *J Exp Integr Med* 2013;3:225-230.