

ISBN : 978-623-7911-00-5

**EFEKTIFITAS EKSTRAK
DAUN SIRIH MERAH DAN EUGENOL
TERHADAP SEL HepG2 (Induksi H₂O₂)**

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

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



**Penerbit :
UNPRI PRESS**

**EFEKTIFITAS EKSTRAK
DAUN SIRIH MERAH DAN EUGENOL
TERHADAP SEL HepG2 (Induksi H₂O₂)**

Penulis

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

Editor

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

ISBN

ISBN : 978-623-7911-00-5

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 Efektifitas Ekstrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol Terhadap Sel HepG2 (Induksi H₂O₂), berisi tentang efektifitas ekstrak daun sirih merah dan eugenol terhadap sel Kanker Hati (HepG2) yang di induksi dengan H₂O₂.

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.

Medan, Februari 2020
Penulis

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

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil uji sitotoksik EDSM dan Eugenol pada sel HepG2	6
Tabel 2. Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein TNF- α pada sel HepG2 setelah diinduksi H ₂ O ₂	16
Tabel 3. Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein IL-10 pada sel HepG2 setelah diinduksi H ₂ O ₂	19
Tabel 4. Kadar MDA pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi H ₂ O ₂	43
Tabel 5. Kadar SOD pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi H ₂ O ₂	46
Tabel 6. Kurva standar BSA	64
Tabel 7. Hasil uji Protein Total menggunakan metode Bradford.....	65
Tabel 8. Konsentrasi protein AST pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi H ₂ O ₂	67
Tabel 9. Konsentrasi protein ALT pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi H ₂ O ₂	69
Tabel 10. Konsentrasi protein LDH pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi H ₂ O ₂	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Morfologi Sel HepG2 Uji Sitotoksik Ekstrak Daun Sirih Merah dan Eugenol Terhadap Sel HepG2.....	4
Gambar 2. Viabilitas sel HepG2 setelah diinduksi EDSM dan eugenol.....	7
Gambar 3. Morfologi Sel HepG2 Uji Antiinflamasi Ekstrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol Terhadap Sel HepG2 Yang Diinduksi H ₂ O ₂ ...	11
Gambar 4. Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein TNF- α pada sel HepG2 setelah diinduksi H ₂ O ₂	16
Gambar 5. Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein IL-10 pada sel HepG2 setelah diinduksi H ₂ O ₂ ..	16
Gambar 6. Morfologi Sel HepG2 Uji Antioksidan Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) Dan Eugenol (EUG) Terhadap Sel HepG2 Yang Diinduksi H ₂ O ₂	39
Gambar 7. Aktivitas MDA Sel HepG2 yang diinduksi H ₂ O ₂ serta Perlakuan dengan Eugenol dan Ekstrak Daun Sirih Merah.....	43
Gambar 8. Aktivitas SOD oleh Sel HepG2 yang Diinduksi H ₂ O ₂ dan Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Senyawa Eugenol.....	47
Gambar 9. Morfologi Sel HepG2 Uji Apoptosis Pada Sel HepG2 Yang Diinduksi H ₂ O ₂ Dan Ditreatment Dengan Ekstrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol.....	51
Gambar 10. Morfologi Sel HepG2 Uji Hepatotoksik Ekstrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol Terhadap Sel HepG2	60
Gambar 11. Kurva standar BSA	65
Gambar 12. Kandungan AST Sel HepG2 yang diinduksi H ₂ O ₂ serta Perlakuan dengan Eugenol dan Ekstrak Daun Sirih Merah.....	68

Gambar 13. Aktivitas ALT oleh Sel HepG2 yang Diinduksi H ₂ O ₂ dan Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Senyawa Eugenol.....	70
Gambar 14. Kandungan LDH Sel HepG2 yang diinduksi H ₂ O ₂ serta Perlakuan dengan Eugenol dan Ekstrak Daun Sirih Merah	73
Gambar 15. Morfologi Sel HepG2 Uji Kadar Reactive Oxygen Species (ROS) Pada Sel HepG2 Yang Diinduksi H ₂ O ₂ Dan Ditreatment Dengan Esktrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol	78
Gambar 16. Kadar ROS pada sel HepG2 yang diinduksi H ₂ O ₂ dan diberi perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Eugenol.....	83

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK DAUN
SIRIH MERAH DAN EUGENOL
TERHADAP SEL HepG2**

A. UJI SITOTOKSIK EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH DAN EUGENOL TERHADAP SEL HepG2.

I. KULTUR SEL

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 ganti dengan medium baru.

2. Bahan dan Consumable

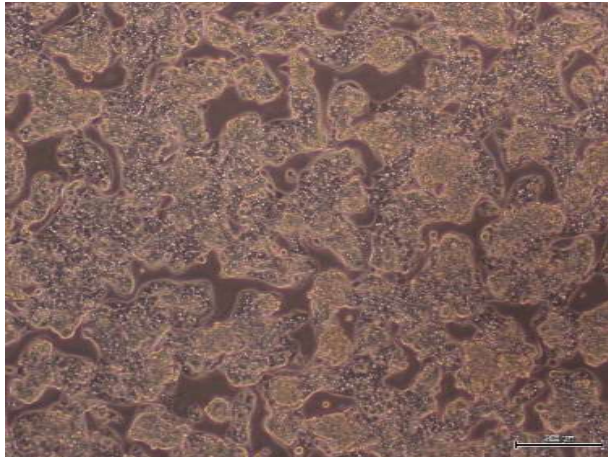
- MEM (Biowest, L0416-500)
- Medium Human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells line (ATCC, HB-8065)
- MEM (Biowest, L0416-500)
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S1810-5000)

- 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)
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)

4. Prosedur

Sel diambil dari tangki 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.



Gambar 1. Morfologi Sel HepG2 Uji Sitotoksik Ekstrak Daun Sirih Merah dan Eugenol Terhadap Sel HepG2.

II. UJI SITOTOKSIK

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-tetrozolium, 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. Bahan

- Medium Human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells line (ATCC, HB-8065)
- MTS 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) Cell Proliferation Assay Kit (Abcam, ab197010)
- DMSO 100% dan 10% (Merck, 1029521000)
- 1% nanomycopulitine (Biowest, LX16)
- Sampel ekstrak Daun Sirih Merah (0160718-C020)
- Sampel senyawa Eugenol (Sigma Aldrich, 35995-250MG)

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)
4. Konsentrasi Uji
- Working solution : 1000; 500; 250; 125; 62.25; 31.25 ($\mu\text{g/mL}$)
 - Final concentration : 100; 50; 25; 1.25; 6.25; 3.125 ($\mu\text{g/mL}$)

5. Cara Kerja

Sel dihitung dengan menggunakan hemocytometer. Sel ditanam dengan kepadatan 5×10^3 sel/well pada 96 well plate, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C , 5% CO_2 . Setelah inkubasi 24 jam, medium kultur diganti dengan medium kultur baru sebanyak $180 \mu\text{l}$ dan ditambahkan sampel $20 \mu\text{l}$ pada setiap well, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C , 5% CO_2 . Setelah perlakuan selama 24 jam, ditambahkan $20 \mu\text{l}$ MTS pada tiap well, diinkubasi selama 3jam pada suhu 37°C , 5% CO_2 . Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometri dibaca pada panjang gelombang 490nm .

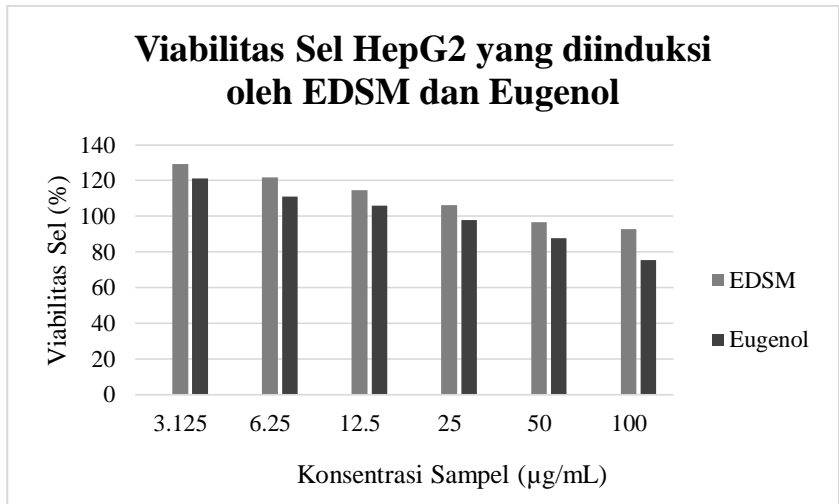
6. Hasil Uji

Tabel 1. Hasil uji sitotoksik EDSM dan Eugenol pada sel HepG2

Sampel	Rata-rata viabilitas sel (%)
Kontrol Negatif	100.00 ± 8.62^{bcde}
Kontrol DMSO	95.85 ± 2.47^{bc}
EDSM $31.25 \mu\text{g/ml}$	129.14 ± 1.29^h
EDSM $62.5 \mu\text{g/ml}$	121.63 ± 5.09^{gh}
EDSM $125 \mu\text{g/ml}$	114.62 ± 2.14^{efgh}
EDSM $250 \mu\text{g/ml}$	106.22 ± 0.80^{cdef}
EDSM $500 \mu\text{g/ml}$	96.63 ± 9.23^{bcd}
EDSM $1000 \mu\text{g/ml}$	92.90 ± 3.79^{bc}
Eug $31.25 \mu\text{g/ml}$	121.18 ± 8.17^{fgh}
Eug $62.25 \mu\text{g/ml}$	110.94 ± 0.19^{defg}

Eug 125 µg/ml	105.84 ±3.74 ^{cdef}
Eug 250 µg/ml	97.76 ±2.59 ^{bcd}
Eug 500 µg/ml	87.70±5.46 ^{ab}
Eug 1000 µg/ml	75.27±0.87 ^a

Data disajikan dalam rata-rata ±SD. Tanda superskrip yang berbeda (a,ab,bc,bcd,bcde,c,cdef,defg,efgh,fgh,gh,h) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) Tukey HSD post hoc test.



Gambar 2 Viabilitas sel HepG2 setelah diinduksi EDSM dan eugenol.

7. Kesimpulan.

Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) dan senyawa Eugenol aman pada rentang konsentrasi 62.5 – 500 µg/mL dengan rata-rata viabilitas sel mencapai >80%. Kosentrasi aman dan efektif yang digunakan untuk uji selanjutnya EDSM 25, 100 µg/mL dan eugenol 62.5 25 µg/mL.

**UJI ANTIINFLAMASI EKSTRAK DAUN
SIRIH MERAH DAN EUGENOL
TERHADAP SEL HepG2 YANG
DIINDUKSI H₂O₂**

B. UJI ANTIINFLAMASI EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH DAN EUGENOL TERHADAP SEL HepG2 YANG DIINDUKSI H₂O₂.

I. KULTUR SEL

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.

2. Bahan dan Consumable.

- MEM (Biowest, L0416-500)
- 10% Fetal bovine serum/FBS (Gibco 10270106)
- 1% Antibiotic and Antimycotic/ABAM (Gibco 1772653)
- PBS 1x (Gibco, 1740576)
- Medium Human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells line (ATCC, HB-8065)

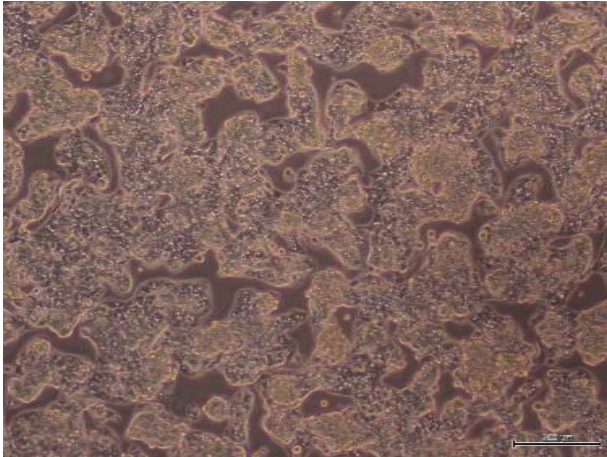
3. Alat dan Consumable

- 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)

4. Prosedur

Sel diambil dari tangki 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.



Gambar 1. Morfologi Sel HepG2 Uji Antiinflamasi Ekstrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol Terhadap Sel HepG2 Yang Diinduksi H₂O₂.

II. INDUKSI APAP, EKSTRAK, DAN SENYAWA

1. Prinsip

Sel yang sebelumnya telah dikultur kemudian diganti mediumnya diinduksi dengan H₂O₂ selama 24 jam untuk membuat model kerusakan hati. Setelah diinduksi H₂O₂, sel diinduksi langsung dengan Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) dan Eugenol. Induksi ini dilakukan untuk melihat pengaruh EDSM dan Eugenol sebagai agen hepatoprotektif menggunakan model kerusakan hati sel HepG2 induksi H₂O₂

2. Bahan dan Consumable

- Medium Kultur Sel Medium kultur sel HepG2
- Hidrogen Peroxide (H₂O₂) (Merck, 8.22287.100)
- Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) (0160718-C020)
- Senyawa Eugenol (Sigma Aldrich, 35995-250MG)

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)

4. Prosedur

Sel yang sudah mencapai konfluensi dibilas dengan PBS dan ditambahkan tripsin EDTA dan diinkubasi 37°C. Kemudian sel dihitung dengan hemositometer dan di*seeding* dalam 6 well plate. Sel diinkubasi dalam incubator 37°C, CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah sel attached, sel diinduksi menggunakan 15 mM H₂O₂ Setelah diinduksi dengan H₂O₂, sel diberi perlakuan dengan senyawa dan ekstrak sebagai berikut:

- a. Control normal cells (ditambah medium complete)
- b. Control DMSO (ditambah DMSO f.c. 1%)
- c. Control 15 mM H₂O₂
- d. 15 mM H₂O₂ + EDSM 25 ug/ml
- e. 15 mM H₂O₂ + EDSM 100 ug/ml
- f. 15 mM H₂O₂ + Eug 6.25 ug/ml
- g. 15 mM H₂O₂ + Eug 25 ug/ml

Setelah diinduksi ekstrak dan senyawa sel diinkubasi kembali selama 24 jam dalam incubator 37°C, CO₂ 5%. Setelah diinkubasi, CM dikoleksi dan sel di*haverst* menggunakan teknik trpisinasi.

III. UJI TNF- α

1. Prinsip

Analisis kadar protein pro inflamasi TNF- α menggunakan prinsip Sandwich Enzym-Linked Immune-Sorbent Assay technology. ELISA dilakukan berdasarkan reaksi antara dua antibodi monoklonal yang berbeda, salah satunya mengetahui kuantifikasi dari TNF- α . ELISA akan mendeteksi bentuk monomerik, dimerik dan Irimerik ditambah fragmen tertentu dari molekul TNF- α . Kuantifikasi TNF- α dalam cairan tubuh adalah penting untuk memprediksi stabilisasi TNF- α in vivo oleh reseptor TNF- α yang ada pada conditioned medium sehingga dapat mempengaruhi hasil suatu penyakit.

Saat dikultur pada Conditioned Medium, MSC akan mengeluarkan sebagian besar growth factor, cytokine, dan chemokine seperti interleukin(IL)-1, IL-6, IL-8, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, leukemia inhibitory factor (LIF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), stem cell factor (SCF), macrophage colony-

stimulating factor (M-CSF) fms-like tyrosine kinase-3 ligand (flk-3L), CCL2, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 2, transforming growth factor (TGF) β , CXCL1, CXCL2, CXCL6, vascular endothelial growth factor (VEGF), and Fibroblast Growth Factor-2 (FGF2).

2. Bahan

- Sel Lini Human hepatocellular carcinoma (HepG2) (ATCC, HB-8065)
- Kit ELISA TNF- α human (BioLegend Cat. No. 430204) yang berisi:
 - Human TNF- α ELISA MAXTM Capture Antibody (200X)
 - Human TNF- α ELISA MAXTM Detection Antibody (200X)
 - Human TNF- α Standard
 - Avidin-HRP (1000X)
 - Substrate Solution A
 - Substrate Solution B
 - Coating Buffer A (5X) (BioLegend, 421701)
 - Assay Diluent A (5X) (BioLegend, 421203)
 - Lot-Specific Certificate of Analysis/ELISA MAXTM Deluxe Set Protocol
- Wash Buffer (BioLegend, 421601)
- PBS (Gibco, 1740576)
- Stop *Solution* (BioLegend, 423001)

3. Alat dan Consumable

- Microwell plate (BioLegend, 423501)
- Plate Sealers (BioLegend, 423601)
- Micropipette (Finnpipette F2)

- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
 - Vortex (Wisemix)
 - Incubator (Esco)
 - Tips Blue, yellow (Neptune)
4. Konsentrasi Uji
- Working solution : 1000; 250; 62.5 ($\mu\text{g/mL}$)
 - Final concentration : 100; 25; 6.25 ($\mu\text{g/mL}$)

5. Cara Kerja

Sehari sebelum melakukan ELISA, masukan 100 μL Capture Antibody tiap well lalu tutup dengan seal dan inkubasi selama 18 jam dengan suhu 4°C. Lalu cuci plate 4 kali dengan 200 μL Wash Buffer tiap well, ketuk plate secara terbalik di atas kertas penyerap untuk menghilangkan sisanya. Kemudian tambahkan Assay Diluent A 100 μL /well, tutup dengan seal lalu inkubasi selama 1 jam diatas plate shaker.

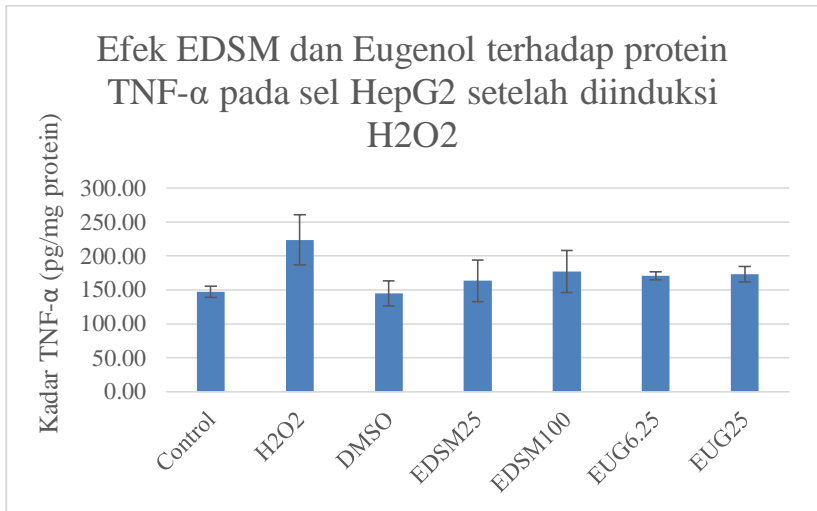
Proses inkubasi selanjutnya dilakukan dengan cara yang sama. Masukan 100 μl standar dan sampel, kemudian inkubasi selama 2 jam dengan situasi sebelumnya. Buang larutan lalu cuci sebanyak empat kali. Tambahkan 100 μl Detection Antibody, dan inkubasi selama 1 jam. Selanjutnya buang larutan lalu cuci sebanyak empat kali. Tambahkan 100 μl Avidin-HRP, inkubasi selama 30 menit.

Selanjutnya buang larutan lalu cuci dengan 200 μl wash buffer sebanyak lima kali. Tambahkan 100 μl TMB Substrate Solution, inkubasi selama 15 menit tanpa cahaya. Hentikan reaksi dengan menambahkan Stop Solution. Ukur Optical Density (OD) pada 450 nm dan 570 nm menggunakan spektrofotometer.

6. Tabel 2.1 Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein TNF- α pada sel HepG2 setelah diinduksi H₂O₂.

Sampel	Konsentrasi TNF- α (pg/mL)	Konsentrasi TNF- α (pg/mg protein)
Kontrol	21.77 \pm 1.24 ^a	147.07 \pm 8.39 ^a
H ₂ O ₂	33.10 \pm 5.48 ^b	223.65 \pm 37.01 ^b
DMSO	21.47 \pm 2.75 ^a	145.05 \pm 18.56 ^a
EDSM 25 μ g/mL	24.20 \pm 4.52 ^{ab}	163.51 \pm 30.55 ^{ab}
EDSM 100 μ g/mL	26.17 \pm 4.58 ^{ab}	176.80 \pm 30.97 ^{ab}
Eug 6.25 μ g/mL	25.27 \pm 0.85 ^{ab}	170.72 \pm 5.75 ^{ab}
Eug 25 μ g/mL	25.63 \pm 1.74 ^{ab}	173.20 \pm 11.75 ^{ab}

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



Gambar 2.1 Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein TNF- α pada sel HepG2 setelah diinduksi H₂O₂.

IV. UJI IL-10

1. Prinsip

IL-10 adalah sitokin anti-inflamasi yang menghambat sekresi sitokin proinflamasi oleh makrofag dan sel dendritik. Analisis kandungan IL-10 dalam pengujian yang dilakukan menggunakan prinsip sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Antibodi rat monoclonal Human IL-10 pertama kali dilapisi pada 96-well plate. Standar dan sampel ditambahkan ke wells, dan IL-10 berikatan dengan antibodi tangkapan yang tidak bergerak. Selanjutnya, biotinylated rat monoclonal anti-human IL-10 detection antibody ditambahkan, menghasilkan antibody-antigen-antibody “sandwich”. Avidin-Horseradish peroxidase (HRP) selanjutnya ditambahkan, diikuti oleh TMB Substrate Solution, menghasilkan warna biru sebanding dengan konsentrasi IL-10 yang ada dalam sampel. Akhirnya, Stop Solution mengubah warna reaksi dari biru menjadi kuning, dan absorbansi microwell dibaca pada 450 nm dengan pembaca lempeng mikro.

2. Bahan

- a. Sel lini *human hepatocellular carcinoma* (HepG2) (ATCC, HB-8065)
- b. Human IL-10 ELISA Kit (BioLegend, 430604)
- c. Yang berisi: Human IL-10 ELISA MAX™ Capture Antibody (200X), Human IL-10 ELISA MAX™ Detection Antibody (200X), Human IL-10 Standard, Avidin-HRP (1000X), Substrate Solution A, Substrate Solution B, Coating Buffer A (5X), Assay Diluent A (5X).
- d. Akuabides

3. Alat dan Consumable

- Microwell plates (BioLegend Cat. No. 423501)
- Plate Sealers (BioLegend Cat. No. 423601)
- Micropipette (Finnpipette F2)
- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
- Vortex (Wisemix)
- Incubator (Esco)
- Tips Blue, yellow (Neptune)

4. Konsentrasi Uji

- Working solution : 1000; 250; 62.5 ($\mu\text{g/mL}$)
- Final concentration : 100; 25; 6.25 ($\mu\text{g/mL}$)

5. Cara Kerja

Tambahkan 100 μl Capture Antibody ke dalam 48 well plate. Tutup dengan seal lalu inkubasi selama 16-18 jam pada suhu 20°C dan 8°C. Selanjutnya buang larutan lalu cuci dengan 200 μl wash buffer lakukan sebanyak 4X. Kemudian tambahkan Assay Diluent A 100 $\mu\text{L/well}$. Tutup dengan seal lalu inkubasi selama 1 jam diatas plate shaker. Masukkan 100 μl standar dan sampel, kemudian inkubasi selama 2 jam diatas plate shaker. Selanjutnya buang larutan lalu cuci dengan 200 μl wash buffer sebanyak 4X. Lalu tambahkan 100 μl Detection Antibody, dan inkubasi selama 1 jam diatas plate shaker.

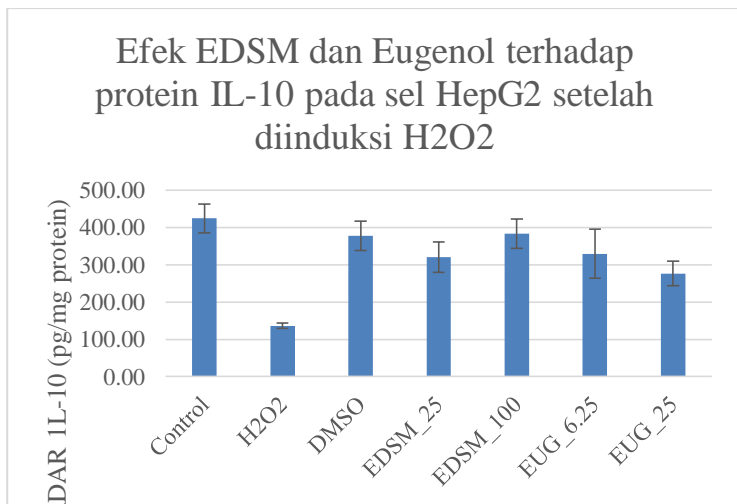
Selanjutnya buang larutan lalu cuci dengan 200 μl wash buffer sebanyak 4X. Tambahkan 100 μl Avidin-HRP, lalu inkubasi selama 30 menit diatas plate shaker. Selanjutnya buang larutan lalu cuci dengan 200 μl wash buffer sebanyak 5X. Tambahkan 100 μl TMB Substrate Solution, inkubasi selama 15 menit tanpa cahaya. Tambahkan Stop Solution. Ukur Optical Density (OD) pada 450 nm dan 570 nm menggunakan spektrofotometer.

6. Hasil Uji

Tabel 3.1 Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein IL-10 pada sel HepG2 setelah diinduksi H₂O₂.

Sampel	Konsentrasi IL-10 (pg/mL)	Konsentrasi IL-10 (pg/mg protein)
Kontrol	62.80 ± 5.7 ^b	424.31 ± 38.57 ^c
H ₂ O ₂	21.66 ± 1.13 ^a	136.25 ± 7.10 ^a
DMSO	59.22 ± 6.19 ^b	377.20 ± 39.44 ^{bc}
EDSM 25 µg/mL	47.76 ± 6.14 ^b	320.53 ± 41.20 ^{bc}
EDSM 100 µg/mL	59.02 ± 6.15 ^b	383.26 ± 39.90 ^{bc}
Eug 6.25 µg/mL	55.33 ± 11.02 ^b	329.34 ± 65.62 ^{bc}
Eug 25 µg/mL	47.52 ± 5.65 ^b	276.28 ± 32.85 ^b

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



Gambar 3.1 Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein IL-10 pada sel HepG2 setelah diinduksi H₂O₂.

7. Kesimpulan

Induksi H₂O₂ pada sel HepG2 meningkatkan ekspresi protein TNF- α dan menurunkan ekspresi protein IL-10. Pada perlakuan EDSM dan Eugenol mampu meningkatkan ekspresi protein IL-10 dan menurunkan ekspresi protein TNF- α .

**UJI EKSPRESI GEN CYPE2B1, GPX,
CYP1B1 DAN PADA SEL HepG2 YANG
DIINDUKSI H₂O₂ DAN DIBERI
PERLAKUAN EKSTRAK DAUN SIRIH
MERAH (EDSM) DAN EUGENOL (EUG).**

C. UJI EKSPRESI GEN CYPE2B1, GPX, CYP1B1 DAN PADA SEL HepG2 YANG DIINDUKSI H₂O₂ DAN DIBERI PERLAKUAN EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH (EDSM) DAN EUGENOL (EUG).

I. KULTUR SEL

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 perbanyakkan 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.

2. Bahan dan Consumable

- Kultur sel lini Human hepatocellular carcinoma (HepG2) (ATCC, HB-8065)
- PBS 1x (Gibco, 1740576)
- MEM- α (Gibco, 11995065)
- Fetal bovine serum/FBS (Gibco, 10270106)
- Antibiotic and Antimycotic/ABAM (Gibco, 1772653)
- Fungizone Amphotericin (Gibco 15290026)
- 0,1% Gentamicin (Gibco 15750060)
- 1% Nanomycopulitin (biowest L-X16)

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)

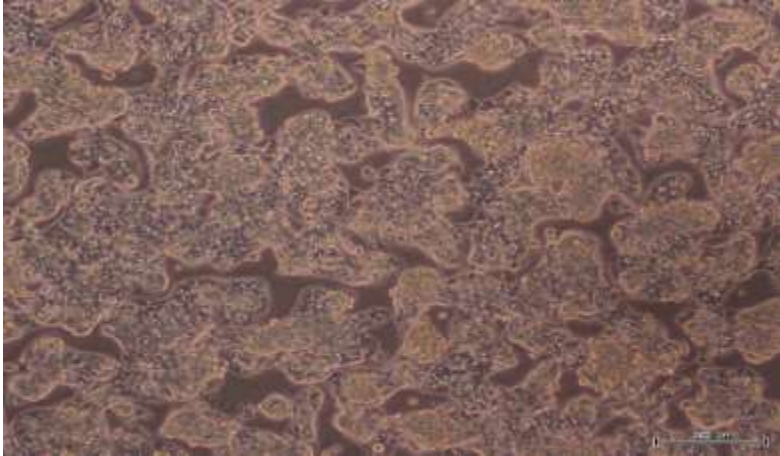
4. Prosedur

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 9

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 dibilas dengan PBS 1x.

Sel kemudian diberikan tripsin EDTA untuk melepaskan ikatan antarsel dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 menit untuk melepaskan ikatan antara sel dengan substrat polistiren di botol kultur. Tripsinisasi dihentikan dengan menambahkan 2 ml medium kultur baru, kemudian 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 hari sekali (subkultur sel).



Gambar 1. Morfologi Sel HepG2 C Uji Ekspresi Gen CYPE2B1, GPX, CYP1B1 DAN PADA SEL HepG2 Yang Diinduksi H₂O₂ Dan Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) Dan Eugenol (EUG).

II. INDUKSI APAP, EKSTRAK, DAN SENYAWA

1. Prinsip

Sel yang sebelumnya telah dikultur kemudian diganti mediumnya diinduksi dengan H₂O₂ selama 24 jam untuk membuat model kerusakan hati. Setelah diinduksi H₂O₂, sel diinduksi langsung dengan Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) dan Eugenol. Induksi ini dilakukan untuk melihat pengaruh EDSM dan Eugenol sebagai agen hepatoprotektif menggunakan model kerusakan hati sel HepG2 induksi H₂O₂.

2. Bahan dan Consumable

- Medium Kultur Sel Medium kultur sel HepG2
- Hidrogen Peroxide (H₂O₂) (Merck, 8.22287.100)
- Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) (0160718-C020)
- Senyawa Eugenol (Sigma Aldrich, 35995-250MG)

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)

4. Prosedur

Sel yang sudah mencapai konfluensi dibilas dengan PBS dan ditambahkan tripsin EDTA dan diinkubasi 37°C. Kemudian sel dihitung dengan hemositometer dan diseeding dalam 6 well plate. Sel diinkubasi dalam incubator 37°C, CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah sel attached, sel diinduksi menggunakan 15 mM H₂O₂ Setelah diinduksi dengan H₂O₂, sel diberi perlakuan dengan senyawa dan ekstrak sebagai berikut:

- a. Control normal cells (ditambah medium complete)
- b. Control DMSO (ditambah DMSO f.c. 1%)
- c. Control 15 mM H₂O₂
- d. 15 mM H₂O₂ + EDSM 25 ug/ml
- e. 15 mM H₂O₂ + EDSM 100 ug/ml
- f. 15 mM H₂O₂ + Eug 6.25 ug/ml
- g. 15 mM H₂O₂ + Eug 25 ug/ml

Setelah diinduksi ekstrak dan senyawa sel diinkubasi kembali selama 24 jam dalam incubator 37°C, CO₂ 5%. Setelah diinkubasi, CM dikoleksi dan sel *dihaverst* menggunakan teknik trpisinasi untuk diisolasi RNAny.

III. ISOLASI RNA DAN SINTESA cDNA

1. Bahan

1. cDNA dari HepG2
2. cDNA dari kontrol H₂O₂
3. cDNA dari H₂O₂ + EDSM100
4. cDNA dari H₂O₂ EDSM25
5. cDNA dari H₂O₂ Eug25
6. cDNA dari H₂O₂ Eug6.25
7. RNA Isolation Kit (Bio-Rad, 732-6820)

Komponen :

- RNA Binding Columns
- Capless wash tube 1.5 ml
- Capped microcentrifuge tube 2 ml
- Lysis Solution
- Low Stringency Wash Solution
- High Stringency Wash Solution
- Elution Solution

2. Alat

1. Pippet Gun (Thermo Scientific)
2. Biosafety Cabinet (Thermo, 1300 Series A)
3. *Refrigerated Centrifuge* (MPW-260R)
4. Falcon Tube 15ml (TPP, 91015)
5. Serological pippete 10ml (SPL, 91010)
6. Mikropipete 1-10 μ l, 10-200 μ l, 100-1000 μ l

3. Prosedur Isolasi RNA

Masukkan suspensi sel ke dalam falcon tube 15ml lalu disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 1600 rpm. Supernatant dibuang lalu 350 μ l lysis solution ditambahkan ke dalam tube yang berisi sel pelet, resuspen. 350 μ l ethanol 70% ditambahkan pada suspensi sel, resuspen. Campuran dipindahkan pada RNA binding column. Sentrifugasi selama 30

detik pada kecepatan 13000 rpm 4°C. Filtrate dibuang. 700 µl low stringency wash solution ditambahkan pada column. Sentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 13000 rpm 4°C Buang filtrate. 76 µl larutan DNase I ditambahkan (1 µl DNase I + 75 µl DNase solution) pada column. Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. 700 µl High stringency wash solution ditambahkan. Sentrifugasi selama 30 detik pada kecepatan 13000 rpm. Buang filtrate. 700 µl low stringency wash solution ditambahkan pada column. Sentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 13000 rpm. Buang filtrat dan sentrifugasi kembali selama 2 menit pada kecepatan 13000 rpm. Transfer RNA binding column pada tube baru 1.5 ml. Inkubasi dilakukan selama 1 menit pada suhu ruang. Sentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 13000 rpm.

4. Sintesa cDNA

- a. Dibuat mix reaksi pada PCR tube yang terdiri dari:

Reagent	Volume (µl)
5x iScript	4 µl
iScript RT	1 µl
RNA	RNA yang dimasukkan 15 µl jumlah NFW yang dimasukkan menyesuaikan dengan jumlah konsentrasi RNA
Nuclease Free Water (NFW)	
Total Reaksi	20 µl

- b. Di-*spindown* menggunakan sentrifuga, kemudian di-*running* menggunakan RT-PCR dengan protokol:

Tahap	Waktu (menit)	Suhu (°C)
Priming	5	25
Reverse Transcription	30	42
RT inactivation	5	85
Hold	5	4

- c. cDNA yang telah dibuat disimpan pada suhu -80°C (jika tidak digunakan).

IV. qPCR CAT, GPX, XYP1B1

1. Prinsip

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode untuk amplifikasi (perbanyak) primer oligonukleotida diarahkan secara enzimatik urutan DNA spesifik. Teknik ini mampu memperbanyak sebuah urutan 10⁵-10⁶-kali lipat dari jumlah nanogram DNA template. Produk PCR diamplifikasi dari template DNA menggunakan DNA polimerase stabil-panas dan menggunakan pengatur siklus termal otomatis untuk menempatkan reaksi sampai 40 atau lebih siklus denaturasi, anil primer, dan polimerisasi.

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.

2. Bahan

- Reverse Transcriptase, iScript Supermix (BioRad, 170-8841)

- cDNA dari :
 1. HepG2
 2. Normal sel
 3. kontrol H₂O₂
 4. H₂O₂ + EDSM100
 5. H₂O₂ EDSM25
 6. H₂O₂ Eug25
 7. H₂O₂ Eug6.25
- Upstream dan Downstream Primer CYP1B1
- Upstream dan Downstream Primer CAT
- Upstream dan Downstream Primer GPx
- *Nuclease free water*
- SsoFast Evagreen Supermix (Bio-Rad #172-5200)
- iScript Reverse Transcription Supermix for RT-PCR (Bio-Rad #170-8841)

Desain Primer Gen-gen yang akan diperiksa:

Gen	Forward	Reverse
CYP1B1	CTGCGACTCCAGTTGTGAGA	AAGGAACTGGGACCTTTGCC
CAT	ACTGTTGCTGGAGAATCGGG	AAGTCTCGCCGCATCTCAA
GPx	CCAAGTCATCACCTGGTCT	TCGATGTCAATGGTCTGGAA

3. Alat dan Consumable

1. RT-PCR (Thermo Scientific, PikoReal 96)
2. PCR Cabinet (SCR-ZAI)
3. Mikropipet (Serana)
4. 0,2 ml PCR Tube Flat Cap Clear (Neptune, 3423)
5. Tips 1-10 µl , 10-200 µl
6. Piko PCR Plates (Finnzymes, SPL0961)

4. Preparasi reagen

- Low stringency Wash Solution (5x)
- Lysis Solution
- RNase Free-DNase I Kit (Norgen, 25710)

5. Prosedur Kuantitatif Ekpresi Gen

1. Dibuat mix reaksi pada PCR tube yang terdiri dari:

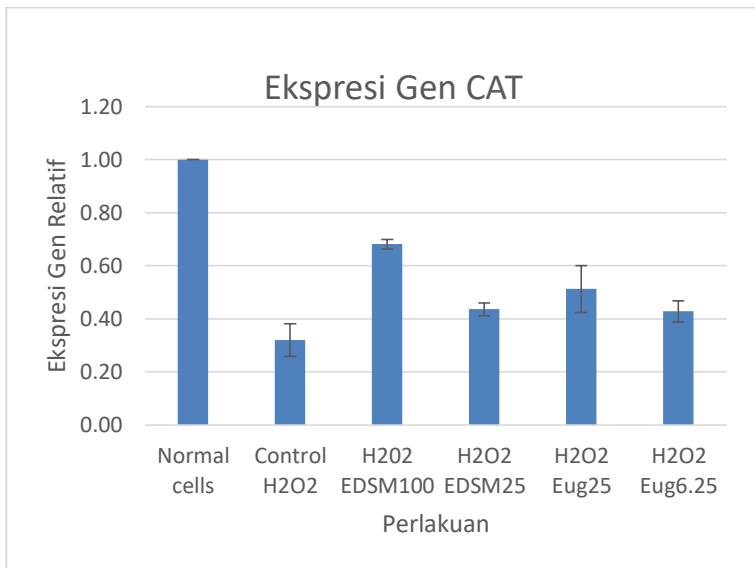
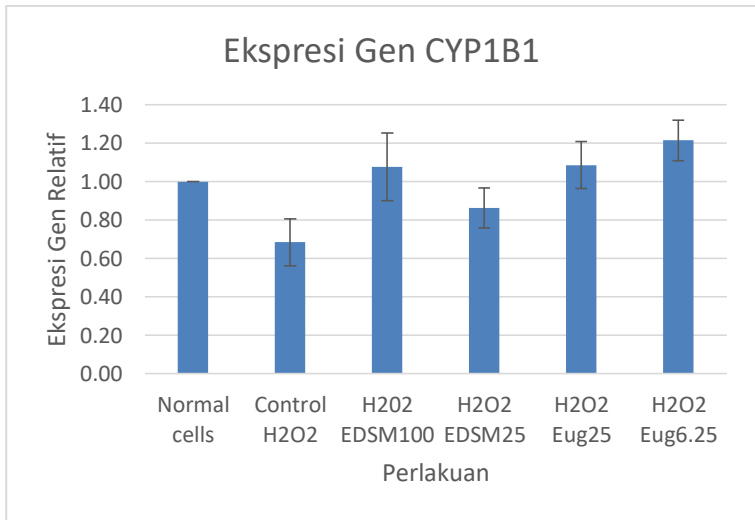
Reagent	Volume
Evagreen	5 μ l
Mix Primer (Forward : Reverse)	2 μ l
CDNA	1 μ l
<i>Nuclease Free Water</i>	2 μ l
Total Volume	10 μ l

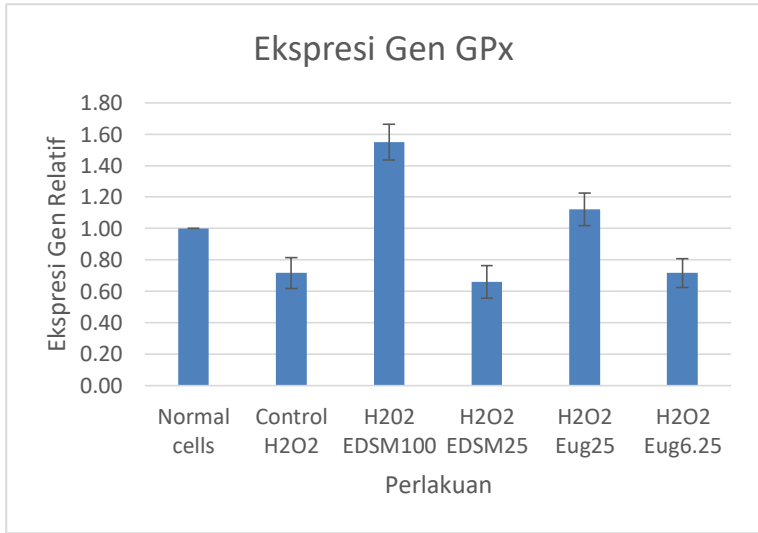
2. Di-spindown terlebih dahulu dengan centrifuge.
3. Dihomogenkan, kemudian dimasukkan tiap sampel kedalam sumur piko real plate.
4. Inkubasi dengan qPCR pada suhu :

Gen	Temperature ; Waktu ; Siklus						
	Pre-denaturasi	Denaturasi	Annealing	Pre-elongasi	Elongasi	Melting Curve	~
CYP1B1	95° C ; 7'	95° C ; 30"; 40 siklus	60° C ; 40"; 40 siklus	72° C ; 1'	72° C ; 5'	55-95° C	4° C
CAT	95° C ; 7'	95° C ; 30"; 40 siklus	60° C ; 40"; 40 siklus	72° C ; 1'	72° C ; 5'	55-95° C	4° C
GPx	95° C ; 7'	95° C ; 30"; 40 siklus	60° C ; 40"; 40 siklus	72° C ; 1'	72° C ; 5'	55-95° C	4° C

6. Hasil Uji

Ekspresi Gen CYP1B1, CAT dan GPx





5. Hasil Analisis

Ekspresi Gen CYP1B1

Sampel	Konsentrasi($\mu\text{g/ml}$)
Normal cells	1.00 ± 0.00^{abc}
Control H2O2	0.68 ± 0.12^a
H2O2 EDSM100	1.08 ± 0.18^{bc}
H2O2 EDSM25	0.86 ± 0.10^{ab}
H2O2 Eug25	1.09 ± 0.12^{bc}
H2O2 Eug6.25	1.21 ± 0.10^c

Tabel dipresentasikan sebagai mean \pm SD. Perbedaan huruf (a,ab, abc,bc,c) pada kolom yang sama (diantara berbagai sampel) adalah signifikan pada $p < 0,05$ (Tukey HSD post hoc test).

Ekspresi Gen CAT

Sampel	Konsentrasi($\mu\text{g/ml}$)
Normal cells	1.00 ± 0.00^d
Control H ₂ O ₂	0.32 ± 0.06^a
H ₂ O ₂ EDSM100	0.68 ± 0.02^c
H ₂ O ₂ EDSM25	0.44 ± 0.02^{ab}
H ₂ O ₂ Eug25	0.51 ± 0.09^b
H ₂ O ₂ Eug6.25	0.43 ± 0.04^{ab}

Tabel dipresentasikan sebagai mean \pm SD. Perbedaan huruf (a,ab,b,c,d) pada kolom yang sama (diantara berbagai sampel) adalah signifikan pada $p < 0,05$ (Tukey HSD post hoc test).

Ekspresi Gen GPX

Sampel	Konsentrasi($\mu\text{g/ml}$)
Normal cells	1.00 ± 0.00^b
Control H ₂ O ₂	0.72 ± 0.10^a
H ₂ O ₂ EDSM100	1.55 ± 0.11^c
H ₂ O ₂ EDSM25	0.66 ± 0.10^a
H ₂ O ₂ Eug25	1.12 ± 0.10^b
H ₂ O ₂ Eug6.25	0.72 ± 0.09^a

Tabel dipresentasikan sebagai mean \pm SD. Perbedaan huruf (a,b,c) pada kolom yang sama (diantara berbagai sampel) adalah signifikan pada $p < 0,05$ (Tukey HSD post hoc test).

7. Kesimpulan:

Berdasarkan hasil qPCR, ekspresi gen CYP1B1 pada setiap sel yang telah di treatment dengan H₂O₂, EDSM 100 $\mu\text{g/ml}$ ml level ekspresi lebih tinggi dibandingkan dan EDSM 25 $\mu\text{g/ mg}$, kontrol positif, kontrol negatif sedangkan

senyawa pembanding eugenol memiliki level yang tertinggi pada dua konsentrasi yang digunakan.

Untuk level ekspresi gen CAT, sel yang telah diberi treatment H₂O₂ memiliki level ekspresi yang lebih tinggi dari kontrol positif (kontrol H₂O₂) namun lebih rendah dibandingkan kontrol negatif. Ekspresi tertinggi pada EDMSM 100 ug/ml dan Eugenol 25 ug/ml, pada konsentrasi rendah masing-masing perlakuan nilai ekspresi gennya lebih kecil.

Ekspresi gen pada sel yang sudah di treatment dengan EDMSM 100 ug/ml dan Eugenol 25 ug/ml (konsentrasi tinggi) memiliki level ekspresi gen yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif (sel normal), kontrol H₂O₂. Sedangkan pada EDMSM 25 ug/ml dan Eugenol 6.25 ug/ml (konsentrasi rendah) hanya mendekati kontrol H₂O₂ saja.

**UJI ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN
SIRIH MERAH (EDSM) DAN EUGENOL
(EUG) TERHADAP SEL HepG2 YANG
DIINDUKSI H₂O₂**

D. UJI ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH (EDSM) DAN EUGENOL (EUG) TERHADAP SEL HepG2 YANG DIINDUKSI H₂O₂.

I. Kultur Sel

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 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.

2. Bahan dan Consumable

- MEM (Biowest, L0416-500)10% Fetal bovine serum/FBS (Gibco 10270106)

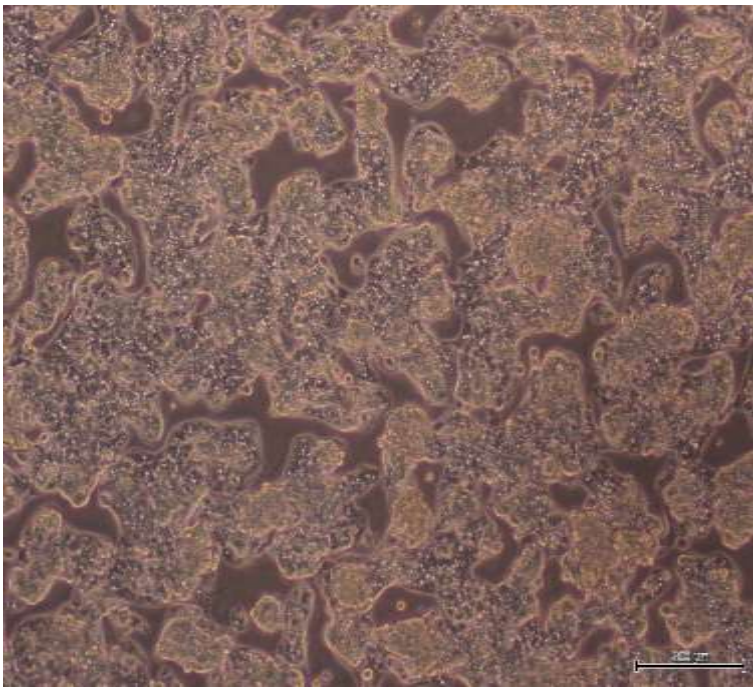
- 1% Antibiotic and Antimycotic/ABAM (Gibco 1772653)
 - PBS 1x (Gibco, 1740576)
 - Sel lini Human hepatocellular
3. Alat dan Consumable
- Pippet Gun (Thermo Scientific 9521)
 - Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
 - CO₂ Incubator (Thermo IH3543)
 - Refrigerated Centrifuge (MWP 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)

4. Prosedur

Sel diambil dari tanki nitrogen cair (-196°C), selanjutnya dicairkan di dalam Ultrasonic cleaner dengan suhu 37°C 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 diresuspendi 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.



Gambar 1. Morfologi Sel HepG2 Uji Antioksidan Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) Dan Eugenol (EUG) Terhadap Sel HepG2 Yang Diinduksi H₂O₂.

II. INDUKSI H₂O₂, EKSTRAK, DAN SENYAWA

1. Prinsip

Sel yang sebelumnya telah dikultur kemudian diganti mediumnya diinduksi dengan APAP selama 24 jam untuk membuat model kerusakan hati. Setelah diinduksi H₂O₂, sel diinduksi langsung dengan Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) dan Eugenol. Induksi ini dilakukan untuk melihat pengaruh EDSM dan Eugenol sebagai agen hepatoprotektif menggunakan model kerusakan hati sel HepG2 induksi H₂O₂.

2. Bahan dan Consumable

- Medium Kultur Sel Medium kultur sel HepG2
- Hidrogen Peroxide (H₂O₂) (Merck, 8.22287.100)
- Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) (0160718-C020)
- Senyawa Eugenol (Sigma Aldrich, 35995-250MG)

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)

4. Prosedur

Sel yang sudah mencapai konfluensi dibilas dengan PBS dan ditambahkan tripsin EDTA dan diinkubasi 37°C. Kemudian sel dihitung dengan hemositometer dan *diseeding* dalam 6 well plate. Sel diinkubasi dalam incubator 37°C, CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah sel attached, sel diinduksi menggunakan 15 mM H₂O₂ Setelah diinduksi

dengan H₂O₂, sel diberi perlakuan dengan senyawa dan ekstrak sebagai berikut:

- a. Control normal cells (ditambah medium complete)
- b. Control DMSO (ditambah DMSO f.c. 1%)
- c. Control H₂O₂ 40 mM
- d. H₂O₂ 15 mM + EDSM 25 ug/ml
- e. H₂O₂ 15 mM + EDSM 100 ug/ml
- f. H₂O₂ 15 mM + Eug 6.25 ug/ml
- g. H₂O₂ 15 mM + Eug 25 ug/ml

Setelah diinduksi ekstrak dan senyawa sel diinkubasi kembali selama 24 jam dalam incubator 37°C, CO₂ 5%. Setelah diinkubasi, CM dikoleksi dan sel di *haverst* menggunakan teknik trpisinasi.

III. UJI MDA

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.

2. Bahan

- Kit Elisa MDA (E-EL-0060)
- Akuabides
- CM dari sample

3. Alat dan Consumable

- Micropipette (Finnpipette F2)
- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
- Vortex (Wisemix)
- Incubator (Esco)
- Tips Blue, yellow, white (Neptune)

4. 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 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

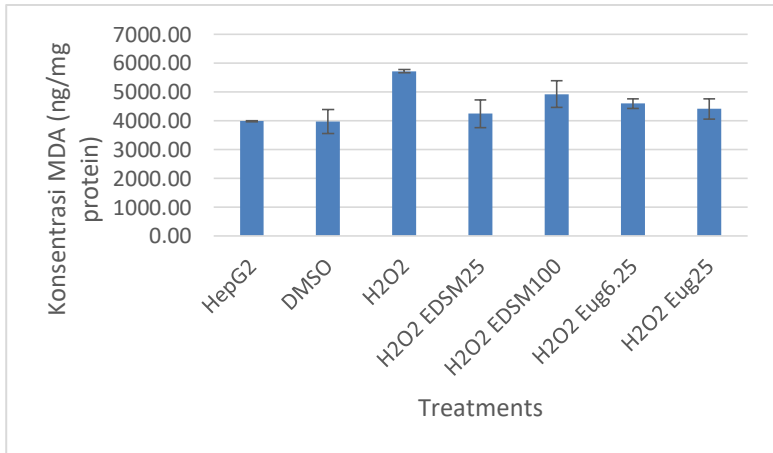
waktu inkubasi tetapi tidak sampai 30 menit. Tambahkan 50 μL /well stop solution pada setiap well. Ukur Optical Density (OD) pada 450 nm menggunakan spektrofotometer.

5. Hasil Uji

Tabel 2.1 Kadar MDA pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi H₂O₂

Sampel	Konsentrasi MDA (ng/mL)	Konsentrasi MDA (ng/mg protein)
Kontrol Sel	589.10 \pm 2.66 ^a	3980.41 \pm 17.99 ^a
Kontrol DMSO	587.00 \pm 61.88 ^a	3966.22 \pm 418.11 ^a
Kontrol H ₂ O ₂	845.33 \pm 7.52 ^c	5711.71 \pm 50.81 ^c
H ₂ O ₂ +EDSM25	627.90 \pm 70.89 ^{ab}	4242.57 \pm 479.52 ^{ab}
H ₂ O ₂ +EDSM100	727.10 \pm 68.58 ^{bc}	4912.84 \pm 463.41 ^{bc}
H ₂ O ₂ +Eug6.25	679.07 \pm 24.96 ^{ab}	4588.29 \pm 168.65 ^{ab}
H ₂ O ₂ +Eug25	651.60 \pm 51.91 ^{ab}	4402.70 \pm 350.77 ^{ab}

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



Gambar 4.1 Aktivitas MDA Sel HepG2 yang diinduksi H₂O₂ serta Perlakuan dengan Eugenol dan Ekstrak Daun Sirih Merah.

IV. UJI SOD

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 microsomes) 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 mengkatalisis reaksi WST-1 dengan O_2^- untuk menghasilkan yang larut dalam air berwarna formazan. SOD dapat mengkatalisis 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.

2. Bahan

- Sel lini Human hepatocellular carcinoma (HepG2) (ATCC, HB-8065)
- Kit SOD (E-BC-K020-M)
Yang berisi: Buffer solution, substrate solution, enzyme stock solution, enzyme diluent
- Akuabides
- CM dari sample

3. Alat dan Consumable

- 96 wellplate
- Multichannel pipettor
- Micropipette (Finnpipette F2)
- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
- Vortex mixer
- Tips Blue, yellow, white (Neptune)

4. Cara Kerja

A. Isolasi Protein Seluler

- 1) Sel-sel yang melekat harus dilepaskan dengan tripsin dan kemudian ambil supernatnya. Supernatan berisi sel kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada 1000 g, setelah sel dan supernatant terpisah, supernatant di sentrifugasi. Resuspen sel dalam 1 mL PBS dingin, kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada 1000 g, supernatant kemudian dibuang. Resuspen sel dalam PBS (1x). Sonicate atau giling dengan tangan. giling dengan tangan dioperasikan dengan air yang

dioperasikan dalam bath air es untuk memecah sel untuk menghancurkan sel (atau Membekukan sel pada $\leq 2020^{\circ}\text{C}$. Sel mencair dengan pencampuran lembut. Ulangi. Sel pencairan dengan pencampuran lembut. Ulangi siklus pembekuan / pencairan selama 3 kali.) Pembekuan / pencairan siklus untuk 3 kali)

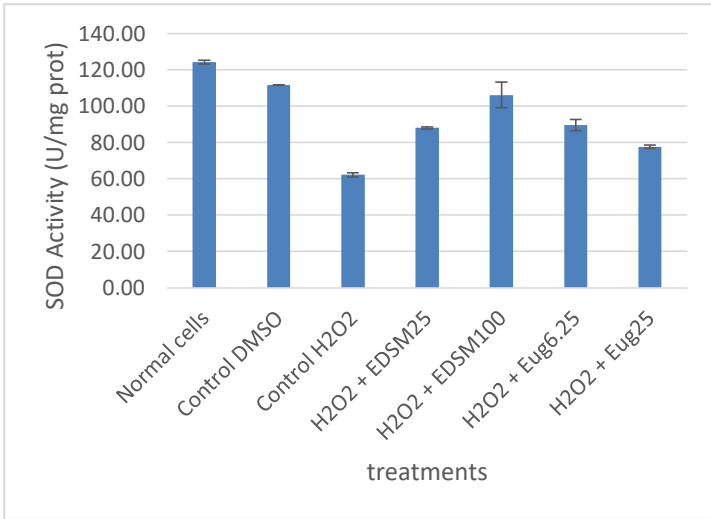
- 2) Homogenat sel disentrifugasi pada 1500 g selama 10 menit. Kumpulkan supernatan 1500 g selama 10 menit. Kumpulkan supernatan dan simpan dan simpan di atas es untuk dideteksi. Sementara itu, tentukan konsentrasi protein supernatan protein.

5. Hasil Uji

Tabel 3.1 Kadar SOD pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi H₂O₂

Sampel	Rasio inhibisi (%)	SOD Activity (U/mL)	SOD Activity (U/mg prot)
Kontrol Sel	76.55 ± 0.66 ^e	18.37 ± 0.16 ^e	124.14 ± 1.07 ^e
Kontrol DMSO	72.97 ± 0.17 ^{de}	17.51 ± 0.04 ^{de}	111.54 ± 0.26 ^d
Kontrol H ₂ O ₂	41.25 ± 0.76 ^a	9.90 ± 0.18 ^a	62.12 ± 1.15 ^a
H ₂ O ₂ +EDSM25	54.55 ± 0.38 ^b	13.09 ± 0.09 ^b	87.95 ± 0.62 ^c
H ₂ O ₂ +EDSM100	67.86 ± 4.48 ^d	16.29 ± 1.08 ^d	106.02 ± 7.00 ^d
H ₂ O ₂ +Eug6.25	62.44 ± 2.11 ^c	14.99 ± 0.51 ^c	89.45 ± 3.03 ^c
H ₂ O ₂ +Eug25	55.59 ± 0.56 ^b	13.34 ± 0.14 ^b	77.62 ± 0.79 ^b

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



Gambar 3.1 Aktivitas SOD oleh Sel HepG2 yang Diinduksi H₂O₂ dan Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Senyawa Eugenol.

6. Kesimpulan

Induksi H₂O₂ meningkatkan kadar MDA pada sel HepG2 hingga 5711.11 nmol/mg protein. Perlakuan EDSM dan eugenol pada perlakuan EDSM100 dan Eugenol6.25 mampu menurunkan kadar MDA, juga pada EDSM25 dan Eug25 namun dengan penurunan lebih rendah. Induksi H₂O₂ menurunkan kadar SOD. Konsentrasi EDSM (25 µg/ml) menurunkan kadar SOD dibandingkan dengan konsentrasi EDK (100 µg/ml), sebaliknya konsentrasi tertinggi Quercitrin menurunkan kadar SOD dan konsentrasi rendahnya (6.25 µg/ml) hanya sedikit menurunkan kadar SOD.

**UJI APOPTOSIS PADA SEL HepG2 YANG
DIINDUKSI H₂O₂ DAN DITREATMENT
DENGAN ESKTRAK DAUN SIRIH
MERAH DAN EUGENOL**

E. UJI APOPTOSIS PADA SEL HepG2 YANG DIINDUKSI H₂O₂ DAN DITREATMENT DENGAN ESKTRAK DAUN SIRIH MERAH DAN EUGENOL.

I. Kultur Sel

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 perbanyakkan 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.

2. Bahan dan Consumable

- MEM (Biowest, L0416-500)
- 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)
 - MEM (Biowest, L0416-500)
 - HepG2 cells line (ATCC, HB-8065)
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)

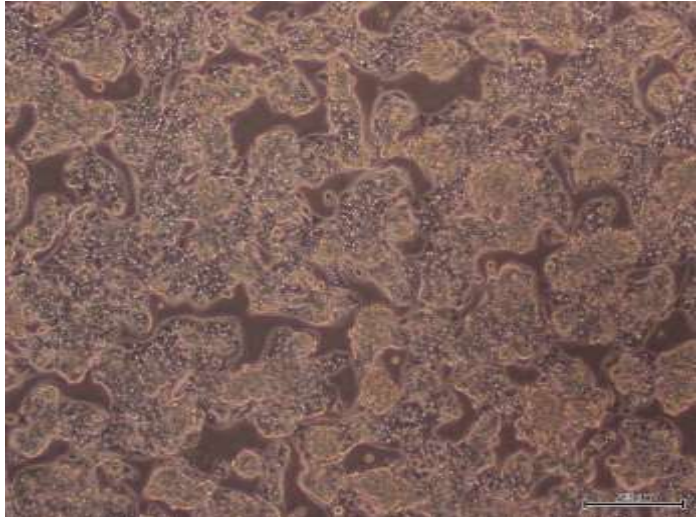
4. Prosedur

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.

5. Hasil Kultur Sel



Gambar 1. Morfologi Sel HepG2 Uji Apoptosis Pada Sel HepG2 Yang Diinduksi H₂O₂ Dan Ditreatment Dengan Ekstrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol

II. UJI APOPTOSIS

1. Prinsip Uji Apoptosis

Uji Apoptosis terhadap sel HepG2 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 (Rieger *et al.*, 2011). 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 (Vermees *et al.*, 2000). 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 (Rieger *et al.*, 2011).

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. Bahan

- Sel HepG2 (ATCC® HB-8065™)
- Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BioLegend, Part 79998)
- Propidium Iodide Solution (BioLegend, Part 79997)

- Annexin V Binding Buffer (BioLegend, 640194)
 - 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)
 - Eugenol (Sigma Aldrich 35995-250MG)
 - Sampel ekstrak Daun Sirih Merah (0160718-C020)
 - Hidrogen Peroxide (H_2O_2) (Merck, 8.22287.100)
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)

4. Cara Kerja

a. Induksi H₂O₂, Ekstrak dan Senyawa

1. Masing-masing sel lini HepG2 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 diinkubasi, medium dibuang dan diinduksi H₂O₂ dengan konsentrasi akhir sebanyak 15 mM. Sel diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂.
8. Setelah diinduksi APAP, sel diinduksi dengan ekstrak sirih merah dan eugenol dengan perincian sebagai berikut:
 - 1) Kontrol Ekstrak
 - 2) Kontrol H₂O₂ 15 mM

- 3) H₂O₂ 15 mM + EDSM 100 ug/ml
- 4) H₂O₂ 15 mM + EDSM 25 ug/ml
- 5) H₂O₂ 15 mM + Eugenol 25 ug/ml
- 6) H₂O₂ 15 mM + Eugenol 6.25 ug/ml

Sel diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂.

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.
- 6) Sampel dianalisis menggunakan flowcytometry.

5. Hasil Uji

Tabel. Hasil Uji Apoptosis Sel HepG2 dengan Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Eugenol

SAMPEL	Live Cells	Early Apoptotic	Late Apoptotic	Necrotic
Kontrol	92.46±0.54 ^d	4.51±0.65 ^c	1.99±0.16 ^a	1.04±0.05 ^a
Kontrol H2O2	48.13±1.02 ^a	26.15±0.31 ^b	23.90±0.85 ^d	1.81±0.12 ^a
H2O2 EDSM100	78.60±1.96 ^b	1.32±0.11 ^a	6.73±1.44 ^c	13.35±0.41 ^d
H2O2 EDSM25	86.92±0.42 ^c	1.07±0.10 ^a	3.95±0.34 ^{a,b}	8.06±0.25 ^c
H2O2 EUG25	87.01±0.92 ^c	1.87±0.13 ^a	4.19±0.55 ^b	6.92±0.51 ^b
H2O2 EUG6.25	77.92±0.79 ^b	1.80±0.05 ^a	6.53±0.64 ^c	13.76±0.13 ^d

Perbedaan huruf pada rata-rata menunjukkan perbedaan signifikan 0,05 berdasarkan analisis statistika ANOVA-Tukey.

6. Kesimpulan

Hasil Uji Apoptosis menunjukkan bahwa Induksi H₂O₂ dapat mengikat presentase sel pada *Early Apoptosis*, *Late Apoptosis*. Perlakuan EDSM dan Eugenol pada sel HepG2 dapat menurunkan jumlah sel apoptosis. Perlakuan terbaik adalah EDSM 100 ug/ml.

**UJI HEPATOTOKSIK EKSTRAK DAUN
SIRIH MERAH DAN EUGENOL
TERHADAP SEL HepG2**

F. UJI HEPATOTOKSIK EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH DAN EUGENOL TERHADAP SEL HepG2.

I. Kultur Sel

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.

2. Bahan dan *Consumable*

- HepG2 cells line (ATCC, HB-8065)
- MEM (Biowest, L0416-500)
- 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)
- HepG2 cells line (ATCC, HB-8065)

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)

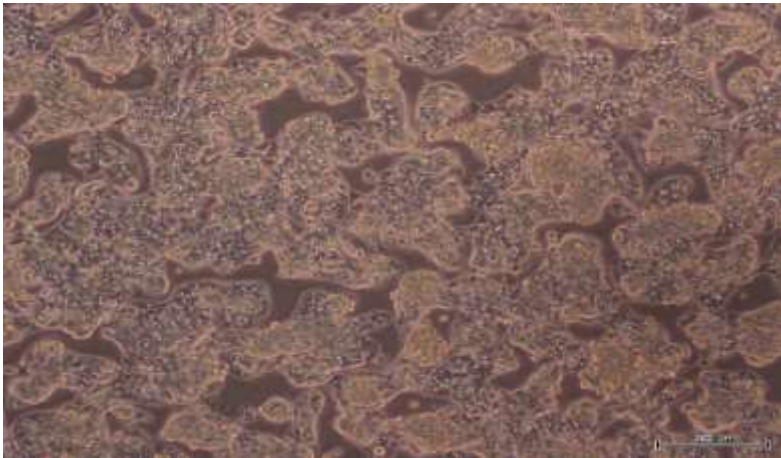
4. Prosedur

Sel diambil dari tanki nitrogen cair (-196°C), selanjutnya dicairkan di dalam Ultrasonic cleaner dengan suhu 37°C 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.



Gambar 1. Morfologi Sel HepG2 Uji Hepatotoksik Ekstrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol Terhadap Sel HepG2

II. INDUKSI APAP, EKSTRAK, DAN SENYAWA

1. Prinsip

Sel yang sebelumnya telah dikultur kemudian diganti mediumnya diinduksi dengan H₂O₂ selama 24 jam untuk membuat model kerusakan hati. Setelah diinduksi H₂O₂, sel diinduksi langsung dengan Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) dan Eugenol. Induksi ini dilakukan untuk melihat pengaruh EDSM dan Eugenol sebagai agen hepatoprotektif menggunakan model kerusakan hati sel HepG2 induksi H₂O₂

2. Bahan dan Consumable

- Medium Kultur Sel Medium kultur sel HepG2
- Hidrogen Peroxide (H₂O₂) (Merck, 8.22287.100)
- Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) (0160718-C020)
- Senyawa Eugenol (Sigma Aldrich, 35995-250MG)

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)

4. Prosedur

Sel yang sudah mencapai konfluensi dibilas dengan PBS dan ditambahkan tripsin EDTA dan diinkubasi 37°C. Kemudian sel dihitung dengan hemositometer dan *diseeding* dalam 6 well plate. Sel diinkubasi dalam

incubator 37°C, CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah sel attached, sel diinduksi menggunakan 15 mM H₂O₂ Setelah diinduksi dengan H₂O₂, sel diberi perlakuan dengan senyawa dan ekstrak sebagai berikut:

- a. Control normal cells (ditambah medium complete)
- b. Control DMSO (ditambah DMSO f.c. 1%)
- c. Control 15 mM H₂O₂
- d. 15 mM H₂O₂ + EDSM 25 ug/ml
- e. 15 mM H₂O₂ + EDSM 100 ug/ml
- f. 15 mM H₂O₂ + Eug 6.25 ug/ml
- g. 15 mM H₂O₂ + Eug 25 ug/ml

Setelah diinduksi ekstrak dan senyawa sel diinkubasi kembali selama 24 jam dalam incubator 37°C, CO₂ 5%. Setelah diinkubasi, CM dikoleksi dan sel di*haverst* menggunakan teknik trpisinasi

III. UJI TOTAL PROTEIN (BRAFORDE)

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

2. Bahan

- Protein Lysat dari sampel
- BSA (bovine serum albumin) (Sigma, A9576)
- Aquabidest
- Quick Start Dye Reagent 1x (Biorad, 500-0205)

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)

4. Konsentrasi Uji

- a. Working solution : 1000; 500; 250; 125; 62.25; 31.25 ($\mu\text{g/mL}$)

- b. Final concentration : 100; 50; 25; 1.25; 6.25; 3.125 ($\mu\text{g/mL}$)

5. Cara Kerja

a. Preparasi Standar

BSA Stock (2000 $\mu\text{g/mL}$): Larutkan 2 mg BSA dalam 1000 μl ddH₂O. Lalu dibuat seri pengenceran dari 200 sampai 0.

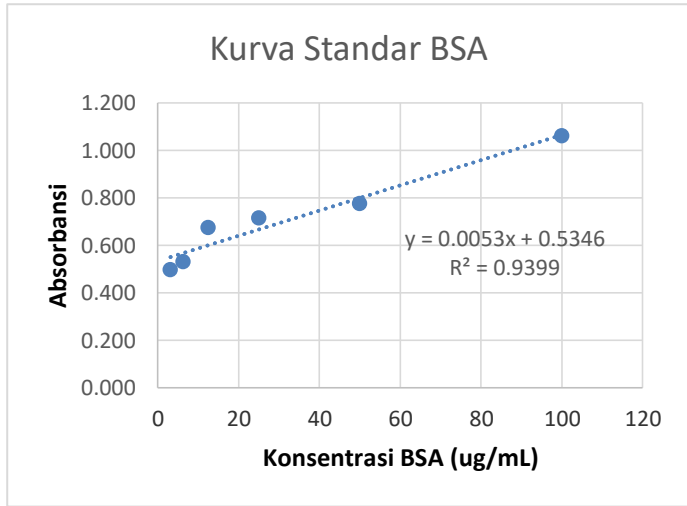
b. Cara Kerja

Masukkan larutan standar sebanyak 20 μL kedalam well plate. Masukkan sampel sebanyak 20 μl pada well plate dan tambahkan Quick Start Dye Reagen 1X sebanyak 200 μL pada masing-masing well plate. Larutan akan berubah warna menjadi biru. Inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit lalu ukur absorbansi pada 595 nm.

6. Hasil Uji

Tabel 2.1 Kurva standar BSA

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-Rata
	1	2	3	
0	0.297	0.332	1.213	0.614
3,125	0.318	0.323	0.849	0.497
6,25	0.420	0.560	0.614	0.531
12,5	0.511	1.074	0.437	0.674
25	0.747	0.806	0.589	0.714
50	0.778	0.768	0.783	0.776
100	1.011	0.998	1.172	1.060



Gambar 2.1 Kurva standar BSA

Tabel 2.2 Hasi uji Protein Total menggunakan metode Bradford

Sampel	Average ± SD
Normal cells	148.340 ± 2.83
Control DMSO	157.233 ± 9.97
Control APAP	157.698 ± 16.00
Control H2O2	159.390 ± 17.06
APAP + EDMS25	153.440 ± 8.39
APAP + EDMS100	159.189 ± 8.39
APAP + Eug6.25	146.428 ± 15.60
APAP + Eug25	158.528 ± 14.03
H2O2 + EDMS25	148.862 ± 12.78
H2O2 + EDMS100	153.623 ± 8.92
H2O2 + Eug6.25	167.535 ± 8.26
H2O2 + Eug25	171.887 ± 12.98

IV. UJI AST

1. Prinsip

Enzim-enzim yang biasanya digunakan sebagai marker untuk menilai adanya kerusakan hepatoseluler yaitu alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST) dan Lactate dehydrogenase (LDH). AST merupakan enzim yang berada di sitoplasma dan mitokondria yang dominan ditemukan pada hati, jantung, otot rangka, ginjal, pankreas, eritrosit, paru-paru, dan jaringan otak. AST mempunyai sensitivitas lebih rendah dari ALT, namun masih tetap dijadikan biomarker valid pada penyakit hati. AST biasanya dikombinasikan dengan marker lainnya untuk memperoleh hasil yang lebih signifikan

2. Bahan

- Sel lini Human hepatocellular carcinoma (HepG2) (ATCC, HB-8065)
- Acetaminophen (Sigma Aldrich, A7085)
- DMSO (Merck, 1029521000)
- kit uji AST (Elabscience, E-BC-K236)
- Eugenol (Sigma Aldrich, 35995-250MG)

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)

4. Cara Kerja

Sel-sel HepG2 dilapisi dalam pelat 6-sumur dengan kepadatan sel 1×10^6 sel / sumur dan diinkubasi dalam

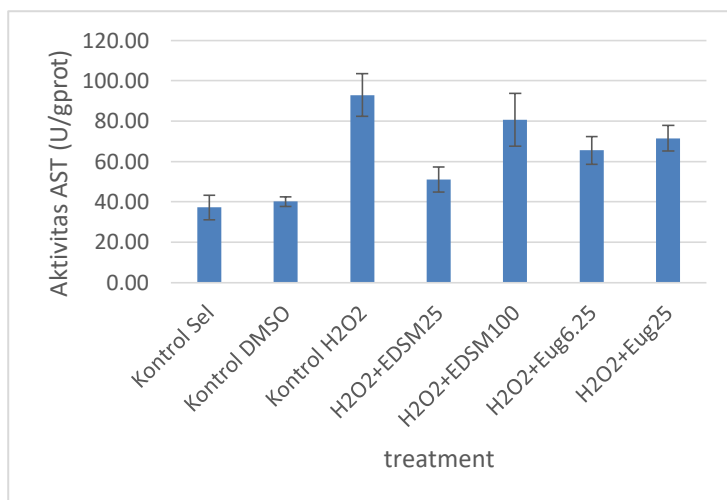
suhu 37°C dan 5% CO₂ sampai mencapai *confluent*. Setelah 24 jam, sel diberi perlakuan dengan 1,8 mL 2% FBS yang ditambahkan DMEM yang mengandung 40 mM acetaminophen 1% dan DMSO, dan medium hanya selama 24 jam dalam 37 °C dan 5% CO₂. Sel-sel ditambahkan dengan larutan eugenol pada konsentrasi 6,25 ug / mL dan 25 ug / mL selama 24 jam. Level AST ditentukan menggunakan kit uji AST.

5. Hasil Uji

Tabel 3.1 Konsentrasi protein AST pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi H₂O₂.

Sampel	Konsentrasi Protein (U) (mg protein/mL)	Aktivitas AST (U/mg protein)
Kontrol Sel	0.148	37.25 ± 6.08 ^a
Kontrol DMSO	0.157	40.14 ± 2.42 ^a
Kontrol H ₂ O ₂	0.159	92.91 ± 10.53 ^d
H ₂ O ₂ +EDSM25	0.149	51.00 ± 6.12 ^{ab}
H ₂ O ₂ +EDSM100	0.154	80.70 ± 13.09 ^{cd}
H ₂ O ₂ +Eug6.25	0.168	65.45 ± 6.89 ^{bc}
H ₂ O ₂ +Eug25	0.172	71.50 ± 6.43 ^{bcd}

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



Gambar 3.1 Kandungan AST Sel HepG2 yang diinduksi H₂O₂ serta Perlakuan dengan Eugenol dan Ekstrak Daun Sirih Merah.

V. UJI ALT

1. Prinsip

Enzim-enzim yang biasanya digunakan sebagai marker untuk menilai adanya kerusakan hepatoseluler yaitu alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST) dan Lactat dehidrogenase (LDH). ALT merupakan enzim intraseluler sitoplasma yang paling banyak ditemukan di hati dan bertanggungjawab dalam proses transaminasi atau metabolisme alanin. ALT mengkatalisasi alanin menjadi alfa ketoglutarat dan menghasilkan piruvat serta l-glutamin. Digunakan sebagai biomarker spesifik kerusakan pada sitoplasma dan mitokondria sel hati.

2. Bahan

- Human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells line (ATCC, HB-8065TM)

- cetaminophen (Sigma Aldrich, A7085)
- DMSO (Merck, 1029521000)
- kit uji ALT (Elabscience, E-BC-K235)
- Eugenol (Sigma Aldrich 35995-250MG)

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)

4. Cara Kerja

Sel-sel HepG2 dilapisi dalam pelat 6-sumur dengan kepadatan sel 1×10^6 sel / sumur dan diinkubasi dalam suhu 37°C dan 5% CO_2 sampai mencapai *confluent*. Setelah 24 jam, sel diberi perlakuan dengan 1,8 mL 2% FBS yang ditambahkan DMEM yang mengandung 40 mM acetaminophen 1% dan DMSO, dan medium hanya selama 24 jam dalam 37°C dan 5% CO_2 . Sel-sel ditambahkan dengan larutan eugenol pada konsentrasi 6,25 ug / mL dan 25 ug / mL selama 24 jam. Level AST ditentukan menggunakan kit uji ALT.

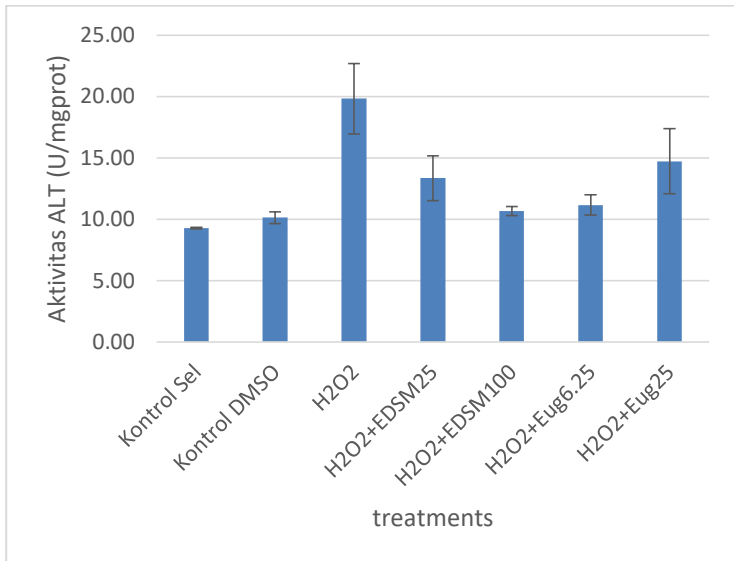
5. Hasil Uji

Tabel 4.1 Konsentrasi protein ALT pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi H₂O₂.

Sampel	Konsentrasi Protein (U) (mg protein/mL)	Aktivitas ALT (U/mg protein)
Kontrol Sel	1.38	9.27 ± 0.09^a
Kontrol DMSO	1.59	10.12 ± 0.49^{ab}
Kontrol H ₂ O ₂	3.16	19.81 ± 2.85^{ab}
H ₂ O ₂ +EDSM25	1.99	13.35 ± 1.82^{ab}

Sampel	Konsentrasi Protein (U) (mg protein/mL)	Aktivitas ALT (U/mg protein)
H2O2+EDSM100	1.64	10.65 ± 0.38 ^{ab}
H2O2+Eug6.25	1.87	11.15 ± 0.82 ^b
H2O2+Eug25	2.53	14.71 ± 2.66 ^c

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



Gambar 4.2 Aktivitas ALT oleh Sel HepG2 yang Diinduksi H₂O₂ dan Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Senyawa Eugenol.

VI. UJI LDH

1. Prinsip

Pemeriksaan enzim serum merupakan uji yang sering dilakukan selain uji bilirubin. Enzim alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST) merupakan marker yang sering digunakan untuk menilai adanya kerusakan hepatoseluler. Laktat

Dehidrogenase (LDH) adalah enzim yang berperan pada banyak sel yang melakukan metabolisme, Aktivitas dari LDH total dalam serum dapat meningkat pada kerusakan organ atau jaringan atau terjadinya destruksi sel. Laktat dehidrogenase mengkatalis proses reduksi piruvat menjadi laktat dan menghasilkan NADH yang terjadi pada sitosol. Aktivitas LDH dapat diperiksa dengan menggunakan metode kolorimeter dengan menggunakan spektrofotometer.

2. Bahan

- Human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells line (ATCC, HB-8065TM)
- Acetaminophen (Sigma Aldrich, A7085)
- DMSO (Merck, 1029521000)
- kit uji LDH (Elabscience, E-BC-K045)
- Eugenol (Sigma Aldrich 35995-250MG)

3. Alat dan Cosumable

- 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)

4. Cara Kerja

Sel-sel HepG2 dilapisi dalam pelat 6-sumur dengan kepadatan sel 1×10^6 sel / sumur dan diinkubasi dalam suhu 37°C dan 5% CO_2 sampai mencapai *confluent*. Setelah 24 jam, sel diberi perlakuan dengan 1,8 mL 2%

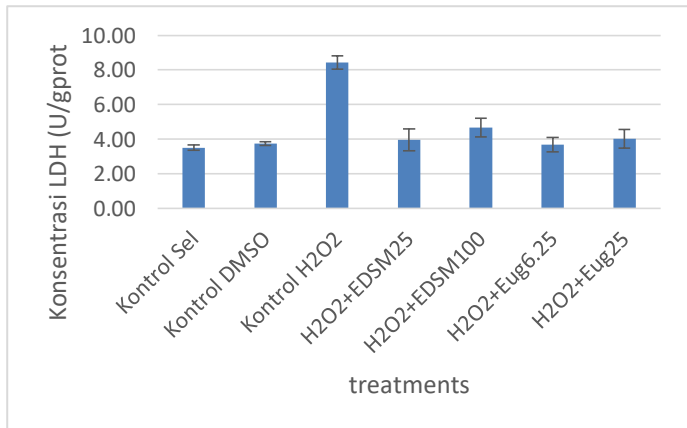
FBS yang ditambahkan DMEM yang mengandung 40 mM acetaminophen 1% dan DMSO, dan medium selama 24 jam dalam 37 °C dan 5% CO₂. Sel-sel ditambahkan dengan larutan eugenol pada konsentrasi 6,25 ug / mL dan 25 ug / mL selama 24 jam. Level AST ditentukan menggunakan kit uji LDH.

5. Hasil Uji

Tabel 5.1 Konsentrasi protein LDH pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi H₂O₂.

Sampel	Konsentrasi Protein (U) (mg protein/mL)	Aktivitas ALT (U/mg protein)
Kontrol Sel	0.148	3.51 ± 0.15 ^a
Kontrol DMSO	0.157	3.74 ± 0.11 ^{ab}
Kontrol H ₂ O ₂	0.159	8.44 ± 0.38 ^a
H ₂ O ₂ +EDSM25	0.149	3.97 ± 0.62 ^a
H ₂ O ₂ +EDSM100	0.154	4.69 ± 0.54 ^{ab}
H ₂ O ₂ +Eug6.25	0.168	3.70 ± 0.41 ^{ab}
H ₂ O ₂ +Eug25	0.172	4.02 ± 0.53 ^b

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



Gambar 5.2 Kandungan LDH Sel HepG2 yang diinduksi H₂O₂ serta Perlakuan dengan Eugenol dan Ekstrak Daun Sirih Merah.

6. Kesimpulan

Hasil uji Hepatotoksik menunjukkan bahwa sel HepG2 yang diinduksi H₂O₂, pada EDSM pada konsentrasi 25 µg/mL dan eugenol pada konsentrasi 6.25 µg / mL mengurangi lebih banyak level AST mendekati level normal AST. Level ALT pada sel HepG2 yang diinduksi APAP pada EDSM pada konsentrasi 100 µg / mL dan eugenol pada konsentrasi 6.25 µg / mL mengurangi lebih banyak level ALT mendekati level normal ALT. Hasil bahwa sel HepG2 yang diinduksi diinduksi H₂O₂ pada EDSM pada konsentrasi 25 µg / mL dan eugenol pada konsentrasi 6.25 µg / mL mengurangi lebih banyak level LDH mendekati level normal LDH pada kelompok kontrol.

**UJI KADAR REACTIVE OXYGEN
SPECIES (ROS) PADA SEL HepG2 YANG
DIINDUKSI H₂O₂ DAN DITREATMENT
DENGAN ESKTRAK DAUN SIRIH
MERAH DAN EUGENOL**

G. UJI KADAR REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) PADA SEL HepG2 YANG DIINDUKSI H₂O₂ DAN DITREATMENT DENGAN ESKTRAK DAUN SIRIH MERAH DAN EUGENOL.

I. Kultur Sel.

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 ganti dengan medium baru.

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)
- MEM (Biowest, L0416-500)
- Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) cells line (ATCC, HB-8065)

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)

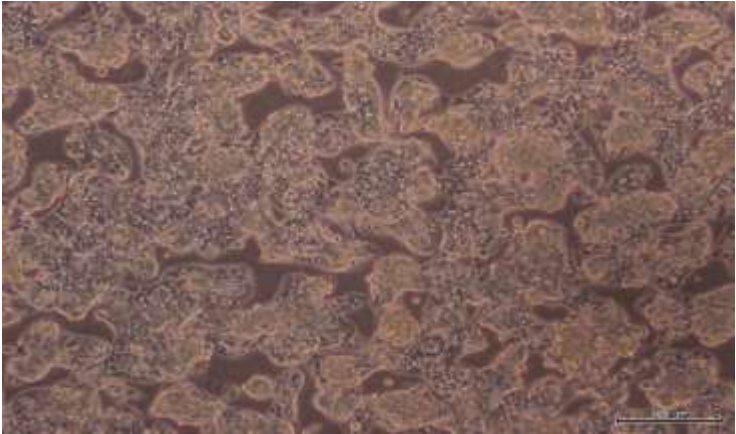
4. Prosedur

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.

5. Hasil Kultur Sel



Gambar 1. Morfologi Sel HepG2 Uji Kadar Reactive Oxygen Species (ROS) Pada Sel HepG2 Yang Diinduksi H₂O₂ Dan Ditreatment Dengan Esktrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol.

II. Uji Kadar ROS-DCFDA

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, peroksil, 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. Bahan dan Consumable

- 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)

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)
- Mikropipet (100-1000μL, 10-100 μL, 1-10μL)
- Mikropipet Tips (100-1000μL, 10-100 μL, 1-10μL)
- 5ml Falcon Round-Bottom Tube (Corning, 352024)
- Flowcytometer (Miltenyi Biotec)

4. Konsentrasi Uji

Sampel: Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM), Eugenol

Konsentrasi uji: Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM), Eugenol

- a. Working Solution : 1000; 250; 62.5; ($\mu\text{g/mL}$)
- b. Final Concentration : 100; 25; 6.25; ($\mu\text{g/mL}$)

5. Cara Kerja

a. Induksi H₂O₂, EDSM. Dan Eugenol

- a. Masing-masing sel lini HepG2 yang telah mencapai *confluent* 80% ditripsi 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 H₂O₂ dengan konsentrasi akhir sebanyak 15 mM. Sel diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂.
- h. Setelah diinduksi H₂O₂, sel diinduksi dengan ekstrak daun sirih merah dan eugenol dengan perincian sebagai berikut:
- Kontrol Normal
 - Kontrol H₂O₂ 15 mM
 - H₂O₂ 15 mM + EDSM 100 ug/ml
 - H₂O₂ 15 mM + EDSM 25 ug/ml
 - H₂O₂ 15 mM + Eugenol 25 ug/ml
 - H₂O₂ 15 mM + Eugenol 6.25 ug/ml
- Sel diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂.

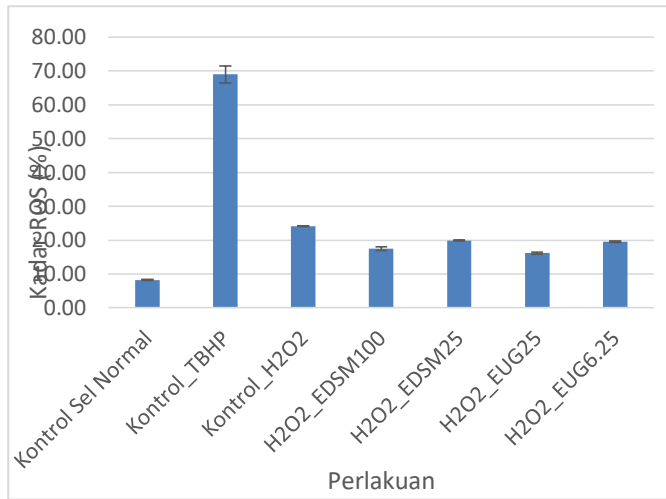
- b. Pengukuran kadar ROS.
- a. Sel dimasukkan kedalam FACS *round tube* sebanyak 250000 sel/0.5ml.
 - b. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit.
 - c. Supernatant dibuang, pelet sel diresuspensi menggunakan buffer DCFDA 1x + 10% FBS.
 - d. 20 µM DCFDA dimasukkan kedalam suspensi sel kemudian diinkubasi selama 45 menit di dalam ruang gelap, pada suhu 37°C, 5% CO₂.
 - e. Setelah diinkubasi sel diberi perlakuan sebagai berikut (*Final concentration*):
 1. Kontrol Normal
 2. Kontrol H₂O₂ 15 mM
 3. H₂O₂ 15 mM + EDSM 100 ug/ml

4. H₂O₂ 15 mM + EDSM 25 ug/ml
 5. H₂O₂ 15 mM + Eugenol 25 ug/ml
 6. H₂O₂ 15 mM + Eugenol 6.25 ug/ml
- f. Sel diinkubasi selama 4 jam dalam inkubator pada suhu 37°C, 5% CO₂.
 - g. Kadar ROS diukur dengan menggunakan flowcytometer

6. Hasil Uji

Sampel	Kadar ROS-DCFDA (%)
Kontrol Sel Normal	8.26±0.21 ^a
Kontrol TBHP	68.95±2.54 ^d
Kontrol H ₂ O ₂	24.10±0.14 ^c
H ₂ O ₂ EDSM100	17.49±0.52 ^b
H ₂ O ₂ EDSM25	19.90±0.14 ^{b,c}
H ₂ O ₂ EUG25	16.14±0.28 ^c
H ₂ O ₂ EUG6.25	19.55±0.19 ^c

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



Gambar 7.1 Kadar ROS pada sel HepG2 yang diinduksi H₂O₂ dan diberi perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Eugenol.

7. Kesimpulan.

Hasil uji ROS menunjukkan bahwa induksi H₂O₂ 15 mM meningkatkan kadar ROS. EDSM dan Eugenol pada konsentrasi EDSM 25 µg/mL, 100 µg/mL dan Eugenol 25 µg/mL, 6.25 µg/mL dapat menurunkan kadar ROS pada sel HepG2 yang diinduksi H₂O₂ 15 mM.

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.
- 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.
- Broekman W, Amatngalim GD, Mooij-eijk Y, De Oostendorp J, Roelofs H, Taube C, et al. TNF- α and IL-1 β -activated human mesenchymal stromal cells increase airway epithelial wound healing in vitro via activation of the epidermal growth

- factor receptor. *Respiratory Research*; 2016;1–12. <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0316-1>
- Chen H, Min XH, Wang QY, Leung FW, Shi L, Zhou Y, et al. Pre-activation of mesenchymal stem cells with TNF- α , IL-1 β 2 and nitric oxide enhances its paracrine effects on radiation-induced intestinal injury. *Scientific Reports* 2015;5:1–14. <https://doi.org/10.1038/srep08718>
- Corti A, Poiesi C, Merli S, Cassani G. Tumor Necrosis Factor (TNF) α quantification by ELISA and bioassay: effects of TNF α -soluble TNF receptor (p55) complex dissociation during assay incubations. *Journal of Immunological Methods* 1994; 177(1–2):191–198. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90156-2)
- Danielpour D, Dart LL, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB. Immunodetection and quantitation of the two forms of transforming growth factor-beta (TGF- β 1 and TGF- β 2) secreted by cells in culture. *Journal of Cellular Physiology* 1989; 138(1):79–86. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041380112>
- Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, et al. TNF- α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 2000;103(7):1071–1083. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00210-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00210-5)
- Kandoi LPK, Misra S, Vijayalakshmi R, Rajagopal SK. Cytokine and Growth Factor Reviews The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2019;1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.04.002>
- Pawitan JA. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium. 2014; 7–9.

- Petyovka N, Lyach L, Voitenok NN. Homologous ELISA for detection of oligomeric human TNF: properties of the assay. *Journal of Immunological Methods*, 186(2) 1995;161–170. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00183-B](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00183-B)
- Wallace HJ, Stacey MC. Levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and soluble TNF receptors in chronic venous leg ulcers - Correlations to healing status. *Journal of Investigative Dermatology* 1998;110(3):292–296. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00113.x>
- Zhang C, Deng X, Zhang X, Pan Z, Zhao W, Zhang Y, Yang X, Association between Serum TNF- α Levels and Recurrent Spontaneous Miscarriage: A Meta-analysis. *American J Reproductive Immunology* 2016; 75(2):86–93 <https://doi.org/10.1111/aji.12447>.
- Galindo, L. T., Filippo, T. R. M., Semedo, P., Ariza, C. B., Moreira, C. M., Camara, N. O. S., & Porcionatto, M. A. (2011). Mesenchymal Stem Cell Therapy Modulates the Inflammatory Response in Experimental Traumatic Brain Injury, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/564089>
- Huurne, M., Schelbergen, R., Blattes, R., Blom, A., Munter, W. De, Grevers, L. C., Lent, P. L. E. M. Van. (2012). Antiinflammatory and Chondroprotective Effects of Intraarticular Injection of Adipose-Derived Stem Cells in Experimental Osteoarthritis, 64(11), 3604–3613. <https://doi.org/10.1002/art.34626>
- Järvinen, K., Vuolteenaho, K., Nieminen, R., Moilanen, T., & Knowles, R. G. (n.d.). Selective iNOS inhibitor 1400W enhances anti-catabolic IL-10 and reduces destructive MMP-10 in OA cartilage . Survey of the effects of 1400W on inflammatory mediators produced by OA cartilage as detected by protein antibody array, 275–282.

- Kim, Y., Wee, Y., Choi, M., Lim, D., Kim, S., & Han, D. (2011). Interleukin (IL) -10 Induced by CD11b + Cells and IL-10-Activated Regulatory T Cells Play a Role in Immune Modulation of Mesenchymal Stem Cells in Rat Islet Allografts, 7(II). <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00098>
- Kwong, L. S., Hope, J. C., Thom, M. L., Sopp, P., Duggan, S., Bembridge, G. P., & Howard, C. J. (2002). Development of an ELISA for bovine IL-10, 85, 213–223.
- Min, C., Kim, B., Park, G., Cho, B., & Oh, I. (2007). IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation, (February), 637–645. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705644>
- Payne, N. L., Sun, G., McDonald, C., Moussa, L., Emerson-webber, A., Loisel-meyer, S., ... Bernard, C. C. A. (2013). Brain , Behavior , and Immunity Human adipose-derived mesenchymal stem cells engineered to secrete IL-10 inhibit APC function and limit CNS autoimmunity. *Brain Behavior and Immunity*, 30, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.01.079>
- Platas, J., Guillén, M. I., Dolores, M., Gomar, F., Mirabet, V., & Alcaraz, M. J. (2013). Conditioned Media from Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Downregulate Degradative Mediators Induced by Interleukin-1 β in Osteoarthritic Chondrocytes, 2013.
- Prockop, D. J., & Oh, J. Y. (2009). Mesenchymal Stem / Stromal Cells (MSCs): Role as Guardians of Inflammation. *Molecular Therapy*, 20(1), 14–20. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.211>
- Yang, S., Park, M., Yoon, I., Kim, S., Hong, S., Shin, J., ... Park, C. (2009). Soluble mediators from mesenchymal stem cells

suppress T cell proliferation by inducing IL-10, 41(5), 315–324. <https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.5.035>

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.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.

Burkholder, J. K., Decker, J., and Yang, N. S. (1993) Rapid transgene expression in lymphocyte and macrophage primary cultures after particle bombardment-mediated gene transfer. *J Immunol Methods* 165, 149–156.

Capecchi, M. R. (1980) High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22, 479–488.

Freshney, R. I. (1993) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Wiley-Blackwell, New York.

- Kim, T. K. and Eberwine, J. H. (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397, 3173–3178.
- Laksmiawati DL, 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 Souroup (*Annona muricata* L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). *Journal of Natural Remedies* 2016;Vol 16 (2).
- 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. *Research Journal of Medicinal 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. *Natural Product Sciences* 22(3) : 147-153 (2016).
- 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 May;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 Soursoop (*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.
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D. and Barreda, D. R. 2011. Modified annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *J Vis Exp.* (50): 2597.
- Vermes, I., Hannen, C., and Reutelingsperger, C. 2000. Flowcytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*, 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 Souroup (*Annona muricata* L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). *J Nat Remedies* 2016;16(2):73-81
- Novilla A, Djahhuri 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.
- 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.
- Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248–254 (1976).
- Compton SJ and Jones CG, Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Anal Biochem* 151, 369–374 (1985)
- Fanger B, Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents, *Anal Biochem* 162, 11–17 (1987)
- Fazekas de St. Groth S et al., Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips, *Biochim Biophys Acta* 71, 377–391 (1963).
- Sedmak JJ and Grossberg SE, A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250, *Anal Biochem* 79, 544–552 (1977).

- 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* 86, 142–146 (1978).
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Biokimia Harper Edisi 25*. Jakarta: eGC. 2003:195-205.
- Shimizu Y. Liver in systemic disease. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2008 Jul 14;14(26):4111.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*. 2009 May 22;324(5930):1029-33.
- 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 Sour soup (*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 *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, Laksmiawati 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.

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

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

EFEKTIFITAS EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH DAN EUGENOL TERHADAP SEL HepG2 (Induksi H₂O₂)

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

ISBN 978-623-7911-00-5

