

ISBN : 978-623-91085-4-0

Buku Monograf

**MANFAAT EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH
TERHADAP SEL HepG2 (Sel Kanker Hati).**

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

Editor :

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



Penerbit :
UNPRI PRESS



MANFAAT EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH TERHADAP SEL HepG2 (Sel Kanker Hati).

Penulis

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

Editor

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

ISBN

978-623-91085-4-0

Desain Cover

Johannes Bastira Ginting, M.K.M

Penerbit

UNPRI PRESS

Redaksi

Jl. Belanga No 1. Simp. Ayahanda, Medan

Cetakan Pertama, Desember 2019

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 dengan judul **MANFAAT EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH TERHADAP SEL HepG2 (Sel Kanker Hati)**, berisi tentang pengaruh ekstrak daun sirih merah dan eugenol terhadap sel kanker hati (HepG2).

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

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

Penulis

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

DAFTAR ISI

	Halaman
Kata Pengantar	ii
Daftar Isi	iii
Daftar Gambar	viii
Daftar Tabel	ix
Pendahuluan	1
A. Uji Sitotoksik Ekstrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol Terhadap Sel HepG2	6
I. Kultur Sel	9
1.1 Prinsip	9
1.2 Bahan dan Consumable	10
1.3 Alat dan Consumable.....	10
1.4 Prosedur	11
II. Uji Sitotoksik	12
2.1 Prinsip	12
2.2. Bahan	13
2.3 Alat dan Consumable	13
2.4 Konsentrasi Uji	14
2.5 Cara Kerja	14
2.6 Hasil Uji	15
2.7 Kesimpulan	16
B. Uji Antiinflamasi Ekstrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol Terhadap Sel HepG2	
Yang Diinduksi Apap	18
I. Kultur Sel	19
1.1 Prinsip	19
1.2 Bahan dan Consumable	20
1.3 Alat dan Consumable.....	20
1.4 Prosedur	21
II. Induksi apap, ekstrak, dan senyawa	22
2.1 Prinsip	22
2.2. Bahan dan Consumable.....	23
2.3 Alat dan Consumable	23
2.4 Prosedur	23
III. UJI TNF- α	
3.1 Prinsip	24
3.2. Bahan dan Consumable.....	25

3.3 Alat dan Consumable	26
3.4 Konsentrasi Uji	26
3.5 Cara Kerja	27
3.6 Hasil Uji	28
IV. UJI IL-10	29
4.1 Prinsip	29
4.2. Bahan.....	29
4.3 Alat dan Consumable	30
4.4 Konsentrasi Uji	30
4.5 Cara Kerja	30
4.6 Hasil Uji	31
4.7 Kesimpulan	32
 C. UJI EKSPRESI GEN CYP2B1, GPX, CYP1B1 DAN PADA SEL HepG2 YANG DIINDUKSI APAP DAN DIBERI PERLAKUAN EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH (EDSM) DAN EUGENOL (EUG)	
I. Kultur Sel	34
1.1 Prinsip	34
1.2 Bahan dan Consumable	35
1.3 Alat dan Consumable.....	35
1.4 Prosedur	36
II. Induksi Apap, Ekstrak, Dan Senyawa	38
2.1 Prinsip	38
2.2. Bahan dan Consumable.....	38
2.3 Alat dan Consumable	38
2.4 Prosedur	39
III. Isolasi RNA Dan Sintesa cDNA.....	40
3.1 Bahan	40
3.2. Alat.....	40
3.3 Prosedur Isolasi RNA.....	41
3.4 Sintesa cDNA	42
IV. qPCR CYP2E1, GPx, CYP1B1	43
4.1 Prinsip	43
4.2. Bahan dan Consumable.....	44
4.3 Alat dan Consumable	45
4.4 Preparasi Reagen	45
4.5 Prosedur Kuantitatif Ekspresi Gen	45

4.6 Hasil Uji	46
4.7 Hasil Analisis	48
4.8 Kesimpulan	49
D. Uji Antioksidan Ekstrak Daun Sirih Merah (Edsm) Dan Eugenol (Eug) Terhadap Sel HepG2 Yang Diinduksi APAP	
I. Kultur Sel	52
1.1 Prinsip	52
1.2 Bahan dan Consumable	53
1.3 Alat dan Consumable.....	53
1.4 Prosedur	54
II. Induksi Apap, Ekstrak, Dan Senyawa	55
2.1 Prinsip	55
2.2. Bahan dan Consumable.....	56
2.3 Alat dan Consumable	56
2.4 Prosedur	56
III. Uji MDA	57
3.1 Prinsip	57
3.2. Bahan.....	58
3.3 Alat dan Consumable	58
3.4 Cara Kerja	59
3.5 Hasil Uji.....	60
IV. UJI SOD	61
4.1 Prinsip	61
4.2. Bahan dan Consumable.....	63
4.3 Alat dan Consumable	63
4.4 Cara Kerja	64
4.5 Hasil Uji	65
4.6 Kesimpulan	66
E. UJI APOPTOSIS PADA SEL HepG2 YANG DIINDUKSI APAP DAN DITREATMENT DENGAN ESKTRAK DAUN SIRIH MERAH DAN EUGENOL.....	69
I. Kultur Sel	69
1.1 Prinsip	69
1.2 Bahan dan Consumable	70
1.3 Alat dan Consumable.....	70
1.4 Prosedur	71
1.5 Hasil Kultur Sel	72

II.	Uji Apoptosis	72
2.1	Prinsip	72
2.2.	Bahan dan Consumable.....	73
2.3	Alat dan Consumable	74
2.4	Prosedur	75
2.5	Hasil Uji	77
2.6	Kesimpulan	78
F.	UJI HEPATOTOKSIK EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH DAN EUGENOL TERHADAP SEL HepG2 YANG DIINDUKSI APAP.....	80
I.	Kultur Sel	80
1.1	Prinsip	80
1.2	Bahan dan Consumable	81
1.3	Alat dan Consumable.....	81
1.4	Prosedur	82
II.	Induksi Apap, Ekstrak, Dan Senyawa	83
2.1	Prinsip	83
2.2.	Bahan dan Consumable.....	84
2.3	Alat dan Consumable	84
2.4	Prosedur	85
III.	Uji Total Protein (Braford).....	86
3.1	Prinsip	86
3.2.	Bahan.....	87
3.3	Alat dan Cosumable.....	87
3.4	Konsentrasi Uji	88
3.5	Sintesa cDNA	88
3.6	Hasil Uji	89
IV.	Uji AST	90
4.1	Prinsip	90
4.2.	Bahan	91
4.3	Alat dan Consumable	91
4.4	Preparasi Reagen	92
4.5	Hasil Uji	93
V.	Uji ALT	94
5.1	Prinsip	94
5.2.	Bahan	95
5.3	Alat dan Consumable	95
5.4	Cara Kerja	96
5.5	Hasil Uji	97

VI.	Uji LDH	98
6.1	Prinsip	98
6.2.	Bahan	99
6.3	Alat dan Consumable	99
6.4	Cara Kerja	100
6.5	Hasil Uji	101
6.6	Kesimpulan	102
G.	UJI KADAR REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) PADA SEL HepG2 YANG DIINDUKSI APAP DAN DITREATMENT DENGAN ESKTRAK DAUN SIRIH MERAH DAN EUGENOL.....	105
I.	Kultur Sel	105
1.1	Prinsip	105
1.2	Bahan dan Consumable	106
1.3	Alat dan Consumable.....	106
1.4	Prosedur	107
1.5	Hasil Kultur Sel	108
II.	Uji Kadar ROS-DCFDA	108
2.1	Prinsip	108
2.2.	Bahan dan Consumable.....	109
2.3	Alat dan Consumable	110
2.4	Konsentrasi Uji	110
2.5	Cara Kerja	111
2.6	Hasil Uji	113
2.7	Kesimpulan	114
	DAFTAR PUSTAKA	x

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Morfologi Sel HepG2.....	12
Gambar 2 Viabilitas sel HepG2 setelah diinduksi EDSM dan eugenol	16
Gambar 3 Morfologi Sel HepG2.....	22
Gambar 4 Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein TNF- α pada sel HepG2 setelah diinduksi APAP	32
Gambar 5 Gambar 5 Ekspresi Gen CYP2E1, GPx DAN CYP1B1	46
Gambar 6. Morfologi Sel HepG2 pada perbesaran 400x.....	55
Gambar 8. Aktivitas MDA Sel HepG2 yang diinduksi APAP serta Perlakuan dengan Eugenol dan Ekstrak Daun Sirih Merah	61
Gambar 9. Aktivitas SOD oleh Sel HepG2 yang Diinduksi APAP dan Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Senyawa Eugenol.....	66
Gambar 10. Morfologi Sel HepG2 Uji Apoptosis	72
Gambar 11. Morfologi Sel HepG2 Uji Hepatotoksik	83
Gambar. 12 Kurva standar BSA	89
Gambar. 13 Kandungan AST Sel HepG2 yang diinduksi APAP serta Perlakuan dengan Eugenol dan Ekstrak Daun Sirih Merah	94
Gambar 14. Aktivitas ALT oleh Sel HepG2 yang Diinduksi APAP dan Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Senyawa Eugenol.....	98
Gambar 15. Kandungan LDH Sel HepG2 yang diinduksi APAP serta Perlakuan dengan Eugenol dan Ekstrak Daun Sirih Merah	102
Gambar 16. Morfologi Sel HepG2 Uji Reactive Oxygen.	108
Gambar 17. Kadar ROS pada perlakuan pada sel HepG2 yang diinduksi APAP dan ditreatment dengan ekstrak daun sirih merah d,an eugenol.....	114

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Hasil uji sitotoksik EDSM dan Eugenol pada sel HepG2	15
Tabel 2 Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein TNF- α pada sel HepG2 setelah diinduksi APAP	28
Tabel 3 Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein IL-10 pada sel HepG2 setelah diinduksi APAP	31
Tabel 4 Kadar MDA pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi APAP	60
Tabel 5 Kadar SOD pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi APAP	65
Tabel 6 Hasil Uji Apoptosis Sel HepG2 dengan Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Eugenol	77
Tabel 7 Kurva standar BSA.....	89
Tabel 8 Hasi uji Protein Total menggunakan metode Bradford.....	90
Tabel 9 Konsentrasi protein AST pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi APAP	93
Tabel 10 Konsentrasi protein ALT pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi APAP	97

PENDAHULUAN

Saat ini masyarakat dunia dan juga Indonesia mulai mengutamakan penggunaan obat secara alami (back to nature). Pemanfaatan herbal medicine ramai dibicarakan, termasuk manfaatnya, namun kebanyakan informasi yang ada hanya sebatas bukti empiris belum ada bukti ilmiah. Indonesia memiliki jenis tanaman obat yang banyak ragamnya (Juliantina, 2009).

Salah satu tumbuhan yang dikenal luas oleh masyarakat yang berguna untuk pengobatan adalah sirih. Sirih merupakan tanaman yang telah banyak digunakan sebagai obat di Asia tenggara. Sirih di indonesia ada beberapa jenis, yang dibedakan berdasarkan besar daun, rasa dan aromanya, yaitu sirih hijau, sirih banda, sirih cengkih, sirih hitam dan sirih merah (Moljanto & Mulyono, 2003; Sudewo, 2005).

Daun sirih merah mengandung senyawa kimia seperti alkaloid, flavonoid, tanin dan minyak atsiri yang diduga berpotensi sebagai daya antimikroba (Ebadi, 2002). Sehubungan dengan sirih merah dan sirih hijau berasal dari genus yang sama, diperkirakan sirih merah juga memiliki efek yang sama terhadap pertumbuhan mikroba.

Namun, evidence based medicine mengenai pemanfaatan sirih merah masih sedikit. Hal ini disebabkan sirih merah masih belum lama dikenal masyarakat luas sehingga informasi ilmiah mengenai tanaman ini terbatas, demikian juga dengan jurnal ilmiah di dalam negeri maupun luar negeri (Juliantina dkk, 2009).

Menurut Syariefa (2006) seluruh bagian tanaman daun sirih merah mengandung unsur-unsur pengobatan, terutama daunnya.

Tanaman sirih merah

- Keterangan botani

Familia : Piperacea (suku sirih-sirihan)

Genus : *Piper*

Spesies : *Piper crocatum* Ruiz & Pav.
(Anonim,

2008b)

- Sinonim

Piper ornatum N. E. Br

- Deskripsi

Tanaman sirih merah tumbuh menjalar. Batangnya bulat berwarna hijau keunguan dan tidak berbunga. Daunnya bertangkai membentuk jantung dengan bagian atas meruncing, bertepi rata dan

permukaannya mengkilap dan tidak berbulu. Panjang daunnya bisa mencapai 15-20 cm. Warna daun bagian atas hijau bercorak putih keabu-abuan, bagian bawah daun berwarna merah hati cerah. Daunnya berlendir, berasa sangat pahit, dan beraroma wangi khas sirih. Batangnya beruas dengan jarak buku 5-10 cm. Disetiap buku tumbuh bakal akar (Sudewo, 2005).

- Habitat

Sirih merah tergolong langka karena tidak tumbuh di setiap tempat atau daerah. Sirih merah tidak dapat tumbuh subur di daerah panas. Sementara itu, di tempat berhawa dingin sirih merah dapat tumbuh dengan baik. Tanaman sirih merah akan tumbuh dengan baik jika mendapatkan 60-70% cahaya matahari (Sudewo, 2005).

- Kandungan kimia

Berdasarkan penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa sirih merah mengandung flavonoid, alkoloid, senyawa polifenolat, tanin dan minyak atsiri (Sudewo, 2005).

Oleh karena manfaat daun sirih merah yang sudah mulai menjadi salah satu prioritas untuk pengobatan herbal yang dapat menyembuhkan penyakit kanker, maka oleh karena itu penulis tertarik untuk membuat buku monograf

tentang beberapa hasil penelitian laboratorium yang dilakukan oleh penulis.

Di dalam buku ini, penulis akan menyajikan beberapa hasil penelitian laboratorium ekstrak daun sirih merah dan eugenol dengan beberapa uji, yaitu :

1. Uji Sitotoksik Ekstrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol Terhadap Sel HepG2.
2. Uji Antiinflamasi Ekstrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol Terhadap Sel HepG2 Yang Diinduksi Apap.
3. Uji Ekspresi Gen CYP2B1, GPX, CYP1B1 DAN PADA Sel HepG2 Yang Diinduksi Apap Dan Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) dan Eugenol (EUG).
4. Uji Antioksidan Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) dan Eugenol (EUG) terhadap Sel HepG2 yang diinduksi APAP
5. Uji Apoptosis pada SEL HepG2 yang diinduksi APAP dan ditreatment dengan esktrak daun sirih merah dan Eugenol.
6. Uji Hepatotoksik Ekstrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol Terhadap Sel HepG2 yang diinduksi Apap.
7. Uji Kadar Reactive Oxygen Species (ROS) pada sel HEPG2 yang diinduksi APAP dan Ditreatment Dengan Esktrak Daun Sirih Merah Dan Eugenol.

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

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

Senyawa sitotoksik merupakan suatu senyawa atau zat yang dapat merusak sel normal atau sel kanker, serta digunakan untuk menghambat pertumbuhan dari sel tumor maligna (Purwanto, et.al., 2005). Senyawa sitotoksik berpotensi sebagai obat anti kanker dengan cara menghambat pertumbuhan sel kanker (Lindholm, 2005).

Dewasa ini, telah banyak obat-obat yang telah dikembangkan untuk melawan kanker. Namun, kebanyakan obat antikanker menimbulkan efek-efek yang berbahaya. Tidak satupun dapat memberikan efek yang memuaskan tanpa efek samping yang merugikan. Hal ini umumnya disebabkan antineoplastik yang digunakan untuk pengobatan kanker menyebabkan toksisitas karena menghambat pembelahan sel normal yang proliterasinya cepat (Yuandani, et al., 2011).

Uji sitotoksitas

Uji sitotoksitas adalah uji in vitro dengan menggunakan kultur sel yang digunakan dalam evaluasi keamanan obat, kosmetika, zat tambahan makanan, pestisida, dan digunakan juga untuk mendeteksi adanya

aktivitas anti neoplastik dari suatu senyawa (Freshney, 1986).

Menurut national institute of health (NIH), senyawa antikanker dikategorikan dalam lima klasifikasi berdasarkan nilai LC₅₀. Klasifikasi tersebut meliputi :

- Kategori 1, senyawa antikanker dengan strongest LC₅₀ = 190-528 µg/ml ;
- Kategori 2 senyawa antikanker dengan strongest LC₅₀ = 528-1197 µg/ml ;
- Kategori 3 senyawa antikanker dengan strongest LC₅₀ = 1259-2515 µg/ml ;
- Kategori 4 senyawa antikanker dengan strongest LC₅₀ = 2528-4939 µg/ml ;
- Kategori 5 senyawa antikanker dengan strongest LC₅₀ > 5000 µg/ml ;

1. Metode MTT

Salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui viabilitas sel pada uji sitotoksitas adalah dengan menggunakan metode MTT. Pada metode MTT, garam tetrazolium MTT (3(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida), diabsorbsi ke dalam sel dan direduksi melalui reaksi yang ada di mitokondria

untuk membentuk formazan. Produk formazan terakumulasi di sel karena tidak dapat menembus membran sel (Barille, 1997). Metode ini cepat, sensitif, akurat dan dapat mengukur sampel dalam jumlah banyak (Doyle & Griffiths, 2000).

2. Metode Direct Counting

Metode yang paling umum dilakukan untuk penghitungan sel yang akurat dan efisien adalah dengan menggunakan haemocytometer. Dalam metode ini digunakan suatu bilik hitung dengan kedalaman 0,1 mm dan persegi untuk mempermudah penghitungan. Menggunakan zat warna seperti trypan blue, penghitungan sel yang hidup dan sel yang tidak hidup dapat dilakukan. Sampling yang akurat, pengenceran dan pengisian bilik secara tepat sangat penting. Pengisian yang berlebihan, adanya gelembung udara dan bilik hitung yang kurang bersih menyebabkan kesalahan perhitungan. Kesalahan statistik dapat dikurangi dengan menghitung cukup sel dengan replikasi yang tepat. Penghitungan dengan haemocytometer adalah metode yang paling sederhana dan *versatile* dengan keuntungan yaitu memberikan pengukuran langsung (aktual sel) (Doyle and Griffiths, 2000).

I. KULTUR SEL

1.1 Prinsip

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

Subkultur, juga disebut sebagai passaging, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan 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.

1.2 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)
- Nanomycopulitine (Biowest, LX16-100)
- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Amphotericine B (Biowest, L0009-050)

1.3 Alat dan Consumable

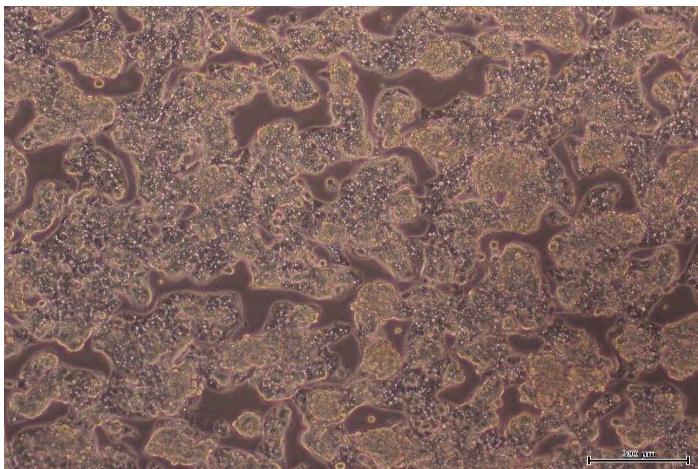
- Pipet Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO₂ Incubator (Thermo IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)
- Ultrasonic cleaner (Digital Pro, JP-020S)
- Flask T25 (Corning 430168)
- Centrifuge Tube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

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

1.4 Prosedur

Sel diambil dari tangki 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

II. UJI SITOTOKSIK

2.1 Prinsip

Uji MTS merupakan salah satu pengujian terhadap proliferasi melalui pengukuran viabilitas sel dengan melihat aktivitas metabolismnya. Prinsip pengujian MTS yaitu dengan pengukuran secara tidak langsung terhadap produk senyawa berwarna yang dihasilkan oleh sel viabel. MTS merupakan komponen tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, bentuk garam, MTS], komponen tetrazolium MTS direduksi oleh sel membentuk produk formazan

berwarna yang larut dalam medium kultur. Jumlah produk formazen diukur serapannya pada panjang gelombang 490 nm, dimana serapan yang dihasilkan ini setara dengan jumlah sel viabel.

2.2 Baham

- Medium Human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells line (ATCC, HB-8065)
- MTS 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-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)

2.3 Alat dan Consumable

- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO₂ Incubator (Thermo IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)

- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
- Hemacytometer (Neubauer)
- Syringe filter tissue culture 0,22 um (Sartorius, 17845)
- Syringe with needle 1 ml (Terumo, PS01T26)
- Microtube 1,5 ml (SPL, 62015)
- 96 well plate (Corning, 3596)
- Micropipette (Finnpipette F2)
- Tips Blue, yellow, white (Neptune)

2.4 Konsentrasi Uji

- 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 ($\mu\text{g/mL}$)

2.5 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% CO₂. Setelah inkubasi 24 jam, medium kultur diganti dengan medium kultur baru sebanyak 180 μl dan ditambahkan sampel 20 μl pada setiap well, selanjutnya

diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂. Setelah perlakuan selama 24 jam, ditambahkan 20 µl MTS pada tiap well, diinkubasi selama 3jam pada suhu 37°C, 5% CO₂. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometri dibaca pada panjang gelombang 490nm.

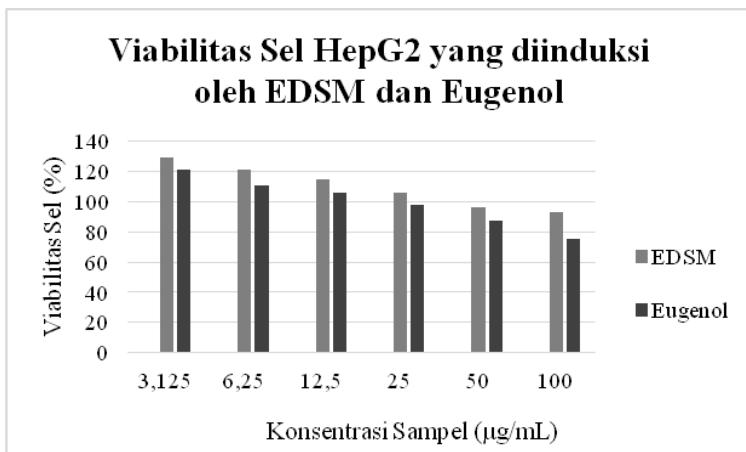
2.6 Hasil Uji

Tabel 1 Hasil uji sitotoksik EDSM dan Eugenol pada sel HepG2

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

2.7 Kesimpulan

Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) dan senyawa Eugenol aman pada rentang konsentrasi 62.5 – 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dengan rata-rata viabilitas sel mencapai $>80\%$. Konsentrasi aman dan efektif yang digunakan untuk uji selanjutnya EDSM 25, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan eugenol 62.5 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

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

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

Inflamasi adalah suatu respon protektif setempat yang ditimbulkan oleh kerusakan pada jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik, zat kimia yang merusak, atau zat mikrobiologik. Inflamasi berfungsi untuk menghancurkan, mengurangi, atau melokalisasi (sekuster) baik agen yang merusak maupun jaringan yang rusak.

Obat antiinflamasi yang biasa digunakan dibagi menjadi dua, yaitu antiinflamasi steroid dan antiinflamasi nonsteroid.

Namun kedua golongan obat tersebut memiliki banyak efek samping. Antiinflamasi steroid dapat menyebabkan tukak peptik, penurunan imunitas terhadap infeksi, osteoporosis, atropi otot dan jaringan lemak, meningkatkan tekanan intra okular,serta bersifat diabetik, sedangkanantiinflamasi nonsteroid dapat menyebabkan tukak lambung hingga pendarahan,mgangguan ginjal, dan anemia.

I. KULTUR SEL

1.1 Prinsip

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

Subkultur, juga disebut sebagai *passaging*, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan 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

1.2 Bahan dan Consumable

- MEM (Biowest, L0416-500)
- Medium Human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells line (ATCC, HB-8065)
- 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)

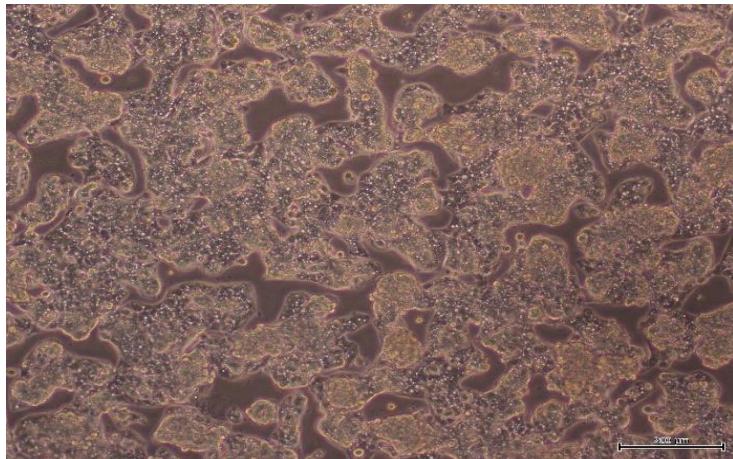
1.3 Alat dan Consumable

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

1.4 Prosedur

Sel diambil dari tangki 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 3. Morfologi Sel HepG2

II. INDUKSI APAP, EKSTRAK, DAN SENYAWA

2.1 Prinsip

Sel yang sebelumnya telah dikultur kemudian diganti mediumnya diinduksi dengan APAP selama 24 jam untuk membuat model kerusakan hati. Setelah diinduksi APAP, 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 APAP.

2.2 Bahan dan Consumable

- Medium Kultur Sel Medium kultur sel HepG2
- Acetominophene (APAP) (Sigma Aldrich, A7085-100G)
- Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) (0160718-C020)
- Senyawa Eugenol (Sigma Aldrich, 35995-250MG)

2.3 Alat dan Consumable

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

2.4 Prosedur

Sel yang sudah mencapai konfluensi dibilas dengan PBS dan ditambahkan tripsin EDTA dan diinkubasi 37°C. Kemudian sel dihitung dengan hemositometer dan diseeding dalam 6 well plate. Sel diinkubasi dalam incubator 37°C, CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah sel attahed, sel diinduksi menggunakan 40mM APAP Setelah diinduksi dengan APAP, 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 APAP 40 mM
- d. APAP 40 mM + EDSM 25 ug/ml
- e. APAP 40 mM + EDSM 100 ug/ml
- f. APAP 40 mM + Eug 6.25 ug/ml
- g. APAP 40 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 dihaverst menggunakan teknik trpisinasi.

III. UJI TNF-α

3.1 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) b, CXCL1, CXCL2, CXCL6, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), and *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF2).

3.2 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 MAX™ Deluxe Set Protocol
- Wash Buffer (BioLegend, 421601)
- PBS (Gibco, 1740576)
- Stop Solution (BioLegend, 423001)

3.3 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)

3.4 Konsentrasi Uji

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

3.5 Cara Kerja

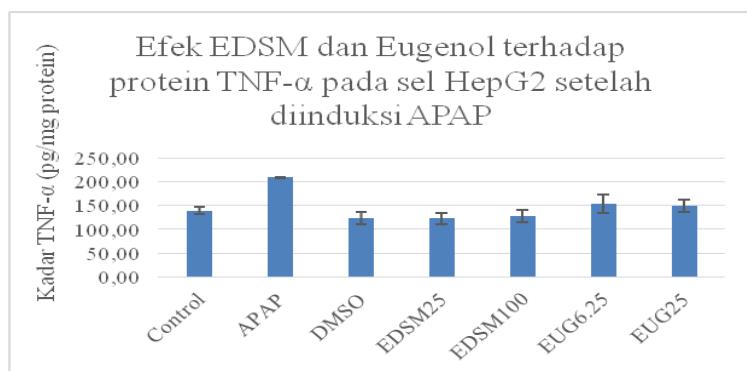
Sehari sebelum melakukan ELISA, masukan 100 μL *Capture Antibody* tiap well lalu tutup dengan seal dan inkubasi selama 18 jam dengan suhu 4°C. Lalu cuci plate 4 kali dengan 200 μL *Wash Buffer* tiap well, ketuk plate secara terbalik di atas kertas penyerap untuk menghilangkan sisanya. Kemudian tambahkan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

3.6 Hasil Uji

Tabel 2 Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein TNF- α pada sel HepG2 setelah diinduksi APAP

Sampel	Konsentrasi TNF- α (pg/mL)	Konsentrasi TNF- α (pg/mg protein)
Kontrol +	20.60 ± 1.13 ^a	139.19 ± 7.61 ^a
APAP	33.00 ± 0.10 ^b	208.86 ± 0.30 ^b
DMSO	19.37 ± 2.06 ^a	123.35 ± 10.6 ^a
EDSM 25 μ g/mL	18.80 ± 1.84 ^a	122.88 ± 9.76 ^a
EDSM 100 μ g/mL	20.37 ± 2.02 ^a	128.09 ± 9.93 ^a
Eug 6.25 μ g/mL	22.40 ± 2.80 ^a	153.42 ± 12.50 ^a
Eug 25 μ g/mL	23.40 ± 2.17 ^a	149.48 ± 9.14 ^a

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



Gambar 4 Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein TNF- α pada sel HepG2 setelah diinduksi APAP.

IV. UJI IL-10

4.1 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

4.2 Bahan

- Sel lini human hepatocellular carcinoma (HepG2) (ATCC, HB-8065)
- Human IL-10 ELISA Kit (BioLegend, 430604)
- Yang berisi: Human IL-10 ELISA MAXTM Capture Antibody (200X), Human IL-10 ELISA MAXTM

Detection Antibody (200X), Human IL-10 Standard, Avidin-HRP (1000X), Substrate Solution A, Substrate Solution B, Coating Buffer A (5X), Assay Diluent A (5X), Lot-Specific.

- Akuabides

4.3 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)

4.4 Konsentrasi Uji

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

4.5 Cara Kerja

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

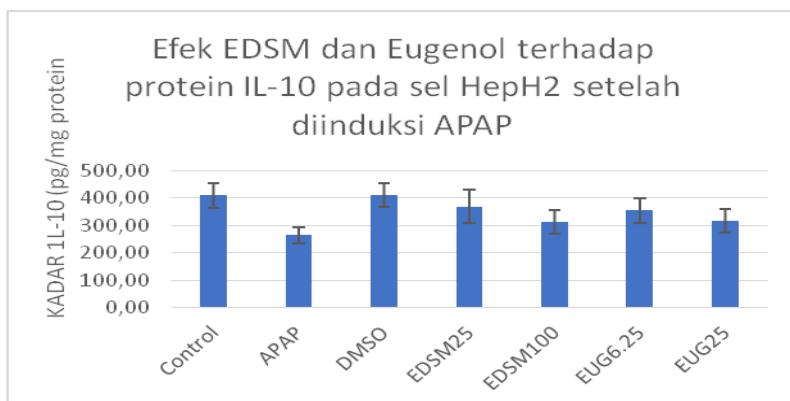
lalu inkubasi selama 1 jam diatas *plate shaker*. Masukan 100 μl standar dan sampel,kemudian inkubasi selama 2 jam diatas *plate shaker*. Selanjutnya buang larutan lalu cuci dengan 200 μl *wash buffer* sebanyak 4X. Lalu tambahkan 100 μl *Detection Antibody*,dan inkubasi selama 1 jam diatas *plate shaker*. Selanjutnya buang larutan lalu cuci dengan 200 μl *wash buffer* sebanyak 4X. Tambahkan 100 μl *Avidin-HRP*, alu 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.

4.6 Hasil Uji

Tabel 3 Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein IL-10 pada sel HepG2 setelah diinduksi APAP

Sampel	Konsentrasi IL-10 (pg/mL)	Konsentrasi IL-10 (pg/mg protein)
Kontrol +	$60.63 \pm 6.57^{\text{b}}$	$409.64 \pm 44.40^{\text{b}}$
APAP	$39.25 \pm 4.41^{\text{a}}$	$265.22 \pm 29.78^{\text{a}}$
DMSO	$60.66 \pm 6.41^{\text{b}}$	$409.84 \pm 43.33^{\text{b}}$
EDSM 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$54.65 \pm 9.18^{\text{ab}}$	$369.25 \pm 62.05^{\text{ab}}$
EDSM 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$46.23 \pm 6.60^{\text{ab}}$	$312.39 \pm 44.61^{\text{ab}}$
Eug 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$52.56 \pm 6.55^{\text{ab}}$	$355.14 \pm 44.27^{\text{ab}}$
Eug 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$47.00 \pm 6.33^{\text{ab}}$	$317.54 \pm 42.79^{\text{ab}}$

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 5 Efek EDSM dan Eugenol terhadap protein IL-10 pada sel HepG2 setelah diinduksi APAP

4.7 Kesimpulan

Induksi APAP 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 CYP2B1, GPX, CYP1B1
DAN PADA SEL HepG2 YANG DIINDUKSI
APAP DAN DIBERI PERLAKUAN EKSTRAK
DAUN SIRIH MERAH (EDSM)
DAN EUGENOL (EUG)**

C. UJI EKSPRESI GEN CYP2B1, GPX, CYP1B1 DAN PADA SEL HepG2 YANG DIINDUKSI APAP DAN DIBERI PERLAKUAN EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH (EDSM) DAN EUGENOL (EUG)

1. KULTUR SEL

1.1 Prinsip

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

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

Subkultur, juga disebut sebagai *passaging*, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan 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

1.2 Bahan dan Consumable

- Kultur sel lini Human hepatocellular carcinoma (HepG2) (ATCC, HB-8065)
- MEM (Biowest, L0416-500)
- PBS 1x (Gibco, 1740576)
- Fetal bovine serum/FBS (Gibco, 10270106)
- Antibiotic and Antimycotic/ABAM (Gibco, 1772653)
- Fungizone Amphotericin (Gibco 15290026)
- 0,1% Gentamicin (Gibco 15750060)
- 1% Nanomycopulin (biowest L-X16)

1.3 Alat dan Consumable

- Pipet Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)

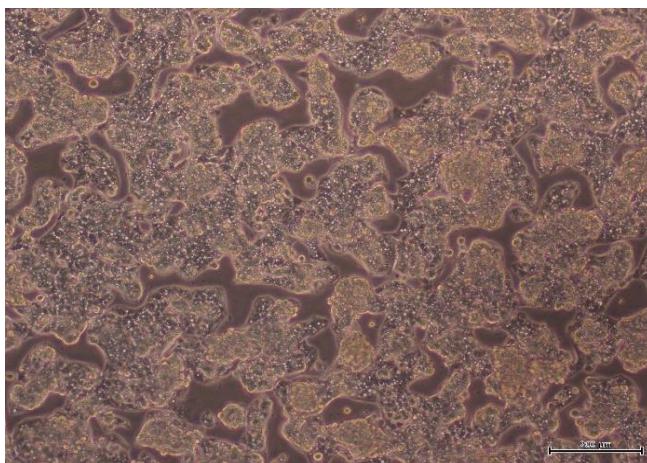
- CO₂ Incubator (Thermo IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)
- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)
- Ultrasonic cleaner (Digital Pro, JP-020S)
- Flask T25 (Corning 430168)
- Centrifuge Tube 15ml (SPL 50015)
- Tube 50ml (SPL 50015)
- Serological Pippet 5ml (SPL 91005)
- Serological Pippet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

1.4 Prosedur

Sel diambil dari tanki nitrogen cair (-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 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.

Tripsiniasi 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 6. Morfologi Sel HepG2

2. INDUKSI APAP, EKSTRAK, DAN SENYAWA

2.1 Prinsip

Sel yang sebelumnya telah dikultur kemudian diganti mediumnya diinduksi dengan APAP selama 24 jam untuk membuat model kerusakan hati. Setelah diinduksi APAP, 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 APAP

2.2 Bahan dan Consumable

- Medium Kultur Sel Medium kultur sel HepG2
- Acetominophene (APAP) (Sigma Aldrich, A7085-100G)
- Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) (0160718-C020)
- Senyawa Eugenol (Sigma Aldrich, 35995-250MG)

2.3 Alat dan Consumable

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

2.4 Prosedur

Sel yang sudah mencapai konfluensi dibilas dengan PBS dan ditambahkan tripsin EDTA dan diinkubasi 37°C. Kemudian sel dihitung dengan hemositometer dan diseeding dalam 6 well plate. Sel diinkubasi dalam incubator 37°C, CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah sel attahed, sel diinduksi menggunakan 40mM APAP Setelah diinduksi dengan APAP, 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 APAP 40 mM
- d. APAP 40 mM + EDSM 25 ug/ml
- e. APAP 40 mM + EDSM 100 ug/ml
- f. APAP 40 mM + Eug 6.25 ug/ml
- g. APAP 40 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 dihaverst menggunakan teknik trpisinasi.

3. ISOLASI RNA DAN SINTESA cDNA

3.1 Bahan

1. cDNA dari HepG2
2. cDNA dari kontrol APAP
3. cDNA dari APAP + EDSM100
4. cDNA dari APAP +EDSM25
5. cDNA dari APAP + Eug25
6. cDNA dari APAP +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

3.2 Alat

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

3.3 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 μ l low stringency wash solution ditambahkan pada column. Sentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 13000 rpm 4°C Buang filtrate. 76 μ l larutan DNase I ditambahkan (1 μ l DNase I + 75 μ l DNAse solution) pada column. Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. 700 μ l High stringency wash solution ditambahkan. Sentrifugasi selama 30 detik pada kecepatan 13000 rpm. Buang filtrate. 700 μ l 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.linkubasi dilakukan selama 1 menit pada suhu ruang. Sentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 13000 rpm.

3.4 Sintesa cDNA

1. 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
Nuclease Free Water (NFW)	jumlah NFW yang dimasukkan menyesuaikan dengan jumlah konsentrasi RNA
Total Reaksi	20 μl

2. 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

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

4. qPCR CYP2E1, GPx, CYP1B1

4.1 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.

4.2 Bahan dan Consumable

- Reverse Transcriptase, iScript Supermix (BioRad, 170-8841)
- cDNA dari :
 1. HepG2
 2. Normal cells
 3. Kontrol APAP
 4. APAP + EDSM100
 5. APAP + EDSM25
 6. APAP + Eug25
 7. APAP + 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
CYP2E1	GTTCTTGCAGGGACAGAGA	GAGGGTGATGAACCGCTGAA
GPx	CCAAGCTCATCACCTGGTCT	TCGATGTCAATGGTCTGGAA
CYP1B1	CCAAGCTCATCACCTGGTCT	TCGATGTCAATGGTCTGGAA

4.3 Alat dan Consumable

- RT-PCR (Thermo Scientific, PikoReal 96)
- PCR Cabinet (SCR-ZAI)
- Mikropippet (Serana)
- 0,2 ml PCR Tube Flat Cap Clear (Neptune, 3423)
- Tips 1-10 μ l , 10-200 μ l
- Piko PCR Plates (Finnzymes, SPL0961)

4.4 Preparasi reagen

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

4.5 Prosedur Kuantitatif Ekspresi 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
Nuclease Free Water	2 μ l
Total Volume	10 μ l

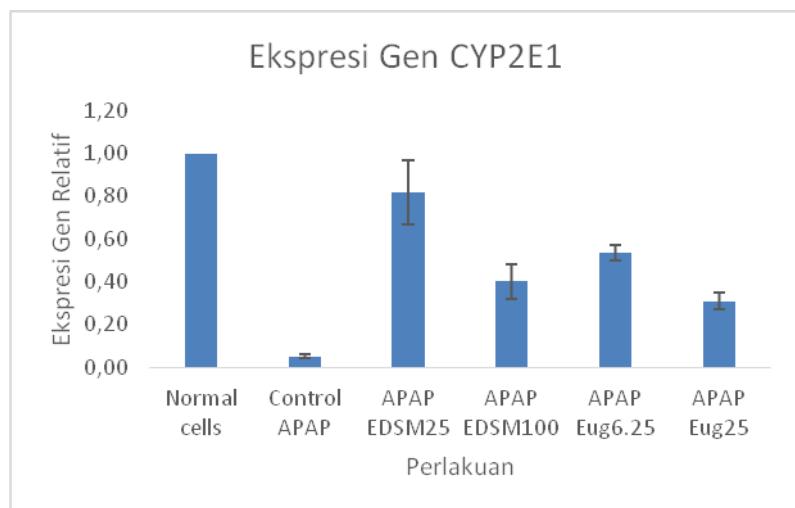
2. Di-spindown terlebih dahulu dengan centrifuge.
3. Dihomogenkan, kemudian dimasukkan tiap sampel kedalam sumur piko real plate.

4. Inkubasi dengan qPCR pada suhu :

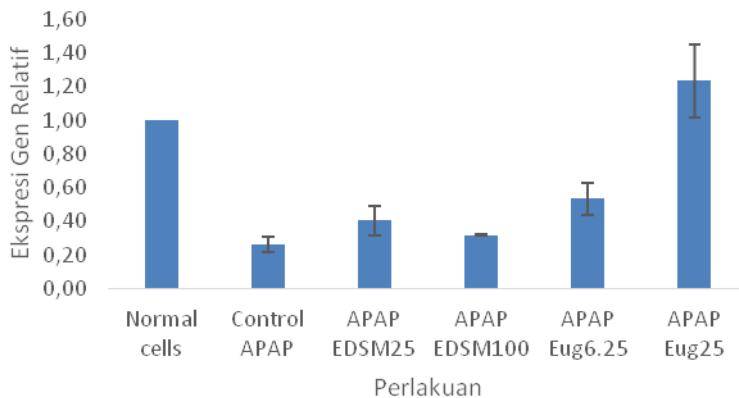
Gen	Temperature ; Waktu ; Siklus						
	Predenaturasi	Denaturasi	Annealing	Pre-elongasi	Elongasi	Melting Curve	
CYP 2E1	95° C ; 5'	95° C ; 30"; 40 siklus	59° C ; 40"; 40 siklus	72° C ; 1'	72° C ; 5'	55-95° C	4° C
GPx	95° C ; 5'	95° C ; 30"; 40 siklus	59° C ; 40"; 40 siklus	72° C ; 1'	72° C ; 5'	55-95° C	4° C
CYP 1B1	95° C ; 7'	95° C ; 30"; 40 siklus	60° C ; 40"; 40 siklus	72° C ; 1'	72° C ; 5'	55-95° C	4° C

4.6 Hasil Uji

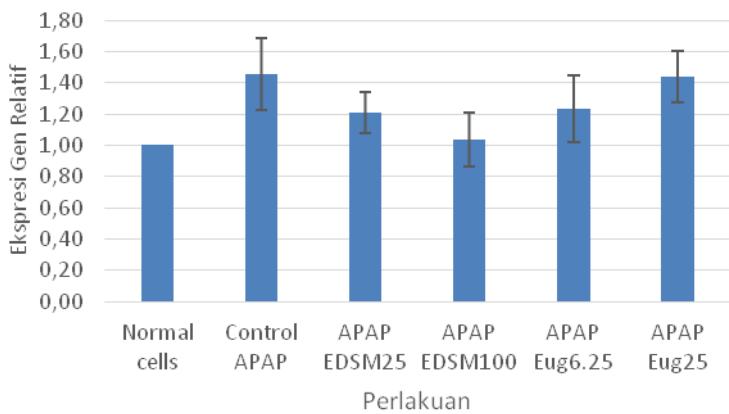
Gambar 5 Ekspresi Gen CYP2E1, GPx DAN CYP1B1



Ekspresi Gen GPX



Ekspresi Gen CYP1B1



4.7 Hasil Analisis

Ekspresi Gen CYP2E1

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)
Normal cells	$1.00 \pm 0.00^{\text{d}}$
Control APAP	$0.05 \pm 0.01^{\text{a}}$
APAP EDSM25	$0.82 \pm 0.15^{\text{b}}$
APAP EDSM100	$0.40 \pm 0.08^{\text{bc}}$
APAP Eug6.25	$0.53 \pm 0.03^{\text{c}}$
APAP Eug25	$0.31 \pm 0.04^{\text{d}}$

Tabel dipresentasikan sebagai mean \pm SD. Perbedaan huruf (a,b,bc,c) 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	$1.00 \pm 0.00^{\text{b}}$
Control APAP	$0.26 \pm 0.26^{\text{a}}$
APAP EDSM25	$0.40 \pm 0.40^{\text{a}}$
APAP EDSM100	$0.32 \pm 0.32^{\text{a}}$
APAP Eug6.25	$0.53 \pm 0.53^{\text{a}}$
APAP Eug25	$1.23 \pm 1.23^{\text{b}}$

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

Ekspresi Gen CYP1B1

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Normal cells	1.00 \pm 0.00 ^a
Control APAP	1.46 \pm 0.23 ^a
APAP EDSM25	1.21 \pm 0.13 ^a
APAP EDSM100	1.04 \pm 0.17 ^a
APAP Eug6.25	1.23 \pm 0.22 ^a
APAP Eug25	1.44 \pm 0.16 ^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).

4.8 Kesimpulan

Berdasarkan hasil uji qPCR menunjukkan adanya perbedaan diantara sampel uji, ekspresi gen CYP2BE1 pada setiap sel yang telah di treatment dengan EDSM 25 ug/ml memiliki level ekspresi lebih tinggi dibandingkan kontrol positif, dan senyawa pembanding eugenol namun tidak melebihi ekspresi pada sel normal. Untuk level ekspresi gen

GPx, sel yang telah diberi treatment eugenol 25 ug/ml pada memiliki level ekspresi yang lebih tinggi dari kontrol positif (kontrol APAP) namun lebih rendah dibandingkan kontrol negatif. Sedangkan Ekspresi gen CYP1B1 pada sel yang sudah di treatment dengan ekstrak daun karet 100 ug/ml dan 25 ug/ml memiliki level ekspresi gen yang lebih rendah dibandingkan dengan pembanding eugenol 6.25 ug/ml dan 25 ug/ml dan tidak terekspresi dengan baik pada EDSM 25 ug/ml dan EDSM 100 ug/ml.

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

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

1. KULTUR SEL

1.1 Prinsip

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

Subkultur, juga disebut sebagai *passaging*, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan 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 dipindahkan ke flask yang baru dengan medium baru

1.2 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)
- Nanomycopulitine (Biowest, LX16-100)
- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Amphotericine B (Biowest, L0009-050)
- Sel lini Human hepatocellular carcinoma (HepG2) (ATCC, HB-8065)

1.3 Alat dan Consumable

- Pipet 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)

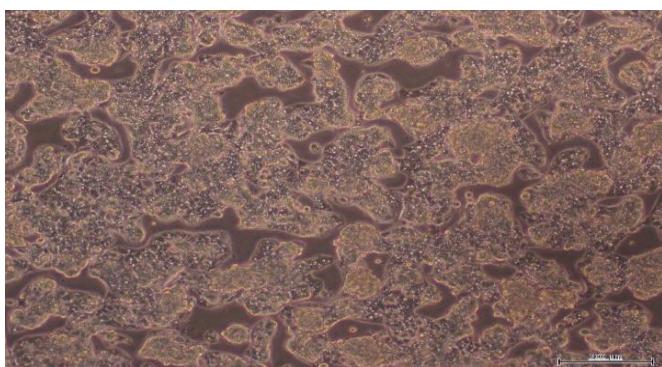
- Flask T25 (Corning 430168)
- Centrifuge Tube 15ml (SPL 50015)
- Tube 50ml (SPL 50015)
- Serological Pipett 5ml (SPL 91005)
- Serological Pipett 10ml (SPL 91010)

1.4 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 6. Morfologi Sel HepG2 pada perbesaran 400x

2. INDUKSI APAP, EKSTRAK, DAN SENYAWA

2.1 Prinsip

Sel yang sebelumnya telah dikultur kemudian diganti mediumnya diinduksi dengan APAP selama 24 jam untuk membuat model kerusakan hati. Setelah diinduksi APAP, 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 APAP

2.2 Bahan dan Consumable

- Medium Kultur Sel Medium kultur sel HepG2
- Acetominophene (APAP) (Sigma Aldrich, A7085-100G)
- Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) (0160718-C020)
- Senyawa Eugenol (Sigma Aldrich, 35995-250MG)

2.3 Alat dan Consumable

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

2.4 Prosedur

Sel yang sudah mencapai konfluensi dibilas dengan PBS dan ditambahkan tripsin EDTA dan diinkubasi 37°C. Kemudian sel dihitung dengan hemositometer dan *diseeding* dalam 6 well plate. Sel diinkubasi dalam incubator 37°C, CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah sel attahed, sel diinduksi menggunakan 40mM APAP Setelah diinduksi dengan APAP,

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 APAP 40 mM
- d. APAP 40 mM + EDSM 25 ug/ml
- e. APAP 40 mM + EDSM 100 ug/ml
- f. APAP 40 mM + Eug 6.25 ug/ml
- g. APAP 40 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 dihaverst menggunakan teknik trpisinasi

3. UJI MDA

3.1 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 perokksida, 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 hidroperokksida. Deteksi kadar MDA dapat mencerminkan tingkat peroksidasi lipid dalam sel berbanding lurus dengan tingkat kerusakan seluler secara tidak langsung. MDA dalam katabolit lipid perokksida dapat bereaksi dengan asam tiobarbiturat (TBA) dan menghasilkan warna merah senyawa, yang memiliki puncak penyerapan maksimum pada 532 nm.

3.2 Bahau

- MDA Kit
- Yang berisi: Extract solution dan liquid
- Akuabides
- CM dari sampel

3.3 Alat dan Consumable

- Micropipette (Finnpipette F2)
- Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)

- Vortex (Wisemix)
- Incubator (Esco)
- Tips Blue, yellow, white (Neptune)

3.4 Cara Kerja

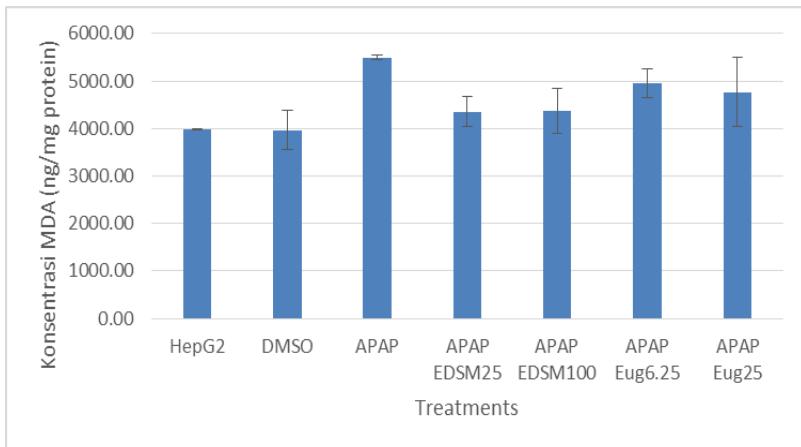
Larutan standart dimasukkan ke dalam well masing-masing dua kali sebanyak $100\mu\text{L}$. Tutup dengan seal lalu inkubasi selama 90 menit pada 37 oC . Selanjutnya buang larutan lalu langsung tambahkan larutan Biotinylated Detection Ab sebanyak $100\ \mu\text{L}/\text{well}$, tutup lalu inkubasi selama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

3.5 Hasil Uji

Tabel 4 Kadar MDA pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi APAP

Sampel	Konsentrasi MDA (ng/mL)	Konsentrasi MDA (ng/mg protein)
HepG2	589.10 ± 2.66 ^a	3980.41 ± 17.99 ^a
Kontrol DMSO	587.00 ± 61.88 ^a	3966.22 ± 418.11 ^a
Kontrol APAP	813.57 ± 7.32 ^c	5497.07 ± 49.47 ^b
APAP+EDSM25	644.77 ± 46.16 ^a	4356.53 ± 311.88 ^a
APAP+EDSM100	647.73 ± 70.16 ^{ab}	4376.58 ± 474.21 ^{ab}
APAP+Eug6.25	733.03 ± 44.85 ^{ab}	4952.93 ± 303.93 ^{ab}
APAP+Eug25	706.13 ± 109.18 ^{ab}	4771.17 ± 737.73 ^{ab}

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 8. Aktivitas MDA Sel HepG2 yang diinduksi APAP serta Perlakuan dengan Eugenol dan Ekstrak Daun Sirih Merah

4. UJI SOD

4.1 Prinsip

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

Kit SOD digunakan untuk penentuan SOD dalam serum, plasma, cairan serebrospinal, efusi pleura, asites,

cairan dialisis ginjal, urin, semen, sel darah merah, sel darah putih, trombosit, sel miokard, sel tumor dan berbagai jaringan dan sel tumbuhan dan hewan, tingkat subselular (mitokondria dan microsome) dapat diuji dengan kit ini.

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

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

4.2 Bahan dan Consumable

- Sel lini Human hepatocellular carcinoma (HepG2) (ATCC, HB-8065)
- Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Elabscience, E-BC-K020)
- Yang berisi: Sample, ddH₂O, enzim working solution, enzim diluen dan substrat application Solution
- Akuabides
- Sampel Protein Sel
- Aquabidest
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S1810-5000)
- 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM) (Biowest, L0010-100)
- PBS 1x (Biowest X0515-500)
- Nanomycopulitine (Biowest, LX16-100)
- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Trypsin-EDTA 0.25% (Biowest, L0931-500)
- Protease Inhibitor Cocktail (Bimake, B14011)
- Ripa Buffer pH 7.4 (Bioworld, 4202002)

4.3 Alat dan Consumable

- 96 wellplate
- Multichanel pipettor

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

4.4 Cara Kerja

- Ekstraksi Protein Seluler

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

- Komponen Kit

Persiapan penggunaan reagen substrat: Campurkan Reagen 1 dan Reagen 2 dengan perbandingan 200: 1 secara menyeluruh. Siapkan reagen segar sebelum digunakan dan reagen yang tidak digunakan dapat disimpan pada 2 ~ 8 °C selama 7 hari.

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

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

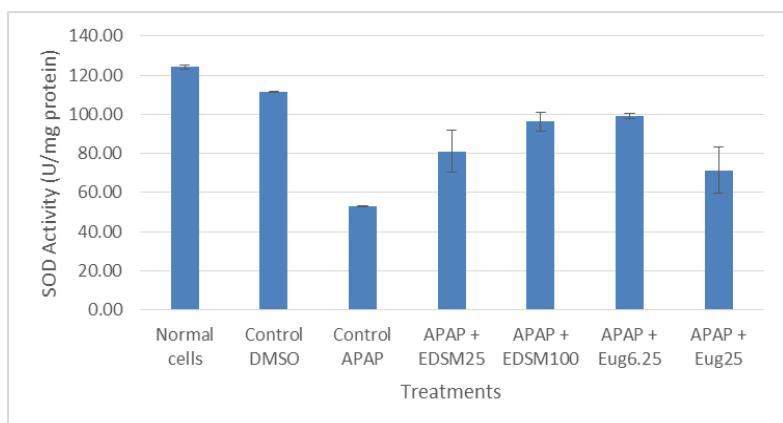
4.5 Hasil Uji

Tabel 5 Kadar SOD pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi APAP

Sampel	Rasio inhibisi (%)	SOD (U/mL)	Activity SOD (U/mg prot)
Kontrol Sel	76.55 ± 0.66 ^f	18.37 ± 0.16 ^f	124.14 ± 1.07 ^f
Kontrol DMSO	72.97 ± 0.17 ^{ef}	17.51 ± 0.04 ^{ef}	111.54 ± 0.26 ^{ef}

Kontrol APAP	$34.93 \pm 0.22^{\text{a}}$	$8.38 \pm 0.05^{\text{a}}$	$53.06 \pm 0.34^{\text{a}}$
APAP+EDSM25	$51.86 \pm 6.98^{\text{bc}}$	$12.45 \pm 1.67^{\text{bc}}$	$81.12 \pm 10.91^{\text{bc}}$
APAP+EDSM100	$63.80 \pm 3.20^{\text{de}}$	$15.31 \pm 0.77^{\text{de}}$	$96.18 \pm 4.83^{\text{cd}}$
APAP+Eug6.25	$60.45 \pm 0.90^{\text{cd}}$	$14.51 \pm 0.22^{\text{cd}}$	$99.07 \pm 1.47^{\text{d}}$
APAP+Eug25	$47.18 \pm 7.74^{\text{b}}$	$11.32 \pm 1.86^{\text{b}}$	$71.43 \pm 11.72^{\text{b}}$

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



Gambar 9. Aktivitas SOD oleh Sel HepG2 yang Diinduksi APAP dan Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Senyawa Eugenol

4.6 Kesimpulan

Induksi APAP meningkatkan kadar MDA hingga 5497.07 nmol/mg protein. Perlakuan EDSM dan eugenol mampu menurunkan kadar MDA. Induksi APAP

menurunkan kadar SOD. Konsentrasi EDSM 100 µg/ml menurunkan kadar SOD lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi ESDM (25µg/ml), sebaliknya konsentrasi rendah pada eugenol (6.25) menurunkan kadar SOD lebih tinggi dibandingkan konsentrasi tinggi 25 µg/ml

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

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

1. KULTUR SEL

1.1 Prinsip

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

Subkultur, juga disebut sebagai passaging, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan 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

1.2 Bahan dan Consumable

- Dulbecco's modified Eagle's medium/DMEM High-glucose (Biowest, L0104-500)
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S1810-5000)
- 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM) (Biowest, L0010-100)
- PBS 1x (Biowest X0515-500)
- Nanomycopulitine (Biowest, LX16-100)
- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Amphotericine B (Biowest, L0009-050)
- MEM (Biowest, L0416-500)
- HepG2 cells line (ATCC, HB-8065)

1.3 Alat dan Consumable

- Pipet 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 Pipett 5ml (SPL 91005)
- Serological Pipett 10ml (SPL 91010)

1.4 Prosedur

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

Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 1 ml medium kultur. Suspensi sel dibagi ke dalam 2 buah flask T25. Inkubasi sel dalam inkubator CO₂ 5%, suhu 37°C. Selama perawatan sel, medium pertumbuhan diganti atau ditambah setiap 2 – 3 hari sekali.

1.5 Hasil Kultur Sel



Gambar 10. Morfologi Sel HepG2 Uji Apoptosis

2. UJI APOPTOSIS

2.1 Prinsip

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 (Vermes *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.

2.2 Bahan dan Consumable

- 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)
- Acetaminophen (Sigma Aldrich, A7085)
- Eugenol (Sigma Aldrich 35995-250MG)
- Sampel ekstrak Daun Sirih Merah (0160718-C020)
- Acetominophene (APAP) (A7085-100G)

2.3 Alat dan Consumable

- Pipett 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)
- Centrifube Tube 50ml (TPP, 91050)
- Serological Pipett 5ml (SPL, 91005)
- Serological Pipett 10ml (SPL, 91010)
- Mikropipett (100-1000µL, 10-100 µL, 1-10µL)
- Mikropipett Tips (100-1000µL, 10-100 µL, 1-10µL)
- 5ml Falcon Roud-Bottom Tube (Corning, 352024)
- Flowcytometer (Miltenyi Biotech)

2.4 Cara Kerja

a. Induksi APAP, 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 APAP dengan konsentrasi akhir

sebanyak 40mM. 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 APAP 40 mM
 3. APAP 40 mM + EDSM 100 ug/ml
 4. APAP 40 mM + EDSM 25 ug/ml
 5. APAP 40 mM + Eugenol 25 ug/ml
 6. APAP 40 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.

2.5 Hasil Uji

Tabel 6 Hasil Uji Apoptosis Sel HepG2 dengan Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Eugenol

Sampel	Live Cells (%)	Early Apoptosis Cells (%)	Late Apoptosis Cells (%)	Necrotic Cells (%)
Kontrol Normal	92.46±0.68 ^c	4.51±0.65 ^a	1.99±0.16 ^a	1.04±0.05 ^a
Kontrol APAP	68.41±5.07 ^a	16.16±3.69 ^c	11.30±0.62 ^d	4.13±0.22 ^c
APAP EDSM100	85.36±0.46 ^b	9.64±1.75 ^b	2.83±0.31 ^{a,b}	2.18±0.55 ^b
APAP EDSM25	82.08±0.84 ^b	11.29±0.31 ^b	3.91±0.36 ^{b,c}	2.72±0.21 ^b

APAP EUG25	82.39 ± 0.66^b	11.13 ± 0.40^b	$3.71 \pm 0.27^{b,c}$	2.77 ± 0.20^b
APAP EUG6.25	79.98 ± 0.42^b	$13.83 \pm 0.19^{b,c}$	3.39 ± 0.22^c	2.79 ± 0.15^b
Perbedaan huruf pada rataan menunjukkan perbedaan signifikan 0,05 berdasarkan analisis statistika ANOVA-Tukey.				

2.6 Kesimpulan

Hasil Uji Apoptosis menunjukkan bahwa Induksi APAP dapat meningkatkan presentase sel pada Early Apoptosis, Late Apoptosis dan Necrotic cells. 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 YANG DIINDUKSI APAP**

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

1. KULTUR SEL

1.1 Prinsip

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

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

Subkultur, juga disebut sebagai passaging, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan 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

1.2 Bahan dan Consumable

- Sel lini Human hepatocellular carcinoma (HepG2) (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)

1.3 Alat dan Consumable

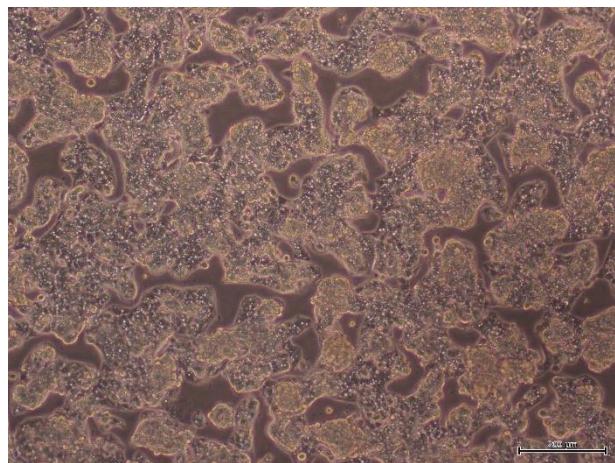
- Pipet Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)

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

1.4 Prosedur

Sel diambil dari tanki nitrogen cair (-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 11. Morfologi Sel HepG2 Uji Hepatotoksik

2. INDUKSI APAP, EKSTRAK, DAN SENYAWA

2.1 Prinsip

Sel yang sebelumnya telah dikultur kemudian diganti mediumnya diinduksi dengan APAP selama 24 jam untuk

membuat model kerusakan hati. Setelah diinduksi APAP, sel diinduksi langsung dengan Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) dan Eugenol. Induksi ini dilakukan untuk melihat pengaruh EDSM dan Eugenol sebagai agen hepatprotektif menggunakan model kerusakan hati sel HepG2 induksi APAP.

2.2 Bahan dan Consumable

- Medium Kultur Sel Medium kultur sel HepG2
- Acetominophene (APAP) (Sigma Aldrich, A7085-100G)
- Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) (0160718-C020)
- Senyawa Eugenol (Sigma Aldrich, 35995-250MG)

2.3 Alat dan Consumable

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

2.4 Prosedur

Sel yang sudah mencapai konfluensi dibilas dengan PBS dan ditambahkan tripsin EDTA dan diinkubasi 37°C. Kemudian sel dihitung dengan hemositometer dan diseeding dalam 6 well plate. Sel diinkubasi dalam incubator 37°C, CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah sel attahed, sel diinduksi menggunakan 40mM APAP Setelah diinduksi dengan APAP, 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 APAP 40 mM
- d. APAP 40 mM + EDSM 25 ug/ml
- e. APAP 40 mM + EDSM 100 ug/ml
- f. APAP 40 mM + Eug 6.25 ug/ml
- g. APAP 40 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 dihaverst menggunakan teknik trpisinasi.

3. UJI TOTAL PROTEIN (BRAFORD)

3.1 Prinsip

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

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

terdaftar mengganggu dalam kombinasi dengan protein tertentu. Namun, protein seperti bovine serum albumin (BSA) dan bovine gamma-globulin, merupakan reagen yang sering digunakan karena tidak terdapat interferensi.

3.2 Bahan

- Protein Lysat dari sampel
- Sel lini Human hepatocellular carcinoma (HepG2) (ATCC, HB-8065)
- BSA (bovine serum albumin) (Sigma, A9576)
- Aquabidest
- Quick Start Dye Reagent 1x (Biorad, 500-0205)

3.3 Alat dan Consumable

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

3.4 Konsentrasi Uji

- a. Working solution : 1000; 500; 250; 125;
62.5; 31.25 ($\mu\text{g/mL}$)
- b. Final concentration : 100; 50; 25; 1.25; 0.625;
3.125 ($\mu\text{g/mL}$)

3.5 Sintesa cDNA

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.

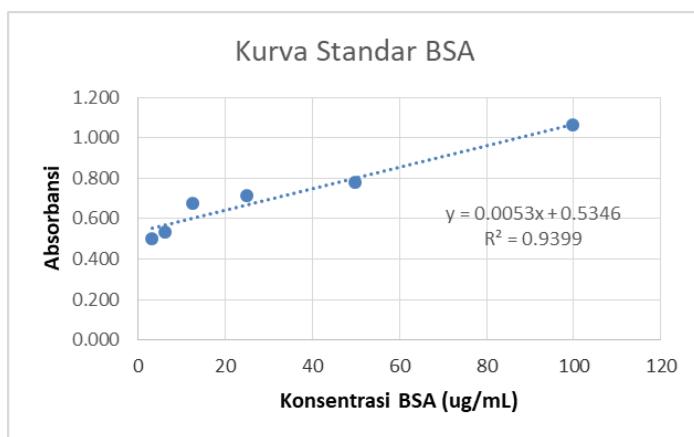
b. Cara Kerja

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.

3.6 Hasil Uji

Tabel 7 Kurva standar BSA

Konsentrasi (ug/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. 12 Kurva standar BSA

Tabel 8 Hasil 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 + EDSM25	153.440 ± 8.39
APAP + EDSM100	159.189 ± 8.39
APAP + Eug6.25	146.428 ± 15.60
APAP + Eug25	158.528 ± 14.03
H2O2 + EDSM25	148.862 ± 12.78
H2O2 + EDSM100	153.623 ± 8.92
H2O2 + Eug6.25	167.535 ± 8.26
H2O2 + Eug25	171.887 ± 12.98

4. UJI AST

4.1 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 arendah dari ALT, namun masih tetap dijadikan biomarker valid pada penyakit hati. AST biasanya dikombinasikan dengan marker lainnya untuk memperoleh hasil yang lebih signifikan.

4.2 Bahau

- Sel lini Human hepatocellular carcinoma (HepG2) (ATCC, HB-8065)
- Acetaminophen (Sigma Aldrich, A7085-100G)
- DMSO (Merck, 1029521000)
- Kit Uji AST (Elabscience, E-BC-K236)
- Eugenol (Sigma Aldrich, 35995-250MG)
Ekstrak Daun Sirih Merah (EDSM) (0160718-C020)

4.3 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)

4.4 Preparasi reagen

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.

	A	B	C	D	E
Reagent 1 (μL)	5	5	5	5	5
Reagent 3 (μL)	20	18	16	14	12
Reagent 2 (μL)	0	2	4	6	8
Homogenkan (penting), kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.					
Reagent 4 (μL)	20	20	20	20	20
Homogenkan pada microplate reader selama 10 detik and inkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit					
Reagent 5 working	200	20	20	20	200

solution (μL)		0	0	0	
Homogenkan dengan microplatereader selama 10 detik, tahan selama 15 menit pada suhu kamar dan ukur nilai OD masing-masing sumur dengan microplate reader pada 510nm.					

	blank	Sample
Air destilasi	6 μ L	
Sampel	6 μ L	
Reagent 1	200 μ L	200 μ L
homogenkan, inkubasi pada suhu 37°C selama 3~5 menit, lalu tambahkan reagen 2.		

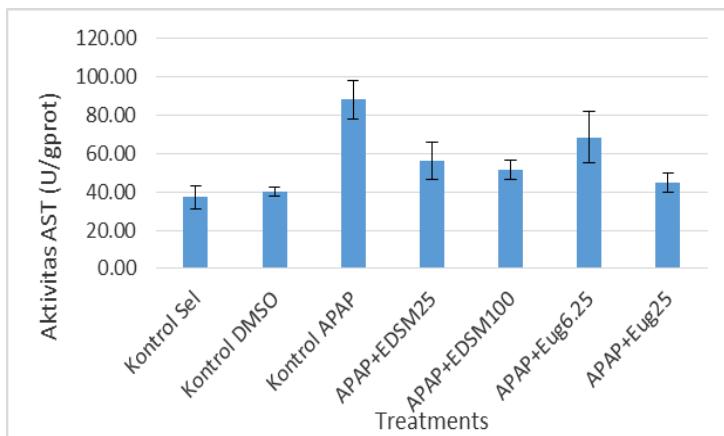
4.5 Hasil Uji

Tabel 9 Konsentrasi protein AST pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi APAP

Sampel	Konsentrasi	Aktivitas AST
	Protein (U) (mg protein/mL)	(U/mg protein)
Kontrol Sel	0.148	37.25 ± 6.08 ^a
Kontrol DMSO	0.157	40.14 ± 2.42 ^a
Kontrol APAP	0.158	88.15 ± 10.03 ^c
APAP+EDSM25	0.153	55.96 ± 9.77 ^{ab}
APAP+EDSM100	0.159	51.60 ± 4.96 ^{ab}

APAP+Eug6.25	0.146	68.50 ± 13.25^{bc}
APAP+Eug25	0.159	45.01 ± 5.13^a

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



Gambar. 13 Kandungan AST Sel HepG2 yang diinduksi APAP serta Perlakuan dengan Eugenol dan Ekstrak Daun Sirih Merah

5. UJI ALT

5.1 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 mengkatalisis alanin menjadi alfa ketoglutarat dan menghasilkan piruvat serta l-glutamin. Digunakan sebagai biomarker spesifik kerusakan pada sitoplasma dan mitokondria sel hati.

5.2 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)

5.3 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)

5.4 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 ALT ditentukan menggunakan kit uji ALT.

	A	B	C	D	E
Reagent 1 (μL)	5	5	5	5	5
Reagent 3 (μL)	20	18	16	14	12
Reagent 2 (μL)	0	2	4	6	8
Homogenkan (penting), kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.					
Reagent 4 (μL)	20	20	20	20	20
Homogenkan pada microplate reader selama 10 detik and inkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit					
Reagent 5 working solution (μL)	200	200	200	200	200
Homogenkan dengan microplatereader selama 10 detik, tahan selama 15 menit pada suhu kamar dan ukur nilai					

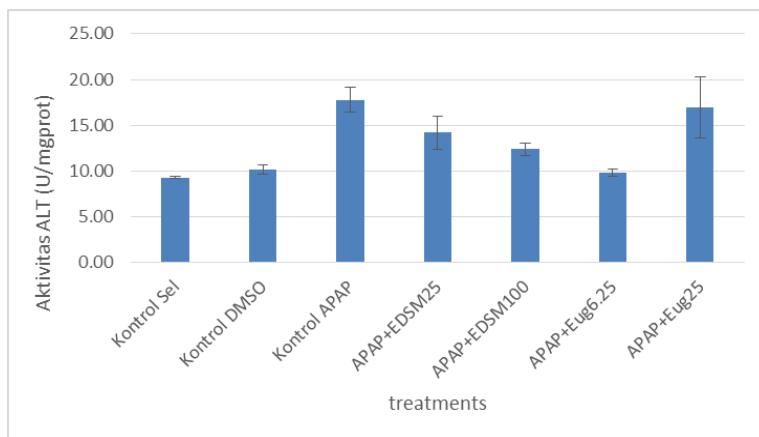
OD masing-masing sumur dengan microplate reader pada 510nm.		
	blank	Sample
Air destilasi	6µL	
Sampel	6µL	
Reagent 1	200µL	200µL
homogenkan, inkubasi pada suhu 37°C selama 3~5 menit, lalu tambahkan reagen 2.		

5.5 Hasil Uji

Tabel 10 Konsentrasi protein ALT pada sel HepG2 pada EDSM dan eugenol setelah diinduksi APAP

Sampel	Konsentrasi	Aktivitas ALT
	Protein (U) (mg protein/mL)	(U/mg protein)
Kontrol Sel	1.38	9.27 ± 0.09 ^a
Kontrol DMSO	1.59	10.12 ± 0.49 ^a
Kontrol APAP	2.80	17.78 ± 1.35 ^{ab}
APAP+EDSM25	2.18	14.18 ± 1.78 ^{ab}
APAP+EDSM100	1.97	12.37 ± 0.7 ^{bc}
APAP+Eug6.25	1.43	9.80 ± 0.38 ^c
APAP+Eug25	2.69	16.97 ± 3.35 ^c

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



Gambar 14. Aktivitas ALT oleh Sel HepG2 yang Diinduksi APAP dan Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Sirih Merah dan Senyawa Eugenol.

6. UJI LDH

6.1 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.

6.2 Bahan

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

6.3 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)

6.4 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 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 LDH ditentukan menggunakan kit uji LDH.

	A	B	C	D	E
Reagent 1 (μL)	5	5	5	5	5
Reagent 3 (μL)	20	18	16	14	12
Reagent 2 (μL)	0	2	4	6	8
Homogenkan (penting), kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.					
Reagent 4 (μL)	20	20	20	20	20
Homogenkan pada microplate reader selama 10 detik and inkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit					
Reagent 5 working solution (μL)	200	200	200	200	200

Homogenkan dengan microplatereader selama 10 detik, tahan selama 15 menit pada suhu kamar dan ukur nilai OD masing-masing sumur dengan microplate reader pada 510nm.		
	blank	Sample
Air destilasi	6µL	
Samp	6µL	
Reagent 1	200µL	200µL
homogenkan, inkubasi pada suhu 37°C selama 3~5 menit, lalu tambahkan reagen 2.		

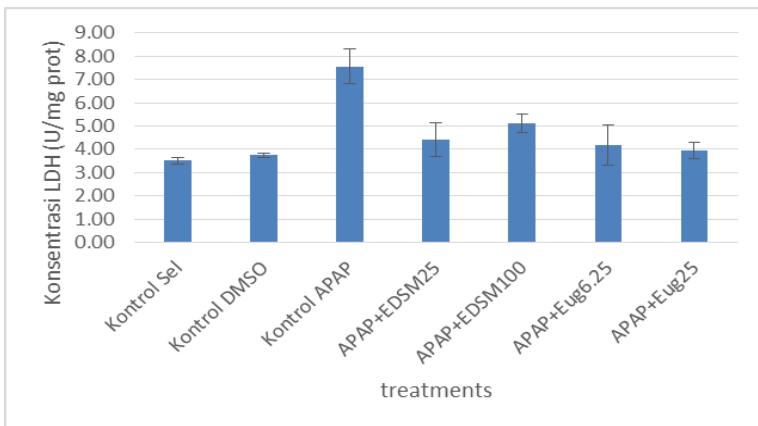
6.5 Hasil Uji

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

Sampel	Konsentrasi	Aktivitas ALT
	Protein (U) (mg protein/mL)	(U/mg protein)
Kontrol Sel	0.148	3.51 ± 0.15 ^a
Kontrol DMSO	0.157	3.74 ± 0.11 ^{ab}
Kontrol APAP	0.158	7.57 ± 0.73^c
APAP+EDSM25	0.153	4.41 ± 0.74 ^{bc}
APAP+EDSM100	0.159	5.11 ± 0.40 ^{ab}
APAP+Eug6.25	0.146	4.19 ± 0.87 ^a

APAP+Eug25 0.159 3.94 ± 0.34^c

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



Gambar 15. Kandungan LDH Sel HepG2 yang diinduksi APAP serta Perlakuan dengan Eugenol dan Ekstrak Daun Sirih Merah

6.6 Kesimpulan

Hasil uji Hepatotoksik menunjukkan bahwa sel HepG2 dapat meningkatkan konsentrasi ALT, AST, dan LDH dibandingkan dengan kontrol normal dan DMSO. Hasil uji Hepatotoksik menunjukkan bahwa sel HepG2 yang diinduksi APAP pada perlakuan EDSM konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ dan eugenol pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$

menurunkan level AST mendekati level normal AST pada kelompok kontrol. Level ALT pada sel HepG2 yang diinduksi APAP pada EDSM pada konsentrasi 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ dan eugenol pada konsentrasi 6.25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ menurunkan level ALT mendekati level normal ALT dan berbanding lurus dengan sel yang diinduksi H₂O₂. Hasil bahwa sel HepG2 yang diinduksi APAP pada EDSM pada konsentrasi 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ dan eugenol pada konsentrasi 6.25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ menurunkan level LDH mendekati level normal LDH pada kelompok kontrol.

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

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

1. KULTUR SEL

1.1 Prinsip

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

Subkultur, juga disebut sebagai passaging, adalah penggantian medium dan transfer sel dari kultur sebelumnya ke medium pertumbuhan baru, prosedur yang memungkinkan 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.

1.2 Bahan dan Consumable

- Dulbecco's modified Eagle's medium/DMEM High-glucose (Biowest, L0104-500)
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S1810-5000)
- 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM) (Biowest, L0010-100)
- PBS 1x (Biowest X0515-500)
- Nanomycopulitine (Biowest, LX16-100)
- 0.1% Gentamicin (Gibco, 15750060)
- Amphotericine B (Biowest, L0009-050)
- MEM (Biowest, L0416-500)
- HepG2 cells line (ATCC, HB-8065)

1.3 Alat dan Consumable

- Pipett Gun (Thermo Scientific 9521)
- Biosafety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- CO₂ Incubator (Thermo IH3543)
- Refrigerated Centrifuge (MWP 260r)

- Microscop Inverted (Olympus CKX41-F32FL)
- Ultrasonic cleaner (Digital Pro, JP-020S)
- Flask T25 (Corning 430168)
- Centrifuge Tube 15ml (SPL 50015)
- Tube 50ml (SPL 50015)
- Serological Pippet 5ml (SPL 91005)
- Serological Pippet 10ml (SPL 91010)

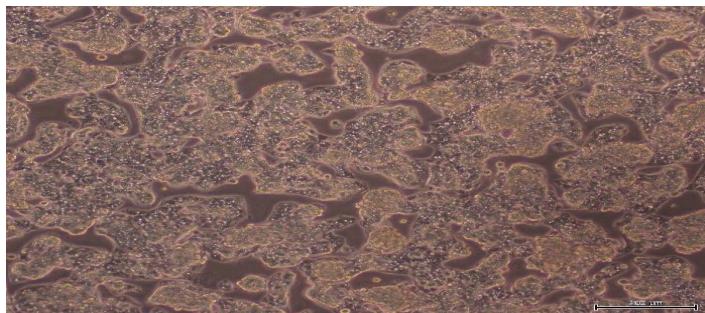
1.4 Prosedur

Sel diambil dari tanki nitrogen cair (-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.

1.5 Hasil Kultur Sel



Gambar 16. Morfologi Sel HepG2 Uji Reactive Oxygen

2. UJI KADAR ROS-DCFDA

2.1 Prinsip

DCFDA – Cellular Reaction Oxygen Species Detection Assay Kit (ab113851) merupakan reagent permanen 2',7'-dichlorofluorescin 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.

2.2 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 Sirih Merah (EDSM) (0160718-C020)
- Senyawa Eugenol (Sigma Aldrich, 35995-250MG)

2.3 Alat dan Consumable

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

2.4 Konsentrasi Uji

Sampel: Ekstrak Daun Karet, Quercitrin

Konsentrasi uji: Sampel ekstrak daun karet, Quercitrin

- a. Working Solution : 1000; 250; 62.5; (µg/mL)
- b. Final Concentration : 100; 25; 6.25; (µg/mL)

2.5 Cara Kerja

a. Induksi APAP, EDSM, DAN QUERCETRIN

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 (*detach*), *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 Acetominophene (APAP) dengan konsentrasi akhir sebanyak 40mM. 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:
- Kontrol Normal
 - Kontrol APAP 40 mM
 - APAP 40 mM + EDSM 100 ug/ml
 - APAP 40 mM + EDSM 25 ug/ml
 - APAP 40 mM + Eugenol 25 ug/ml
 - APAP 40 mM + Eugenol 6.25 ug/ml

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

b. Pengukuran kadar ROS

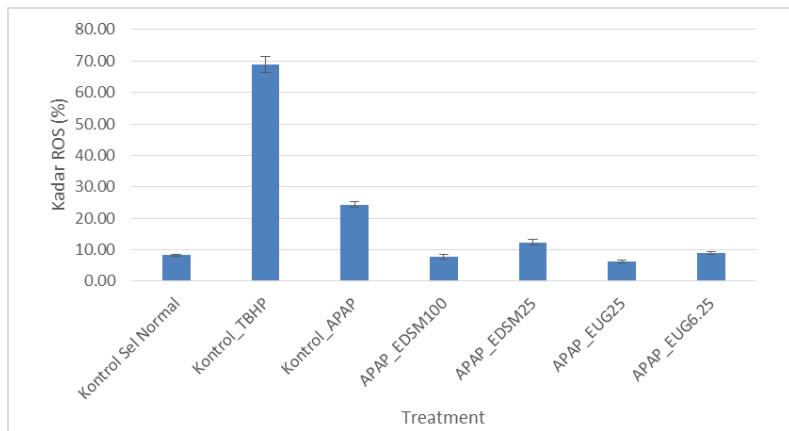
- Sel dimasukkan kedalam FACS *round tube* sebanyak 250000 sel/0.5ml.
- Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit.
- Supernatant dibuang, pelet sel diresuspensi menggunakan buffer DCFDA 1x + 10% FBS.
- 20 µM DCFDA dimasukkan kedalam suspensi sel kemudian diinkubasi selama 45 menit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

- 2) Kontrol APAP 40 mM
 3) APAP 40 mM + EDSM 100 ug/ml
 4) APAP 40 mM + EDSM 25 ug/ml
 5) APAP 40 mM + Eugenol 25 ug/ml
 6) APAP 40 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.

2.6 Hasil Uji

Sampel	Kadar ROS-DCFDA (%)
Kontrol Sel Normal	8.26 ± 0.21 ^a
Kontrol_TBHP	68.95 ± 2.54 ^d
Kontrol_APAP	24.29±0.93 ^c
APAP_EDSM100	7.77±0.73 ^a
APAP_EDSM25	12.33 ± 0.85 ^b
APAP_EUG25	6.31 ± 0.42 ^a
APAP_EUG6.25	901 ± 0.36 ^a

*Data disajikan dalam rata-rata ± SD. Tanda superskrip yang berbeda (a, b, c, d) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p <0.05$) Tukey HSD post hoc test.



Gambar 17. Kadar ROS pada perlakuan pada sel HepG2 yang diinduksi APAP dan ditreatment dengan ekstrak daun sirih merah dan eugenol

2.7 Kesimpulan

Hasil uji ROS menunjukkan bahwa induksi APAP meningkatkan kadar ROS. EDSM dan Eugenol pada konsentrasi EDSM 25 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ dan Eugenol 25 $\mu\text{g/mL}$, 6.25 $\mu\text{g/mL}$ dapat menurunkan kadar ROS pada sel HepG2 yang diinduksi APAP 40 mM.

DAFTAR PUSTAKA

- Abcam, Inc. Cell Titer 96 Aqueous One solution cell proliferation assay Technical Bulletin, MTS Cell Proliferation Assay Kit (Colorimetric). Abcam Discover More. 2009.
- Agustina, Ri., D. T. Indrawati, dan M. A. Masruhin. Aktivitas Ekstrak Daun Salam (*Eugenia poyantha*) Sebagai Antiinflamasi Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *J. Trop. Pharm. Chem.* 2015;3(2):120-123.
- Arika WM, Nyamai DW, Osano KO, Ngugi MP, Njagi EN. Biochemical Markers of In VivoHepatotoxicity. *JClinToxicol.* 2016;6(2):297-305.
- 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).
- 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>
- Compton SJ and Jones CG, Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Anal Biochem* 151, 369-374 (1985)

- 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)
- Ebadi, M. 2002. Pharmacodynamic Basic of Herbal Medicine: Alkaloids: Manuka and Fungal Diseases: Flavoids. New York: CRC press. Pp. 179-84, 189-92, 393-403.
- 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).
- Juliantina, F., Citra, D.A., Nirwani, B., Nurmasitoh, T., Bowo, E.T. 2009. Manfaat sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai agen Antibakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan

- gram negatif. Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia 1(1): 12-20.
- 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.cytofr.2019.04.002>
- Laksmitawati DR, Prasanti AP, Larasinta N, Syauta GA, Hilda R, Ramadaniati HU, Widyastuti A, Karami N, Afni M, Rihibiha DD, Kusuma HSW, Widowati W. Anti-Inflammatory Potential of Gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and Soursoup (*Annona muricata* L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). J Nat Remedies 2016;16(2):73-81
- Laksmitawati DR, Widyastuti A, Karami N, Afifah E, Rihibiha DD, Nufus H, Widowati W. Anti-inflammatory effects of Anrederacordifolia and Piper crocatumextracts on lipopolysaccharide-stimulated macrophage cell line. Bangladesh J Pharmacol 2017; 12: 35-40.
- Lindholm, P. 2005. Cytotoxic Compounds Of Plant Origin-Biological and Chemical Diversity. Sweden: Uppsala University.
- McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book. Elsevier Health Sciences; 2017 Apr 5.
- McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book. Elsevier Health Sciences; 2017 Apr 5.
- Moeljanto, R.D., Mulyono. 2003. Khasiat dan Manfaat Daun Sirih, Obat Mujarab Dari Masa ke Masa. Agromedia Pustaka; 7-11, Yogyakarta.

- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Biokimia Harper Edisi 25. Jakarta: eGC. 2003:195-205.
- Novilla A, Djamburi 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.
- 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)
- Purwanto, N., Rismawati, E., & Sadiyah, E.R. 2015. Uji Sitotoksik Ekstrak Biji Salak (Salacca Zalacca (Geart) Voss) Dengan Menggunakan Metoda Brine Shrimp Lethality Test (BS LT). Prosiding Penelitian SpeSIA Unisba. 2460-2472.
- 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.
- 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, Laksmiwati 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.
- 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).
- Shimizu Y. Liver in systemic disease. World journal of gastroenterology: WJG. 2008 Jul 14;14(26):4111
- Soeng s, Evacuasiany E, Widowati W, Fauziah N, Manik VT, Maesaroh M. Inhibitory potential of rambutan seeds extract and fractions on adipogenesis in 3T3-L1 cell line. J Exp Integr Med 2015;5(1):55-60.
- 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).
- Sudewo, B., 2007, Basmi Penyakit dengan Sirih Merah, PT Agromedia Pusat, Jakarta.
- Syariefa, E. 2006. Resep sirih Wulung untuk Putih Merona Hingga Kanker Ganas, dalam Majalah Trubus No.434, tahun XXXVII Januari 2006, hlm 88.
- 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.
- Vermes, I., Hannen, C., and Reutelingsperger, C. 2000. Flowcytometry of apoptotic cell death. J Immunol Methods, 243: 167 – 190.
- 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>

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.

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>.

Penerbit :
UNPRI PRES



ISBN 978-623-91085-4-0

A standard linear barcode representing the ISBN number 978-623-91085-4-0. The barcode is oriented vertically and is positioned next to the ISBN number.

9 786239 108540