

**KAJIAN *IN VITRO* PERANAN PUERARIN TERHADAP
PENINGKATAN AKTIVITAS SOD DAN PRODUKSI H₂O₂
PADA KULTUR HUVEC_s YANG DIINDUKSI LEPTIN**

SKRIPSI

oleh :

EKO PUJI ASTUTIK

0310910015-91



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2008

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**KAJIAN *IN VITRO* PERANAN PUERARIN TERHADAP
PENINGKATAN AKTIVITAS SOD DAN PRODUKSI H₂O₂
PADA KULTUR HUVEC_s YANG DIINDUKSI LEPTIN**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

oleh :

EKO PUJI ASTUTIK

0310910015-91



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2008

LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR

**KAJIAN *IN VITRO* PERANAN PUERARIN TERHADAP
PENINGKATAN AKTIVITAS SOD DAN PRODUKSI H₂O₂
PADA KULTUR HUVECs YANG DIINDUKSI LEPTIN**

Oleh :

**EKO PUJI ASTUTIK
0310910015-91**

telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 30 Juni 2008
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr.Ir. Moch. Sasmito Djati, MS
NIP. 132 090 387**

**Drs. Sofy Permana, MSc., Dsc.
NIP. 132 085 941**

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Dr.Agung Pramana.W. M., M.Si.
NIP. 131 970 480**

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Eko Puji Astutik
Nim : 0310910015-91
Jurusan : Biologi
Penulis Tugas Akhir berjudul :

**KAJIAN *IN VITRO* PERANAN PUERARIN TERHADAP
PENINGKATAN AKTIVITAS SOD DAN PRODUKSI H₂O₂
PADA KULTUR HUVECs YANG DIINDUKSI LEPTIN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa :

1. Isi dari Tugas Akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di dalam isi dan tertulis di daftar pustaka dalam Tugas Akhir ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata Tugas Akhir yang saya tulis terbukti jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 30 Juni 2008
Yang menyatakan,

(Eko Puji Astutik)
NIM. 0310910015-91

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



KAJIAN *IN VITRO* PERANAN PUERARIN TERHADAP PENINGKATAN AKTIVITAS SOD DAN PRODUKSI H₂O₂ PADA KULTUR HUVECS YANG DIINDUKSI LEPTIN

Eko Puji Astutik, M. Sasmito Djati, Sofy Permana
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji peranan paparan puerarin dalam mempengaruhi aktivitas SOD serta produksi H₂O₂ pada kultur HUVECS yang diinduksi leptin. Kultur sel endotel yang *confluent* diinduksi leptin serta puerarin dalam waktu bersamaan dengan konsentrasi leptin 0 (kontrol) dan 25 ng/ml, dikombinasikan dengan puerarin dengan konsentrasi 0 (kontrol), 5, 25, 200 dan 525 µM. Inkubasi leptin dan puerarin dilakukan selama 12 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya pengukuran kadar H₂O₂ menggunakan *Colorimetric Hidrogen Peroxide Kit* (produk *Assay Design*) serta pengukuran aktivitas SOD menggunakan *Superoxide Activity Assay kit* (produk *Bio Vision*). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan rancangan dasar RAL faktorial dan uji lanjutan BNJ. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan leptin dan puerarin tidak mempengaruhi aktivitas SOD, sedangkan induksi puerarin dengan konsentrasi 200 µM menurunkan kadar H₂O₂ pada kultur sel endotel manusia (HUVECS) yang diinduksi leptin 25 ng/mL.

Kata kunci : H₂O₂, leptin, puerarin dan SOD (*Superoksida Dismutase*).

THE ROLE OF PUERARIN TOWARDS THE INCREASE OF SOD ACTIVITIES AND H₂O₂ PRODUCTION IN HUVECs CULTURE THAT WAS INDUCED BY LEPTIN IN VITRO

Eko Puji Astutik, M. Sasmito Djati, Sofy Permana
Departement of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Brawijaya University, Malang

ABSTRACT

The aim of this experiment was to study the effect of puerarin treatments toward the SOD activities and H₂O₂ production in HUVECs culture that was induced by leptin. The confluent endothel cells culture were induced by 0 ng/ml (as control) and 25ng/ml leptin. Then, they were simultaneously treated by 0; 5; 25; 200;525 μM puerarin each for 12 hours in 37°C. The H₂O₂ concentration was measured by *Colorimetric Hidrogen Peroxide Kit* (Assay Design product, USA) and SOD activity by *Superoxide Activity Assay kit Kit* (Bio Vision product, USA). The data were analyzed by Factorial Randomized Complete Design then followed by *HSD (Honest Significant Difference)* test. The result show that the combination between leptin and puerarin did not affect the SOD activity. On the other hands, the 200 μM puerarin treatment decreased H₂O₂ production in the HUVECs that was induced by 25 ng/ml leptin

Keyword : H₂O₂, leptin, puerarin and SOD (*Superoxide Dismutase*).

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat-Nya kepada penulis selama penyusunan tugas akhir yang berjudul **“KAJIAN *IN VITRO* PERANAN PUERARIN TERHADAP PENINGKATAN AKTIVITAS SOD DAN PRODUKSI H_2O_2 PADA KULTUR HUVEC_s YANG DIINDUKSI LEPTIN”**. Proses penyusunan skripsi ini tidak lepas dari dukungan berbagai pihak. Dengan segala hormat dan kerendahan hati penulis sampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. **Dr.Agung Pramana.W. M., M.Si** selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA atas arahan dan dukungannya selama di Biologi
2. **dr. Ahmad Dian Wahyudiono** yang telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk turut serta dalam proyek besar penelitiannya.
3. **DR. dr. Rasjad Indra** selaku Ka. Lab Faal, **Fitri Rahmania, S.Si, Titik beserta staff Biomedik dan Faal** yang banyak memberikan bantuan dan kemudahan selama pengerjaan tugas akhir.
4. **Dr.Ir. Moch. Sasmito Djati, MS** selaku Pembimbing I yang selama ini telah membimbing dengan penuh kesabaran dan memberikan banyak motivasi kepada penulis.
5. **Drs. Sofy Permana, MSc., Dsc.** selaku Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan berbagai nasihat untuk perbaikan tugas akhir penulis.
6. **DR. Sri Rahayu, M.Kes** selaku Penguji I yang telah memberikan berbagai informasi dan nasihat yang mendukung penelitian penulis.
7. **Satuman, S.Si, M.Kes** selaku Penguji II yang telah memberikan banyak nasihat dan masukan untuk penulis.
8. **Muhaimin Rifa'i, MSc., PhD.Med.Sc** selaku Penguji III yang banyak memberikan bantuan kepada penulis.
9. **Ayah-Ibu, Mbah dan adik** yang telah memberikan dukungan dan doa serta motivasi kepada penulis dalam penyelesaian tugas akhir.
10. **Suamiku tercinta**, yang telah menemani dalam suka dan duka serta memberikan dukungan kepada penulis.
11. **Rekan-rekan penelitian, anggota Bio'03 dan semua pihak** yang banyak memberikan dukungan kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa penyusunan Tugas Akhir ini jauh dari sempurna. Oleh sebab itu, kritik dan saran sangat penulis harapkan. Penulis memohon maaf apabila terdapat kesalahan dan kekurangan dalam tulisan ini. Semoga tulisan ini bermanfaat bagi semua pihak dan pengembang ide selanjutnya.

Amin.

Malang, 30 Juni 2008

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Permasalahan.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Endotel dan Disfungsi Endotel.....	3
2.2 Leptin.....	4
2.3 Radikal Bebas.....	5
2.4 Antioksidan.....	7
2.4.1 Puerarin.....	10
2.5 Hipotesis Penelitian.....	12
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	13
3.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	13
3.2.1 Alat Penelitian.....	13
3.2.2 Bahan Penelitian.....	13
3.3 Kultur Sel Endotel Manusia (HUVECs).....	13
3.4 Perlakuan Induksi Leptin pada HUVECs.....	14
3.5 Perlakuan Puerarin.....	14
3.6 Pengukuran kadar H ₂ O ₂ menggunakan Colorimetric Hidrogen Peroxide Kit	

(Assay Design).....	15
3.7 Pengukuran kadar SOD menggunakan Superoxide Hydrogen Peroxide Kit (Assay Design).....	15
3.8 Analisis Data.....	15
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Kultur Human Umbilicus Vein Endothelial Cells (HUVECs)	16
4.2 Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD).....	17
4.3 Kadar Hidrogen Peroksida (H ₂ O ₂).....	19
4.4 Hubungan kadar SOD dan H ₂ O ₂	21
BAB V Kesimpulan dan Saran	
5.1 Kesimpulan.....	23
5.2 Saran.....	23
DAFTAR PUSTAKA	24
LAMPIRAN	29



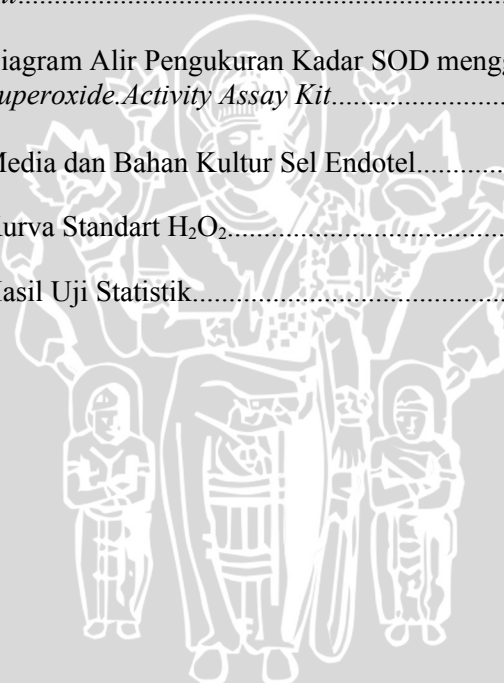
DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1.	Leptin mengaktifkan AMPKK/AMPK pada otot.....	5
Gambar 2.	Sumber utama radikal dalam tubuh dan akibat kerusakan yang ditimbulkannya.....	6
Gambar 3.	Cara kerja enzim-enzim antioksidan (superoksida dismutase, katalase, dan glutathione peroksidase)	7
Gambar 4.	Sistem pertahanan antioksidan melawan radikal bebas.....	8
Gambar 5.	Struktur molekul puerarin	10
Gambar 6.	Kerangka konsep penelitian	11
Gambar 7.	Kultur endotel normal confluent hari ke-4 pada perbesaran 400 x.....	16
Gambar 8.	Histogram hubungan konsentrasi puerarin pada kultur sel endotel yang diinduksi 0 ng/ml leptin dan 25 ng/ml leptin terhadap aktivitas SOD... ..	18
Gambar 9.	Histogram hubungan konsentrasi puerarin pada kultur sel endotel yang diinduksi 0 ng/ml leptin dan 25 ng/ml leptin terhadap kadar H ₂ O ₂	20
Gambar 10.	Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi.....	21

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Skema Isolasi dan Kultur Sel Endotel.....	29
Lampiran 2. Skema Kerja Penelitian.....	31
Lampiran 3. Diagram Alir Pengukuran Kadar H_2O_2 menggunakan <i>Colorimetric Hidrogen Peroxide Kit</i>	32
Lampiran 4. Diagram Alir Pengukuran Kadar SOD menggunakan <i>Superoxide Activity Assay Kit</i>	34
Lampiran 5. Media dan Bahan Kultur Sel Endotel.....	37
Lampiran 6. Kurva Standart H_2O_2	38
Lampiran 7. Hasil Uji Statistik.....	39



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN



ACC	: <i>Acetil-Coa Carboxylase</i>
AMPK	: <i>5'-Adenosine Mono Phosphate-activated protein kinase</i>
AMPKK	: <i>5'-AMP-activated protein kinase kinase</i>
BAEC	: <i>Bovine Aortic Endothelial Cells</i>
CPT-1	: <i>Carnitine Palmitolytransferase- 1</i>
EC-SOD	: <i>Extracellular SOD</i>
EDCF	: <i>Endothelium Derived Contracting Factors</i>
ELISA	: <i>Enzym-Linked immuno Absorbent Assay</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
GSSG	: <i>Gluthation teroksidasi</i>
GSH	: <i>Gluthation tereduksi</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hidrogen Peroxide</i>
HUVECs	: <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
LOOH*	: <i>Peroksida Lipid</i>
LOH	: <i>Hidroxy Fatty Acid</i>
MCP-1	: <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
NaBic	: <i>Natrium Bicarbonat</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NOS	: <i>Nitric Oxide synthase</i>
NOX	: <i>NADPH-dependent oxidases</i>
PBSA	: <i>dulbecco's Phospat Buffer Saline</i>
PGH2	: <i>Prostaglandin H2</i>
PKA	: <i>Protein Kinase A</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
TXA2	: <i>Thromboxane A2</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Leptin merupakan hormon yang disekresikan dalam aliran darah oleh sel-sel adiposit (Quehenberger dkk, 2002) yang berperan dalam mengontrol berat badan. Konsentrasi leptin dalam plasma darah secara nyata berkorelasi dengan indeks massa tubuh, dan juga merupakan salah satu mediator jika dalam kondisi hiperleptinemia dapat menyebabkan arterosklerosis (Yamagishi dkk, 2001) yaitu salah satu sindroma metabolik yang menjadi penyebab utama kematian yang diawali dengan disfungsi endotel. Pada kondisi obesitas terjadi peningkatan sekresi leptin oleh sel-sel adiposit. Reseptor leptin terdapat dalam sel-sel endotel (Honigmann dkk, 1998) yang dapat meningkatkan agregasi platelet dan trombosis.

Leptin memproduksi generasi *Reactive Oxygen Species* salah satunya melalui peningkatan oksidasi asam lemak (Yamagishi dkk, 2001). ROS merupakan radikal bebas yang memiliki atom dengan elektron yang tidak berpasangan, bersifat tidak stabil dan mempunyai reaktivitas yang tinggi. Jika tidak diinaktivasi, reaktivitasnya menyebabkan kerusakan seluruh tipe makromolekul seluler, termasuk karbohidrat, protein, lipid dan asam nukleat (Tuminah, 2000). Reaktivitas oksidan dapat dihambat atau dihentikan oleh suatu substansi antioksidan sehingga dapat menghambat kerusakan oksidatif suatu molekul yang diakibatkannya (Gutteridge dan Halliwell, 1996). Pada konsentrasi 10 ng/ml leptin pada plasma darah cukup untuk mendekati overproduksi ROS (Yamagishi dkk, 2001)

Puerarin merupakan senyawa aktif dari *radix* Pueraria (akar dari *Pueraria lobata* dengan nama lokal *Kudzu*) yang bersifat sebagai antioksidan dan efek farmakologi lain (Lee dkk, 2001). Hasil penelitian oleh Zhu (1997) menunjukkan bahwa puerarin berpotensi meningkatkan diferensiasi preadiposit yang diinduksi dengan insulin, mendorong pengambilan glukosa dari sel adiposit yang mengalami resistensi terhadap insulin akibat kadar glukosa tinggi dan sitokin yang menyebabkan apoptosis dan penurunan viabilitas sel endotel. Sebagai antioksidan, puerarin (isoflavon) menangkap dan membersihkan (*scavenge*) radikal bebas secara langsung sehingga oksidan berubah menjadi lebih stabil dan kurang reaktif (Mayes, 1993 ; Winarsi, 2005).

H_2O_2 merupakan indikasi adanya proses *scavenging* oksidan sehingga kadarnya dapat diukur sebagai produk dari aktivitas enzim Superoksida Dismutase (SOD). SOD merupakan salah satu enzim antioksidan yang diproduksi dalam tubuh dan kadarnya diatur secara internal yang perannya dalam salah satu tahap reaksi berantai *scavenge* radikal bebas adalah sebagai pendekomposisi hidropersida menjadi bentuk stabil (Wafers dan Sies, 1988). Enzim ini menghasilkan produk H_2O_2 yang masih akan didekomposisi oleh pertahanan senyawa antioksidan dalam reaksi berantai tersebut (Langseth, 1995).

Penelitian tentang efektifitas puerarin dalam perannya sebagai senyawa antioksidan secara *in vitro* belum banyak dilakukan, sehingga perlu dilakukan studi terhadap hal tersebut. Studi ini dilakukan dengan mengukur kadar H_2O_2 dan aktivitas enzim SOD ekstraselular pada kultur sel endotel dengan perlakuan berbagai dosis puerarin.

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapakah konsentrasi puerarin yang efektif untuk meningkatkan aktivitas SOD dalam kultur sel endotel pada perlakuan 25 ng/ml leptin secara *in vitro*.
2. Bagaimanakah dampak pemberian 25 ng/ml leptin terhadap kadar H_2O_2 dan SOD dalam media kultur sel endotel dalam berbagai dosis puerarin secara *in vitro*.

1.3 Tujuan

1. Mengetahui konsentrasi puerarin yang efektif untuk meningkatkan aktivitas SOD dalam kultur sel endotel pada perlakuan 25 ng/ml leptin secara *in vitro*.
2. Mengetahui dampak pemberian 25 ng/ml leptin terhadap kadar H_2O_2 dalam kultur sel endotel dengan berbagai dosis puerarin secara *in vitro*.

1.4 Manfaat

Dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang manfaat puerarin dalam peningkatan aktivasi SOD sebagai antioksidan enzim untuk menghambat aktivitas oksidatif molekul radikal bebas khususnya dalam sindroma metabolik.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Endotel dan Disfungsi Endotel

Endotel adalah lapisan sel epitelial yang melapisi pembuluh darah bagian dalam dan membatasi dinding pembuluh darah serta dinding pembuluh limfe, terletak di antara sirkulasi darah dan pembuluh darah. Pada orang dewasa dengan berat badan 70 kg, endotel meliputi area seluas 700 m² dengan berat 11,5 kg (Luscher dan Barton, 1997). Fungsi utama endotel adalah : 1. mengatur tonus pembuluh darah, 2. mengatur adesi leukosit dan inflamasi, dan 3. mempertahankan keseimbangan antara trombosis dan fibrinolisis (Sowinski, 2000). Selain itu juga beberapa fungsi lain seperti pengaturan hemodinamik, metabolisme, inflamasi (Sowinski, 2000; Goligorsky dan Gross, 2001), dan proses trombogenik (Goligorsky dan Gross, 2001).

Pada keadaan tertentu seperti penuaan, menopause, dan keadaan patologis seperti hipertensi, diabetes melitus, aterosklerosis (Luscher dan Barton, 1997), sel endotel teraktivasi untuk menghasilkan faktor konstriksi seperti EDGF yang terdiri dari TXA₂, PGH₂ dan radikal bebas yang menghambat efek relaksasi NO. Radikal bebas dapat menghambat fungsi endotel dengan menyebabkan rusaknya NO (Goligorsky dan Gross, 2001).

Disfungsi endotel adalah suatu peristiwa yang disebabkan oleh ketidakseimbangan antara faktor kontraksi dan relaksasi yang terjadi pada endotel (Luscher dan Barton, 1997). Sedangkan menurut Taddei dkk (2002) disfungsi endotel merupakan perubahan fungsi sel endotel yang berakibat pada kegagalan availabilitas NO, sehingga disfungsi endotel harus dibedakan dari kerusakan endotel yang berarti terjadinya kerusakan anatomi endotel.

Salah satu mekanisme penyebab terjadinya kerusakan/kegagalan availabilitas NO adalah produksi stres oksidatif. Stres oksidatif yang berupa ROS (*Reactive Oxygen Species*) terutama anion superoksida ini dapat bergabung dan menghancurkan peroksinitrat yang menghasilkan NO, sehingga terjadi efek negatif terhadap struktur dan fungsi pembuluh darah (Taddei dkk, 2002)

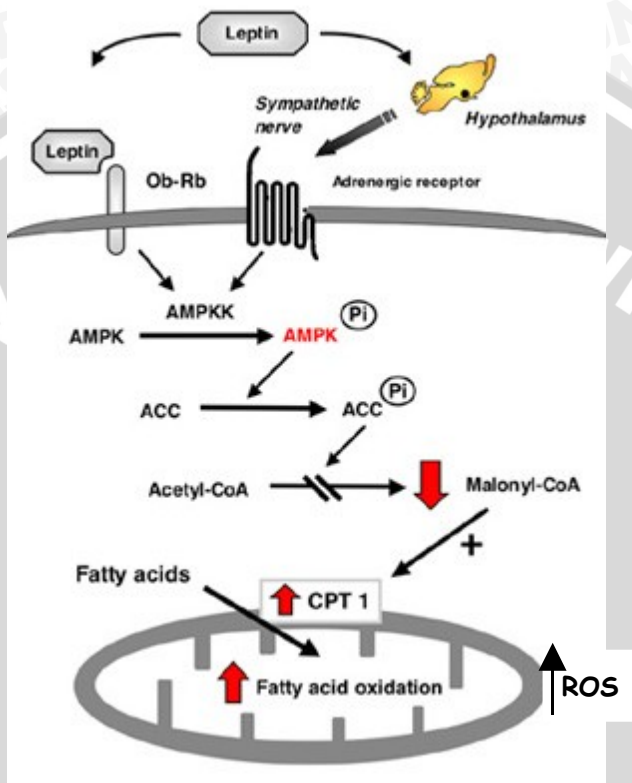
2.2 Leptin

Leptin merupakan protein dengan berat molekul 16 kDa yang disintesis oleh jaringan adipose. Struktur leptin dan reseptor menunjukkan bahwa leptin merupakan anggota dari famili sitokin (Zhang dkk, 1997). Leptin berperan dalam regulator pada *food intake* dan pemanfaatan energi, yang muncul sebagai molekul pleiotropic yang terlibat dalam berbagai kondisi fisiologi dan patologis. Peran pleiotropic leptin pada fisiologi mamalia secara jelas terdapat pada sindrom kompleks pada tikus defisiensi leptin dan *leptin receptor-deficient (db/dbmice)*. Tikus tersebut memiliki berat badan abnormal (*loss of body weight*) dan juga mengalami abnormalitas pada fungsi neuroendokrin, level hormon, struktur tulang, dan fungsi imun (Flier, 1998; dan Montez dkk, 2004).

Konsentrasi leptin dalam plasma dikorelasikan dengan indeks massa tubuh. Dimana jika massa tubuh besar, maka kadar leptin dalam plasma darah juga tinggi. Penyakit yang ditimbulkan oleh hiperleptinemia antara lain obesitas dan resistensi insulin yang merupakan faktor resiko penyebab penyakit kardiovaskular. Reseptor leptin terdapat pada sel-sel endotel dan mempromotif angiogenesis dan inflamasi (Honigman dkk, 1998). Hiperglikemia menginduksi over produksi *reactive oksigen species (ROS)* dalam mitokondria. Level leptin pada plasma pada subjek yang sehat kurang dari 10 ng/ml. Pada subjek obesitas kandungan leptin antara 10-100 ng/ml. Pada studi yang dilakukan oleh Yamagishi dkk (2001) menunjukkan bahwa 10 ng/ml leptin cukup untuk mendekati induksi tripel asam lemak yang menginduksi overproduksi ROS.

Leptin menginduksi produksi superoksida mitokondrial dan ekspresi MCP-1 pada BAEC oleh peningkatan oksidasi asam lemak melalui PKA. PKA menstimulasi CPT-1 (enzim kunci dalam oksidasi asam lemak/*Carnitine Palmitoyltransferase-1*), melalui dua mekanisme, **pertama** yaitu dengan menurunkan level malonyl-CoA melalui fosforilasi dan inaktivasi ACC. **Yang kedua** yaitu dengan memodulasi interaksi antara CPT-1 dan sitoskeleton melalui fosforilasi filamen intermediet pada malonyl-CoA melalui cara sendiri (Velasco dkk, 1998). Selain itu menurut Boulomieu dkk (1999) Leptin secara langsung memproduksi generasi ROS intraselular secara langsung yang selanjutnya berperan sebagai second messenger. Dalam kondisi hiperleptinemia ROS mampu menginduksi oksidatif stress kronik. Model efek stimulasi leptin

pada oksidasi asam lemak dijelaskan oleh Minokoshi dan Khan (2003) pada gambar 1.



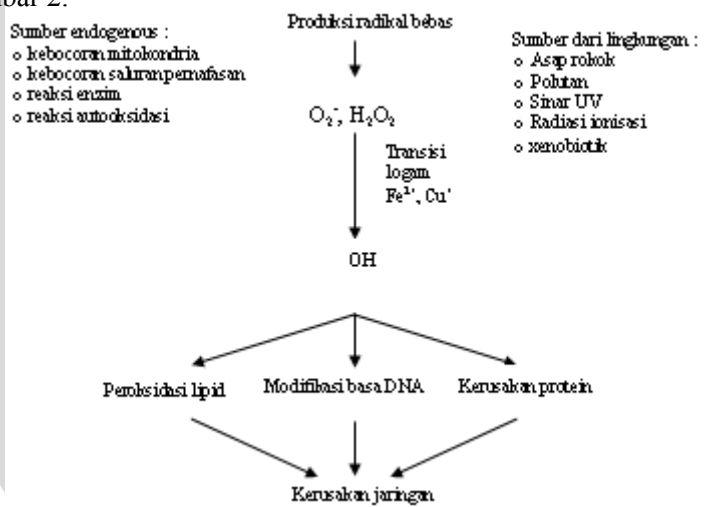
Gambar 1. Leptin mengaktifkan AMPKK/AMPK pada otot

Gambar ini menjelaskan bahwa leptin mengaktifkan AMPKK/AMPK pada otot melalui dua mekanisme yang berbeda : yang pertama leptin secara langsung dan melalui mediasi oleh hipotalamus. Aktivasi fosforilasi AMPK menghambat aktivitas ACC. Selanjutnya menghambat sintesis Malonyl-CoA, mengaktifkan CPT 1, diteruskan peningkatan konsumsi mitokondria dan oksidasi asam lemak menghasilkan ROS.

2.3. Radikal Bebas

Radikal bebas didefinisikan sebagai semua spesies molekul, yang mampu secara independen hadir yang mengandung sebuah elektron

tidak berpasangan sebagai hasil sifat umum tertentu yang dibagi oleh sebagian besar radikal. Banyak radikal yang sangat reaktif dan mampu mendonasikan sebuah elektron menuju maupun mengikat sebuah elektron dari molekul lain, oleh karena itu berperan sebagai pengikat oksidan. Karena memiliki reaktivitas yang tinggi, sebagian besar radikal berumur pendek (10^{-6} detik bahkan kurang) di dalam sistem biologi, walaupun beberapa spesies memiliki kemungkinan ketahanan hidup yang lebih panjang. Radikal bebas yang paling utama berperan dalam timbulnya berbagai macam penyakit adalah derivat oksigen, khususnya superoksida dan radikal hidroksil (Young dan Woodside, 2001). Jika radikal bebas tidak diinaktivasi, reaktivitasnya dapat merusak seluruh tipe makromolekul seluler, termasuk karbohidrat, protein, lipid dan asam nukleat. Dampak perusakan pada protein oleh radikal bebas menyebabkan katarak, dampak pada lipid menyebabkan aterosklerosis dan dampak pada DNA menyebabkan kanker. Akan tetapi, radikal bebas tidak selalu merugikan. Misalnya, radikal bebas berperan dalam pencegahan penyakit yang disebabkan karena mikrobia melalui sel-sel darah khusus yang disebut fagosit (Tuminah, 2000). Adapun sumber utama radikal bebas di dalam tubuh dan dampaknya dapat dilihat pada gambar 2.

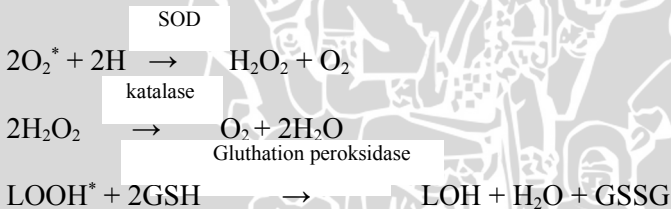


Gambar 2. Sumber utama radikal bebas di dalam tubuh dan akibat kerusakan yang ditimbulkannya (Young dan Woodside, 2001).

2.4. Anti Oksidan

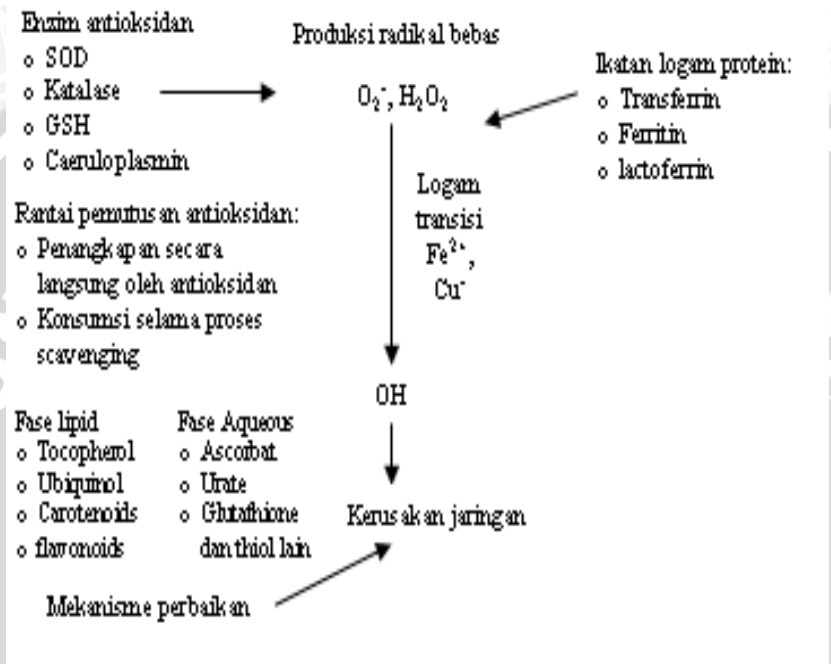
Antioksidan merupakan zat yang dapat menetralkan radikal bebas atau senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan (*scavenging*), menahan pembentukan ataupun meniadakan efek ROS (Murray dkk, 1993). Antioksidan baik endogen maupun eksogen terbagi dalam tiga jenis utama, yaitu: antioksidan enzim, antioksidan pemecah rantai, dan ikatan protein metal transisi (*transition metal binding protein*) (Young dan Woodside, 2001).

Antioksidan enzim terdiri dari *Superoksida Dismutase*, *katalase*, dan *glutathion peroksidase*. SOD merupakan golongan enzim antioksidan yang penting dalam pendekomposisi radikal superoksida menjadi hydrogen peroksida dan oksigen. Katalase secara spesifik mengkatalisis dekomposisi hidrogen peroksida. Glutathion peroksidase merupakan golongan enzim antioksidan yang mengandung selenium yang penting dalam mengurangi hidropersida (Langseth, 1995). Mekanisme kerja enzim-enzim antioksidan ditunjukkan dalam mekanisme berikut :



Gambar 3. Cara kerja enzim-enzim antioksidan (superoksida dismutase, katalase, dan glutathione peroksidase) (Langseth, 1995).

Sedangkan sistem pertahanan antioksidan melawan serangan radikal bebas dijelaskan oleh Young and Woodside (2001) menurut gambar 4 berikut :



Gambar 4. Sistem pertahanan antioksidan melawan serangan radikal bebas.

Antioksidan enzim mengkatalis pemecahan ROS, biasanya dalam lingkungan intraseluler. Ikatan protein logam transisi mencegah interaksi logam seperti besi dan copper dengan hidrogen peroksida dan superoksida memproduksi radikal hidroksil yang sangat reaktif. Rantai pemecahan antioksidan merupakan elektron donor yang sangat kuat dan bereaksi mencegah radikal bebas sebelum molekul target yang penting mengalami kerusakan. Dalam waktu yang sama, antioksidan dioksidasi dan diperbaharui atau digantikan. (Young dan Woodside, 2001).

Flavonoid merupakan jenis grup antioksidan polifenolik yang terkandung dalam berbagai jenis buah-buahan, sayur dan minuman seperti teh dan wine. Flavonoid dibagi ke dalam beberapa jenis berdasarkan struktur kimianya antara lain flavonol, flavanol, flavone, dan isoflavon (Young dan Woodside, 2001).

Flavonoid dapat mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas melalui banyak jalur. Salah satu jalur adalah penangkapan radikal bebas secara langsung. Mekanismenya menurut Korkina dan Afanas (1997) dalam Nijveldt dkk (2001) : Flavonoid dioksidasi oleh radikal menjadi lebih stabil, yaitu menjadi radikal yang kurang reaktif. Dengan kata lain, flavonoid menstabilkan ROS dengan bereaksi dengan komponen reaktif radikal. Karena reaktivitas grup hidroksil flavonoid tinggi menyebabkan radikal inaktif berdasarkan reaksi berikut :



Dimana R^* merupakan radikal bebas dan O^* adalah oksigen radikal bebas. Flavonoid yang terpilih dapat secara langsung menangkap superoksida, ketika flavonoid lain menangkap derivat oksigen yang sangat reaktif disebut peroxyinitrite. Dengan menangkap radikal, flavonoid dapat menghambat oksidasi LDL secara in vitro (Kerry dan Abbey, 1997). Aksi ini melindungi partikel LDL dan flavonoid memiliki aksi preventif mencegah arteriosklerosis.

Mekanisme lain yang bertanggung jawab dalam penangkapan radikal bebas turunan oksigen oleh flavonoid yaitu dengan imobilisasi leukosit dan memperkuat adesi leukosit pada dinding endotel. Namun disisi lain terjadi pelepasan oksidan dan sitotoksik dan mediator inflamasi, serta aktivasi sistem komplemen. Flavonoid juga berperan sebagai antioksidan dengan cara menginduksi aktivitas enzim nitrit oksida synthase. Senyawa nitrit oksida ini, diproduksi oleh berbagai jenis sel termasuk endotel dan makrofag yang dikatalisis oleh enzim nitrit oksida synthase (Winarsi, 2005). Selain itu menurut Levine dkk (1999) antioksidan berperan sebagai kofaktor bagi enzim antioksidan dengan mengkatalisis reaksi hidrosilasi dengan cara antioksidan menyediakan elektron untuk

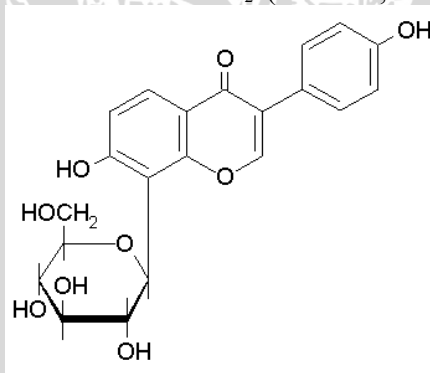
enzim yang memerlukan ion metal prostetik pada pengurangan bentuk untuk mencapai aktivitas enzimatik penuh.

2.4.1 Puerarin

Pueraria lobata merupakan tanaman sejenis bengkoang yang termasuk dalam famili Leguminosae yang berasal dari Cina. Puerarin merupakan salah satu zat aktif yang terkandung dalam tanaman kudzu yang dikenal mampu menurunkan tekanan darah pada hewan. Senyawa ini memiliki kemampuan 100 kali aktivitas antioksidan jika dibandingkan dengan vitamin E (Anonymous 2, 2005).

Puerarin memiliki potensi sebagai antioksidan yang mampu mengeruk/membersihkan (*scavenge*) radikal bebas yang berupa superoksida anion antara lain radikal hidroksil dan radikal peroxil, serta menghambat peroksidasi lipid di dalam sistem biologi in vitro (Sato dkk, 1992)

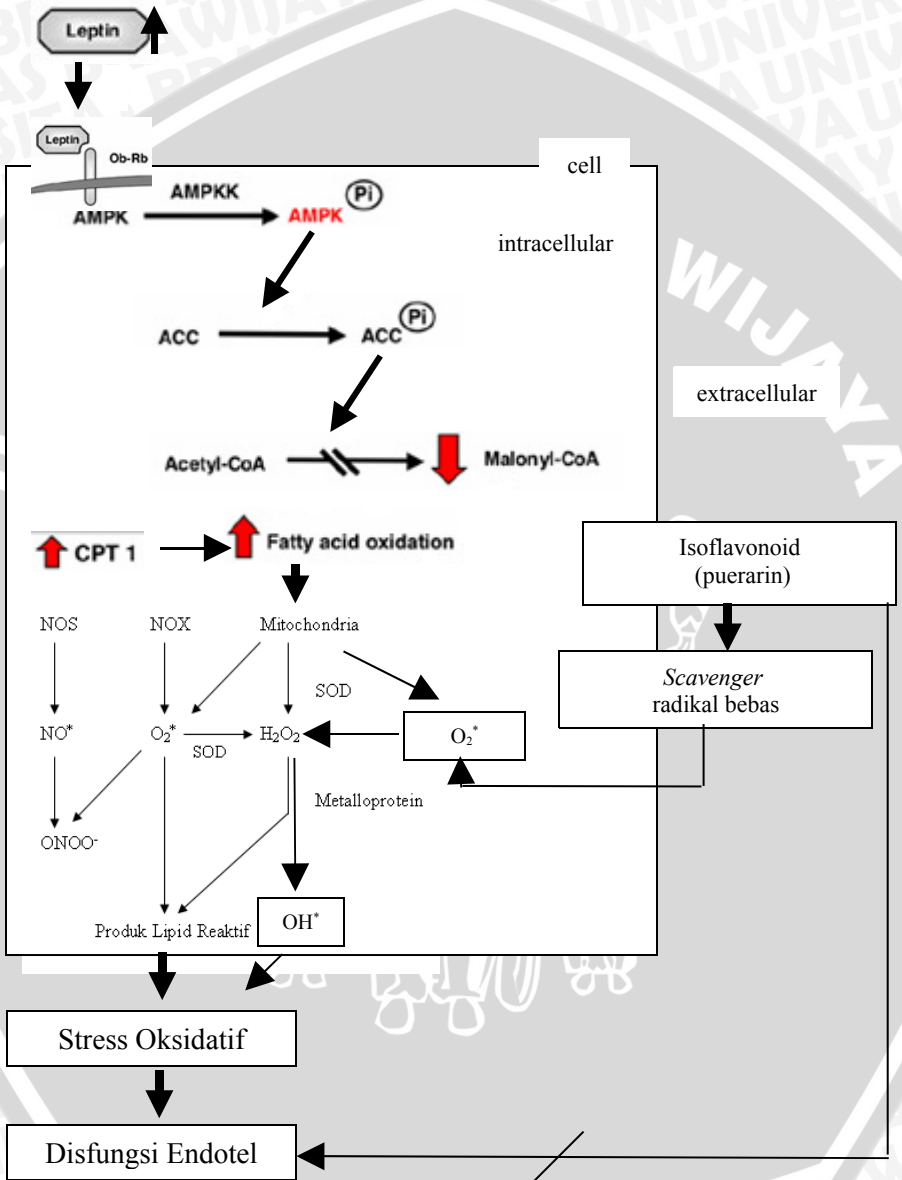
Isoflavonoid, memiliki dua grup hidroksil pada 6 dan 7 pada posisi A-cincin yang menunjukkan potensi yang kuat sebagai antioksidan (Jha dkk, 1985) memiliki kemampuan dalam *scavenging* free radical dalam bentuk OH^\cdot dan O_2^\cdot (Sato dkk, 1992).



Gambar 5. Struktur molekul puerarin (Anonymous 1, 2005)

Dari gambar struktur kimia di atas puerarin dari golongan isoflavonoid berfungsi sebagai antioksidan melalui group hidroksil (OH) pada 6 posisi A-cincin dan 4' posisi B-cincin pada cincin benzena sebagai donatur hidrogen dalam aktivitas *scavenger*.

2.4.2 Konsep Penelitian



Gambar 6. Kerangka konsep penelitian

2.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah puerarin dapat meningkatkan aktivitas SOD dan meningkatkan kadar H_2O_2 terhadap sel endotel yang diinduksi leptin.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, pada bulan Juni - November 2007

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Laminar air flow (Esco Bre), cannul, bunsen, sentrifus (Wina-Korea), inkubator CO₂ (Heraeus), mikropipet, mikroskop inverted (Nikon), 24 *well-plate culture* (Iwaki), oven 37 °C (Binder-Germany), *microtiter plate* (Assay Design), cover slip, ELISA *reader* (Wearnes-USA)..

3.2.2 Bahan Penelitian

Umbilikus (ari-ari) hasil persalinan caesar, alkohol 70% , Hank's Balance Salt Solution (Sigma), Gentamisin Sulfat (Sigma), Natrium bikarbonat (Sigma), Phenol red, deonized water, Kolagenase tipe II (Sigma), PBSA (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Sigma), Gelatin (Sigma), Medium 199 (Sigma), Penisilin Streptomisin (Sigma), Glutamin (Sigma), Fetal Bovine Serum, Puerarin (C₂₁H₂₀O₉ produk ChemExper), *Human Recombinant Leptin* (Sigma), *Colorimetric Hydrogen Peroxide Kit* (produk *Assay Design*, USA), *Superoxide Activity Assay Kit* (produk *Bio Vision*, USA).

3.3 Kultur Sel Endotel Manusia (HUVECs)

Umbilikus dibersihkan dari jaringan dan sisa darah dengan tisu steril yang dibasahi dengan alkohol 70 %. Salah satu ujung umbilikus dipotong secara transversal sehingga terlihat adanya dua pembuluh arteri dan vena dimana pembuluh vena memiliki dinding yang lebih tebal, besar dan elastis. Kanul (pipa kecil) dimasukkan salah satu ujung pembuluh vena kira-kira 1 cm lalu diikat erat dengan benang. Pembuluh vena dicuci dengan PBS A melalui kanul yang telah terpasang dengan menggunakan spuit 20 cc. Dilakukan 2-3 kali. Setelah bersih, ujung umbilikus yang lain diikat dengan ikatan

kuat atau diklem. Larutan *Collagenase* tipe II dimasukkan dan spuit dibiarkan menancap pada kanul. Selanjutnya umbilikus dihangatkan dengan cara didekap kedua belah tangan selama 10 menit atau diinkubasi. Larutan *Collagenase* yang mengandung endotel dikeluarkan dari umbilikus dengan cara menyedot melalui spuit yang terpasang pada ujung kanul. Kemudian larutan tersebut dimasukkan tabung sentrifuse steril 15 cc. Umbilikus dibilas dengan 8 cc larutan PBS-A untuk membilas sel endotel yang tersisa. Kemudian larutan bilasan tersebut ditambahkan ke tabung sentrifuse yang berisi larutan endotel sebelumnya. Larutan yang mengandung endotel disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit pada suhu ruang sehingga diperoleh pellet yang berisi sel endotel. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan 4 mL medium kultur pada pellet dan diresuspensi dengan cara pipeting sehingga sel endotel terpisah. Larutan dipindahkan ke dalam flask 25 cm² yang telah dilapisi larutan Gelatin 0,2 % kemudian dimasukkan dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37 °C selama 30 menit. Selanjutnya sel endotel dicuci dengan medium kultur serum free sebanyak dua kali. Kemudian dimasukkan 2 ml medium komplet ke dalam masing-masing *well*. Sel diinkubasi selama kurang lebih 3 hari setelah itu didapatkan kultur sel endotel monolayer.

3.4 Perlakuan Induksi Leptin pada HUVECs

Metode ini bertujuan untuk membuat model sindroma metabolik pada sel kultur endotel secara *in vitro*. Metode induksi leptin pada sel kultur endotel manusia merujuk pada Quehenberger dkk,(2002). Perlakuan kadar human recombinant leptin pada sel kultur dengan dosis 25 ng/ml. Sel endotel diinkubasi 37°C selama 12 jam.

3.5 Perlakuan Puerarin

Sel diinduksi leptin dan perlakuan puerarin secara bersamaan. Metode perlakuan ini merujuk hasil penelitian Xu dkk, (2005). Senyawa puerarin didapatkan dari produk Chem Exper. Kadar puerarin terdiri dari 4 level yaitu 0 µM (kontrol), 5 µM, 25 µM, 200 µM dan 525 µM. Setelah ditambahkan sel diinkubasi pada 37°C, 5 % CO₂ dan 95 % kelembaban udara selama 12 jam.

3.6 Pengukuran kadar H₂O₂ menggunakan *Colorimetric Hydrogen Peroxide Kit (Assay Design)*.

Pengukuran kadar H₂O₂ dari medium kultur menggunakan *Colorimetric Hydrogen Peroxide Kit (Assay Design)*. Larutan standart dibuat dengan melarutkan 34 µl stok *Hydrogen Peroxide Standart* dengan 966 µl diluent dan disebut sebagai larutan standart I. Larutan standart II dibuat dengan melarutkan 500 µl larutan standart I dengan 500 µl diluent. Dibuat hingga larutan standart 6 dengan cara yang sama. Kemudian dimasukkan 50 µl diluent pada *well* 1 sebagai larutan blanko, 50 µl larutan standart 1 hingga IV ke dalam *well* selanjutnya. Masing-masing larutan sampel diambil 50 µl dimasukkan ke dalam *well* selanjutnya. Selanjutnya semua *well* ditambahkan 100 µl Color Reagent dan dipipeting selama 1 detik. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya dibaca pada panjang gelombang 450 nm dengan *Elisa Reader*.

3.7 Pengukuran kadar SOD (Superoksida Dismutase) menggunakan *Superoxide Activity Assay Kit (Bio Vision)*.

Pengukuran kadar SOD dari medium kultur menggunakan *Superoxide Activity Assay Kit*. 20 µl sample dimasukkan dalam *well*, dan larutan blanko (H₂O) dua *well* masing-masing sebanyak 20 µl. Kemudian pada masing-masing *well* ditambahkan 200 µl WST (*Working Solution*). Blank 2 ditambahkan 20 µl dilution buffer. Lalu pada masing-masing *well* kecuali blank 2 ditambahkan 20 µl *enzyme working solution*. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C. Kemudian dibaca pada panjang gelombang 450 nm. Dilakukan tiga kali ulangan.

3.8 Analisis Data

Nilai konsentrasi H₂O₂ sampel ditentukan dengan memplotkan nilai OD masing-masing standart dengan konsentrasi H₂O₂. Data kadar SOD serta H₂O₂ dianalisis dengan menggunakan rancangan RAL dengan uji lanjut BNJ.

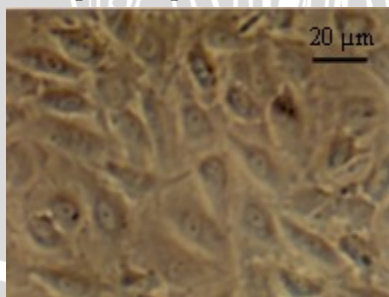
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultur Human Umbilikus Vein Endothelial Cells (HUVECs)

Kultur sel endotel manusia (HUVECs) diperoleh dari vena umbilikus manusia. Umbilikus yang digunakan harus memenuhi kriteria inklusi, yaitu didapatkan dari hasil persalinan *Section Caesaria* (SC) yang meliputi : kehamilan fisiologis (normal), kehamilan dengan pinggul sempit dan kehamilan dengan letak melintang. Sedangkan umbilikus hasil persalinan SC yang tidak boleh digunakan adalah kehamilan disertai infeksi, hipertensi atau kondisi ketuban pecah dini.

Umbilikus yang didapat dari hasil persalinan disimpan dalam media transport (*cord solution*) dengan komposisi NaBic, M199 dan gentamycin. Penyimpanan dalam medium ini bertujuan untuk mempertahankan kondisi fisiologi umbilikus sebelum dilakukan kultur. Umbilikus harus segera ditumbuhkan paling lama 12 jam setelah proses persalinan agar kondisi sel yang didapatkan setelah ditumbuhkan dapat optimal. Sel endotel digunakan dalam penelitian ini karena menurut Boulomie dkk (1999) HUVEC mengekspresikan reseptor fungsional terhadap leptin yang merupakan produk dari *ob gene*.

Sel endotel ditumbuhkan dalam medium komplit yang terdiri dari M199 yang mengandung FBS 10 %. Hasil yang diperoleh dari kultur endotel yang *confluent* pada hari ke – 4 ditunjukkan pada gambar 7. Sel *confluent* dicirikan dengan populasi sel yang memenuhi tempat *attachment* dan saling bersentuhan antar sel menandakan adanya hubungan komunikasi agar sel tumbuh. Dalam keadaan ini, sel siap diperlakukan untuk keperluan penelitian.



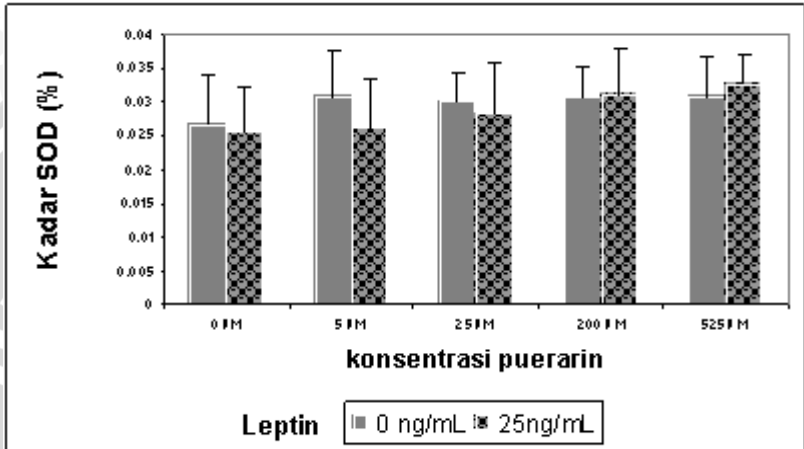
Gambar 7. Kultur endotel normal confluent hari ke- 4 pada perbesaran 400 x

4.2 Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)

Pengukuran aktivitas enzim SOD ditandai dengan terjadinya peningkatan kadar SOD pada medium kultur sel endotel (HUVECs). Deteksi kadar SOD menggunakan ELISA Kit karena dianggap lebih sensitif (pengukuran hingga kadar nano gram/ 10^{-9} dari sample) sehingga hasil yang didapat dapat lebih akurat. Obyek yang diukur pada penelitian ini adalah *extracellular SOD* (EC-SOD) yang terkandung dalam medium kultur. Menurut Grayck dkk (2000), EC-SOD mayoritas diekspresikan di beberapa jaringan termasuk jaringan vaskuler, paru-paru, dan uterus. EC-SOD tersusun dari 70 % dari total aktivitas SOD pada manusia.

Hasil perhitungan kadar SOD dengan 3x ulangan didapatkan rata-rata kadar SOD seperti digambarkan pada gambar 8. Data dianalisis menggunakan uji statistik (uji hipotesis yang terlampir pada lampiran 7.). Dari hasil pengukuran diketahui bahwa aktivitas SOD terukur pada semua perlakuan. Berdasarkan konsentrasi puerarin yang diperlakukan (pada gambar 8.), pada puerarin 0 μ M, paparan leptin 0 ng/ml menunjukkan kadar SOD yang sedikit lebih tinggi yaitu 0,027 % jika dibandingkan dengan paparan leptin 25 ng/ml yaitu 0,025 %. Hal ini juga ditunjukkan pada perlakuan puerarin 5 μ M dimana paparan leptin 0 ng/ml kadar SOD yang terukur lebih tinggi yaitu sebesar 0,031 % jika dibandingkan dengan leptin 25 ng/ml sebesar 0,026. Demikian juga pada perlakuan leptin 25 μ M, kadar SOD pada paparan leptin 0 ng/ml lebih tinggi yaitu 0,030 %, sedangkan paparan leptin 25 ng/ml kadar SOD sebesar 0,028 %. Kadar SOD lebih tinggi pada paparan leptin 25 ng/ml jika dibandingkan dengan paparan leptin 0 ng/ml ditemukan pada perlakuan puerarin 525 μ M. Dimana paparan leptin 25 ng/ml kadar SOD sebesar 0,033 % sedangkan leptin 0 ng/ml sebesar 0,031 %. Pada perlakuan puerarin 200 μ M kadar SOD yang terukur antara paparan leptin 0 ng/ml dan leptin 25 ng/ml hampir sama, yaitu sebesar 0,0306 dan 0,0309. Hasil uji statistik (p value > 0,05) menyatakan bahwa variasi konsentrasi puerarin (0, 5, 25, 200, 525 μ M) tidak menunjukkan beda nyata terhadap terhadap kontrol (tanpa paparan leptin). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi leptin 25 ng/ml pada kultur sel endotel selama 12 jam belum dapat mempengaruhi aktivitas SOD ekstraselular. Dimana radikal yang dihasilkan dalam mitokondria ini merupakan ROS primer yaitu superoksida (O_2^*) (Brooks dkk, 2004). Sehingga jika jumlah

superoksida tinggi, maka superoksida yang ditangkap oleh SOD dan diubah menjadi H_2O_2 meningkat sehingga aktivitas SOD juga diharapkan meningkat. Namun aktivitas SOD dalam penelitian ini menunjukkan perbedaan yang tidak nyata.



Gambar 8. Histogram hubungan konsentrasi puerarin pada kultur sel endotel yang diinduksi 0 ng/ml leptin dan 25 ng/ml leptin terhadap aktivitas SOD.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi antara puerarin dan leptin tunggal belum dapat mempengaruhi aktivitas SOD secara signifikan. Sedangkan menurut pernyataan Yamagishi dkk (2001) yang menyatakan bahwa kadar leptin 10 ng/ml dalam plasma darah telah dapat menginduksi over produksi ROS. Sedangkan interaksi antara 25 ng/ml leptin dan peningkatan konsentrasi puerarin secara bertahap tidak mempengaruhi aktivitas SOD ekstraselular. Dari hasil tersebut dapat diduga bahwa pengukuran kadar SOD ekstraselular belum dapat mempresentasikan jumlah superoksida karena keberadaan SOD intraselular tidak dapat diabaikan jika dilihat dari kadar pengukuran H_2O_2 . Hal ini dijelaskan oleh Hayden dan Tyagi (2002) bahwa adanya Parameter Status Antioksidan Total (SAT) diperlukan untuk dapat menggambarkan status keseimbangan redoks, dan untuk mewakili aktivitas menyeluruh suatu oksidan dan antioksidan. Dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa puerarin bekerja sinergis dengan SOD dalam menangkap radikal superoksida melalui proses scavenger secara langsung. Hal ini dijelaskan oleh

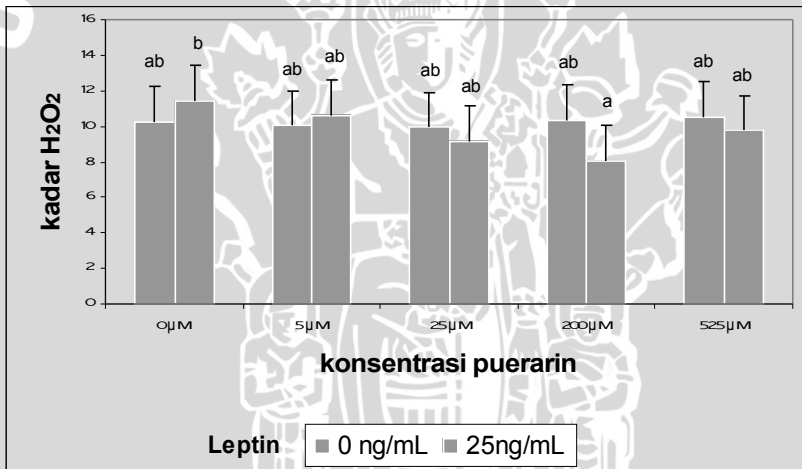
Nijveldt (2001) bahwa flavonoid bertindak sebagai antioksidan untuk mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dengan penangkapan oksidan secara langsung (*direct scavenging*). Mekanismenya menurut Korkina dan Afanas'ev (1997) sebagai berikut : Flavonoid dioksidasi oleh radikal menghasilkan bentuk radikal yang lebih stabil dan kurang reaktif. Dengan kata lain, flavonoid menyetabilkan ROS dengan bereaksi bersama komponen reaktif radikal. Reaktivitas flavonoid bergantung pada gugus hidroksil flavonoid tersebut, yang menyebabkan radikal menjadi inaktif. Pernyataan ini dapat menjelaskan bahwa cara kerja antioksidan flavonoid tidak mengaktivasi antioksidan endogen, namun flavonoid (puerarin) bekerja sinergis dengan antioksidan endogen (SOD) dalam menangkap radikal bebas. Selain itu menurut Grayck dkk (2000) SOD berperan dalam memodulasi reaksi NO dengan menghambat reaksi antara superoksida dan NO, karena superoksida bereaksi cepat dengan NO menginaktivasi aktivitas vasodilator NO dan membentuk oksidan sekunder kuat yaitu peroksinitrit (OONO⁻).

4.3 Kadar Hidrogen Peroksida (H₂O₂)

Pengukuran kadar H₂O₂ dapat diukur sebagai produk dari aktivitas enzim SOD. H₂O₂ dibentuk dari dismutasi superoksida secara spontan pada pH rendah yang dikatalisis oleh SOD (Hancock dkk, 2001).

Hasil pengukuran kadar H₂O₂ menggunakan Elisa, diketahui bahwa H₂O₂ terukur pada semua perlakuan dengan kadar yang digambarkan pada gambar 9. Data dianalisis menggunakan uji statistik yang dapat dilihat pada lampiran 6. Berdasarkan variasi konsentrasi puerarin yang diperlakukan (gambar 9.), pada perlakuan puerarin 0 µM dan 5 µM menunjukkan kadar H₂O₂ yang lebih tinggi pada paparan leptin 25 ng/ml jika dibandingkan dengan leptin 0 ng/ml. Yaitu berurutan pada puerarin 0 dan 25 µM : leptin 25 µM kadar H₂O₂ sebesar 11,42 ng/ml sedangkan pada paparan leptin 0 ng/ml kadarnya sebesar 10,25 ng/ml; leptin 25 ng/ml kadar H₂O₂ sebesar 10,6 ng/ml sedangkan leptin 25 ng/ml kadar H₂O₂ sebesar 10,01 ng/ml. Pada tiga perlakuan puerarin lainnya yaitu 25 µM, 200 µM dan 525 µM menunjukkan kadar H₂O₂ lebih tinggi pada paparan leptin 0 ng/ml jika dibandingkan dengan paparan leptin 25 ng/ml, yang artinya puerarin menurunkan kadar H₂O₂. Yaitu masing-masing

berurutan berdasarkan konsentrasi puerarin 25 μM , 200 μM dan 525 μM dengan konsentrasi paparan leptin 0 dan 25 ng/ml : 9,92 ng/ml lebih tinggi jika dibandingkan dengan 9,12 ng/ml, 10,32 ng/ml lebih tinggi jika dibandingkan 8,08 ng/ml dan 10,5 lebih tinggi jika dibandingkan dengan 9,75 ng/ml. Hasil uji statistik (berdasarkan perhitungan pada lampiran 7.) menyatakan bahwa penambahan konsentrasi leptin 25 ng/ml tidak mempengaruhi secara signifikan kadar H_2O_2 yang diproduksi jika dibandingkan dengan sel normal (tanpa paparan leptin). Sedangkan variasi konsentrasi puerarin (0, 5, 25, 200, 525 μM) menunjukkan beda nyata terhadap kontrol. Berdasarkan uji lanjut BNJ, didapatkan adanya konsentrasi optimum puerarin dalam menurunkan kadar H_2O_2 yaitu 200 μM . Sedangkan konsentrasi puerarin di atasnya (525 μM) menyebabkan kadar H_2O_2 meningkat.

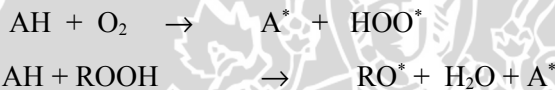


Gambar 9. Histogram hubungan konsentrasi puerarin pada kultur sel endotel yang diinduksi 0 ng/ml leptin dan 25 ng/ml leptin terhadap kadar H_2O_2 .

H_2O_2 merupakan hasil dari konversi superoksida (O_2^*) dari reaksi dismutasi yang dikatalis oleh SOD. H_2O_2 selanjutnya ditransformasi menjadi radikal hidroxil (OH^*) dengan keberadaan ion metal melalui reaksi Fenton atau Haber-Weiss (Brooks dkk., 2004). Kadar H_2O_2 dalam penelitian ini dipengaruhi oleh perlakuan kombinasi 25 ng/ml leptin dan puerarin, sesuai dengan pernyataan Zmijewski dkk (2005)

yang menyatakan bahwa jumlah H₂O₂ dalam sel dipengaruhi oleh produksi superoksida dari mitokondria.

Perlakuan kombinasi 25 ng/ml leptin dan puerarin menunjukkan didapatkannya konsentrasi optimum puerarin dalam menurunkan kadar H₂O₂ yaitu 200 μM. Sedangkan konsentrasi di atasnya yaitu 525 μM kembali meningkatkan kadar H₂O₂. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi antioksidan yang berlebihan jika dibandingkan dengan kadar ROS akan menyebabkan efek negatif yaitu antioksidan dianggap sebagai oksidan dalam sel yang menyebabkan over produksi H₂O₂. Hal ini dijelaskan oleh Gordon (1990) bahwa konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan sering lenyap, bahkan berubah sifatnya menjadi prooksidan. Sifat antioksidan yang berubah menjadi prooksidan dijelaskan pada gambar 10.



Gambar 10. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi (Gordon 1990)

Berdasarkan persamaan di atas dapat dimengerti bahwa keberadaan antioksidan yang tidak dibutuhkan (berlebih) akan terdisosiasi dan bersifat radikal. Radikal yang terbentuk akan menangkap oksigen (O₂) dan hidropersoksida (ROOH) stabil menghasilkan radikal HOO* dan radikal lipida (RO*). Pada penelitian ini keberadaan H₂O₂ yang menurun pada konsentrasi flavonoid optimum (200 μM) dan naik pada konsentrasi di atas optimum (525 μM) mengindikasikan dosis yang berlebih (di atas optimum) meningkatkan produksi radikal superoksida yang menghasilkan peningkatan produksi H₂O₂.

4.4 Hubungan kadar SOD dan H₂O₂

Induksi 25 ng/ml leptin dan paparan puerarin dalam berbagai dosis dalam penelitian kali ini tidak mempengaruhi aktivitas SOD. Namun perlakuan tersebut dapat menurunkan kadar H₂O₂ hingga konsentrasi puerarin optimum (200 μM). Hal ini menunjukkan

bahwa selain superoksida dikonversi menjadi H_2O_2 oleh SOD, superoksida juga ditangkap secara langsung (scavenger) oleh flavonoid (puerarin). Sehingga dapat dijelaskan bahwa flavonoid bekerja sinergis dengan SOD. Dosis puerarin $525 \mu M$ meningkatkan produksi H_2O_2 yang menandakan terjadi peningkatan anion superoksida akibat puerarin berlebih. Namun aktivitas SOD ekstraselular yang terukur tidak ikut meningkat. Hal ini dijelaskan oleh Sukandar (2006) bahwa anion superoksida yang diproduksi di luar sel endotel vaskular dikonversi menjadi H_2O_2 oleh bantuan SOD ekstraselular. Sedangkan anion superoksida yang diproduksi di dalam sel endotel akan dikonversi oleh bantuan Cu/Zn SOD dan Mn SOD menjadi H_2O_2 yang bergerak menembus membran sel. Antioksidan eksogen memerangkap radikal bebas pada membran sel dan lipoprotein serta memotong reaksi peroksidasi lipid pada bagian tersebut (Young dan Woodside, 2001). Sehingga dalam penelitian ini menunjukkan bahwa dosis antioksidan berlebih akan terdisosiasi dan bersifat radikal dan membentuk anion superoksida intraseluler berlebih yang selanjutnya oleh Cu/Zn SOD dan Mn SOD dikonversi menjadi H_2O_2 , sehingga H_2O_2 yang terukur tinggi.



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pemberian puerarin hingga konsentrasi 525 μM tidak meningkatkan aktivitas ekstraselular SOD pada sel endotel dengan paparan leptin 25 ng/ml. Sedangkan pemberian puerarin dosis optimumnya adalah 200 μM untuk menurunkan kadar H_2O_2 *in vitro*

5.2 Saran

Perlu dilakukan pengukuran kadar SOD total (intraselular dan ekstraselular) untuk mendapatkan nilai jumlah superoksida yang representatif. Selain itu perlu dilakukan uji dosis dalam range konsentrasi puerarin antara 200 hingga 525 μM untuk mengetahui berapa dosis optimum puerarin dalam menurunkan kadar H_2O_2 .



DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous 1. 2005. Puerarin. [http : //www.mdidea.com](http://www.mdidea.com). Tanggal akses 28 April 2008.
- Anonymous 2.2005.Kudzu(Pueriara lobata).[Http.www. Mdidea.com](http://www.Mdidea.com). Diakses tanggal 5 September 2007
- Boulomie, A., T. Marumo., M. Lafontan., R. Busse.1999. Leptin Induce Oxidative Stress in Human Endotelial Cells. The FASEB Journal Vol 13.hal:1231-1237
- Brooks, P.S., Y. Yoon., J.L Robotham., M.W. Anders., S.S. Sheu.2004.Calcium, ATP, and ROS : a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C817-C833.
- Flier J.S. (1998) *J. Clin. Endocrinol. Metab* **83**, 1407-1413.
- Goligorsky MS dan SS Gross. 2001. The ins and outs of endothelial dysfunction : much a do about NO-thing. *Drug New Perspect*; 14 : 133-42
- Gordon, M.H 1990. The mechanism of antioxidants action in vitro. Dalam: B.J.F. Hudson, editor. *Food Antioxidants*. Elsvier Applied Science, London.Dalam: Wini T.2003.antioksidan: Jenis, sumber, mekanisme kerja dan peran terhadap kesehatan. Intoductory Science Philosophy (PPS702).Graduate Program / S3.Institut Pertanian Bogor
- Grayck, E.N., C.S. Dieterle., C.A. Piantadosi., J.J. Enghild., T.D. Oury.2000.Secretion of extracellular superoksida dismutase in neonatal lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:977-984
- Gutteridge JMC dan B Halliwell.1996. *Antioksidants in Nutrition, Health and Disease*. Oxford. University Press hal 40-81

- Hancock, J.T., R. Desikan. S.J. Neill.2001.Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways.J. Biochemical Society Transactions, Vo. 29, part 2.
- Hayden MR and SC Tyagi.2002. Intimal Redox Stress: Accelerated Atherosclerosis in Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus. *Atheroscleropathy. Cardiab* ;1:1- 27.
- Honigman S., M.R. Nath., A. K. Murakami., C.G. Cardena, G., Papapetropoulos., A. Sessa, W.C. Madge., L. A. Schechner., J. S. Schwabb., M. B. Polverini., P. J. and F. Riveros, J. S. (1998) *Science* 281, 1683-1686.
- Jha, H.C., V. Recklinghausen., F. Zilliken.1995. Kudzu. *Biochem. Pharmacol.*, 4,1367
- Kerry NL dan M Abbey. 1997. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*;135:93–102.
- Khotimah, H. 2003. Pengaruh Vitamin E dan Vitamin C terhadap *Release Endothelial Derived Relaxing Factor* (REDR) Kadar MDA dan Kepadatan Sel Endotel HUVECs yang dipapar Glukosa Tinggi. Tesis Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang.
- Korkina LG, IB Afanas'ev.1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol*;38:151–63.
- Langseth L. 1995. Oxidant, Antioksidants and Disease Prevention. ILSI Europe Concise Monograph Series. Brussel, Belgium.
- Lee KT, IC Sohn, YK Kim. 2001. Tectorigenin, an isoflavone of *Pueraria thunbergiana* Benth, induces differentiation and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol Pharm Bull* 24(10):1117-21.

Levine M, SC Rumsey, R Daruwala.1999. Criteria and recommendation for vitamin C Intake. JAMA 1999;281:1415-23.

Luscher TF dan M Barton. 1997. Biology of the endothelium. Clin. Cardiol.; 20 Suppl 2:3-10

Mayes PA.1993. Structure and Function of The Lipid-Soluble Vitamins. Dalam : Murray KM, Granner DX, Mayes PA, Rodwell VW. Harpers Biochemistry 23rd ed. Connecticut: Appleton dan Lange,;5925.

Minokoshi Y and B. B. Kahn.2003. Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle. Biochemical Society Transactions Vol. 31, part 1

Murray KM, DK Granner, PA Mayes, VW Rodwell.1993. Harper's Biochemistry. 22rd ed. Connecticut:Appleton & Lange, 688703.

Montez, J.S., A. Soukas., E. Asilmaz., G. Fayzikhodjaeva., G. Fantuzzi. 2004. Acute leptin deficiency, leptin resistance, and the physiologic response to leptin withdrawal. PNAS. Vol. 102. no. 07.2537-2542

Nijveldt R. J., Els van Nood., Danny EC van Hoorn., Petra G Boelens., Klaske van Norren., Paul AM van Leeuwen.2001. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. American Society for Clinical Nutritions. Am J Clin Nutr 2001;74:418-25

Quehenberger, P., M. Exner., RS.Plassmann., K. Ruzicka, C.Bieglmayer, G. Endler, C. Muelner, W.Speiser and O.Wagner. 2002.Leptin Induce Endothelin-1 in Endothelial Cells In Vitro. Circ. Res.2002;90;711-718. Didownload dari <http://cicres.ahajournals.org/cgi/content/full/90/6/711>.

Sato, Takashi., S. Kawamoto., A. Tamura., Y. Tatsumi., T. Fujii. 1992. Mechanism of Oxidant Action of Pueraria Glycoside

(PG)-1(an Isoflavonoid) and Mangiferin (a Xanthonoid).
Chem. Pharm. Bull. 40(3) 721-724. Japan

Sowinski KM. 2000. Endothelial function and dysfunction. Report of the American College of Clinical Pharmacy Annual Meeting; 2000 Nov 5-8, Los Angeles, California

Sukandar, Enday.2006. Stres Oksidatif Sebagai Faktor Risiko Penyakit Kardiovaskular Pada Penyakit Ginjal Kronis Tahap 1 Sampai 4. Jakarta Nephrology and Hypertension (JNHC)

Taddei S, A Virdis, L Ghiadoni, I Sudano, A Salvetti. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction. *Drugs* 2002; 62 : 265-84

Tuminah, S. 2000. Radikal Bebas dan Antioksidan. Cermin Dunia Kedokteran No. 128. Pusat Penelitian Penyakit Tidak Menular, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.

Velasco, G., M. J. H.Geelen, , G.Pulgar, , and M Guzmán,. (1998) *J. Biol.Chem.* **273**, 21497-21504. Di dalam: Yamagishi, S., D. Edelstein, X.L. Du, Y. Kaneda, M. Guzmán, M. Brownlee.2001. Leptin induces mitochondrial superoxide production. Department of Medicine, Diabetes Research Center, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY

Wafers, H. dan H Sies,. 1988, The Protection by Ascorbate and Glutathione Against Microsomal Lipid Peroxidation is Dependent on Vitamin E. *Eur. J. Biochem.* 174:353-357.

Winarsi, H. 2005. Isoflavon. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta

Xu ME, SZ. Xian., YH. Sun, XX Zheng., Y Ou-Yang., and C. Guan. The study of anti-metabolic syndrome effect of puerarin in vitro. *Live Science.* 2005. 77(25):3183-96

Yamagishi, S., D. Edelstein, X.L. Du, Y. Kaneda, M. Guzmán, M. Brownlee.2001. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. Department of Medicine, Diabetes Research Center, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY. Di download dari www.jbc.org by tanggal 6 Agustus 2007

Young, I.S., dan J.V. Woodside.2001. Antioksidants in Health and Disease. *Journal Clin Pathol*. Didownload dari jcp.brnjournals.com. Tanggal 24 September 2006

Zhang F., M.B. Basinski., J.M. Beals., S.L. Briggs., L.M. Churgay., D.K. Clawson., R.D. DiMarchi., T.C. Furman.1997. *Nature (London)* **387**, 206-2093

Zmijewski, J.W., A. Landar., N. Wanatabe., D.A Dickinson., N. Noguchi., V.M Darler-Usmr.2005. Cell signaling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochemical Society Transactions* . Vol 33, part 6

Zhu QL, Lv XR. 1997. The pharmacology and clinical development of Puerarin. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 28(11):691-696.

Lampiran 1. Skema Isolasi dan Kultur Sel Endotel

Umbilikus

dibersihkan dengan tisu yang telah dibasahi alkohol 70 % bagian ujung dipotong transversal sehingga terlihat dua arteri dan satu vena
canulle dimasukkan pada salah satu ujung vena (kira-kira 1 cm), kemudian diikat dengan benang
vena umbilikus dibersihkan dengan mengalirkan 10 ml PBSA ujung umbilikus yang lain disumbat dengan klem
5 ml kolagenase dimasukkan pada *canulle* yang dipasang dihangatkan dengan cara didekap dengan kedua tangan dan didekatkan dengan bunsen selama 7 menit
kolagenase yang telah mengandung endotel dikeluarkan dan dimasukkan dalam tabung sentrifus steril
dibilas dengan 8 ml larutan PBSA lalu ditambahkan ke tabung sentrifus yang berisi larutan kolagenase
disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit pada suhu ruang
pelet ditambah *serum free media*
disentrifugasi kembali dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit pada suhu ruang

Pelet

- diresuspensi dengan medium kultur

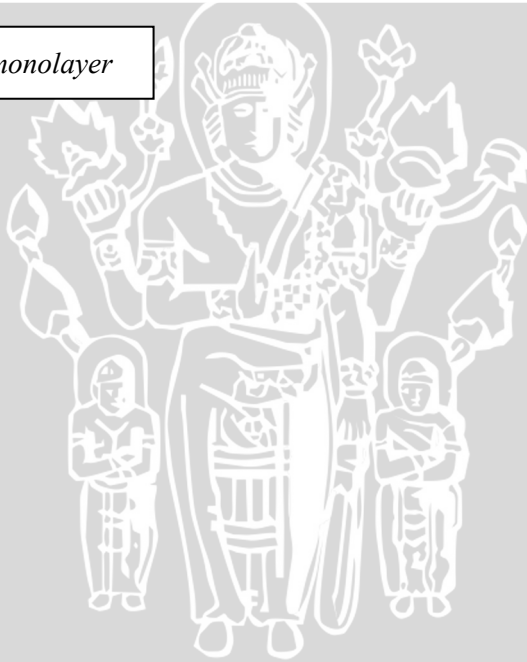
Suspensi sel endotel

ditransfer ke 6 *well-plate culture* yang sebelumnya telah dilapisi gelatin 0,2%

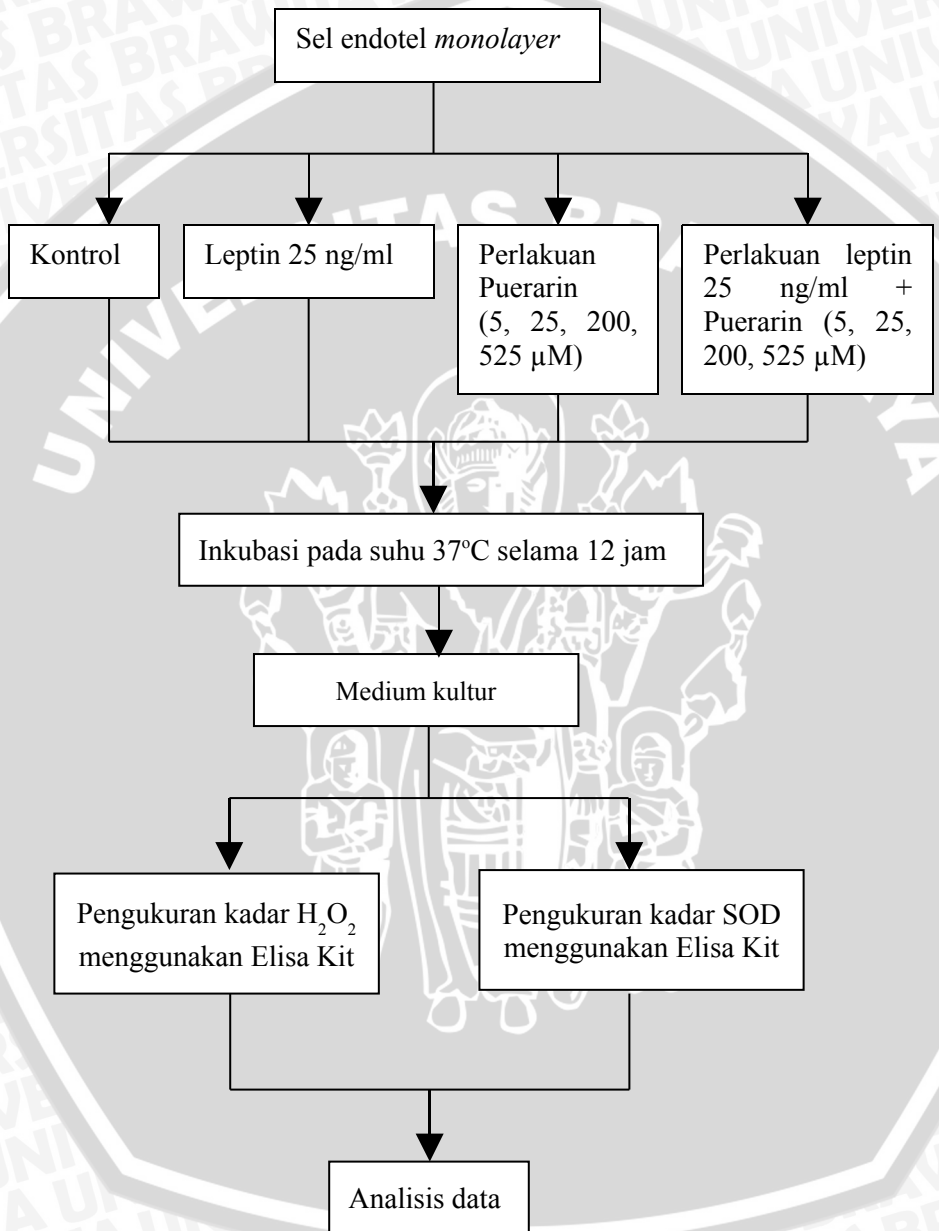
6 well-plate culture

dimasukkan dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 30 menit
diamati dibawah mikroskop inverted
sel dibilas dengan 3 ml larutan *serum free media* dan ditambahkan medium yang baru
dimasukkan dalam inkubator sampai terbentuk *monolayer* kurang lebih 3-4 hari

Sel endotel *monolayer*



Lampiran 2. Skema Kerja Penelitian



Lampiran 3. Diagram Alir Pengukuran Kadar H_2O_2 menggunakan *Colorimetric Hydrogen Peroxide Kit* (produk *Assay Design, USA*).

Isi Kit :

- | | |
|---|--------|
| 1. Half-Area Microtiter Plate | 1 buah |
| 2. Hydrogen Peroxide Standart | 0,5 ml |
| 3. Hydrogen Peroxide Color Reagent | 11 ml |
| 4. Hydrogen Peroxide Assay Layout Sheet | 1 buah |
| 5. Plate Sealer | 2 buah |

Bahan dan Alat yang digunakan :

1. deionized water
2. PBS 50 mM pH 6.0
3. refrigerator
4. mikropipet
5. inkubator 37°C
6. kertas tissue
7. microplate reader
8. kertas grafik untuk kurva standart

Note :

Semua isi kit, kecuali Hydrogen Peroxide Color Reagent stabil pada suhu 4°C hingga tanggal kadaluwarsa. Hydrogen Peroxide Color Reagent harus disimpan pada suhu -20°C.

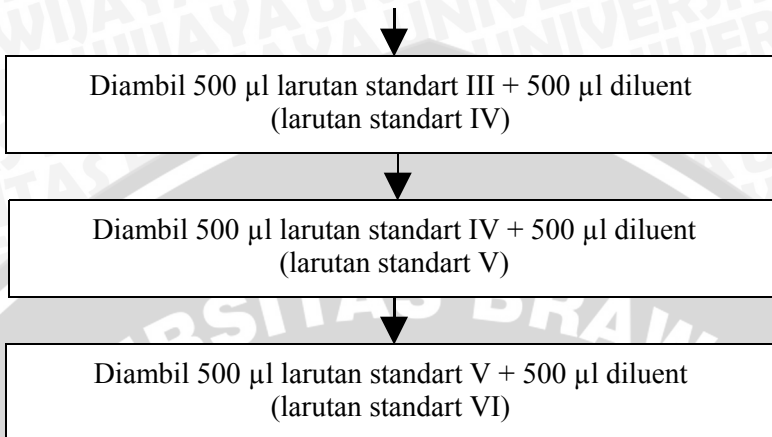
Preparasi reagen

1. Hydrogen Peroxide Standart

34 μl stok Hydrogen Peroxide Standart + 966 μl diluent
(larutan standart I)

Diambil 500 μl larutan standart I + 500 μl diluent
(larutan standart II)

Diambil 500 μl larutan standart II + 500 μl diluent
(larutan standart III)



Prosedur Assay

1. 50 µl diluent di *well* I sebagai blanko diulang dua kali
2. 50 µl larutan standart I hingga Standart VI dalam *well*
3. 50 µl sample ke dalam *well*
4. 100 µl Color Reagent ke dalam *well* blanko, *well* standart dan *well* sample.
5. Masing-masing *well* dipipetting selama 10 detik
6. Diinkubasi selama 30 menit dalam suhu ruang.
7. Dibaca pada panjang gelombang 450 nm dengan Elisa Reader

Lampiran 4. Diagram Alir Pengukuran Kadar SOD (Superoksida Dismutase) menggunakan *Superoxide Activity Assay Kit* (produk *Bio Vision, USA*)

Isi Kit :

- | | |
|--------------------|------------|
| 1. WST Solution | 1 ml |
| 2. Enzyme Solution | 20 μ l |
| 3. Buffer Solution | 20 ml |
| 4. Dilution Buffer | 10 ml |

Bahan dan Alat yang digunakan :

1. deionized water
2. refrigerator
3. mikropipet
4. inkubator 37°C
5. kertas tissue
6. microplate reader

Preparasi Reagent :

WST Working Solution :

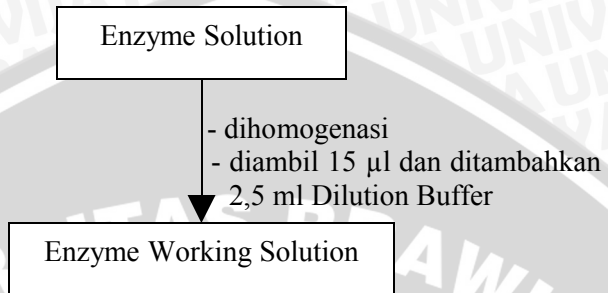
1 ml WST Solution + 19 ml Buffer Solution



WST Working Solution

Note : Dapat disimpan pada suhu 4°C selama 2 bulan

Enzyme Working Solution :



Note : Dapat disimpan selama 3 minggu pada suhu 4°C

Tabel komposisi bahan tiap well

	sample	Blank1	Blank2	Blank3
Sample Solution	20 µl		20 µl	
ddH ₂ O		20 µl		20 µl
WST Working Solution	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Enzyme Working Solution	20 µl	20 µl		
Dilution Buffer			20 µl	20 µl

Prosedur Assay (sesuai dengan tabel protocol flow chart)

1. Masing-masing 20 µl larutan sampel dimasukkan dalam well, well blanko 2 dan pada blanko 2 dan blanko 3 ditambahkan 20 µl ddH₂O
2. Semua well ditambahkan 200 µl WST Solution
3. Pada well blanko 2 dan 3 ditambahkan 20 µl dilution buffer
4. Blanko 1 dan masing-masing sampel ditambahkan 20 µl Enzyme Working Solution, kemudian dihomogenasi
5. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit

6. Dibaca absorbansinya pada 450 nm dengan Elisa Reader

7. Aktivitas SOD (%) dihitung menggunakan rumus :

$$\text{SOD Activity (inhibition rate)} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 5. Media dan Bahan Kultur Sel Endotel

1. Medium transport (*cord solution*)

Bahan	Volume (mL)
HBSS	10 mL
Deionized	90 mL
Bicarbonate Phenol Red	3,75 mL
Gentamycin	1,25 mL

- pH 7,4
- disimpan dalam refrigerator suhu 4 °C /6 bulan

2. Serum Free Medium

Bahan	Volume/ 10 mL
M199	10 mL
Penisilin-streptomisin	0,125 mL
Natrium Bikarbonat	0,5 mL
L-Glutamin	0,09 mL

3. Medium Kultur

- serum free medium + 10% FBS

4. Larutan Kolagenase tipe II

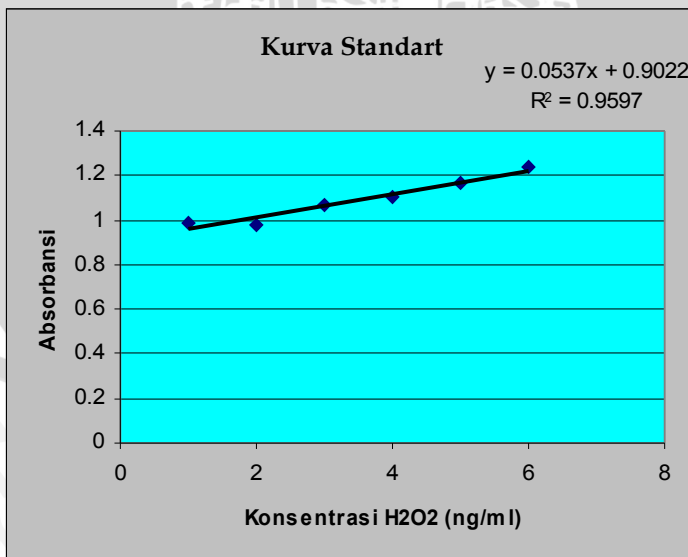
- dibuat larutan 0,5 mg/cc
- disterilisasi dengan filter 0,2 µm

5. Larutan Natrium Bikarbonat-Phenol Red

- 4,4 g sodium hydrogen bicarbonate dan 3 mg phenol red dilarutkan dalam 100 mL deionized water

- diukur ph 7,6
 - disterilisasi dengan filter 0,2 μM
 - disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ /6 bulan
6. Larutan Gentamisin
 - 75 mg gentamisin dilarutkan ke dalam 10 mL deionized water
 - disterilisasi dengan filter 0,2 μM
 - disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ /6 bulan
 7. Larutan Penisilin-Streptomisin
 - 23,95 mg penisilin dan 52,5 mg streptomisin dilarutkan ke dalam 10 mL deionized water
 - disterilisasi dengan filter 0,2 μM
 - disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ /6 bulan
 8. Larutan Glutamin
 - 0,292 g L-Glutamin dilarutkan dalam 10 mL deionized water
 - disterilisasi dengan filter 0,2 μM
 - disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ /6 bulan

Lampiran 6. Kurva Standart H_2O_2



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 7. Hasil Uji Statistik

a. SOD

Oneway

Descriptives

Kadar SOD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
L1P1	3	.02668	.007201	.004158	.00879	.04457	.018	.031
L1P2	3	.03073	.006774	.003911	.01390	.04756	.023	.036
L1P3	3	.03020	.004422	.002553	.01921	.04118	.026	.034
L1P4	3	.03067	.004442	.002564	.01963	.04170	.026	.035
L1P5	3	.03097	.005927	.003422	.01624	.04569	.026	.037
L2P1	3	.02557	.006476	.003739	.00948	.04166	.018	.030
L2P2	3	.02616	.007385	.004264	.00781	.04450	.018	.032
L2P3	3	.02837	.007293	.004211	.01025	.04648	.020	.034
L2P4	3	.03099	.006694	.003865	.01436	.04762	.023	.036
L2P5	3	.03272	.004868	.002811	.02063	.04481	.028	.037
Total	30	.02930	.005698	.001040	.02718	.03143	.018	.037

ANOVA

Kadar SOD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	9	.000	.458	.886
Within Groups	.001	20	.000		
Total	.001	29			

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Kadar SOD

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.000(a)	9	1.79E-005	.458	.886
Intercept	.026	1	.026	660.025	.000
leptin	8.87E-006	1	8.87E-006	.227	.639
puerarin	.000	4	2.94E-005	.754	.567
leptin * puerarin	3.42E-005	4	8.54E-006	.219	.925
Error	.001	20	3.90E-005		
Total	.027	30			
Corrected Total	.001	29			

a. R Squared = .171 (Adjusted R Squared = -.202)

b. H₂O₂

Oneway

Descriptives

Kadar H2O2

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					L1P1	2		
L1P2	2	10.01490	.605713	.428304	4.57278	15.45701	9.587	10.443
L1P3	2	9.92179	.052671	.037244	9.44856	10.39502	9.885	9.959
L1P4	2	10.32216	.197509	.139660	8.54761	12.09671	10.183	10.462
L1P5	2	10.49907	.395032	.279330	6.94985	14.04829	10.220	10.778
L2P1	2	11.42086	.908569	.642455	3.25769	19.58402	10.778	12.063
L2P2	2	10.60149	.803231	.567970	3.38475	17.81823	10.034	11.169
L2P3	2	9.12104	1.211431	.856611	-1.76323	20.00532	8.264	9.978
L2P4	2	8.07821	.263354	.186220	5.71207	10.44436	7.892	8.264
L2P5	2	9.74488	.223852	.158287	7.73365	11.75611	9.587	9.903
Total	20	10.00093	.998151	.223193	9.53378	10.46808	7.892	12.063

ANOVA



Kadar H2O2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.704	9	1.634	3.866	.023
Within Groups	4.226	10	.423		
Total	18.930	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar H2O2

Tukey HSD

(I) interaksi leptin puerarin	(J) interaksi leptin puerarin	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
L1P1	L1P2	.270018	.650076	1.000	-2.30341	2.84345
	L1P3	.363126	.650076	1.000	-2.21030	2.93656
	L1P4	-.037246	.650076	1.000	-2.61068	2.53618
	L1P5	-.214156	.650076	1.000	-2.78759	2.35927
	L2P1	-1.135941	.650076	.752	-3.70937	1.43749
	L2P2	-.316576	.650076	1.000	-2.89001	2.25685
	L2P3	1.163871	.650076	.729	-1.40956	3.73730
	L2P4	2.206702	.650076	.112	-.36673	4.78013

L1P2	L2P5	.540035	.650076	.996	-2.03339	3.11346
	L1P1	-.270018	.650076	1.000	-2.84345	2.30341
	L1P3	.093108	.650076	1.000	-2.48032	2.66654
	L1P4	-.307264	.650076	1.000	-2.88069	2.26617
	L1P5	-.484174	.650076	.998	-3.05760	2.08926
L1P3	L2P1	-1.405959	.650076	.529	-3.97939	1.16747
	L2P2	-.586594	.650076	.993	-3.16002	1.98684
	L2P3	.893853	.650076	.910	-1.67958	3.46728
	L2P4	1.936684	.650076	.199	-.63675	4.51011
	L2P5	.270017	.650076	1.000	-2.30341	2.84345
	L1P1	-.363126	.650076	1.000	-2.93656	2.21030
	L1P2	-.093108	.650076	1.000	-2.66654	2.48032
	L1P4	-.400372	.650076	1.000	-2.97380	2.17306
	L1P5	-.577282	.650076	.993	-3.15071	1.99615
	L2P1	-1.499067	.650076	.456	-4.07250	1.07436
14	L2P2	-.679702	.650076	.981	-3.25313	1.89373
	L2P3	.800745	.650076	.949	-1.77268	3.37417
	L2P4	1.843576	.650076	.240	-.72985	4.41700
	L2P5	.176909	.650076	1.000	-2.39652	2.75034
	L1P1	.037246	.650076	1.000	-2.53618	2.61068
	L1P2	.307264	.650076	1.000	-2.26617	2.88069
	L1P3	.400372	.650076	1.000	-2.17306	2.97380
	L1P5	-.176910	.650076	1.000	-2.75034	2.39652

L1P5	L2P1	-1.098695	.650076	.780	-3.67212	1.47473
	L2P2	-.279330	.650076	1.000	-2.85276	2.29410
	L2P3	1.201117	.650076	.699	-1.37231	3.77455
	L2P4	2.243948	.650076	.103	-.32948	4.81738
	L2P5	.577281	.650076	.993	-1.99615	3.15071
	L1P1	.214156	.650076	1.000	-2.35927	2.78759
	L1P2	.484174	.650076	.998	-2.08926	3.05760
	L1P3	.577282	.650076	.993	-1.99615	3.15071
	L1P4	.176910	.650076	1.000	-2.39652	2.75034
	L2P1	-.921785	.650076	.896	-3.49521	1.65164
L2P1	L2P2	-.102420	.650076	1.000	-2.67585	2.47101
	L2P3	1.378027	.650076	.552	-1.19540	3.95146
	L2P4	2.420858	.650076	.070	-.15257	4.99429
	L2P5	.754191	.650076	.964	-1.81924	3.32762
	L1P1	1.135941	.650076	.752	-1.43749	3.70937
	L1P2	1.405959	.650076	.529	-1.16747	3.97939
	L1P3	1.499067	.650076	.456	-1.07436	4.07250
	L1P4	1.098695	.650076	.780	-1.47473	3.67212
	L1P5	.921785	.650076	.896	-1.65164	3.49521
	L2P2	.819365	.650076	.943	-1.75406	3.39279
L2P3	2.299812	.650076	.091	-.27362	4.87324	
L2P4	3.342643(*)	.650076	.009	.76921	5.91607	
L2P5	1.675976	.650076	.333	-.89745	4.24941	

L2P2	L1P1	.316576	.650076	1.000	-2.25685	2.89001
	L1P2	.586594	.650076	.993	-1.98684	3.16002
	L1P3	.679702	.650076	.981	-1.89373	3.25313
	L1P4	.279330	.650076	1.000	-2.29410	2.85276
	L1P5	.102420	.650076	1.000	-2.47101	2.67585
	L2P1	-.819365	.650076	.943	-3.39279	1.75406
	L2P3	1.480447	.650076	.470	-1.09298	4.05388
	L2P4	2.523278	.650076	.056	-.05015	5.09671
	L2P5	.856611	.650076	.928	-1.71682	3.43004
	L2P3	L1P1	-1.163871	.650076	.729	-3.73730
L1P2		-.893853	.650076	.910	-3.46728	1.67958
L1P3		-.800745	.650076	.949	-3.37417	1.77268
L1P4		-1.201117	.650076	.699	-3.77455	1.37231
L1P5		-1.378027	.650076	.552	-3.95146	1.19540
L2P1		-2.299812	.650076	.091	-4.87324	.27362
L2P2		-1.480447	.650076	.470	-4.05388	1.09298
L2P4		1.042831	.650076	.821	-1.53060	3.61626
L2P5		-.623836	.650076	.989	-3.19727	1.94959
L2P4		L1P1	-2.206702	.650076	.112	-4.78013
	L1P2	-1.936684	.650076	.199	-4.51011	.63675
	L1P3	-1.843576	.650076	.240	-4.41700	.72985
	L1P4	-2.243948	.650076	.103	-4.81738	.32948
	L1P5	-2.420858	.650076	.070	-4.99429	.15257

L2P5	L2P1	-3.342643(*)	.650076	.009	-5.91607	-.76921
	L2P2	-2.523278	.650076	.056	-5.09671	.05015
	L2P3	-1.042831	.650076	.821	-3.61626	1.53060
	L2P5	-1.666667	.650076	.339	-4.24010	.90676
	L1P1	-.540035	.650076	.996	-3.11346	2.03339
	L1P2	-.270017	.650076	1.000	-2.84345	2.30341
	L1P3	-.176909	.650076	1.000	-2.75034	2.39652
	L1P4	-.577281	.650076	.993	-3.15071	1.99615
	L1P5	-.754191	.650076	.964	-3.32762	1.81924
	L2P1	-1.675976	.650076	.333	-4.24941	.89745
	L2P2	-.856611	.650076	.928	-3.43004	1.71682
	L2P3	.623836	.650076	.989	-1.94959	3.19727
	L2P4	1.666667	.650076	.339	-.90676	4.24010

* The mean difference is significant at the .05 level.

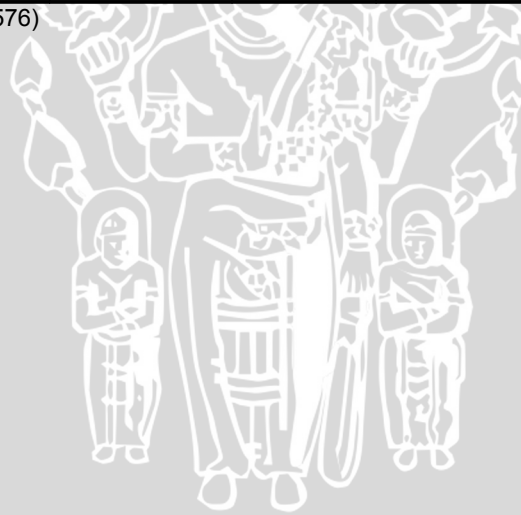
Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Kadar H2O2

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	14.704(a)	9	1.634	3.866	.023
Intercept	2000.372	1	2000.372	4733.498	.000
leptin	.862	1	.862	2.040	.184
puerarin	6.824	4	1.706	4.037	.033
leptin * puerarin	7.018	4	1.754	4.151	.031
Error	4.226	10	.423		
Total	2019.302	20			
Corrected Total	18.930	19			

a. R Squared = .777 (Adjusted R Squared = .576)

Tukey HSD
Kadar H2O2



interaksi leptin puerarin	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
L2P4	2	8.07821	
L2P3	2	9.12104	9.12104
L2P5	2	9.74488	9.74488
L1P3	2	9.92179	9.92179
L1P2	2	10.01490	10.01490
L1P1	2	10.28491	10.28491
L1P4	2	10.32216	10.32216
L1P5	2	10.49907	10.49907
L2P2	2	10.60149	10.60149
L2P1	2		11.42086
Sig.		.056	.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

Keterangan :

L = Leptin 1 = 0 ng/ml; 2 = 25 ng/ml

P = Puerarin 1 = 0 µM; 2 = 5 µM; 3 = 25 µM; 4 = 200 µM; 5 = 525 µM