

**KAJIAN PERANAN PUERARIN TERHADAP PENURUNAN
JUMLAH SEL PADA KULTUR *Human Umbilical Vein Endothelial
Cells* (HUVECs) YANG DIINDUKSI LEPTIN**

SKRIPSI

Oleh :

**NOER HASANAH
0310910037-91**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008**

**KAJIAN PERANAN PUERARIN TERHADAP PENURUNAN
JUMLAH SEL PADA KULTUR *Human Umbilical Vein Endothelial
Cells* (HUVECs) YANG DIINDUKSI LEPTIN**

SKRIPSI

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

Oleh :

**NOER HASANAH
0310910037-91**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

KAJIAN PERANAN PUERARIN TERHADAP PENURUNAN JUMLAH SEL PADA KULTUR *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUEVCs) YANG DIINDUKSI LEPTIN

Oleh:

NOER HASANAH
0310910037-91

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 04 Agustus 2008
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I,

Dr. Ir. Moch. Sasmito Djati, M.S.
NIP. 132 090 387

Pembimbing II,

Dr. Sri Widayarti, M.Si.
NIP. 131 960 434

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Agung Pramana W. M., M.Si.
NIP. 131 971 480

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Noer Hasanah
NIM : 0310910037-91
Jurusan : Biologi
Penulis Skripsi berjudul :

KAJIAN PERANAN PUERARIN TERHADAP PENURUNAN JUMLAH SEL PADA KULTUR *Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)* YANG DIINDUKSI LEPTIN

Dengan ini saya menyatakan bahwa :

1. Isi dari Skripsi 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 Skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata Skripsi yang saya tulis terbukti jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 04 Agustus 2008
Yang menyatakan,

(Noer Hasanah)
NIM. 0310910037-91

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 sejauh penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



**KAJIAN PERANAN PUERARIN TERHADAP PENURUNAN
JUMLAH SEL PADA KULTUR *Human Umbilical Vein Endothelial
Cells* (HUVECs) YANG DIINDUKSI LEPTIN**

Noer Hasanah, M. Sasmito Djati, Sri Widyarti

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya, Malang.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh puerarin dalam menghambat penurunan jumlah sel pada kultur HUVECs yang diinduksi leptin. Kultur sel endotel dilabeli *BrdU* selama 20 jam, kemudian dikelompokkan menjadi 4 yaitu kultur sel endotel (1) kontrol, (2) diinduksi leptin 25 ng/mL (3) diinduksi puerarin masing-masing 5 ; 25 ; 200 ; dan 525 μ M tanpa leptin, dan (4) leptin 25 ng/mL dan puerarin masing-masing 5 ; 25 ; 200 ; dan 525 μ M. Inkubasi leptin dan puerarin masing-masing selama 6 jam pada suhu 37°C. Lisat sel yang dilabel *BrdU* dianalisis menggunakan ELISA. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan SPSS dengan uji ANOVA satu arah dan uji lanjutan Tukey HSD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa puerarin 200 μ M cenderung menurunkan jumlah sel sebanyak 24,88 % dan meningkatkan jumlah sel sebanyak 9,24 % pada kultur HUVECs yang diinduksi leptin walaupun tidak berpengaruh secara signifikan.

Kata kunci : HUVECs, leptin, dan puerarin.

**THE STUDY OF ROLE PUERARIN FOR DECREASING CELLS
AMOUNT OF LEPTIN-INDUCED *Human Umbilical Vein Endothelial
Cells (HUVECs)***

Noer Hasanah, M. Sasmito Djati, Sri Widyarti
Biology Departement, Mathematic and Science Faculty
Brawijaya University, Malang.

ABSTRACT

The aim of the research was to determine the effect of puerarin to inhibit for decreasing cells amount of leptin-induced *Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)*. After BrdU labeling for 20 hours, HUVECs culture were divided into four groups, there were (1) control, (2) leptin 25 ng/mL, (3) puerarin 5 ; 25 ; 200 and 525 μ M without leptin, (4) leptin and puerarin 5 ; 25 ; 200 and 525 μ M. Treatment of leptin and puerarin were incubated for 6 hours at 37°C. Labeled lysate cells are analyzed using ELISA. The data were analyzed using SPSS with one way ANOVA then followed by Tukey HSD test. It was showed that puerarin 200 μ M decrease cells amount 24,88 % and increase cells amount 9,24 % of leptin-induced HUVECs although did not affect significantly.

Key word : HUVECs, leptin, and puerarin.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT. yang telah melimpahkan segala rahmat-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul "**Kajian Peranan Puerarin Terhadap Penurunan Jumlah Sel Pada Kultur Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUEVCs) Yang Diinduksi Leptin**". Proses penyusunan skripsi ini tidak lepas dari dukungan berbagai pihak. Rasa syukur serta ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. **dr. Ahmad Dian Wahyudiono** yang telah memberikan kesempatan untuk bergabung dalam proyek besar penelitian ini.
2. **Dr. Ir. Moch. Sasmito Djati, M.S.** selaku Pembimbing I yang selama ini telah membimbing dengan penuh kesabaran dan ketabahan serta memberikan banyak motivasi kepada penulis.
3. **Dr. Sri Widayarti, M.Si.** selaku Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, informasi dan pengarahan untuk penyelesaian skripsi penulis.
4. **Dr. Sri Rahayu, M.Kes.** selaku Penguji I yang telah memberikan berbagai informasi, nasihat dan saran serta bantuannya demi kesempurnaan penyusunan skripsi ini.
5. **Satuman, S.Si., M.Kes.** selaku Penguji II yang telah banyak memberikan nasihat dan masukan kepada penulis.
6. **Muhaimin Rifa'i, PhD. Med.Sc.** selaku Penguji III yang telah banyak memberikan bantuan kepada penulis.
7. **Dr. Agung Pramana W. M., M.Si.** selaku Ketua Jurusan Biologi yang telah banyak memberikan kemudahan, kelancaran dan kenyamanan kepada penulis selama belajar di Jurusan Biologi.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini jauh dari sempurna. Oleh sebab itu, kritik dan saran sangat penulis harapkan. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi semua pihak dan perkembangan ilmu pengetahuan. Amien.

Malang, 04 Agustus 2008

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Leptin, Endotel, <i>Reactive Oxygen Species (ROS)</i> , dan Kematian Sel	3
2.2 Puerarin Sebagai Antioksidan	11
2.3 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	12
2.4 Hipotesis	14
2.5 Konsep Penelitian	14
BAB III METODE PENELITIAN	15
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	15
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	15
3.2.1 Alat Penelitian	15
3.2.2 Bahan Penelitian	15
3.3 Isolasi dan Kultur HUVECs	15
3.4 Pelabelan Sel, Perlakuan Induksi Leptin dan Puerarin pada HUVECs	16

3.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	17
3.6 Konversi Hasil ELISA Menjadi Jumlah Sel.....	18
3.7 Analisis Data	18
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	19
BAB V PENUTUP	25
5.1 Kesimpulan.....	25
5.2 Saran	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN-LAMPIRAN	33



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Model efek stimulasi leptin pada oksidasi asam lemak di mitokondria.....	5
Gambar 2.2 Kematian sel	6
Gambar 2.3 Struktur molekul puerarin.....	11
Gambar 2.4 Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan.....	12
Gambar 2.5 Kerangka konsep penelitian.....	14
Gambar 4.1 Kurva standart jumlah sel	19
Gambar 4.2 Hubungan antara konsentrasi puerarin pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin dan non-leptin dengan penurunan jumlah sel	22

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1 Perbedaan apoptosis dan nekrosis	8
Tabel 4.1 Rerata jumlah sel/well pada akhir perlakuan leptin dan puerarin.....	20
Tabel 4.2 Rerata penurunan dan penambahan jumlah sel (%) pada akhir perlakuan leptin dan puerarin.....	21
Tabel L 5.1 Komposisi kit untuk pengukuran ELISA	42
Tabel L 8.1 Perhitungan jumlah sel.....	53



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

Lampiran 1. Skema Isolasi dan Kultur HUVECs.....	35
Lampiran 2. Skema Kerja Penelitian.....	37
Lampiran 3. Pelabelan Sel, Perlakuan Induksi Leptin dan Puerarin pada HUVECs.....	38
Lampiran 4. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	39
Lampiran 5. Komposisi Kit Untuk Pengukuran ELISA.....	42
Lampiran 6. Media dan Bahan Kultur HUVECs.....	45
Lampiran 7. Hasil Uji Statistik Penurunan Jumlah Sel	47
Lampiran 8. Perhitungan Jumlah Sel.....	53



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

α	: <i>Alfa</i>
λ	: Panjang gelombang
ACC	: <i>Acetyl-CoA Carboxylase</i>
AIF	: <i>Apoptosis Inducing Factor</i>
AMPK	: <i>Adenosine Mono Phosphate Kinase</i>
AMPKK	: <i>Adenosine Mono Phosphate Kinase Kinase</i>
Apaf-1	: <i>Apoptotic Protease Activation Factor-1</i>
AP	: <i>Alkaline Phosphatase</i>
ATP	: <i>Adenosine 5'-Triphosphate</i>
BAEC	: <i>Bovine Aortic Endothelial Cells</i>
BrdU	: <i>5'-Bromo-2'-Deoxy-Uridine</i>
CARD	: <i>Caspase Recruitment Domain</i>
CPT 1	: <i>Carnitine Palmitoyltransferase 1</i>
DD	: <i>Death Domain</i>
DED	: <i>Death Effector Domain</i>
DISC	: <i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
DR	: <i>Death Receptor</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
HBSS	: <i>Hank's Balance Salt Solution</i>
HEPES	: <i>10 N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid</i>
HRP	: <i>HorseRadish Peroxidase</i>
HUVECs	: <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
PARP	: <i>Poly (ADP-ribose) Polymerase</i>
PBSA	: <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SC	: <i>Sectio Caesaria</i>
TMB	: <i>3,3',5,5' Tetra Methyl Benzidine</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-Alfa</i>
TNF-R 1	: <i>Tumor Necrosis Factor-Receptor 1</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kegemukan atau yang dikenal dengan istilah "obesitas" adalah suatu kondisi tubuh dengan berat badan berlebih dibandingkan berat badan normal. Orang yang mengalami obes (gemuk), memiliki kecenderungan lebih malas, sulit bergerak, sehingga kandungan lemak tidak terbakar. Akibatnya terjadi penumpukan lemak di berbagai organ tubuh yang akhirnya memicu terganggunya proses metabolisme. Obesitas memacu terjadinya beberapa penyakit degeneratif seperti halnya atherosklerosis (Winarsi, 2005). Atherosklerosis merupakan salah satu sindroma metabolik yang diawali dengan terjadinya disfungsi endotel dan menjadi penyebab utama kematian (Yamagishi dkk, 2001).

Obesitas ditandai dengan hiperplasi dan hipertropi jaringan lemak. Jaringan lemak sendiri mensekresi beberapa molekul biologi yang aktif, yang salah satunya adalah leptin. Leptin merupakan plasma protein yang disekresikan oleh adiposit yang berperan dalam mengontrol berat badan (Bouloumié dkk, 1999). Reseptor leptin diekspresikan pada sel perifer seperti sel endotel (Artwohl dkk, 2002). Dalam kultur sel endotel (HUVECs), leptin berperan dalam peningkatan akumulasi ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang merupakan radikal bebas (oksidan) (Bouloumié dkk, 1999). Menurut Yamagishi dkk, (2001), 10 ng/mL leptin dapat meningkatkan produksi ROS pada kultur *bovine aortic endothelial cells* (BAEC). Bouloumié dkk, (1999), juga menyatakan bahwa konsentrasi leptin sebanyak 1-100 ng/mL pada kultur HUVECs juga berperan dalam meningkatkan ROS. Peningkatan akumulasi ROS ini dapat menimbulkan kondisi stress oksidatif, sehingga terjadi kematian sel secara langsung yaitu melalui apoptosis atau nekrosis (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Untuk menghambat peningkatan akumulasi ROS yang bertindak sebagai oksidan (radikal bebas) akibat stimulasi leptin yang dapat menyebabkan kematian sel, maka diperlukan adanya antioksidan seperti halnya puerarin yang berfungsi sebagai *scavenger* radikal bebas secara langsung sehingga oksidan berubah menjadi lebih stabil dan kurang reaktif (Mayes, 1993 ; Winarsi, 2005). Puerarin

merupakan salah satu senyawa isoflavanon (berperan sebagai antioksidan) yang diekstrak dari *Pueraria lobata* (XiaoXiang dkk, 2005), yang merupakan salah satu spesies dari familia tanaman kacang-kacangan (Leguminosae) (Hyene, 1987). Menurut Halliwell dan Gutteridge (1996), reaktivitas oksidan dapat dihambat atau dihentikan oleh suatu substansi antioksidan sehingga dapat menghambat kerusakan oksidatif suatu molekul yang diakibatkannya.

Sampai saat ini masih sedikit penelitian tentang puerarin dalam menambahkan penurunan jumlah sel pada kultur HUVECs yang diinduksi leptin. Sehingga berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini dilakukan dengan mengamati penurunan jumlah sel pada kultur HUVECs yang diinduksi leptin dengan paparan puerarin.

1.2 Perumusan Masalah

Apakah puerarin dapat menghambat penurunan jumlah sel pada kultur HUVECs yang diinduksi leptin?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh puerarin dalam menghambat penurunan jumlah sel pada kultur HUVECs yang diinduksi leptin.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah mengetahui dan menambah informasi tentang penggunaan puerarin sebagai salah satu senyawa anti-apoptosis yang dapat mencegah kematian sel endotel sehingga dapat dijadikan alternatif senyawa untuk mengatasi patologis akibat obesitas.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Leptin, Endotel, *Reactive Oxygen Species (ROS)* dan Kematian Sel

Leptin berasal dari bahasa Yunani “*Leptos*” yang artinya kurus (Fantuzzi dan Faggioni, 2000). Leptin merupakan plasma protein yang dikode oleh *ob gene* (Lu dan Li, 2000 ; Rouet-Benzineb dkk, 2004 ; Bouloumié dkk, 1999 ; Quehenberger dkk, 2002 ; Sweeney, 2002), dengan berat molekul 16 kDa (Sweeney, 2002 ; Rouet-Benzineb dkk, 2004 ; Fantuzzi dan Faggioni, 2000) yang terutama disekresikan dalam aliran darah oleh jaringan adiposit (Gullicksen dkk, 2003 ; Maffei dkk, 1995 ; Rouet-Benzineb dkk, 2004 ; Bruno dkk, 2005 ; Wagoner dkk, 2006). Leptin berperan dalam regulasi berat badan (Bouloumié dkk, 1999 ; Knudson dkk, 2005), metabolisme, dan reproduksi (Lawton, 2006). Pengaruh leptin dapat diperantarai oleh efek hipotalamus terhadap pengontrolan perilaku makan dan lapar serta pemakaian energi. Leptin berefek untuk mengurangi nafsu makan, tetapi hal ini tidak ditemukan pada orang obesitas (Lawton, 2006). Aksi biologi leptin pada jaringan target melalui interaksi reseptor spesifik yaitu Ob-R (Rouet-Benzineb dkk, 2004). Reseptor leptin mempunyai 6 isoform yaitu Ob-Ra, Ob-Rb (merupakan reseptor leptin yang dapat mengkode semua reseptor, termasuk di sepanjang daerah intraseluler, yang berperan dalam efek biologi leptin), Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re dan Ob-Rf (Rahmouni dan Haynes, 2004). Reseptor leptin diekspresikan pada beberapa sel perifer seperti pada adiposa, otot, ginjal, paru-paru, dan kelenjar adrenal (Fujita dkk, 2002 ; Utsumi dkk, 2003) serta sel endotel yang merupakan target yang berpotensi untuk aksi leptin (Artwohl dkk, 2002 ; Yamagishi dkk, 2001).

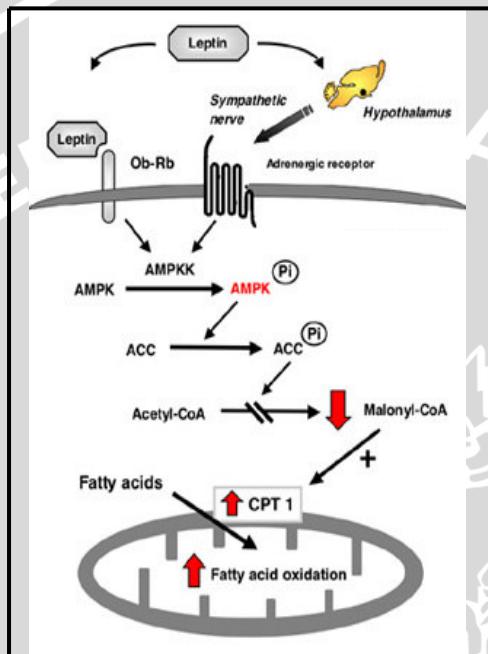
Endotel merupakan selapis sel yang membatasi permukaan bagian dalam dari pembuluh darah. Pada dasarnya, pembuluh darah terdiri dari tunika adventitia, tunika media, dan tunika intima yang terdiri dari selapis sel endotel dan submukosa (Bevelander dan Ramaley, 1998). Semua sel endotel selalu bersentuhan langsung dengan cairan darah karena letaknya tersebut. Sel-sel ini merupakan selapis sel pipih berbentuk poligonal dengan ukuran 25-50 μm x 10-15 μm (Widodo, 1995). Secara fisiologis endotel mempunyai peran yang

sangat penting dalam penentuan kualitas hidup. Hal ini sangat berhubungan dengan banyaknya fungsi sel endotel dalam mempertahankan proses homeostasis tubuh, yaitu sebagai barier, sebagai tempat metabolisme dan tempat sintesa berbagai macam bahan aktif (Rudijanto, 1999). Pada keadaan normal, sel endotel merupakan permukaan yang tidak lengket sehingga dapat mencegah koagulasi, adesi sel dan kebocoran cairan rongga intravaskular. Sifat antikoagulasi endotel yang hilang menunjukkan rusaknya sel endotel. Kerusakan endotel tersebut menimbulkan agregasi trombosit dan leukosit yang mengakibatkan terjadinya trombosis intravaskuler dan penyempitan dan penyumbatan pembuluh darah (Baratawidjaja, 2006).

Sel endotel yang distimulasi dengan leptin akan memproduksi atau meningkatkan akumulasi ROS yang merupakan radikal bebas (oksidan) secara langsung (Bouloumié dkk, 1999 ; Yamagishi dkk, 2001), melalui mekanisme yaitu leptin berikatan dengan reseptor leptin (Ob-Rb) pada membran plasma, kemudian leptin mengaktifasi AMPK yang merupakan enzim *fuel sensing* yang akan teraktivasi apabila terjadi peningkatan rasio AMP/ATP. Fosforilasi AMPK mengaktifasi fosforilasi ACC (*Acetyl-CoA Carboxylase*) dan kemudian mengaktifasi Acetyl-CoA. Acetyl-CoA selanjutnya menghambat sintesis *Malonyl-CoA*, mengaktifkan CPT 1 (*Carnitine Palmitolytransferase* 1 yang merupakan enzim kunci dalam oksidasi asam lemak). Hal ini mengakibatkan peningkatan oksidasi asam lemak di mitokondria sehingga meningkatkan produksi ROS berupa radikal mitokondrial, akibatnya terjadi kondisi stress oksidatif (Gambar 2.1) (Minokoshi dan Khan, 2003 ; Pallan, 2007).

Stress oksidatif merupakan suatu keadaan yang tidak seimbang antara ROS (yang merupakan pro-oksidan) dan pertahanan antioksidan (*antioxidant defence*). Pada prinsipnya, stress oksidatif dipicu oleh dua kondisi umum yaitu kurangnya antioksidan dan kelebihan produksi ROS (Halliwell dan Gutteridge, 1999). ROS dibagi menjadi dua bagian yaitu (1) ROS yang berasal dari proses fisiologis (ROS endogen), seperti anion superoksid (O_2^-), hidroksil (OH^\cdot), alkoksil (RO^\cdot), peroksil (ROO^\cdot), peroksida lipid (LOOH), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan *singlet oxygen* ($1O_2$), dan (2) ROS eksogen seperti polusi, asap rokok, emisi kendaraan bermotor dan industri, asbes, radiasi ionisasi, infeksi bakteri, jamur dan virus, serta paparan zat kimia (termasuk obat) yang bersifat mengoksidasi

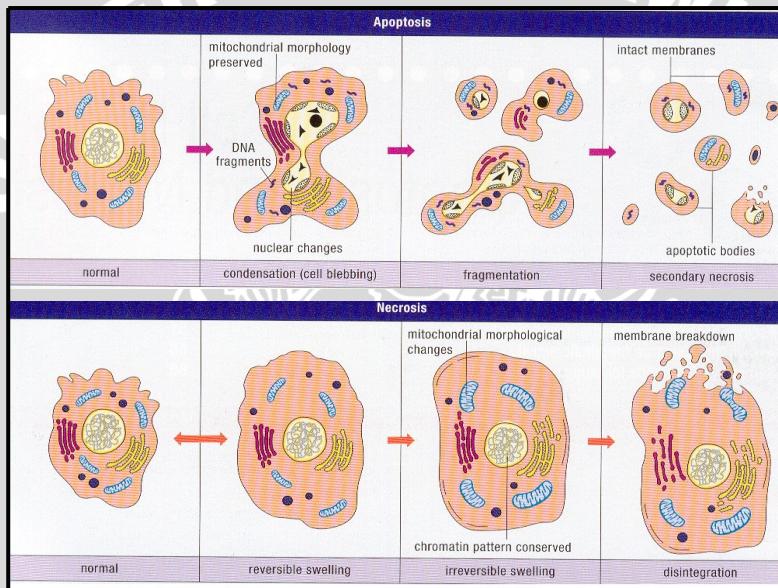
(Pietta, 2000 ; Sauriasari, 2007). Adanya akumulasi ROS pada sel-sel endotel sebagai akibat dari induksi leptin tersebut mengakibatkan terjadinya kondisi stress oksidatif (Lum dan Roebuck, 2001), yang akhirnya dapat menyebabkan kematian sel secara langsung (Halliwell dan Gutteridge, 1999).



Gambar 2.1 Model efek stimulasi leptin pada oksidasi asam lemak di mitokondria (Minokoshi dan Khan, 2003).

Proses kematian sel dapat melalui dua mekanisme yaitu apoptosis dan nekrosis (Gambar 2.2) (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Apoptosis adalah mekanisme proses aktif yang membutuhkan energi (ATP), dimana sel itu sendiri aktif dalam proses destruksi (Tsujimoto, 1997). Apoptosis disebut sebagai kematian sel yang terprogram dan merupakan suatu bentuk fisiologi normal yang memegang peranan penting dalam homeostasis jaringan dewasa dan perkembangan embrio. Peristiwa ini dikontrol secara genetik. Pada individu dewasa, apoptosis berfungsi untuk menjaga keseimbangan proliferasi pada saat pergantian sel-sel yang rusak agar jumlah sel tetap konstan (Cooper, 2000). Sel-sel yang berapoptosis akan mengalami perubahan morfologi dan molekuler. Perubahan

morfologi terjadi karena sel mengalami dehidrasi sehingga sel yang pada awalnya berbentuk bulat berubah menjadi lonjong dengan ukuran yang menyusut, setelah itu kondensasi kromatin pun terjadi yang diikuti dengan fragmentasi inti, pengkerutan membran plasma dan adanya fragmentasi seluler untuk membentuk badan apoptotik (Fuller dan Shields, 1998 ; Rossi dan Gaidano, 2003). Selain perubahan morfologi, perubahan molekuler pun terjadi yaitu dengan adanya peningkatan konsentrasi Ca^{2+} dan aktivasi enzim protease, terutama endonuklease yang dapat mendegradasi DNA pada bagian internukleosomal (Darzynkiewicz dkk, 1995).



Gambar 2.2 Kematian sel (Pkukmweb, 2008).

Jalur dari apoptosis ada dua macam yaitu melalui jalur ekstrinsik (melalui reseptor permukaan sel) dan jalur intrinsik (melalui mitokondria) (Garrindo, dkk, 2001). Menurut Lowe dan Lin (2000), pada jalur ekstrinsik, sinyal apoptosis yang diterima oleh reseptor kematian yang meliputi Fas/CD95, *tumor necrosis factor receptor* (TNF-R) 1, DR3 (*death receptor* 3), DR4, DR5 dan DR6. Sekali diaktifasi, reseptor kematian menerima protein adaptor melalui interaksi hemofilik dari *death domain* (DD) sendiri menuju DD protein adaptor. Selain mempunyai DD, protein adaptor juga

mengandung *death effector domain* (DED) yang terlibat dalam tahap selanjutnya sinyal apoptosis ekstrinsik. DED dari protein adaptor berinteraksi secara hemofilik dengan DED dari enzim penginisiasi apoptosis yaitu procaspase-8 membentuk DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). Kemudian procaspase-8 diaktifkan secara proteolitik menjadi caspase-8 dan selanjutnya mengaktifkan caspase efektor sepanjang jalur apoptosis (Rossi dan Gaidano, 2003).

Jalur apoptosis secara intrinsik diawali dengan Ca^{2+} yang terkumpul di mitokondria diakumulasi oleh energi yang dimiliki sel. Adanya Ca^{2+} tersebut, menyebabkan pembentukan oksigen reaktif. Senyawa ini bersama dengan protein Bax membuka pori-pori membran mitokondria, sehingga mitokondria akan *blebbing* dan melepas salah satu protein intermembran (sitokrom c) ke sitosol (dengan dikontrol Bcl-2). Pelepasan sitokrom c akan mengikat Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activation Factor-1*) dan terbentuknya CARD (*Caspase Recruitment Domain*). Oligomer dari Apaf-1 dan ATP kemudian mengikat procaspase-9 pada sitosol membentuk apoptosome (suatu kompleks aktivasi caspase-9). Caspase-9 selanjutnya mentriger maturasi katalitik dari procaspase-9 menjadi caspase-3 yang berperan dalam menghentikan cascade caspase (Kroemer dan Reed, 2002). Caspase-3 beraktivitas memecah *poly(ADP-ribose) polymerase* (PARP) 116 kDa menjadi fragmen 85 kDa dan 25 kDa. Protein PARP 85 kDa dapat dijadikan penanda teraktifkannya apoptosis (Salvesen, 2002).

Proses kematian sel pada apoptosis berbeda dengan proses kematian sel pada nekrosis (Tabel 2.1). Nekrosis merupakan kematian sel akibat respon patologis dan mengakibatkan peradangan jaringan (Mitchell dan Cotran, 1997). Nekrosis merupakan kematian sel yang tidak membutuhkan energi (ATP) (Trump dkk, (1965) dalam Bezvenyuk, 2001 ; Tsujimoto, 1997), yang terlihat sebagai pembengkakan pada mitokondria (Darzynkiewicz dkk, 1995) dan retikulum endoplasma (Trump dkk, (1965) dalam Bezvenyuk (2001), yang menyebabkan volume sel bertambah, kerusakan fungsi membran hingga terlepasnya materi seluler dan disertai respon inflamasi. Respon inflamasi terjadi pada kondisi patologis yang diaktifkan oleh makrofag (Cocco dan Ucker, 2001).

Tabel 2.1 Perbedaan apoptosis dan nekrosis

Morfologi		
	Apoptosis	Nekrosis
Ciri	Sitoplasma tampak menyusut dan terjadi kondensasi nukleus.	Terjadi pembengkakan pada sitoplasma dan mitokondria.
Membran plasma	Membran plasma <i>Blebbing</i> tanpa kehilangan integritas membran plasma.	Kehilangan integritas membran plasma.
<u>Kromatin</u>	Terjadi aggregasi kromatin pada membran inti.	
Organel	Mitokondria berlubang membentuk pori yang meliputi protein bcl-2 <i>family</i> .	Beberapa organel mengalami disintegrasi (pembengkakan).
<u>Vesikel</u>	Membentuk badan apoptotik (<i>apoptotic bodies</i>).	Seluruh sel mengalami lisis.
Terminal	Fragmentasi dari sel menjadi bentuk yang lebih kecil (<i>apoptotic bodies</i>).	Seluruh sel mengalami lisis.

Lanjutan Tabel 2.1 Perbedaan apoptosis dan nekrosis

Biokimia		
	Apoptosis	Nekrosis
Regulasi	Proses berlangsung secara terus menerus meliputi tahapan aktivasi dan enzimatik.	Kehilangan regulasi homeostasis ion.
Kebutuhan Energi	Membutuhkan energi (ATP).	Tidak membutuhkan energi (ATP).
DNA	Panjang fragmentasi Non-random mono- dan oligonukleosomal dari DNA.	DNA menjadi acak.
Waktu	Fragmentasi DNA terjadi sebelum sel mengalami lisis.	Fragmentasi DNA terjadi setelah sel mengalami lisis (= tahap akhir dalam kematian sel).
Biokimia	Melepaskan beberapa faktor penginduksi apoptosis seperti sitokrom c dan AIF ke dalam sitoplasma oleh mitokondria. Diaktifasi oleh cascade <u>caspase</u> . Terjadi perubahan pada membrane menjadi asimetri (translokasi fosfatidilserin dari sitoplasma ke bagian ekstraseluler membran).	

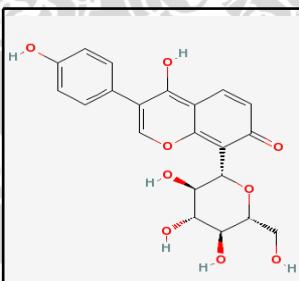
Lanjutan Tabel 2.1 Perbedaan apoptosis dan nekrosis

Fisiologi		
	Apoptosis	Nekrosis
Tingkat	Terjadi pada sel itu sendiri.	Mempengaruhi beberapa sel yang terdapat didekatnya.
Induksi	Disebabkan oleh proses fisiologi.	Disebabkan oleh gangguan non-fisiologi.
Fagositosis	Difagositosis oleh sel-sel yang didekatnya atau oleh makrofag.	Difagositosis oleh makrofag.
Sistem imun	Tidak terjadi respon inflamasi.	Terjadi respon inflamasi.

(Halliwell dan Gutteridge, 1999).

2.2 Puerarin Sebagai Antioksidan

Flavonoid merupakan kelompok besar antioksidan polifenolik yang terkandung dalam berbagai jenis buah-buahan, sayur-sayuran dan minuman seperti teh dan anggur. Berdasarkan struktur kimianya, flavonoid dibagi dalam beberapa jenis yaitu flavonol, flavanol, flavon, dan isoflavon (Young dan Woodside, 2001). Puerarin merupakan salah satu senyawa isoflavon yang diekstrak dari *Pueraria lobata* (wild) ohwi (XiaoXiang dkk, 2005) yang merupakan salah satu spesies dari familia tanaman kacang-kacangan (Leguminosae) (Hyene, 1987). Isoflavonoid yang terkandung di dalam akar *Pueraria lobata* meliputi puerarin (Gambar 2.3), daidzin, daidzein, formonetin serta glukosida-glukosida C dan O yang lain. Senyawa-senyawa tersebut berhubungan erat dengan efek antioksidan, dan beberapa efek farmakologis yang lain. Puerarin (*daidzein 8-C-glucoside*) dan daidzin (*daidzein 7-O-glucoside*) merupakan senyawa isoflavon terbesar pada akar *Pueraria lobata* (Meezan dkk, 2005).



Gambar 2.3 Struktur molekul puerarin
(Med-Owl, 2007)

Menurut Nijveldt dkk (2001), salah satu mekanisme kerja isoflavon sebagai antioksidan adalah dengan cara menangkap radikal bebas (*free radical scavenger*) secara langsung, sehingga oksidan berubah menjadi lebih stabil dan kurang reaktif (Gambar 2.4), yaitu ketika isoflavon berinteraksi dengan senyawa oksidan, maka senyawa isoflavon memberikan satu gugus H kepada senyawa oksidan. Sehingga seketika itu juga, senyawa isoflavon berubah menjadi radikal isoflavon, sementara senyawa oksidan menjadi senyawa yang stabil. Meskipun isoflavon berubah menjadi senyawa radikal, namun senyawa tersebut tidak memiliki potensi untuk melakukan propagasi. Radikal tersebut akan di non-aktifkan oleh

senyawa radikal lain, sehingga kembali menjadi senyawa stabil. Sel yang menjadi target isoflavan dalam tubuh sebagian besar adalah jaringan kardiovaskuler, jaringan reproduksi uterus, payudara dan prostat, pembuluh darah arteri serta jaringan skeletal. Menurut Halliwell dan Gutteridge (1996), reaktivitas oksidan dapat dihambat atau dihentikan oleh suatu substansi antioksidan sehingga dapat menghambat kerusakan oksidatif suatu molekul yang diakibatkannya.



Gambar 2.4 Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan
(Nijveldt dkk, 2001)

2.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA merupakan salah satu metode yang sensitif untuk mendeteksi antibodi, antigen, hormon maupun bahan toksik. Metode ini merupakan pengembangan dari sistem deteksi dengan imunofloresen atau radioaktif (Rantam, 2003).

Metode ELISA pertama kali diperkenalkan oleh Engvall dan Perlmann (1971) dengan cara mengkonjugasikan enzim dalam imunoassay. Dua macam antibodi yang digunakan dalam ELISA, antibodi primer (*primary antibody*) mengikat pada antigen dan antibodi kedua (*secondary antibody*) atau antibodi antiglobulin mengikat pada antibodi pertama. Antiglobulin yang dilabel dengan enzim seperti *horseradish peroxidase* (HRP), alkalin phosphatase (AP) yang mempermudah untuk monitor dengan perubahan warna. Adanya reaksi dari enzim ini secara kuantitatif antibodi pertama dapat dianalisis (Rantam, 2003). Beberapa model ELISA yang banyak digunakan di laboratorium antara lain (Burgess, 1995) :

1. Direct ELISA

Direct ELISA adalah salah satu model ELISA yang diikatkan antara antigen dan antibodi, dimana antibodi harus dilabel dahulu baru divisualisasi dengan cara menambahkan substrat (Rantam, 2003). Kelemahan model ini adalah diperlukan keahlian dalam melakukan konjugasi atau melabel antibodi dengan enzim. Keuntungannya adalah kesederhanaan sistem dan lebih murah (Rantam, 2003).

2. Indirect ELISA

Indirect ELISA merupakan konfigurasi paling sederhana yang dapat digunakan untuk mengukur titer antibodi. Antigen teradsorbsi pada substrat padat. Antibodi primer tidak berlabel dan dapat diperoleh serum, dan antibodi sekunder terikat pada enzim yang sesuai, yang biasanya disebut sebagai konjugat. Hasil akan tampak bila ditambahkan substrat (Burgess, 1995). Menurut Rantam (2003), model ini dapat dilakukan dengan cara melapiskan antibodi pada dasar mikroplate, selanjutnya ditambahkan antigen dan diinkubasikan dalam waktu 45 menit pada temperatur 37°C baru ditambahkan antibodi monoklonal dan akhirnya ditambahkan substrat yang dilabel dengan enzim alkalin fosfatase atau peroksidase.

3. Sandwich ELISA

Sandwich ELISA adalah model tes ELISA yang menggunakan perangkat tiga macam antibodi. Antibodi pertama biasanya menggunakan antibodi monoklonal yang dilapiskan pada mikroplate dan selanjutnya direaksikan dengan antigen. Setelah dilakukan pencucian baru ditambahkan antibodi kedua atau sampel serum yang akan dideteksi dan selanjutnya direaksikan dengan antibodi ketiga yaitu fragmen imunoglobulin anti imunoglobulin yang akan dideteksi (Rantam, 2003).

4. Cupture ELISA

Cupture ELISA adalah model yang dikembangkan untuk deteksi IgM karena untuk deteksi IgM sering terjadi faktor negatif yaitu adanya faktor reumatoïd, sehingga sering terjadi positif palsu (Rantam, 2003).

5. Sel ELISA

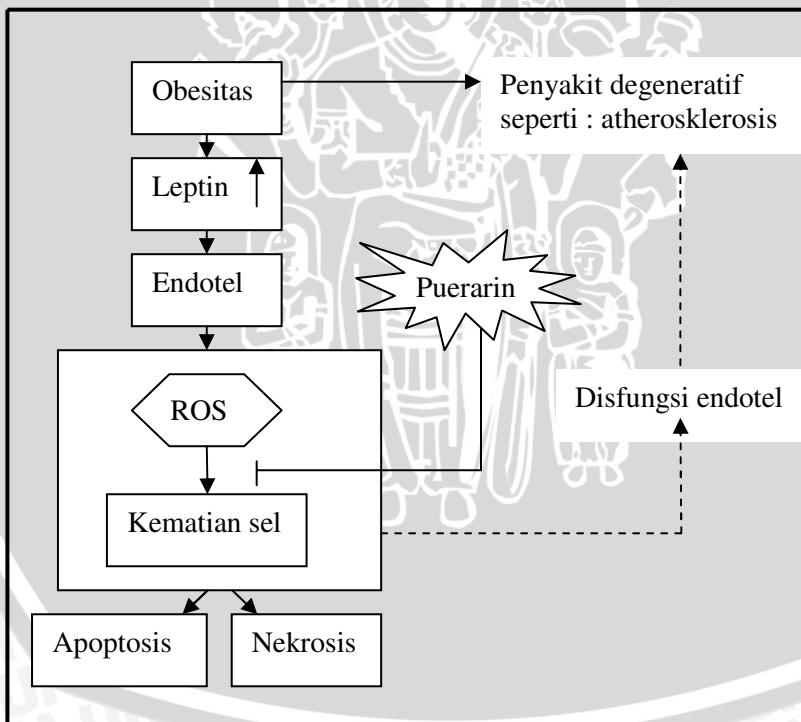
Sel ELISA dikembangkan untuk mendeteksi antigen atau agen yang terdapat dalam sel. Sehingga pada model ini tidak diperlukan pelapisan antigen pada mikroplate tetapi dengan cara fiksasi sel yang diinokulasikan sampel yang dideteksi agennya, kemudian direaksikan dengan antibodi monoklonal atau poliklonal dan akhirnya direaksikan dengan konjugat fragmen imunoglobulin anti imunoglobulin yang digunakan untuk mendeteksi antigen. Antibodi yang sering digunakan untuk mendeteksi agen dalam sel adalah antibodi monoklonal, karena agen yang terdeteksi didalam sel belum tentu merupakan antigen yang komplit, tetapi merupakan bagian tertentu yang dapat menstimulasi antibodi (Rantam, 2003).

2.4 Hipotesis

Pemberian puerarin dapat menghambat penurunan jumlah sel pada kultur HUVECs yang diinduksi leptin 25 ng/mL.

2.5 Konsep Penelitian

Obesitas merupakan faktor resiko terjadinya beberapa penyakit degeneratif seperti atherosklerosis. Atherosklerosis merupakan salah satu sindroma metabolik yang diawali dengan terjadinya disfungsi endotel dan menjadi penyebab utama kematian. Obesitas ditandai dengan hiperplasi dan hipertropi jaringan lemak. Jaringan lemak sendiri aktif mensekresikan berbagai protein yang salah satunya adalah leptin. Leptin diketahui memicu akumulasi ROS (radikal bebas) di endotel. Akumulasi ROS akan menyebabkan kematian sel (melalui apoptosis atau nekrosis). Untuk menghambat hal tersebut, maka diperlukan puerarin (antioksidan) yang berfungsi sebagai *scavenger* radikal bebas (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Kerangka konsep penelitian

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2007 sampai bulan Mei 2008 di Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Laminar air flow (LAF) (Esco Bre), *autoclave*, refrigerator, timbangan analitik, kanul, bunsen, sentrifus, inkubator CO₂, tabung CO₂, mikroskop inverted (Nikon), mikropipet, tip, vorteks, 24 *well-plate culture* (Iwaki), pipet volume, sputif, tabung sentrifus (falcon), filter, *cover slip*, obyek gelas, penjepit (klem), *disposable syringe*, *microtiter plate*, ELISA reader (Wearnes-USA), tabung eppendorf, sputif, dan gunting.

3.2.2 Bahan Penelitian

Umbilikus hasil persalinan *caesar*, alkohol 70%, HBSS (*Hank's Balance Salt Solution*) (Sigma), gentamisin sulfat (Sigma), natrium bikarbonat (Sigma), *phenol red* (Sigma), HEPES (10 N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) (Sigma), *deionized water*, kolagenase (Sigma tipe I), PBSA (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Calcium Chloride and Magnesium*) (Sigma), gelatin, medium 199 (Sigma), penisilin-streptomisin (Sigma), L-glutamin (Sigma), *fetal bovine serum* (FBS), *human recombinant leptin* (Sigma), ekstrak puerarin (ChemExper), *cellular DNA fragmentation* ELISA kit, air kran, dan aquades.

3.3 Isolasi dan Kultur HUVECs

Metode yang digunakan ini menurut modifikasi Khotimah (2003), umbilikus dalam *cord solution* diperoleh dari beberapa rumah bersalin di Malang, melalui persalinan *Sectio Caesaria* (SC). Umbilikus dibersihkan dengan kertas tisu yang telah dibasahi dengan alkohol 70 %. Kanul dimasukkan salah satu ujung vena (kira-kira 1

cm), kemudian diikat erat dengan benang. Vena umbilikus dicuci dengan 10 mL PBSA melalui kanul yang telah terpasang dengan menggunakan sput 12 mL untuk menghilangkan darah dari jaringan, kemudian ujung umbilikus yang lain disumbat dengan penjepit (klem) dan 7 mL kolagenase dimasukkan melalui kanul yang dipasang. Selanjutnya umbilikus dihangatkan dengan cara didekap menggunakan kedua belah tangan dan didekatkan dengan bunsen selama 10 menit. Kolagenase yang telah mengandung endotel dikeluarkan dari umbilikus kemudian dimasukkan dalam tabung sentrifus steril. Umbilikus dibilas dengan 10 mL larutan PBSA untuk membilas sel endotel yang masih tersisa dan ditambahkan ke tabung sentrifus yang berisi kolagenase, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit. Supernatan dibuang sedangkan pelet yang didapatkan ditambah dengan *serum free media* dan dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit, sehingga diperoleh pelet yang berisi sel endotel. Pelet yang diperoleh diresuspensi dengan medium kultur sebanyak 5 mL, kemudian ditransfer ke 24 *well-plate culture* yang sebelumnya telah dilapisi gelatin 0,2 % kemudian dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ 5 % (Heraeus) pada suhu 37°C selama 30 menit. *Culture plate* diamati dibawah mikroskop inverted, jika sel sudah menempel pada dasar *plate*, medium kultur diambil dan sel dibilas dengan 3 mL larutan *serum free media* dan ditambahkan medium yang baru. Selanjutnya *plate* dimasukkan dalam inkubator sampai terbentuk *monolayer* kurang lebih 3-4 hari dan setiap dua hari sekali dicuci dengan *serum free media* serta ditambahkan medium yang baru.

3.4 Pelabelan Sel, Perlakuan Induksi Leptin dan Puerarin pada HUVECs

Kultur sel endotel yang berumur 2 x 24 jam, dicuci dengan 3 mL larutan *serum free media* dan ditambahkan medium kultur yang mengandung BrdU 10 µM (*solution 7*), diinkubasi selama 20 jam. Kemudian dicuci dengan *serum free media*, diinduksi leptin 0 ng/mL (kontrol) dan 25 ng/mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam. Selanjutnya diinduksi puerarin dengan konsentrasi 0 ; 5 ; 25 ; 200 dan 525 µM dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 6 jam. Langkah selanjutnya adalah selnya dilisiskan dengan menambahkan *incubation solution* (*solution 5*) sebanyak 200 µl pada masing-

masing well, dan diinkubasi pada suhu 15-25°C selama 30 menit. Kemudian disentrifugasi 250 x g selama 10 menit. Selanjutnya supernatan diambil 100 µl untuk prosedur ELISA.

3.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Langkah awal dalam kuantifikasi jumlah sel dengan metode ELISA adalah menentukan jumlah well yang digunakan pada *microplates*. Sebelumnya dilakukan *coating microplates* yaitu dipipet 100 µl *anti-DNA coating solution (solution 3)* ke dalam well yang telah ditentukan, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian *coating solution* dalam masing-masing well dibuang dengan cara aspirasi.

Microplates yang telah *dicoating*, selanjutnya dilakukan prosedur *blocking* yaitu ditambah 200 µl 1x *incubation solution (solution 5)*, MP ditutup dengan *adhesive cover foil* dan diinkubasi pada suhu 15-25°C selama 30 menit. Kemudian *incubation solution* dibuang dengan cara aspirasi, dan masing-masing well selanjutnya dicuci dengan *washing solution (solution 4)* 3x 250 µl masing-masing selama 3 menit dan selanjutnya *washing solution* dibuang dengan cara aspirasi.

Microplates yang telah *dicoating* dan *diblocking*, diisi sampel sebanyak 100 µl (setiap perlakuan), kemudian MP ditutup dengan *adhesive cover foil* dan diinkubasi pada suhu 15-25°C selama 90 menit, dan selanjutnya *solution* dibuang dengan cara aspirasi. Masing-masing well selanjutnya dicuci dengan *washing solution (solution 4)* 3x 250 µl masing-masing selama 3 menit, sementara cucian yang terakhir dibiarkan, dan MP tanpa tutup diletakkan diatas beaker 500 mL yang sudah diisi 300 mL air pada *microwave oven*, *diirradiate* selama 5 menit pada 500 W, dan kemudian didinginkan pada suhu -20°C selama 10 menit, dan selanjutnya *fluid* dibuang dengan cara aspirasi. Masing-masing well kemudian ditambah 100 µl *anti-BrdU-POD conjugate solution (solution 6)*, dan ditutup dengan *adhesive cover foil* dan diinkubasi pada suhu 2-8°C overnight (ON), kemudian masing-masing well dicuci dengan *washing solution (solution 4)* 3x 250 µl masing-masing selama 3 menit. *Substrate solution* dipipet sebanyak 100 µl dan dimasukkan pada masing-masing well, selanjutnya MP dishaker dalam keadaan gelap sampai terjadi perubahan warna. *Stop solution (solution 8)* sebanyak 25 µl ditambahkan pada masing-masing well selama 5 menit. Pembacaan

nilai absorbansi dilakukan pada λ 450 nm setelah penambahan *stop solution*.

3.6 Konversi Hasil ELISA Menjadi Jumlah Sel

Tahapan-tahapan dalam menentukan penurunan dan penambahan jumlah sel adalah nilai absorbansi *BrdU* yang terukur pada λ 450 nm dikonversi ke dalam jumlah sel/well yaitu dengan memplotkan nilai absorbansi *BrdU* pada persamaan kurva standart jumlah sel. Jumlah sel yang telah diketahui pada setiap perlakuan kemudian ditentukan persentase nilai penurunan dan penambahan jumlah selnya yaitu dengan mengacu pada jumlah sel dalam kondisi normal (kontrol).

3.7 Analisis Data

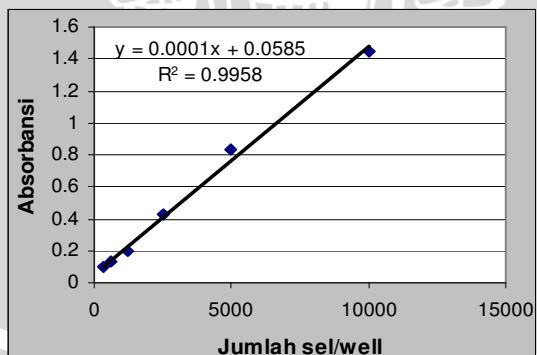
Kuantifikasi jumlah sel pada setiap perlakuan kultur HUVECs dilakukan pada lisat sel yang dilabel *BrdU* dengan metode ELISA. Banyaknya *BrdU* yang terukur menunjukkan jumlah sel. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan analisis ragam satu arah (*oneway ANOVA*) dan uji lanjutan *Tukey HSD (Honest Significant Difference)* menggunakan program SPSS.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kuantifikasi jumlah sel pada kultur HUVECs dilakukan berdasarkan banyaknya *BrdU* yang melakukan korporasi dengan DNA pada sel yang dikultur dalam medium yang mengandung *BrdU*. *BrdU* merupakan analog dengan timin yang sering digunakan dalam studi proliferasi sel. *BrdU* yang terdapat pada medium kultur, akan dipakai oleh sel untuk mensintesis DNA. Dengan demikian, *BrdU* akan terkorporasi pada DNA (dengan kata lain DNA yang baru disintesis akan terlabel oleh *BrdU*). Sel yang mengandung *BrdU*, menunjukkan sel yang membelah selama perlakuan.

Untuk mengkuantifikasi sel yang terlabel *BrdU*, sel dilisiskan sehingga dihasilkan lisat. *BrdU* yang terkandung dalam lisat diukur menggunakan metode ELISA pada λ 450 nm. Adapun mekanisme deteksi *BrdU* pada ELISA adalah sebagai berikut. Pertama, MP (*microplate*) dicoated dengan anti-DNA. Kedua, DNA terlabel *BrdU* pada lisat terikat pada anti-DNA. Ketiga, *BrdU* yang terlabel pada DNA diikat oleh *anti-BrdU-POD conjugate*. Keempat, dilakukan visualisasi dengan menambahkan TMB sebagai substrat POD. Kelima, *BrdU* yang ada dalam lisat menunjukkan absorbansi yang terukur pada λ 450 nm. Absorbansi *BrdU* yang terukur menunjukkan jumlah sel. Oleh karena itu, untuk memperkirakan jumlah sel, absorbansi yang terukur pada λ 450 nm selanjutnya dikonversi menjadi jumlah sel menggunakan grafik pada Gambar 4.1. Grafik tersebut dimodifikasi dari Roche Applied Science (2005).



Gambar 4.1 Kurva standart jumlah sel

Berdasarkan konversi absorbansi *BrdU* ke dalam jumlah sel, selanjutnya disusun Tabel 4.1 yang menunjukkan jumlah sel pada akhir perlakuan.

Tabel 4.1 Rerata jumlah sel/well pada akhir perlakuan leptin dan puerarin

Perlakuan		Jumlah sel/well
Leptin (ng/mL)	Puerarin (μ M)	
0	0	15.412
	5	10.965
	25	12.162
	200	11.635
	525	12.845
25	0	11.165
	5	10.065
	25	10.652
	200	13.002
	525	16.982

Pada akhir perlakuan tanpa leptin dan puerarin, didapatkan jumlah sel sebanyak 15.412 sel/well. Perlakuan tersebut sekaligus dijadikan dasar atau patokan jumlah sel dalam kondisi normal. Pada akhir perlakuan kultur HUVECs yang diinduksi puerarin 5 μ M, sel berkurang menjadi 10.965 sel/well. Demikian juga pada akhir perlakuan kultur HUVECs yang diberi puerarin 25 ; 200 dan 525 μ M, sel berkurang berturut-turut menjadi 12.162 ; 11.635 dan 12.845 sel/well. Berkurangnya sel tersebut diduga kuat karena sel mati setelah pemberian puerarin. Demikian juga pada akhir perlakuan dengan leptin dan puerarin 0 ; 5 ; 25 dan 200 μ M sel berkurang menjadi 11.165 ; 10.065 ; 10.625 dan 13.002 sel/well. Sementara pada akhir perlakuan dengan leptin dan puerarin 525 μ M, sel bertambah menjadi 16.982 sel/well.

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka disusun tabel pengaruh pemberian puerarin terhadap penurunan jumlah sel (Tabel 4.2). Perhitungan jumlah sel mati didasarkan pada bahwa jumlah sel normal adalah sebanyak 15.412 sel/well. Bila dengan perlakuan, jumlah sel lebih besar daripada 15.412 sel/well, maka perlakuan tersebut dinyatakan menyebabkan pertambahan jumlah sel.

Sedangkan apabila dengan perlakuan, jumlah sel lebih kecil daripada 15.412 sel/well, maka perlakuan tersebut dinyatakan menyebabkan berkurangnya atau menurunnya jumlah sel (terjadi kematian sel).

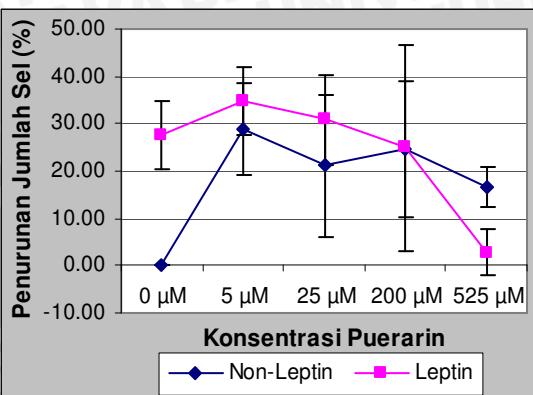
Tabel 4.2 Rerata penurunan dan penambahan jumlah sel (%) pada akhir perlakuan leptin dan puerarin

Perlakuan		Penurunan jumlah sel (%)	Penambahan jumlah sel (%)
Leptin (ng/mL)	Puerarin (μ M)		
0	0	0 ^a	0
	5	28,85 ^{ab}	0
	25	21,09 ^{ab}	0
	200	24,51 ^{ab}	0
	525	16,66 ^{ab}	0
25	0	27,56 ^{ab}	0
	5	34,69 ^b	0
	25	30,89 ^{ab}	0
	200	24,88 ^{ab}	9,24
	525	2,76 ^{ab}	12,95

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan berbeda nyata berdasarkan hasil uji Tukey HSD α 0,05

Pada perlakuan dengan pemberian leptin, jumlah sel menurun sebanyak 27,56 %. Hasil uji Tukey menunjukkan bahwa leptin tidak berpengaruh signifikan ($p > 0,05$) terhadap penurunan jumlah sel pada perlakuan yang diinduksi leptin. Pada Gambar 4.2 diketahui bahwa pada perlakuan dengan pemberian leptin cenderung menyebabkan jumlah sel menurun walaupun secara statistik tidak berbeda nyata yaitu sebanyak 27,56 % (dengan kata lain pada perlakuan dengan pemberian leptin terdapat sel endotel yang mati yaitu sebanyak 27,56 %).

Pada perlakuan yang diberi puerarin 5 ; 25 ; 200 dan 525 μ M masing-masing secara berurutan menyebabkan penurunan jumlah sel endotel sebanyak 28,85 ; 21,09 ; 24,51 dan 16,66 %. Pada Gambar 4.2 diketahui bahwa induksi puerarin 5 ; 25 ; 200 dan 525 μ M cenderung menyebabkan penurunan jumlah sel endotel. Uji lanjut Tukey menunjukkan bahwa puerarin 5 ; 25 ; 200 dan 525 μ M tidak berpengaruh signifikan ($p > 0,05$) terhadap penurunan jumlah sel pada kultur sel endotel yang diinduksi puerarin tanpa leptin.



Gambar 4.2 Hubungan antara konsentrasi puerarin pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin dan non-leptin dengan penurunan jumlah sel

Penurunan jumlah sel pada kultur HUVECs yang diinduksi leptin dan puerarin 5 μM adalah 34,69 %. Sementara pada perlakuan dengan leptin dan puerarin 25 ; 200 dan 525 μM , masing-masing secara berurutan adalah sebanyak 30,89 ; 24,88 dan 2,76 %. Pada Gambar 4.2 diketahui bahwa penurunan jumlah sel pada perlakuan yang diinduksi leptin dan puerarin 5 μM meningkat dibandingkan dengan perlakuan yang diberi leptin, dan pada perlakuan dengan pemberian leptin dan puerarin 25 μM hingga konsentrasi 525 μM cenderung menurun daripada perlakuan yang diberi leptin dan puerarin 5 μM . Uji lanjut *Tukey* menunjukkan bahwa penurunan jumlah sel pada perlakuan dengan pemberian leptin dan puerarin 5 μM berpengaruh signifikan ($p < 0,05$) terhadap perlakuan tanpa induksi leptin dan puerarin, dan tidak berpengaruh signifikan ($p > 0,05$) terhadap perlakuan yang diinduksi leptin. Dengan kata lain pemberian puerarin 5 μM pada perlakuan yang diinduksi leptin juga dapat menyebabkan penurunan jumlah sel (terjadi kematian sel). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian puerarin dengan konsentrasi 5 μM belum mampu menghambat penurunan jumlah sel. Sedangkan pemberian leptin dan puerarin 25 μM hingga konsentrasi 525 μM jumlah sel cenderung menurun dibandingkan perlakuan dengan pemberian leptin dan puerarin 5 μM walaupun tidak berpengaruh signifikan ($p > 0,05$). Dengan demikian penurunan jumlah sel baru

dapat dihambat dengan pemberian puerarin 25 μM dan diatasnya (sampai 525 μM).

Pada perlakuan dengan pemberian leptin dan puerarin dengan konsentrasi 200 dan 525 μM , selain cenderung menyebabkan jumlah sel menurun walaupun tidak berbeda nyata terhadap perlakuan yang diinduksi leptin dan puerarin 5 μM , juga terdapat penambahan jumlah sel yaitu sebanyak 9,24 % dan 12,95 %. Dengan demikian, pada perlakuan dengan pemberian leptin dan puerarin 200 μM walaupun terdapat penurunan jumlah sel yang tinggi, juga merupakan konsentrasi awal adanya penambahan jumlah sel yaitu sebanyak 9,24 %. Hal ini menunjukkan bahwa puerarin dengan konsentrasi 200 μM merupakan konsentrasi awal dalam menghambat penurunan jumlah sel yang diketahui dengan adanya survival sel yaitu sebanyak 9,24 %.

Penelitian ini mengkaji pengaruh puerarin terhadap jumlah sel endotel yang mengarah pada kematian sel akibat induksi leptin dengan mengacu pada efek kerja puerarin dalam menurunkan kematian sel endotel. Hal ini dimungkinkan peranan puerarin sebagai salah satu senyawa antioksidan yang dapat mencegah kerusakan sel endotel baik fungsi maupun strukturnya. Untuk mencegah kerusakan sel tersebut, puerarin (antioksidan) dapat menangkap ROS yang bertindak sebagai oksidan akibat induksi leptin secara langsung. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa induksi leptin 25 ng/mL selama 6 jam pada kultur HUVECs cenderung menyebabkan jumlah sel menurun (terjadi kematian sel) dibandingkan dengan perlakuan tanpa induksi leptin dan puerarin. Hasil penelitian Bouloumié dkk (1999) menyatakan bahwa leptin dengan konsentrasi 1-100 ng/mL diketahui mampu meningkatkan akumulasi ROS intraseluler yang dapat mengakibatkan kematian sel, melalui mekanisme yaitu leptin berikatan dengan reseptor leptin (Ob-Rb) pada membran plasma, kemudian leptin mengaktifkan AMPK yang merupakan enzim *fuel sensing* yang akan teraktivasi apabila terjadi peningkatan rasio AMP/ATP. Fosforilasi AMPK mengaktifkan fosforilasi ACC (*Acetyl-CoA Carboxylase*) dan kemudian mengaktifasi Acetyl-CoA. Acetyl-CoA selanjutnya menghambat sintesis *Malonyl-CoA*, mengaktifkan CPT 1 (*Carnitine Palmitoyltransferase* 1 yang merupakan enzim kunci dalam oksidasi asam lemak). Hal ini menyebabkan peningkatan oksidasi asam lemak di mitokondria sehingga meningkatkan produksi ROS berupa radikal mitokondrial,

akibatnya terjadi kondisi stress oksidatif (Minokoshi dan Khan, 2003), dan didukung oleh Lum dan Roebuck (2001), akumulasi ROS pada sel endotel sebagai akibat dari induksi leptin tersebut mengakibatkan terjadinya kondisi stress oksidatif, yang akhirnya dapat menyebabkan kematian sel (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Pada penelitian ini, pemberian puerarin 5 μM pada perlakuan dengan induksi leptin dapat menyebabkan penurunan jumlah sel tertinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian puerarin 5 μM belum mampu menghambat penurunan jumlah sel pada perlakuan yang diberi leptin. Hal ini diduga karena terjadi kematian sel akibat induksi leptin, sehingga puerarin dengan konsentrasi tersebut belum mampu menghambat kematian sel akibat induksi leptin tersebut. Sedangkan pemberian puerarin 200 μM pada perlakuan yang diberi leptin merupakan konsentrasi awal dalam membantu survival sel yang diketahui dengan adanya penambahan jumlah sel yaitu sebanyak 9,24 % walaupun pada perlakuan tersebut juga cenderung menyebabkan penurunan jumlah sel yang tinggi yaitu 24,88 % dibandingkan dengan perlakuan yang diberi leptin dan puerarin 525 μM . Menurut Nijveldt dkk (2001), mekanisme puerarin (antioksidan) dalam menghambat kematian sel adalah melalui penangkapan ROS (oksidan) akibat induksi leptin secara langsung dengan cara : ketika isoflavon yang berperan sebagai antioksidan berinteraksi dengan senyawa oksidan, maka senyawa isoflavon memberikan satu gugus H kepada senyawa oksidan. Sehingga seketika itu juga, senyawa isoflavon berubah menjadi radikal isoflavon, sementara senyawa oksidan menjadi senyawa yang stabil. Meskipun isoflavon berubah menjadi senyawa radikal, namun senyawa tersebut tidak memiliki potensi untuk melakukan propagasi. Radikal tersebut akan di non-aktifkan oleh senyawa radikal lain, sehingga kembali menjadi senyawa stabil.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Pemberian puerarin 200 μM cenderung menurunkan jumlah sel sebanyak 24,88 % dan meningkatkan jumlah sel sebanyak 9,24 % pada kultur HUVECs yang diinduksi leptin 25 ng/mL walaupun tidak berpengaruh secara signifikan.

5.2 Saran

Perlu dilakukan perhitungan jumlah sel endotel pada setiap well sebelum dan sesudah pemberian leptin dan puerarin. Selain itu, perlu dilakukan karakterisasi kematian sel baik pada apoptosis maupun pada nekrosis.



DAFTAR PUSTAKA

- Artwohl M., M. Roden., H. Hölzenbein., A. Freudenthaler., W. Waldhäusl dan S. M. Baumgartner-Parzer. 2002. Modulation by Leptin of Proliferation and Apoptosis in Vascular Endothelial Cells. *International Journal of Obesity*. 26 : 577-580
- Baratawidjaja, K. G. 2006. Imunologi Dasar. Edisi Ke Tujuh. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Bevelander, G. dan J. A. Ramaley. 1998. Dasar-dasar Histologi. Alih bahasa : Dr. Ir. Wisnu Gunarso. Erlangga. Jakarta
- Bezvenyuk, Z. 2001. Multiple Pathways of DNA Disintegration During Neuronal Apoptosis. *Department of Neuroscience and Neurology. Series of Reports*, No 56. 1-59
- Bouloumié A., T. Marumo., M. Lafontan dan R. Busse. 1999. Leptin Induces Oxidative Stress in Human Endothelial Cells. *The FASEB Journal*. Vol. 13 : 1231-1238
- Bruno, A., S. Conus., I. Schmid dan H. Simon. 2005. Apoptotic Pathway Are Inhibit by Leptin Receptor Activation in Neutrophils. *The Journal of Immunology*. 8090-8096
- Burgess, G. W. 1995. Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. Penerjemah : Dr. Wayan A. Artama. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Cocco, R. E. dan D. Ucker. 2001. Distinct Modes of Macrophage Recognition for Apoptosis and Necrotic Cell Are Not Specified Exclusively by Phosphatidylserine Exposure. *Mol Biol Cell*. 12 (4) : 837-44
- Cooper, G. M. 2000. The Cell A Molecular Approach. Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Massachusett

- Darzynkiewicz, Z., L. Xun., G. Jianping., H. Shinsuke dan T. Frank. 1995. Analysis of Cell Death by Flowcytometry. Dalam G. P. Studzinski (Ed.). *Cell Growth and Apoptosis*. Oxford University Press. New York
- Fantuzzi, G. dan R. Faggioni. 2000. Leptin In The Regulation of Immunity, Inflammation, and Hematopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology*. 68 : 437-446
- Fujita, Y. M. Murakami., Y. Ogawa., H. Masuzaki., M. Tanaka., S. Ozaki., K. Nakao dan T. Mimori. 2002. Leptin Inhibit Stress-Induced Apoptosis of T Lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. 128 : 21-26
- Fuller, G. M. dan D. Shields. 1998. Molecular Basic of Medical Cell Biology. A Simon and Schuster Company. United State of America
- Garrindo, C., S. Gurbuxuni., L. Ravagnan dan Krorner. 2001. Heat Shock Protein : Endogenous Modulators of Apoptosis Cell Death. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 286 : 433-442
- Gullicksen, P. S., M. A. Della-Fera dan C. A. Balle. 2003. Leptin-Induced Adipose Apoptosis : Implication for Body Weight Regulation. *Apoptosis*. 8 : 327-335
- Halliwell, B. dan J. M. C. Gutteridge. 1999. Free Radicals In Biology and Medicine. Third edition. Oxford University Press Inc. New York
- Halliwell, B. dan J. M. C. Gutteridge. 1996. Antioxidant In Nutrition, Health and Disease. Oxford University Press Inc. New York
- Hyene, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid II. Diterjemahkan oleh : Badan Litbang Kehutanan. Jakarta
- Khotimah, H. 2003. Keterkaitan Pengaruh Pemberian Vitamin E dan Vitamin C Terhadap Bioavailabilitas *Endothelial-Derived*

Nitric Oxide (EDNO), *Malondealdehyde* (MDA) dan Kepadatan Sel Endotel Kultur *Human Umbillicus Vein Endothelial Cells* (HUEVCs) Kondisi Glukosa Tinggi. Tesis Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang.

- Knudson, J. D., U. D. Dincer., C. Zhang., Albert N. S, Jr., R. Hoshida., Andrea Picchi., M. Focardi., G. M. Dick dan Jonathan D. Tune. 2005. Leptin Receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial dysfunction. *Am J. Physiol.* 289 : H48-H56.
- Kroemer, G. dan J. C. Reed. 2002. Mitochondrial Control of Cell Death. *Nat. Med.* 6 : 513-519
- Lawton, W. 2006. Leptin. Brown University 401-863-1862. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/bodyweight/leptin.html>. Tanggal akses 30 September 2006.
- Lowe, S. W. dan A. W. Lin. 2000. Apoptosis in Cancer. *Carcinogenesis.* 21 (3) : 485-495
- Lu, H. dan C. Li. 2000. Leptin : A Multifunctional Hormone. *Cell Research.* 10 : 81-92
- Lum, H. dan K. A. Roebuck. 2001. Oxidant Stress and Endothelial Cell dysfunction. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 280 : C719-C741.
- Maffei, M., J. L. Halaas., dan E. Ravussin. 1995. Leptin Level in Human and Rodent : Measurement of Plasma Leptin and ob RNA in Obese and Weight-Reduced Subjects. *Nature Med.* 1 : 1155-1161
- Mayes, P. A. 1993. Structure and Function of The Lipid-Soluble Vitamins. Dalam Murray K. M., D. X. Granner., P. A. Mayes., dan V. W. Rodwell. *Harpers Biochemistry.* 23rd Edition. Connecticut : Appleton dan Lange : 5925

- Med-Owl. 2007. Kudzu. <http://www.med-owl.com/.../tiki-index.php?page=Kudzu>. Tanggal akses 5 Juli 2007
- Meezan, E., E. M. Meezan, K. Jones, R. Moore, S. Barnes, dan J. K. Prasain. 2005. Contrasting Effects of Puerarin and Daidzin on Glucose Homeostasis in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 53, No. 22 : 8760-8767
- Minokoshi, Y. dan 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. 196-201
- Mitchell, R. N. dan R. S. Cotran. 1997. Cell Injury, Death and Adaptation. In : Kumar, V., R. S. Cotran, dan S. L. Rabbin (eds). In *Basic Pathology*. W. B. Saunders. Philadelphia. 4-16
- Nijveldt, R. J., E. Van Nood., D. E. C. Van Hoorn., P. G. Boelens., K. Van Norren., dan P. A. M. Van Leeuwen. 2001. Flavonoid : A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Application. *The American Journal of Clinical Nutrition. Am J Clin Nutr.* 74 : 418-25
- Pallan, S. 2007. Effects and Mechanisms of Action of Leptin on Cardiomyocytes. <http://www.jyi.org/re.php?id=808>. Tanggal Akses 27 Juli 2007
- Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63 : 1035-1042
- Pkukmweb. 2008. Apoptosis. <http://www.pkukmweb.ukm.my/~danial/Apoptosis2.html>. Tanggal akses 08 Februari 2008
- Quehenberger, P., M. Exner., R. Sunder-Plassmann., K. Ruzicka., C. Bieglmayer., G. Endler., C. Muellner., W. Speiser dan O. Wagner. 2002. Leptin Induces Endothelin-1 in Endothelial Cell In Vitro. *Circulation Research.* 90 : 711-718

- Rahmouni K. dan W. G. Haynes. 2004. Leptin and the Cardiovascular System. <http://www.rphr.endojournals.org>. Tanggal akses 4 Juli 2007
- Rantam, F. A. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya
- Roche Applied Science. 2005. Cellular DNA Fragmentation ELISA. Cat. No. 1 585 045. Instruction Manual. Version August 2005
- Rossi, D. dan G. Gaidano. 2003. Messenger of Cell death : Apoptosis Signaling in Health and Disease. *The Journal of Hematology*. 88 : 212-218
- Rudijanto, A. 1999. Peran Endotel Pada Kehidupan. Majalah Kedokteran. Unibraw 3/XV/Des. Malang
- Rouet-Benzineb, P., T. Aparicio., S. Guilmeau., C. Pouzet., V. Descatoire§., M. Buyse dan A. Bado. 2004. Leptin Counteracts Sodium Butyrate-Induced Apoptosis In Human Colon Cancer HT-29 Cell via NFkappa-B Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 1-39
- Salvesen, G. S. 2002. Caspase : Opening the Boxes and Interpreting the Arrow. The Burnham Institute. La Jolla
- Sauriasari, R. 2007. Mengenal dan Menangkal Radikal Bebas. <http://www.beritaiptek.com/zberita-beritaiptek>. Tanggal akses 10 Agustus 2007
- Sweeney, G. 2002. Leptin Signaling. *Cellular Signalling*. 14 : 655-663
- Tsujimoto, Y. 1997. Apoptosis and Necrosis: Intracellular ATP Level as A Determinant for Cell Death Modes. *Cell Death and Differentiation*. 4 : 429-434

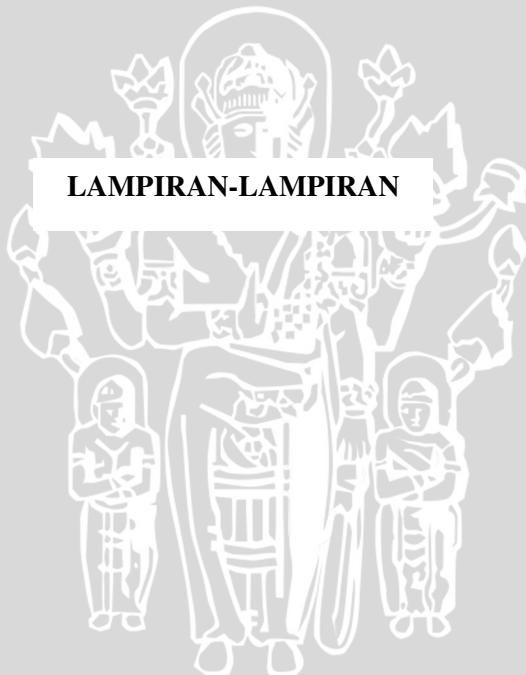
- Utsumi, H., R. Iwakiri, B. Wu., T. Fujise., H. Sakata., R. Shimoda., S. Amemori., S. Tsunada., A. Ootani dan K. Fujimoto. 2003. Intracerebroventricular Administration of Leptin-Induced Apoptosis in the Rat Small Intestinal Mucosa. *Society for Experimental Biology and Medicine*. 1239-1244
- Wagoner, B., D. B. Hausman dan R. B. S. Harris. 2006. Direct and Indirect Effect of Leptin on Preadipocyte Proliferation and Differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 290 : R1557-R1564
- Widodo, M. A. 1995. Seminar Sehari Free Radical Update : Peranannya dalam Patogenesis Penyakit dan Penuaan. FKUB. Malang
- Winarsi, H. 2005. Isoflavon. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- XiaoXiang Z., X. MingEn., X. ShangZhi., S. YongHong., O. Yang dan G. Chen. 2005. Abstract of The Study of Anti-metabolic Syndrome Effect of Puerarin In Vitro. *Life Sciences*. 4 ; 77 (25) : 3183-3196
- Yamagishi, S., D. Edelstein., X. Du., Y. Kaneda., M. Guzman dan 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. *The Journal of Biological Chemistry*. 1-24
- Young, I. S. dan J. V. Woodside. 2001. Antioxidants in Health and Disease. *Journal Clin Pathol*. 54 : 176-186

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN-LAMPIRAN



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 1. Skema Isolasi dan Kultur HUVECs

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
- 7 ml kolagenase dimasukkan pada *canulle* yang dipasang
- dihangatkan dengan cara didekap dengan kedua tangan dan didekatkan dengan bunsen selama 10 menit
- kolagenase yang telah mengandung endotel dikeluarkan dan dimasukkan dalam tabung sentrifus steril
- dibilas dengan 10 ml larutan PBSA lalu ditambahkan ke tabung sentrifus yang berisi larutan kolagenase
- disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit
- pelet ditambah *serum free media*
- disentrifugasi kembali dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit

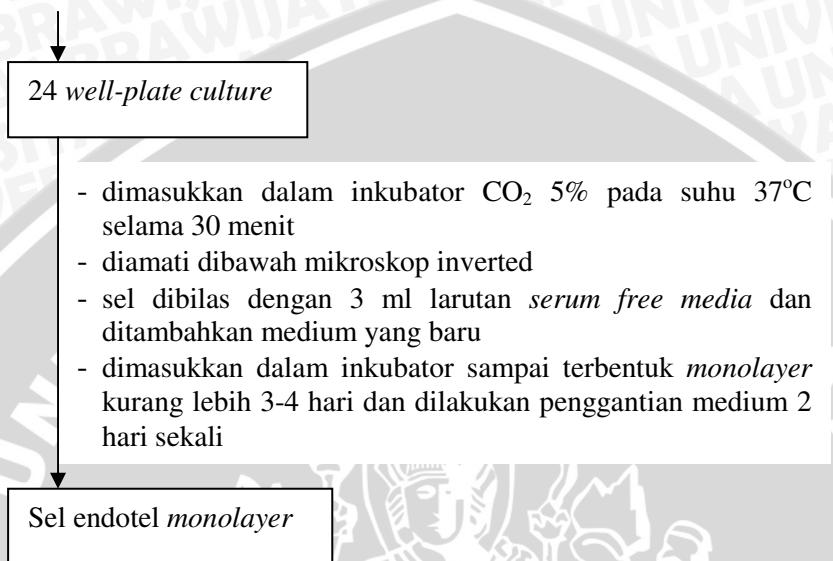
Pelet

- diresuspensi dengan medium kultur

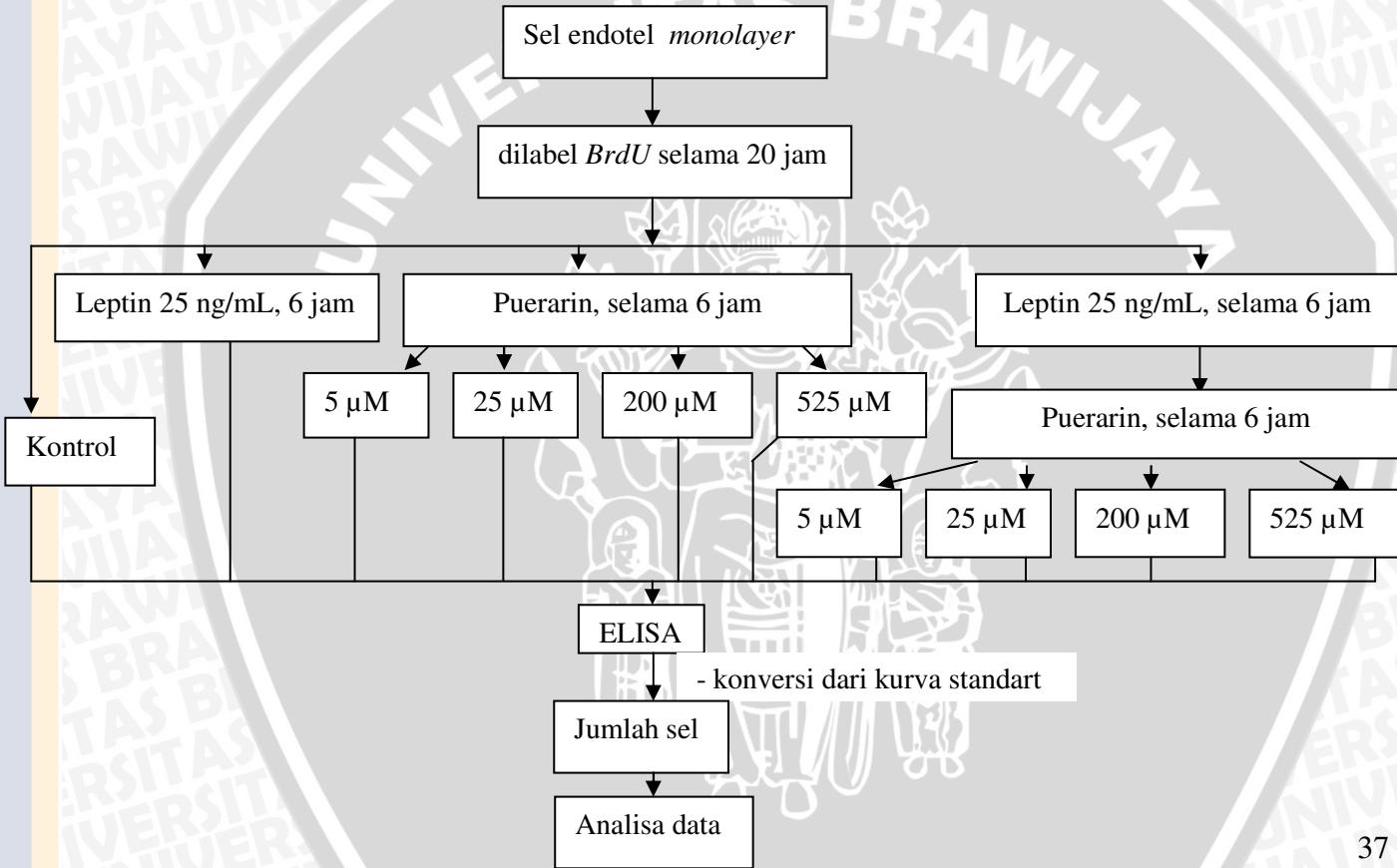
Suspensi sel endotel

- ditransfer ke 24 *well-plate culture* yang sebelumnya telah dilapisi gelatin 0,2%

Lanjutan Lampiran 1. Skema Isolasi dan Kultur HUVECs



Lampiran 2. Skema Kerja Penelitian



Lampiran 3. Pelabelan Sel, Perlakuan Induksi Leptin dan Puerarin pada HUVECs

Kultur sel endotel

- dicuci dengan *serum free media*
- ditambah medium kultur yang mengandung *BrdU* 10 μM
- diinkubasi dalam inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C selama 20 jam
- dicuci dengan *serum free media*
- diinduksi leptin 0 ng/mL (kontrol) dan 25 ng/mL
- diinkubasi dalam inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C selama 6 jam
- diinduksi puerarin hasil ekstraksi dengan konsentrasi 0, 5, 25, 200 dan 525 μM
- diinkubasi dalam inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C selama 6 jam

Sel

- ditambah 200 μl 1x *incubation solution (solution 5)* per well
- diinkubasi pada suhu 15-25°C selama 30 menit
- disentrifugasi 250 x g selama 10 menit
- diambil 100 μl supernatan

ELISA

Lampiran 4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)



Lanjutan Lampiran 4. ELISA

Cuci dengan 250 µl *washing solution (solution 4)* 3x, @ 3 menit

Cucian terakhir dibiarkan

MP dibiarkan terbuka (tidak ditutup)

diletakkan pada beaker 500 ml yang telah berisi 300 ml air pada *microwave oven*

Irradiasi 5 menit, 500 W

Dinginkan kira-kira 10 menit pada suhu -20°C

Dibuang dengan cara aspirasi

Anti-BrdU-POD conjugate solution (solution 6) @ 100 µl

MP ditutup dengan *adhesive cover foil*

Inkubasi pada suhu 2-8°C, *overnight*

Cuci dengan 250 µl *washing solution (solution 4)* 3x, @ 3 menit

Pipet *substrate solution* @ 100 µl

Inkubasi dalam keadaan gelap pada MP shaker sampai terjadi perubahan warna

Lanjutan Lampiran 4. ELISA

↓
Stop solution (solution 8) @ 25 µl, 5 menit

↓
Baca dengan ELISA reader λ 450 nm



Lampiran 5. Komposisi Kit Untuk Pengukuran ELISA

Tabel L 5.1 Isi Kit dan Preparasi Larutan

Tutup Botol	Label	Isi	Kerja Larutan	Rekonstitusi/Preparasi Kerja Larutan	Stabilitas Kerja Larutan	Kegunaan
1 Putih	<i>Anti-DNA antibody</i>	Antibodi monoklonal dari tikus (<i>Clone MCA-33</i>)	<i>Solution 1</i>	1 mL <i>deionized water</i> selama 10 menit pada 15-25°C (suhu ruang), campur dengan sempurna	Stabil disimpan pada suhu 2-8°C/6 bulan	<i>Solution 3</i>
2 Merah	<i>Anti-BrdU peroxidase</i>	Antibodi monoklonal dari tikus (<i>Clone BMG 6H8</i> , Fab-fragment), dikonjugasikan dengan peroxidase	<i>Solution 2</i>	1 mL <i>deionized water</i> selama 10 menit pada suhu ruang, campur dengan sempurna	Stabil disimpan pada suhu 2-8°C/6 bulan	<i>Solution 6</i>
3 Putih	<i>Coating buffer, 10x</i>	Larutan 6 ml		Untuk 1x : 1 mL 10x <i>coating buffer</i> dilarutkan dengan 9 mL <i>deionized water</i>	Tidak stabil, segera disiapkan sebelum digunakan	<i>Solution 3</i>
			<i>Solution 3</i>	Sebelum digunakan, 0,2 mL <i>anti-DNA antibody</i> dilarutkan dengan 9,8 ml 1x <i>coating buffer</i>	Tidak stabil, segera disiapkan sebelum digunakan	Untuk prosedur <i>coating MP</i>

Lanjutan Lampiran 5. Komposisi Kit Untuk Pengukuran ELISA

4 Hijau	<i>Washing buffer, 10x</i>	- 2 botol @ 100 ml - EDTA, Tween 20 dan preservatif	<i>Solution 4</i>	<i>Washing buffer 10x</i> (sesuai dengan suhu ruang) Untuk 1x : 40 mL 10x washing buffer dilarutkan dengan 360 <i>deionized water</i> , campur dengan sempurna	Disimpan pada suhu 2-8°C/2 minggu	- Untuk prosedur <i>coating MP</i> - Untuk prosedur ELISA <i>Solution 6</i>
			<i>Solution 6</i>	0,2 mL <i>anti-BrdU-Peroxidase antibody (solution 2)</i> dilarutkan dengan 9,8 mL 1x <i>washing buffer (solution 4)</i>	Tidak stabil, segera disiapkan sebelum digunakan	- Untuk prosedur ELISA
5 Merah	<i>Incubation buffer, 2x</i>	- Larutan 125 ml BSA, EDTA, Tween 20, dan preservatif	<i>Solution 5</i>	<i>Incubation buffer 10x</i> (sesuai dengan suhu ruang) Untuk 1x : 20 mL 2x <i>incubation buffer</i> dilarutkan dengan 20 mL <i>deionized water</i> , campur dengan sempurna	Disimpan pada suhu 2-8°C/2 minggu	- Untuk prosedur <i>coating MP</i> - Untuk prosedur karakterisasi kematian sel - Untuk kuantifikasi jumlah sel

Lanjutan Lampiran 5. Komposisi Kit Untuk Pengukuran ELISA

6 Merah	<i>Substrate solution</i>	- Larutan TMB 55 ml - Siap pakai		Larutan stok tidak dilarutkan		- Untuk prosedur ELISA
7 Merah	<i>BrdU labelling reagent, 1000x</i>	- 1 ml 10 mM 5'-bromo-2'deoxy-uridine dalam PBS, pH 7,4, steril	<i>Solution 7</i>	Untuk 1 mM : 0,9 mL 1000x <i>BrdU labeling reagent</i> dilarutkan dengan 8,1 mL PBS steril atau medium kultur	- Disimpan pada suhu 2-8°C/3 bulan, atau Stabil disimpan pada suhu -15 sampai -20°C/6 bulan	- Untuk prosedur pelabelan sel
8	<i>Adhesive cover foils</i>	10 sheet				

Keterangan :

- Untuk preparasi solution 8 (stop solution) yaitu dengan menambahkan 560 μ L H₂SO₄ (95-97%) ke dalam 8 mL *deionized water*.

Lampiran 6. Media dan Bahan Kultur HUVECs

1. Medium Transport (*cord solution*)

- *Hank's Balance Salt Solution (HBSS)* 10 mL
- *Bicarbonate-phenol red* 3,75 mL
- Gentamicin 1,25 mL
- *Deionized water* 90 mL
- pH 7,4
- Sterilisasi dengan filter 0,2 μm
- disimpan dalam refrigerator suhu 4°C /6 bulan

2. Serum Free Medium

- Medium M199 20 mL
- Penisilin-streptomycin 1,25 mL
- Natrium bikarbonat 5 mL
- L-glutamin 1,25 mL
- *Deionized water* 80 mL
- Sterilisasi dengan filter 0,2 μm
- disimpan dalam refrigerator suhu 4°C /6 bulan

3. Medium Kultur

- *Serum free medium* 9 mL
- *Fetal bovine serum* 1 mL

4. Larutan Kolagenase Tipe II

- *Collagenase* 0,5 mg/cc
- Sterilisasi dengan filter 0,2 μm

5. Larutan Natrium Bicarbonat-Phenol Red

- *Sodium hydrogen bicarbonate* 4,4 g
- *Phenol red* 3 mg
- *Deionized water* 100 mL
- pH 7,6
- Sterilisasi dengan filter 0,2 μm
- disimpan dalam refrigerator suhu -20°C /6 bulan

Lanjutan Lampiran 6. Media dan Bahan Kultur HUVECs

6. Larutan Gentamicin

- Gentamicin 75 mg
- *Deionized water* 10 mL
- Sterilisasi dengan filter 0,2 µm
- disimpan dalam refrigerator suhu -20°C /6 bulan

7. Larutan Penisilin-Streptomycin

- Penisilin 23,95 mg
- Streptomycin 52,5 mg
- *Deionized water* 10 mL
- Sterilisasi dengan filter 0,2 µm
- disimpan pada suhu -20 °C /6 bulan

8. Larutan L-Glutamin

- *L-glutamin* 0,292 g
- *Deionized water* 10 mL
- Sterilisasi dengan filter 0,2 µm
- disimpan pada suhu -20 °C /6 bulan

Lampiran 7. Hasil Uji Statistik Penurunan Jumlah Sel

Oneway

Descriptives

Penurunan Jumlah Sel

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
LOP0	3	.00	.000	.000	.00	.00	0	0
LOP5	3	28.85	9.528	5.501	5.18	52.52	20	39
LOP25	3	21.09	15.129	8.735	-16.49	58.67	4	34
LOP200	3	24.51	14.326	8.271	-11.08	60.09	11	40
LOP525	3	16.66	4.168	2.407	6.30	27.01	14	21
L25P0	3	27.56	7.246	4.184	9.56	45.56	19	32
L25P5	3	34.69	7.180	4.145	16.86	52.53	27	41
L25P25	3	30.89	9.429	5.444	7.46	54.31	21	40
L25P200	3	24.88	21.626	12.48 6	-28.84	78.60	0	39
L25P525	3	2.76	4.786	2.763	-9.13	14.65	0	8
Total	30	21.19	14.479	2.644	15.78	26.60	0	41

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Penurunan Jumlah Sel

Perlakuan Leptin	Perlakuan Puerarin	Mean	Std. Deviation	N
0	0	.00	.000	3
	5	28.85	9.528	3
	25	21.09	15.129	3
	200	24.51	14.326	3
	525	16.66	4.168	3
	Total	18.22	13.550	15
25	0	27.56	7.246	3
	5	34.69	7.180	3
	25	30.89	9.429	3
	200	24.88	21.626	3
	525	2.76	4.786	3
	Total	24.16	15.225	15
Total	0	13.78	15.774	6
	5	31.77	8.195	6
	25	25.99	12.487	6
	200	24.69	16.408	6
	525	9.71	8.604	6
	Total	21.19	14.479	30

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Penurunan Jumlah Sel

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3628.086(a)	9	403.121	3.288	.013
Intercept	13468.788	1	13468.788	109.873	.000
Leptin	264.152	1	264.152	2.155	.158
Puerarin	2004.165	4	501.041	4.087	.014
Leptin * Puerarin	1359.769	4	339.942	2.773	.055
Error	2451.705	20	122.585		
Total	19548.579	30			
Corrected Total	6079.792	29			

a R Squared = .597 (Adjusted R Squared = .415)

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Penurunan Jumlah Sel
Tukey HSD

(I) Interaksi Leptin Puerarin	(J) Interaksi Leptin Puerarin	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
L0P0	L0P5	-28.853	9.040	.099	-60.86	3.16
	L0P25	-21.090	9.040	.411	-53.10	10.92
	L0P200	-24.507	9.040	.234	-56.52	7.50
	L0P525	-16.657	9.040	.703	-48.67	15.35
	L25P0	-27.557	9.040	.130	-59.57	4.45
	L25P5	-34.693(*)	9.040	.027	-66.70	-2.68
	L25P25	-30.887	9.040	.064	-62.90	1.12
	L25P200	-24.880	9.040	.218	-56.89	7.13
	L25P525	-2.760	9.040	1.000	-34.77	29.25
L0P5	L0P0	28.853	9.040	.099	-3.16	60.86
	L0P25	7.763	9.040	.996	-24.25	39.77
	L0P200	4.347	9.040	1.000	-27.66	36.36
	L0P525	12.197	9.040	.929	-19.81	44.21
	L25P0	1.297	9.040	1.000	-30.71	33.31
	L25P5	-5.840	9.040	1.000	-37.85	26.17
	L25P25	-2.033	9.040	1.000	-34.04	29.98
	L25P200	3.973	9.040	1.000	-28.04	35.98
	L25P525	26.093	9.040	.174	-5.92	58.10
L0P25	L0P0	21.090	9.040	.411	-10.92	53.10
	L0P5	-7.763	9.040	.996	-39.77	24.25
	L0P200	-3.417	9.040	1.000	-35.43	28.59
	L0P525	4.433	9.040	1.000	-27.58	36.44
	L25P0	-6.467	9.040	.999	-38.48	25.54
	L25P5	-13.603	9.040	.875	-45.61	18.41
	L25P25	-9.797	9.040	.981	-41.81	22.21
	L25P200	-3.790	9.040	1.000	-35.80	28.22
	L25P525	18.330	9.040	.591	-13.68	50.34
L0P200	L0P0	24.507	9.040	.234	-7.50	56.52
	L0P5	-4.347	9.040	1.000	-36.36	27.66

	L0P25	3.417	9.040	1.000	-28.59	35.43
	L0P525	7.850	9.040	.996	-24.16	39.86
	L25P0	-3.050	9.040	1.000	-35.06	28.96
	L25P5	-10.187	9.040	.976	-42.20	21.82
	L25P25	-6.380	9.040	.999	-38.39	25.63
	L25P200	-.373	9.040	1.000	-32.38	31.64
	L25P525	21.747	9.040	.372	-10.26	53.76
L0P525	L0P0	16.657	9.040	.703	-15.35	48.67
	L0P5	-12.197	9.040	.929	-44.21	19.81
	L0P25	-4.433	9.040	1.000	-36.44	27.58
	L0P200	-7.850	9.040	.996	-39.86	24.16
	L25P0	-10.900	9.040	.963	-42.91	21.11
	L25P5	-18.037	9.040	.611	-50.05	13.97
	L25P25	-14.230	9.040	.845	-46.24	17.78
	L25P200	-8.223	9.040	.994	-40.23	23.79
	L25P525	13.897	9.040	.862	-18.11	45.91
L25P0	L0P0	27.557	9.040	.130	-4.45	59.57
	L0P5	-1.297	9.040	1.000	-33.31	30.71
	L0P25	6.467	9.040	.999	-25.54	38.48
	L0P200	3.050	9.040	1.000	-28.96	35.06
	L0P525	10.900	9.040	.963	-21.11	42.91
	L25P5	-7.137	9.040	.998	-39.15	24.87
	L25P25	-3.330	9.040	1.000	-35.34	28.68
	L25P200	2.677	9.040	1.000	-29.33	34.69
	L25P525	24.797	9.040	.222	-7.21	56.81
L25P5	L0P0	34.693(*)	9.040	.027	2.68	66.70
	L0P5	5.840	9.040	1.000	-26.17	37.85
	L0P25	13.603	9.040	.875	-18.41	45.61
	L0P200	10.187	9.040	.976	-21.82	42.20
	L0P525	18.037	9.040	.611	-13.97	50.05
	L25P0	7.137	9.040	.998	-24.87	39.15
	L25P25	3.807	9.040	1.000	-28.20	35.82
	L25P200	9.813	9.040	.981	-22.20	41.82
	L25P525	31.933	9.040	.051	-.08	63.94
L25P25	L0P0	30.887	9.040	.064	-1.12	62.90
	L0P5	2.033	9.040	1.000	-29.98	34.04
	L0P25	9.797	9.040	.981	-22.21	41.81

	LOP200	6.380	9.040	.999	-25.63	38.39
	LOP525	14.230	9.040	.845	-17.78	46.24
	L25P0	3.330	9.040	1.000	-28.68	35.34
	L25P5	-3.807	9.040	1.000	-35.82	28.20
	L25P200	6.007	9.040	.999	-26.00	38.02
	L25P525	28.127	9.040	.116	-3.88	60.14
L25P200	LOP0	24.880	9.040	.218	-7.13	56.89
	LOP5	-3.973	9.040	1.000	-35.98	28.04
	LOP25	3.790	9.040	1.000	-28.22	35.80
	LOP200	.373	9.040	1.000	-31.64	32.38
	LOP525	8.223	9.040	.994	-23.79	40.23
	L25P0	-2.677	9.040	1.000	-34.69	29.33
	L25P5	-9.813	9.040	.981	-41.82	22.20
	L25P25	-6.007	9.040	.999	-38.02	26.00
	L25P525	22.120	9.040	.351	-9.89	54.13
L25P525	LOP0	2.760	9.040	1.000	-29.25	34.77
	LOP5	-26.093	9.040	.174	-58.10	5.92
	LOP25	-18.330	9.040	.591	-50.34	13.68
	LOP200	-21.747	9.040	.372	-53.76	10.26
	LOP525	-13.897	9.040	.862	-45.91	18.11
	L25P0	-24.797	9.040	.222	-56.81	7.21
	L25P5	-31.933	9.040	.051	-63.94	.08
	L25P25	-28.127	9.040	.116	-60.14	3.88
	L25P200	-22.120	9.040	.351	-54.13	9.89

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

Homogeneous Subsets

Penurunan Jumlah Sel

Tukey HSD

Interaksi Leptin Puerarin	N	Subset for alpha = .05	
		a	b
L0P0	3	.00	
L25P525	3	2.76	2.76
L0P525	3	16.66	16.66
L0P25	3	21.09	21.09
L0P200	3	24.51	24.51
L25P200	3	24.88	24.88
L25P0	3	27.56	27.56
L0P5	3	28.85	28.85
L25P25	3	30.89	30.89
L25P5	3		34.69
Sig.		.064	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 8. Perhitungan Jumlah Sel

Tabel L 8.1 Perhitungan jumlah sel

Perlakuan	Nilai absorbansi	Jumlah sel/well	Penurunan jumlah sel/well	Rata-rata Penurunan jumlah sel		Rata-rata Penambahan jumlah sel (%)		
				per well	%			
L0P0	1,893	18.345	0	0	0	0		
	1,314	12.555	0					
	1,592	15.335	0					
L0P5	1,289	12.305	3.107	4.447	28,85	0		
	0,998	9.395	6.017					
	1,178	11.195	4.217					
L0P25	1,531	14.725	687	3.250	21,09	0		
	1,075	10.165	5.247					
	1,218	11.595	3.817					
L0P200	1,249	11.905	3.507	3.777	24,51	0		
	0,989	9.305	6.107					
	1,428	13.695	1.717					
L0P525	1,384	13.255	2.157	2.567	16,66	0		
	1,376	13.175	2.237					
	1,269	12.105	3.307					
L25P0	1,304	12.455	2.957	4.247	27,56	0		
	1,112	10.535	4.877					
	1,109	10.505	4.907					
L25P5	0,969	9.105	6.307	5.347	34,69	0		
	1,186	11.275	4.137					
	1,040	9.815	5.597					
L25P25	1,113	10.545	4.867	4.760	30,89	0		
	0,984	9.255	6.157					
	1,274	12.155	3.257					
L25P200	1,053	9.945	5.467	3.835	24,88	9,24		
	0,996	9.375	6.037					
	2,027	19.685	-4.273					
L25P525	1,472	14.135	1.277	426	2,76	12,95		
	1,835	17.765	-2.353	-1.995				
	1,963	19.045	-3.633					

Keterangan :

➤ Penurunan Jumlah Sel

$$1. \text{ L0P0} \longrightarrow \frac{0}{15.412} \times 100\% = 0\%$$

$$2. \text{ L0P5} \longrightarrow \frac{4.447}{15.412} \times 100\% = 28,85\%$$

$$3. \text{ L0P25} \longrightarrow \frac{3.250}{15.412} \times 100\% = 21,09\%$$

$$4. \text{ L0P200} \longrightarrow \frac{3.777}{15.412} \times 100\% = 24,51\%$$

$$5. \text{ L0P525} \longrightarrow \frac{2.567}{15.412} \times 100\% = 16,66\%$$

$$6. \text{ L25P0} \longrightarrow \frac{4.247}{15.412} \times 100\% = 27,56\%$$

$$7. \text{ L25P5} \longrightarrow \frac{5.347}{15.412} \times 100\% = 34,69\%$$

$$8. \text{ L25P25} \longrightarrow \frac{4.760}{15.412} \times 100\% = 30,89\%$$

$$9. \text{ L25P200} \longrightarrow \frac{3.835}{15.412} \times 100\% = 24,88\%$$

$$10. \text{ L25P525} \longrightarrow \frac{426}{15.412} \times 100\% = 2,76\%$$

➤ **Penambahan Jumlah Sel**

$$1. \text{ L25P200} \longrightarrow \frac{-1.424}{15.412} \times 100\% = 9,24\%$$

$$2. \text{ L25P525} \longrightarrow \frac{-1.995}{15.412} \times 100\% = 12,95\%$$