

**Desain Nanopolimerik Kombinasi Eksrak Seledri, Pegagan dan Kumis
Kucing sebagai Immunomodulator melalui Penghambatan Pembentukan
*Advanced Glycation End Product (AGEs)***



Oleh:

apt. Febriana Astuti, M. Farm.

**POLITEKNIK KESEHATAN TNI AU ADISUTJIPTO
YOGYAKARTA
2024**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Desain Nanopolimerik Kombinasi Ekstrak
Seledri, Pegagan dan Kumis Kucing sebagai
Immunomodulator melalui Penghambatan
Pembentukan *Advanced Glycation End
Product* (AGEs)

Jenis Penelitian : deskriptif kuantitatif dengan metode survei

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : apt. Febriana Astuti.,M.Farm

b. NIDN : 0527029005

c. Pangkat : III b

Golongan

d. Jabatan : Lektor

e. Prodi : D3 Farmasi

f. Institusi : Politeknik Kesehatan TNI AU Adisutjipto

g. Bidang Ilmu : Farmasi Klinik

Yogyakarta, 15 Oktober 2024

Mengetahui
Ketua Program Studi D3
Farmasi



apt. Unsa Izzati., M.Farm

Ketua Tim Peneliti



apt. Febriana Astuti.,M.Farm

Menyetujui Penanggung Jawab UPPM
Poltekkes TNI AU Adisutjipto



Marius Agung Sasmita Jati, S.Si.,M.Sc

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	2
DAFTAR ISI.....	1
BAB I PENDAHULUAN.....	2
A. Latar Belakang.....	2
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Penyakit Kardiovaskuler pada pasien diabetes mellitus.....	7
B. <i>Advanced Glycation End-Products</i> (AGEs).....	8
C. Reactive Oxygen Species (ROS)	11
D. Tumor Necrosis Factor (TNF- α).....	12
E. Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)	13
F. Nanopartikel.....	14
G. Seledri (<i>Apium Graveolens</i>).....	16
1. Morfologi Seledri	16
2. Manfaat Tanaman Seledri	17
3. Kandungan Seledri	18
H. Pegagan (<i>Centella asiatica</i> (L.))	19
1. Morfologi Pegagan.....	19
2. Manfaat Pegagan	20
3. Kandungan Pegagan	21
I. Kumis Kucing (<i>Orthosiphon Stamineus</i>)	22
1. Morfologi Tanaman.....	22
2. Manfaat Kumis Kucing.....	23
3. Kandungan Kumis Kucing	23
J. Kerangka Teori	25
BAB III METODE PENELITIAN	26
1. Variabel Bebas.....	28

2.	Variabel Terikat:.....	28
1.	Alat	29
2.	Bahan	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		46
A.	Proses Ekstraksi	46
B.	Hasil Uji Organoleptis Ekstrak Seledri, Kumis kucing dan Pegagan	47
D.	Hasil Uji Kadar Air Ekstrak Seledri, Kumis kucing dan Pegagan	48
E.	Hasil Uji Kadar Abu Ekstrak Seledri, Kumis kucing dan Pegagan ...	49
F.	Skrining Fitokimia Ekstrak Seledri, Kumis Kucing dan Pegagan	50
G.	Karakteristik Formula Optimum.....	53
1.	Ukuran partikel	53
2.	Indeks polidispersitas (PDI)	54
3.	Zeta potensial	54
4.	Morfologi Partikel	55
5.	Analisis FTIR	57
6.	Stabilitas Partikel Nanopolimer Formula Optimum	59
7.	Uji aktivitas Nanopolimerik polih herbal Terhadap Parameter AGEs, GST, Nrf2, NFκB dan TNFα	60
DAFTAR PUSTAKA		73

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit diabetes melitus (DM) merupakan satu penyebab utama kematian di dunia (Yedjou *et al.*, 2023). Organisasi *International diabetes Federation* (IDF) memperkirakan sedikitnya 483 juta orang pada usia 20-79 tahun di dunia menderita diabetes (IDF., 2019). Salah satu komplikasi penyakit DM kronis adalah penyakit kardiovaskular (CVD). Penyakit DM-CVD merupakan penyebab utama peningkatan risiko kematian dini (Ma *et al.*, 2022). CVD yang terkait diabetes melitus tipe 2 seperti hipertensi, dislipidemia, aterosklerosis, gagal jantung, infark miokard dan stroke (Dinesh *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2019). Penyakit DM-CVD menyebabkan terjadinya disfungsi endotel (Janaszak-Jasiecka *et al.*, 2023).

Hiperglikemi pada pasien DM menyebabkan pembentukan *advanced glycation end product* (AGEs) (Bath *et al.*, 2017). AGEs adalah molekul heterogen yang berasal dari produk nonenzim dari reaksi glukosa atau derivatif sakarida lainnya dengan protein atau lipid (Anna Perrone *et al.*, 2020). AGEs dapat memicu terjadinya disfungsi endotel pada pasien DM-CVD dapat diinduksi oleh senyawa (Song *et al.*, 2021). Ikatan AGEs dengan Reseptor AGEs (RAGE) dapat mengaktifkan berbagai jalur sinyal seperti fosfoinositida 3 kinase (PI3k-Akt), mitogen-aktif protein kinase (MAPK). Aktivasi jalur sinyal tersebut memicu aktivasi NADPH oksidase yang menyebabkan pembentukan spesies oksigen reaktif intracellular (ROS) yang memicu terjadinya stress oksidatif. Selain itu peningkatan transkripsi nuklir faktor kappa-B (NF- κ B) yang mengatur ekspresi sitokin (TNF α , IL-1 α , IL-6, MCP-1), faktor pertumbuhan (seperti TNF, IGF-1, IFN- γ) dan molekul adhesi (VCAM-1, ICAM-1). Sehingga ikatan AGEs-RAGE pada pasien DM

menyebabkan kerusakan sel dan memediasi perkembangan penyakit aterosklerosis dan stroke iskemik (Prasad, 2021).

Apigenin merupakan komponen flavonoid dari tanaman seledri. Apigenin terbukti dapat menghambat pembentukan AGEs melalui penghambatan stress oksidatif dan memblokir ikatan AGEs-RAGE. Akibatnya terjadi penghambatan jalur sinyal NF- κ B dan menekan ekspresi molekul ICAM-1 pada disfungsi endotel vascular (Xu Y et al, 2022). Asiatic acid dari tanaman centela asiatica telah terbukti memiliki efek kardioprotektif dan menghambat pembentukan TGF- β 1, TNF- α melalui penekanan ekspresi NF- κ B (Mohd Razali NN *et al*, 2019; Huo L et al, 2016). Sinensetin pada tanaman kumis kucing memiliki aktivitas sebagai imunomodulator, antioksidan, kardioaktif, antidiabetes, antiinflamasi serta agen pelindung syaraf (Ashraf K, 2018; Chung YS et al, 2020). Penggunaan kombinasi ekstrak dapat meningkatkan efektivitas farmakologi melalui efek sinergis, menstimulasi berbagai aktivitas target, mengurangi komponen dosis individu, dan meminimalkan efek samping. Kami bertujuan untuk menyelidiki efek inhibitor sinergis dari tanaman obat yang dipilih (Jeong *et al.*, 2023).

Apigenin, *Asiatic acid* dan *sinensetin* memiliki bioavailabilitas yang rendah oleh karena itu perlu dilakukan metode untuk meningkatkan bioavailabilitas dan bioaktivitas salah satunya menggunakan nanoteknologi (Gunasekaran T *et al*, 2014). Strategi penerapan nanoteknologi pada kombinasi ekstrak penghantaran obat dapat mencapai organ target, meminimalkan resiko efek samping dan meningkatkan

aktivitas (Hesari M *et al*, 2021). Efektivitas nanoformulasi herbal sudah banyak diteliti untuk pencegahan ataupun pengobatan penyakit DM-CVD, namun belum ada sediaan Nano-polimerik kombinasi ekstrak seledri, pegagan dan kumis kucing yang berfokus pada penghambatan pembentukan AGEs secara in-vitro dan in-vivo untuk mencegah perburukan pada penderita penyakit DM-CVD.

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah pengaruh sediaan Nano-polimerik kombinasi ekstrak daun seledri, pegagan dan kumis kucing dalam menghambat produksi ROS secara *in vitro* ?
2. Bagaimanakah pengaruh sediaan Nano-polimerik kombinasi ekstrak daun seledri, pegagan dan kumis kucing dalam menghambat pembentukan AGEs secara *in vitro*?
3. Bagaimanakah pengaruh sediaan Nano-polimerik kombinasi ekstrak daun seledri, pegagan dan kumis kucing dalam menekan ekspresi TNF α secara *in vitro* ?
4. Bagaimanakah pengaruh sediaan Nano-polimerik kombinasi ekstrak daun seledri, pegagan dan kumis kucing dalam menekan ekspresi ICAM-1 secara *in vitro*?

C. Tujuan

1. Diketahui pengaruh sediaan Nano-polimerik kombinasi ekstrak daun seledri, pegagan dan kumis kucing dalam menghambat produksi ROS secara *in vitro* ?

2. Diketahui pengaruh sediaan Nano-polimerik kombinasi ekstrak daun seledri, pegagan dan kumis kucing dalam menghambat pembentukan AGEs secara *in vitro*?
3. Bagaimanakah pengaruh sediaan Nano-polimerik kombinasi ekstrak daun seledri, pegagan dan kumis kucing dalam menekan ekspresi TNF α secara *in vitro*?
4. Bagaimanakah pengaruh sediaan Nano-polimerik kombinasi ekstrak daun seledri, pegagan dan kumis kucing dalam menekan ekspresi ICAM-1 secara *in vitro*?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Penyakit Kardiovaskuler pada pasien diabetes mellitus

Penyakit kardioskular akibat komplikasi pada pasien DM banyak menyebabkan kematian dini. Komplikasi CVD ini dapat mengarah pada stroke yang disebabkan oleh penyumbatan aliran darah ke jantung dan otak. Penggunaan tanaman obat atau *herbal medicine* atau obat herbal terus dikembangkan sebagai pengobatan alternatif pada CVD-DM. Obat herbal mengandung banyak senyawa bioaktif dengan berbagai aktivitas seperti antioksidan, vasorelaksan, antiinflamasi, antiproliferatif, atau diuretik. Obat herbal juga dapat mencegah peralihan fenotipik VSMC, menghambat disfungsi endotel, aktivasi trombosit, peroksidasi lipid, produksi ROS, dan aterogenesis makrofag (Shaito *et al.*, 2020). Berbagai senyawa aktif ditemukan dalam tanaman untuk penyakit kardiovaskular adalah alkaloid, flavonoid, polifenol, sterol dan terpenoid (R. K. Bachheti, L. A. Worku, 2022).

Komplikasi CVD pada pasien DM dapat disebabkan oleh pembentukan dan aktivasi AGEs yang terlibat pada kerusakan sel endotel (Shen *et al.*, 2020). Hasil penelitian sebelumnya senyawa apigenin dalam seledri, asiatikosida dalam pegagan terbukti dapat menghambat pembentukan AGEs (Hafiz *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2019). Sedangkan sinensetin dalam kumis kucing terbukti memiliki efek imunomodulator dan kardioprotektif (Ashraf *et al.*, 2018). Namun penelitian-penelitian tersebut yang dilakukan menggunakan ekstrak tunggal. Selain itu ketiga senyawa tersebut memiliki bioavailabilitas rendah, ukuran molekul besar sehingga mempengaruhi penyerapan senyawa aktif tersebut. Penggunaan kombinasi ketiga ekstrak tersebut diharapkan

dapat meningkatkan efektivitas farmakologis, efek sinergisme, mengurangi dosis dan meminimalkan efek samping. Selain itu untuk memperbaiki bioavailabilitas dan bioktivitas ketiga senyawa tersebut pengembangan formulasi sediaan nanopartikel diharapkan dapat memecahkan masalah tersebut. Sediaan nanopartikel meningkatkan pelepasan dan absorpsi senyawa aktif dalam sediaan dan mengurangi efek samping yang merugikan penggunaan sediaan konvensional.

Keterbaruan dari penelitian ini adalah pemanfaatan nanoteknologi dalam bentuk nanopolimerik yang mengandung kombinasi ekstrak daun seledri, pegagan dan kumis kucing yang belum pernah diteliti sebelumnya. Pemanfaatan nanoteknologi terbukti mampu meningkatkan efektivitas sediaan karena efek sinergis kombinasi ekstrak tersebut dan meminimalkan efek samping akibat pemberian sediaan konvensional.

B. *Advanced Glycation End-Products (AGEs)*

AGEs adalah molekul heterogen yang berasal dari produk non enzim dari reaksi glukosa atau derivatif sakarida lainnya dengan protein atau lipid (Perrone *et al.*, 2020). Pembentukan AGEs di dalam tubuh dapat meningkat pada kondisi hiperglikemi baik dalam keadaan normal terlebih lagi pada penderita DM atau DM-CVD (Bansal *et al.*, 2023). Faktor lain yang mempengaruhi pembentukan AGEs di dalam tubuh adalah radikal bebas yang akan memicu terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) sehingga aktivitas c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) dan NADPH oksidase menginduksi disfungsi mitokondria dan stress oksidatif (Rungratanawanich *et al.*, 2021).

Proses pembentukan AGEs dibagi menjadi tiga tahap yaitu tahap pertama, dalam beberapa jam, glukosa yang mengandung gugus karbonil bereaksi dengan gugus amino secara *reversible* membentuk *basa schiff* yang tidak stabil. Pada tahap ini proses reaksi tergantung pada konsentrasi glukosa. Dalam beberapa minggu, *adducts base schiff* mengalami *rearrangement intramolecular* secara spontan dan membentuk produk amadori yang relatif stabil, terikat kovalent, atau dikenal sebagai produk glikasi awal (Twarda-Clapa *et al.*, 2022). Tahap kedua pada proses pembentukan AGEs sebagian kecil dari produk amadori secara langsung diubah menjadi AGEs melalui jalur oksidasi maupun non oksidasi yang bersifat *irreversible* yang dikenal sebagai jalur Hodge (Sharma *et al.*, 2015). Tahap terakhir sisa produk amadori pada reaksi sebelumnya mengalami *rearrangement* menjadi senyawa dikarbonil seperti glyoxal (GO), methylglyoxal (MGO) dan 3-deoxyglucosone (3-DG) melalui jalur polio maupun peroksidasi lipid. Senyawa dikarbonil akan bereaksi secara polimerisasi dengan struktur protein membentuk senyawa AGEs yang stabil (Song *et al.*, 2021).

AGEs berdasarkan sumbernya dibagi menjadi dua kelompok yaitu endogen dan eksogen. AGEs endogen terbentuk secara spontan dan terakumulasi dalam tubuh sedangkan AGEs eksogen sebagian besar berasal dari asupan makanan, dengan kandungan lemak dan protein tinggi (Song *et al.*, 2021). Berdasarkan struktur kimia dan fluoresensi ada empat kelompok yaitu: a. *Noncrosslinked nonfluorescent products*; b. *Crosslinked nonfluorescent products*; dan c. *Crosslinked fluorescent products*. AGEs *fluorescence* merupakan jenis AGEs yang paling banyak dan dapat diukur untuk

mengetahui jumlah AGEs total dalam tubuh. AGE dengan berat molekul yang tinggi memiliki potensi patogenik tinggi. AGEs *crosslinking* memiliki afinitas tinggi dan tahan terhadap degradasi, sehingga menyebabkan efek toksik bagi tubuh (Song *et al.*, 2021). Hasil penelitian baru-baru ini menunjukkan bahwa AGEs dapat menjadi penanda atau biomarker pada komplikasi kardiovaskular yang terkait dengan DM. AGEs menyebabkan kekakuan jaringan dengan membentuk ikatan silang, serta memicu peradangan melalui *Receptor Advanced Glycation End Products* (RAGE) (Chen *et al.*, 2023). Akumulasi AGEs terjadi dalam jaringan pada kondisi hiperglikemia, insufisiensi ginjal, dan kebiasaan merokok. AGEs telah terdeteksi dalam pembuluh darah, lesi aterosklerosis dan jantung. Temuan ini menunjukkan bahwa AGE dapat menjadi target yang relevan dalam pencegahan dan penanganan penyakit kardiovaskular, terutama pada pasien dengan CVD-DM (Hirai *et al.*, 2022).

RAGE adalah reseptor transmembran yang terlibat dalam sistem imun. RAGE memiliki struktur domain ekstraseluler V, C1, C2 dan ekstraseluler N-terminal. Domain ini memungkinkan RAGE untuk berinteraksi dengan berbagai ligan termasuk AGEs. RAGE berperan dalam mengenali dan merespon produk-produk hasil glikasi/AGEs yang terbentuk dari reaksi antara glukosa dan protein atau lipid terutama pada kondisi hiperglikemi. Reseptor ini terlibat dalam proses patologis di berbagai penyakit seperti DM, CVD, alzheimer, kanker, dan kondisi inflamasi kronis lainnya. (Perrone *et al.*, 2020).

Ikatan AGEs dengan RAGE mengaktifkan berbagai jalur sinyal intraseluler seperti MAPK, ERK, p21ras, p38, dan JAK-STAT. Aktivasi jalur sinyal tersebut menyebabkan peningkatan kadar ROS melalui aktivasi NADPH oksidase. Selain itu ikatan AGEs dengan RAGE dapat memicu aktivasi jalur sinyal pro inflamasi seperti NF- κ B. Aktivasi ini menyebabkan peningkatan produksi sitokin pro inflamasi (TNF- α , IL-1, IL-6), molekul adesi (VCAM-1 dan ICAM-1) dan molekul lainnya. Pada pasien DM interaksi AGEs-RAGE dapat meningkatkan risiko komplikasi yang serius seperti aterosklerosis, penyakit jantung iskemik, gagal jantung dan stroke (**Perrone *et al.*, 2020**).

C. Reactive Oxygen Species (ROS)

ROS merupakan produk sampingan dari reaksi enzimatik, yang terdiri dari oksigen radikal bebas dan non radikal bebas, yang dihasilkan di berbagai kompartemen sel seperti retikulum endoplasma (ER), mitokondria, dan membran sel (Minjarens *et al.*, 2023). ROS radikal bebas memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya, contoh superoksida ($O_2^{\bullet-}$) sedangkan ROS non radikal tidak memiliki elektron yang tidak berpasangan tetapi merupakan senyawa reaktif yang dapat diubah menjadi ROS radikal bebas, contoh hidrogen peroksida (H_2O_2) diubah menjadi radikal hidroksil ($-OH$) (Rubio & Cerón, 2021).

Sumber produksi ROS dalam pembuluh darah meliputi NADPH oksidase, xantin oksidase, eNOS, jalur metabolisme asam arakidonat, disfungsi sistem transfer elektron mitokondria, dan autooksidasi katekolamin. NADPH oksidase merupakan sumber

yang paling penting dalam produksi ROS dan diaktifkan oleh sitokin dan zat vasoaktif (Higashi, 2022). ROS dapat mempercepat produksi AGEs dalam tubuh terutama pada kondisi stres oksidatif yang diakibatkan hiperglikemi pada pasien DM. Selain itu dapat mengaktivasi protein kinase, peningkatan fluks melalui jalur poli-alkohol, dan peningkatan fluks melalui jalur heksosamin. Jalur-jalur ini dapat menyebabkan kerusakan endotel yang diinduksi oleh stres oksidatif pada DM melalui produksi ROS yang berlebihan (An *et al.*, 2023).

D. Tumor Necrosis Factor (TNF- α)

Dalam sistem pertahanan tubuh, TNF- α merupakan bagian dari sistem imunitas non spesifik. Namun karena keterlibatannya dalam aktivitas interleukin, TNF- α seringkali dikatakan terintegrasi ke dalam sistem kekebalan non spesifik (Silva *et al.*, 2019). Studi sebelumnya menunjukkan bagaimana peningkatan kadar TNF- α terjadi pada saat ditemukan abnormalitas atau cedera kardiovaskular, sehingga berpotensi untuk dijadikan penanda biologis penyakit kardiovaskular maupun target terapi (Haryanto *et al.*, 2022; Nassef *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2017). Di sisi lain, beberapa penelitian juga telah mempelajari bagaimana TNF- α berperan dalam proses *signaling* dari reseptor maupun sitokin lain. Di antaranya penelitian oleh Tanaka *et al.*, yang menentukan bahwa TNF- α ikut menginduksi produksi atau pembentukan RAGE (Tanaka *et al.*, 2000).

TNF- α merupakan sitokin yang berperan pada respon inflamasi yang disebabkan kondisi resistensi insulin, obesitas dan diabetes melitus. TNF- α diproduksi oleh

monosit, limfosit jaringan adiposa dan sel otot. Sinyal TNF- α diinduksi oleh NF κ B, menyebabkan peningkatan sekresi molekul adhesi, salah satunya *Intercellular Cell Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) pada sel adiposa menyebabkan penurunan sensitifitas insulin dan cenderung menstimulasi dislipidemia aterogenik (Kaur *et al.*, 2014).

E. Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)

ICAM-1 merupakan glikoprotein yang terdapat pada permukaan sel endotel dan leukosit pada sistem imun (Lawson & Wolf, 2009; Meng *et al.*, 2016). Ekspresi ICAM-1 distimulasi oleh sinyal TNF- α yang berfungsi untuk menarik leukosit ke endotelium kemudian melakukan migrasi ke jaringan perifer sehingga terjadi peningkatan permeabilitas vaskular. Peningkatan permeabilitas vaskular sebagai bentuk respon dari reaksi inflamasi (Lu *et al.*, 2016).

ICAM-1 berperan dalam mengatur homeostatis tubuh dan menyebabkan gangguan pada kondisi patologi seperti kanker, aterosklerosis, fibrosis atrium, infark miokard, stroke, obesitas, penyakit ginjal. Tahap awal aterosklerosis disebabkan oleh disfungsi endotel, yang berhubungan dengan ekspresi berlebih ICAM-1 dan VCAM-1. Peningkatan regulasi molekul adhesi seluler (ICAM-1 dan VCAM-1), merupakan salah satu karakteristik fenotip disfungsi endotel (VCAM-1). Indikasi adanya aterosklerosis adalah peningkatan regulasi ekspresi adhesi monosit interseluler ke endotel. Disfungsi endotel, yang telah dikaitkan dengan perkembangan aterosklerosis, telah ditemukan dipromosikan oleh peningkatan ROS (Singh *et al.*, 2023).

F. Nanopartikel

Nanopartikel adalah teknologi untuk mengembangkan ukuran bentuk sediaan pada rentang 10-1000 nm (Noval *et al.*, 2021), mengandung bahan yang dapat digunakan untuk pengobatan sebagai pembawa obat yang senyawa aktifnya telah larut dan dienkapsulasi (Kurniasari & Atun, 2017). Nanopartikel bertujuan untuk mengatasi kelarutan bahan aktif yang sukar larut, meningkatkan bioavailabilitas yang rendah, meningkatkan stabilitas bahan aktif dari degradasi lingkungan (penguraian enzimatis, oksidasi, dan hidrolisis), memodifikasi sistem penghantaran obat agar obat dapat langsung menuju ke target terapi, meningkatkan penyerapan senyawa makromolekul, dan mengurangi efek iritasi zat aktif pada saluran cerna (Abdassah, 2017).

Nanopartikel umumnya diidentifikasi berdasarkan ukuran, morfologi dan muatan permukaannya, menggunakan teknik mikroskopis canggih seperti pemindaian mikroskop elektron atau *scanning electron microscope* (SEM), *transmission electron microscope* (TEM) dan *atomic force microscope* (AFM) (Ghomrasni *et al.*, 2020). Rata-rata diameter partikel, distribusi ukuran dan muatannya mempengaruhi stabilitas fisik dan distribusi *in vivo* dari nanopartikel. Teknik mikroskop elektron sangat berguna dalam memastikan bentuk keseluruhan nanopartikel polimer yang juga dapat menentukan toksisitasnya. Muatan permukaan nanopartikel mempengaruhi stabilitas fisik, redispersibilitas dispersi polimer serta kinerja *in vivo* (Khanmohammadi *et al.*, 2015).

Pembuatan nanopartikel dapat menggunakan beberapa metode, salah satu metode yang digunakan yaitu dengan metode gelasi ionik. Metode memiliki kelebihan yaitu prosesnya yang sederhana, pelarut yang digunakan tidak berasal dari pelarut organik, dan prosesnya dapat dikontrol dengan mudah sehingga metode gelasi ionik dapat digunakan untuk pembentukan nanopartikel (Samudra *et al.*, 2021). Metode gelasi ionik melibatkan proses sambung silang antara polielektrolit dengan adanya pasangan ion multivalennya dan seringkali diikuti dengan kompleksasi polielektrolit dengan polielektrolit yang berlawanan. Pembentukan ikatan sambung silang ini akan memperkuat kekuatan mekanis dari partikel yang terbentuk (Iswandana *et al.*, 2013).

Pada teknik gelasi ionik dilakukan pencampuran antara polimer yang bersifat polikation dengan polianion. Polimer polikation yang umum digunakan adalah kitosan karena memiliki sifat yang tidak beracun, *biocompatible*, *biodegradable* dan mudah dimodifikasi secara kimia. Sedangkan polimer polianion yang umum digunakan adalah zat yang dapat berfungsi sebagai pengikat silang yang baik misalnya tripolifosfat (TPP). Dengan adanya penambahan TPP kekuatan mekanik gel kitosan dapat meningkatkan sebab TPP memiliki rapat muatan negatif yang tinggi sehingga interaksi dengan polikationik kitosan akan lebih besar (Pakki *et al.*, 2016). Penambahan larutan kitosan ke dalam formulasi nanopartikel yang disiapkan sebelumnya merupakan cara yang mudah. Larutan kitosan dapat pula ditambahkan selama pembentukan nanopartikel lainnya untuk melapisinya (Sreekumar *et al.*, 2018). Di bidang nanoteknologi farmasi, kitosan telah banyak digunakan sebagai polimer

pembentuk partikel dan paling inovatif sebagai pelapis permukaan. Nanopartikel polimer, nanopartikel lipid, dan nanopartikel berbasis logam (atau logam oksida) adalah contoh nanopartikel pembawa obat atau zat aktif lainnya yang telah dimodifikasi dengan kitosan diberbagai aplikasi (Gour & Jain, 2019)

G. Seledri (*Apium Graveolens*)

1. Morfologi Seledri

Seledri adalah jenis tumbuhan sayuran daun dan tumbuhan obat yang termasuk keluarga *Apiaceae* yang sehari-hari dimanfaatkan sebagai bumbu masakan. Tanaman ini berwarna hijau, batangnya termasuk batang tanaman tidak berkayu (Dwinanda *et al.*, 2019). Tanaman seledri berasal dari Eropa Selatan. Namun saat ini sudah banyak ditanam oleh orang-orang untuk diambil daun, akar, dan buahnya.

Batang seledri dapat tumbuh dengan ketinggian 1 meter. Batang tidak berkayu, beralus, beruas, bercabang, tegak, dan berwarna hijau pucat. Daunnya tipis majemuk, daun muda melebar atau meluas dari dasar, hijau mengkilat, segmen dengan hijau pucat, tangkai di semua atau kebanyakan daun. Daun bunganya berwarna putih kehijauan atau putih kekuningan, yang panjangnya sekitar $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{4}$ mm.



Gambar 2. 1 Seledri (Apium Graveolens)

Bunganya tunggal, dengan tangkai yang jelas, sisi kelopak yang tersembunyi, daun bunga putih kehijauan atau merah jambu pucat dengan ujung yang bengkok. Bunga betina majemuk, tidak bertangkai atau bertangkai pendek, sering mempunyai daun berhadapan atau berbatas dengan tirai bunga. Tirai bunga tidak bertangkai atau dengan tangkai bunga tidak lebih dari 2 cm panjangnya. Panjang buahnya sekitar 3 mm, batang angular, berlekuk, sangat aromatik, dan akarnya tebal (Kurniawan *et al.*, 2018).

2. Manfaat Tanaman Seledri

Seledri adalah tumbuhan serbaguna, terutama sebagai sayuran dan obat-obatan. Seledri termasuk salah satu sayuran komersial yang bisa memberikan tambahan pendapatan. Pemanfaatan secara umum sebagai sayuran, daun, tangkai daun, dan umbi sebagai campuran sup. Daun juga dipakai sebagai lalap, atau

dipotong kecil-kecil lalu ditaburkan di atas makanan sebagai pelengkap masakan. Seledri (terutama buahnya) sebagai bahan obat sebagai "penyejuk perut". Seledri disebut-sebut sebagai sayuran antihipertensi. Fungsi lainnya adalah sebagai peluruh (diuretika), anti reumatik serta pembangkit nafsu makan (karminativa). Umbinya memiliki khasiat yang mirip dengan daun tetapi digunakan pula sebagai afrodisiak (Kurniawan *et al.*, 2018). Pada penelitian yang terdahulu, menyebutkan bahwa kandungan kimia yang berada di dalam tanaman seledri memiliki efek seperti antioksidan (Jung *et al.*, 2011), sebagai antideperesan (Desu & Sivaramakrishna, 2012) dan antiketombe (Mahataranti *et al.*, 2012).

3. Kandungan Seledri

Seledri mengandung flavonoid, saponin, tanin 1%, minyak asiri 0,033%, flavo-glukosida (apiin), apigenin, fitosterol, kolin, lipase, pthalides, asparagine, zat pahit, vitamin (A, B dan C), apiin, minyak menguap, apigenin dan alkaloid (Saputra & Fitria, 2016). Kadar flavonoid ekstrak seledri pada organ daun diperoleh hasil terbesar, jika dibandingkan dengan organ tanaman yang lain, sedangkan organ batang memiliki kadar flavonoid paling kecil dibandingkan yang lain. Hal ini terjadi karena daun merupakan organ tempat berlangsungnya proses fotosintesa pada tanaman (Kusumadewi & Widiyastuti, 2010).

H. Pegagan (*Centella asiatica* (L.))

1. Morfologi Pegagan

Pegagan merupakan tumbuhan berhabitus menahun, batang menjalar, memiliki umbi pendek, percabangan dengan geragih (stolon) merayap, panjang 10-80 cm. Daun tunggal, tersusun dalam roset akar, terdiri dari 2-10 daun, kadang-kadang agak berambut, panjang tangkai daun 1-50 mm, helai daun berbentuk ginjal, ukuran 1-7 x 1,5-9 cm, tepi daun beriggit tidak tajam, terutama kearah pangkal daun. perbungaan berupa bunga majemuk payung tunggal atau 2-5 bersama, payung tunggal tersusun atas 3 bunga, ukuran 3-4 mm; Panjang ibu tangkai bunga 5-50 mm, mula-mula tegak kemudian mengangguk; daun pelindung 2-3 helai; tangkai bunga sangat pendek. Daun mahkota ungu sampai kemerahan dengan pangkal hijau muda, panjang 1-1,5 mm, lebar hingga 0,75 mm. Buah pipih, lebar lebih kurang 7 mm dan tinggi lebih kurang 3 mm, berlekuk dua, jelas berusuk, berwarna kuning kecoklatan, berdinding agak tebal. Pegagan tumbuh baik di Indonesia terutama di daerah beriklim tropis baik didataran rendah sampai ketinggian 2500 mdpl. Tumbuh di tempat yang terbuka atau sedikit ternaung, pada tanah yang lembab dan subur seperti pematang sawah, padang rumput, tepi parit dan di tepi jalan (Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2010).



Gambar 2. 2 Pegagan (Centella Asiatica)

2. Manfaat Pegagan

Herba pegagan adalah seluruh bagian di atas tanah *C. asiatica* (L) Urb., suku *Apiaceae* yang megandung asiatikosida tidak kurang dari 0,7%. Herba pegagan berupa lembaran daun yang menggulung dan berkeriput disertai stolon dan tangkai daun yang terlepas, warna hijau kelabu, berbau aromatik lemah mula-mula tidak berasa kemudian pahit, helai daun berbentuk ginjal atau berbentuk bundar, umumnya dengan tulang daun yang menjari; pangkal helaian daun berlekuk; ujung daun membundar; pinggir daun beringgit sampai bergerigi, pinggir pangkal daun bergigi; permukaan daun umumnya licin, tulang daun pada permukaan bawah agak berambut; stolon dan tangkai daun berwarna cokelat kelabu, berambut halus (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008).

3. Kandungan Pegagan

Kandungan kimia herba pegagan adalah terpenoid, minyak esensial, flavonoid, polisakarida, asam amino, asam lemak, alkaloid, sterol, karotenoid tannin, klorofil, pektin, garam anorganik. Triterpen adalah komponen utama dan paling penting yang ada dalam herba pegagan, sekaligus digunakan sebagai *marker constituent* dalam hal kontrol kualitas (Zheng & Qin, 2007).

Secara umum triterpen pentasiklik dalam pegagan terbagi menjadi dua kerangka yaitu *oleanane* dan *ursane*, berdasarkan atas substitusi metil pada atom C₁₉ dan C₂₀. Termasuk dalam golongan *ursane* misalnya asiatikosida dan madekasosida sedangkan centella sapogenol, centella saponin A, asam terminolik termasuk dalam golongan *oleanane* (James & Dubery, 2009). Herba pegagan juga mengandung brahmosida (3,8%), asam brahmat, brahminosida (1,6%), (Sudarsono *et al.*, 2002), tankunisida, isotankunisida, sentelosida, asam madasiat, asam sentoat, asam senelik, asam betulinik dan asam indosentoat.

Pegagan yang berasal dari Tawangmangu memiliki kadar asiatikosida sebesar 0,21% (Pramono & Ajiastuti, 2004). pegagan juga memiliki kandungan flavonoid antara lain kuersetin, kaempferol, katekin, rutin dan naringin, sebagai bagian dari kandungan total fenol, yang berperan terhadap aktivitas antioksidan herba pegagan (Zheng & Qin, 2007). Herba pegagan juga mengandung minyak esensial dalam jumlah sedikit (0,1%), senyawa triterpene steroid seperti stigmasterol dan sitisterol dan poliasetilen (Brinkhaus *et al.*, 2000; Pramono & Ajiastuti, 2004).

I. Kumis Kucing (*Orthosiphon Stamineus*)

1. Morfologi Tanaman

Tanaman kumis kucing memiliki ketinggian 0,3-1,5 m dan memiliki batang 4 sudut. Daunnya sederhana, memiliki lebar 2-4 cm dan panjang 4-7 cm. Bunganya berwarna putih, biru atau ungu. Ketika bunga terbuka, benang sari dan putik meluas jauh melampaui kelopak, yang terlihat seperti "kumis kucing". Tanaman kumis kucing banyak ditemukan di negara tropis seperti Asia dan Australia. Budidaya tanaman ini dapat dilakukan di dataran dengan ketinggian 500-1200 mdpl dengan curah hujan lebih dari 3000 mm/tahun. Kondisi tanah yang subur dan gembur dengan pH 5-7,7, mengandung banyak humus, memiliki aliran air yang baik dan terkena sinar matahari langsung merupakan habitat yang cocok untuk budidaya tanaman ini (Herliana, 2013).



*Gambar 2. 3 Kumis Kucing (*Orthosiphon Stamineus*)*

2. Manfaat Kumis Kucing

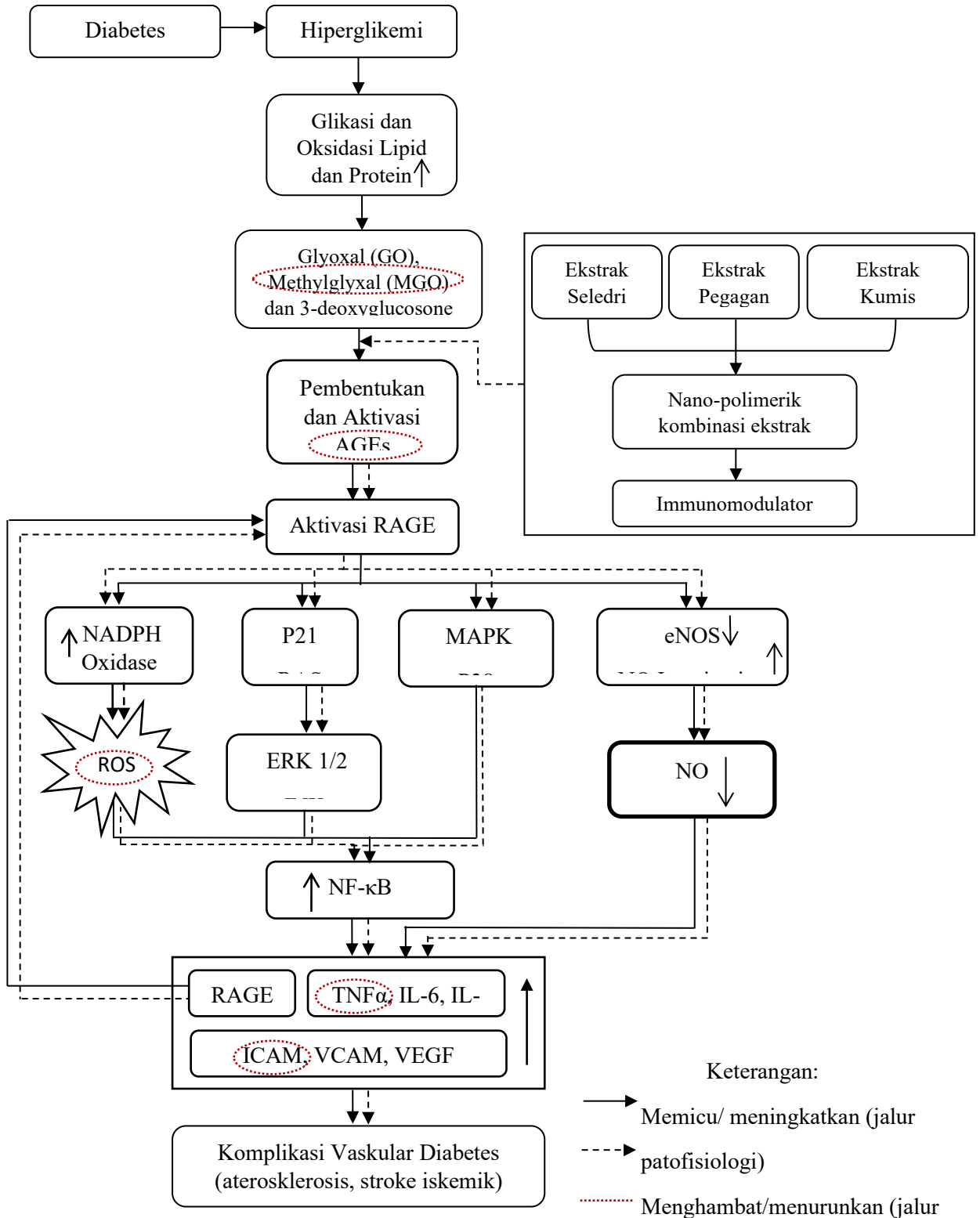
Bagian tanaman yang sering digunakan sebagai obat adalah bagian herba (terutama daunnya), baik yang segar maupun yang telah dikeringkan. Herba kumis kucing rasanya manis sedikit pahit, sifatnya sejuk. Tanaman ini berkhasiat sebagai anti radang, hipertensi, peluruh kencing (diuretik), menghilangkan panas dan lembab, serta menghancurkan batu saluran kencing (Wijayakusuma, 2011). Selain manfaat di atas tanaman daun kumis kucing juga digunakan sebagai obat tradisional oleh masyarakat Indonesia. Beberapa manfaatnya di antaranya sebagai obat rematik, DM, hipertensi, amandel, epilepsi, haid tidak lancar, gonore, sipilis (Mohamed *et al.*, 2011). Kemampuan kumis kucing sebagai obat adalah karena adanya senyawa bioaktif yang terdapat pada daun. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Alshaws *et al.*, 2012) daun kumis kucing mengandung senyawa kimia yang mempunyai daya hambat antibakteri yaitu, alkaloid, saponin, tanin, flavonoid. Hal ini dibuktikan dengan muncul diameter zona hambat pada bakteri gram positif seperti *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus agalactiae*.

3. Kandungan Kumis Kucing

Kandungan tanaman kumis kucing mengandung senyawa-senyawa flavonoid polimetoksilasi, fenil propanoid (turunan asam kafeat), dan terpenoid (terutama diterpen dan triterpen). Flavonoid yang paling menonjol, yang diisolasi dari ekstrak daun kumis kucing adalah sinensetin, eupatorin, 3-hidroksi-5,6,7,4-tetrametoksi-flavon, 20 salvigenin, ladanein, vomifoliol, 7,3, 4-tri-O-metil luteolin, dan skutellarein tetra metil eter (Ameer *et al.*, 2012). Sinensitin merupakan senyawa

golongan flavonoid yang menjadi senyawa fitokimia paling penting dan menjadi senyawa marker dari tanaman kumis kucing (Himani *et al.*, 2013).

J. Kerangka Teori



BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat Penelitian

1. Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan untuk proses ekstraksi simplisia dan uji profil senyawa kimia dalam ekstrak seledri (*A. graveolens* L), pegagan (*C. asiatica*) dan kumis kucing (*O. Stamineus*).
2. Laboratorium Penelitian Terpadu dan Pengujian (LPTP), Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan untuk pembuatan sediaan nanopolimerik kombinasi ekstrak seledri (*A. graveolens* L), pegagan (*C. asiatica*) dan kumis kucing (*O. Stamineus*).
3. Laboratorium *In vitro* Bagian Faal, Fakultas Kedokteran (FK) Universitas Gadjah Mada untuk kultur primer, sekunder dan pemaparan HUVEC dengan perlakuan, pengukuran absorbansi ELISA ROS, AGEs, TNF- α dan ICAM-1 serta hasil imunohistokimianya.
4. Laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada untuk uji *in vitro* sediaan nanopolimerik kombinasi ekstrak seledri (*A. graveolens* L), pegagan (*C. asiatica*) dan kumis kucing (*O. stamineus*).

\

B. Rancangan Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan merupakan rancangan penelitian *eksperimental* secara *in silico* dan *in vitro* menggunakan sediaan nanopolimerik kombinasi ekstrak herbal seledri (*A. graveolens* L), pegagan (*C. asiatica*) dan kumis kucing (*O. Stamineus*) untuk melihat aktivitas penghambatan AGEs. Pada penelitian ini tahap pertama yang dilakukan yaitu ekstraksi dari masing-masing tanaman kemudian dilakukan standarisasi spesifik ekstrak seledri, pegagan dan kumis kucing dengan senyawa marker. Sebelum dilakukan optimasi formula terlebih dahulu dilakukan uji *in silico* menggunakan komputasi untuk mengetahui senyawa yang berpotensi memiliki aktivitas farmakologi yang paling baik. Sediaan dibuat dalam bentuk nanopolimerik menggunakan metode gelasi ionik. Setelah sediaan nanopolimerik dibuat dilakukan uji ukuran partikel, zeta potensial menggunakan *particle size analyzer* (PSA) dan morfologi. Sediaan nanopolimerik kombinasi ekstrak herbal yang sudah diuji ukuran partikel, zeta potensial dan morfologi dilakukan uji secara *in vitro* untuk melihat aktivitas dari sediaan nanopolimerik yang telah dibuat.

Uji *in vitro* dilakukan menggunakan sel endotel vena umbilikal manusia atau *human umbilical vein endothelial cell* (HUVEC). Uji *in vitro* diawali dengan kultur sel endotel yang berasal dari umbilikus bayi kelahiran pagi, siang maupun malam dengan waktu pengerjaan isolasi dan kultur tidak melebihi 24 jam kelahiran secara normal. Pengujian efektivitas pada sediaan nanopolimerik kombinasi ekstrak herbal

untuk mencegah perburukan penyakit kardiovaskular menggunakan parameter ROS, MGO, AGEs, TNF- α , ICAM-1.

C. Variabel yang digunakan

1. Variabel Bebas: Sediaan nanopolimerik kombinasi ekstrak seledri (*A. graveolens* L), pegagan (*C. asiatica*) dan kumis kucing (*O. stamineus*).

2. Variabel Terikat:

a) *Reactive Oxygens Spesies* (ROS)

ROS merupakan suatu jenis radikal bebas yang dapat digunakan sebagai salah satu indikator peningkatan stress oksidatif yang dapat menyebabkan terjadinya disfungsi endotel. ROS diukur menggunakan ROS ELISA kit dan *flow cytometry*.

b) *Methylglyoxal* (MGO)

MGO merupakan senyawa dikarbonil yang bersifat reaktif. MGO dapat bereaksi cepat dengan protein sehingga menginduksi pembentukan AGEs. Pembentukan MGO merupakan salah satu penyebab terjadinya disfungsi endotel yang dapat memicu berbagai macam penyakit.

c) *Advanced glycation end products* (AGEs)

AGEs merupakan suatu senyawa hasil reaksi nonenzimatik antara gula pereduksi dan protein, lipid asam nukleat. Akumulasi AGEs menyebabkan ikatan AGEs dengan RAGE yang akan menginduksi terjadinya

pembentukan ROS, sitokin inflamasi dan molekul adhesi. Pengukuran AGEs menggunakan AGEs ELISA Kit.

d) Sitokin inflamasi (TNF α)

TNF α merupakan mediator inflamasi yang meningkat pada saat terjadi aktivasi *nukleus factor kappa beta* (NF κ B). Protein ini diukur secara kuantitatif menggunakan ELISA kit dan imunohistokimia.

e) Molekul adhesi (ICAM-1)

Molekul adhesi merupakan molekul sel endotel yang berfungsi sebagai vaskular adresin. utama yang merupakan bagian dari imunoglobulin *gene superfamily* yaitu ICAM dan VCAM. Disfungsi endotel dapat di induksi oleh molekul adhesi akibat ekspresi dari *nuclear factor kappa beta* (NF κ B) sehingga menyebabkan peningkatan ekspresi pada molekul adhesi. Pengukuran menggunakan ELISA kit dan imunohistokimia.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Seperangkat alat maserasi, blender, batang pengaduk, timbangan digital, kertas saring, spuit 1cc, alat gelas (*pyrex*), waterbath, inkubator, *magnetic stirrer*, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), *Particle Size Analyzer* (PSA) (Malven), alat sentrifugasi (Centrifuge PLC-05), *Scanning Electron Microscope* (SEM) (Phenom Pro-X) dan *Spektrofotometer Fourier Transform InfraRed* (FTIR) (Perkin Elmer Spectrum 100). Kit *Advanced Glycation End Product*

(AGEs) *Activity Assay*, Kit *Reactive Oxygen Species (ROS) Assay*, Kit *Tumor Necrosis Alpha (TNF- α) Assay*, Kit *Intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) Assay*, ELISA reader seperangkat alat histologi (*Slide, object glass, microtome, cetakan blok, parafin, mikroskop dan stopwatch*). Alat uji *in silico* berupa perangkat keras yaitu laptop dengan spesifikasi RAM 8 GB, windows 13 sebagai sistem operasi dan perangkat lunak Autodock Vina, Marvin Sketch, Biovia Discovery Studio, PubChem, PDB (Protein Data Bank), Pymol dan LigPlot+.

Prosedur

2. Bahan

- a) Standarisasi spesifik ekstrak seledri, pegagan dan kumis kucing dengan senyawa marker menggunakan apigenin, asiatikosida, sinensetin, etanol 70% LP, etanol P, aluminium klorida P 10%, natrium asetat, silika gel 60 F₂₅₄, toluen P-etil asetat P-asam format P, n-heksan P etil asetat P-dietilamin, kloroform P-etil asetat.
- b) Ekstrak daun seledri (*A. graveolens* L), pegagan (*C. asiatica*) dan kumis kucing (*O. stamineus*)
- c) Bahan pembuatan nanoenkapsulasi yaitu kitosan (*Merck*), natrium alginate (*Merck*), natrium tripolifosfat (*Merck*), etanol p.a (*Bratachem*), asam asetat glasial (*Merck*), Pb asetat (*Merck*), akuabides, tween 80, dimethyl sulfoxide 10 % (DMSO 10 %).
- d) Bahan untuk isolasi sel HUVEC yaitu *Hank's Balance Salt Solution*

(HBSS), gentamisin sulfat (Sigma), natrium bikarbonat (Sigma), Phenol red (Sigma), Larutan asam hidroksietilpiperazin etana sulfonat (HEPES), air deionisasi, kolagenase (Sigma tipe IIA).

- e) Bahan untuk media kultur sel HUVEC yaitu *Serum free* yng mengandung Medium 199 (Gibco), penisilin (100 m/ml), streptomisin (100m/ml) (Sigma), Larutan natrium bikarbonat-fenol merah (21mM/ml), glutamin (2mM/ml).
- f) Buffer pencuci, berupa *phosphate-buffered sodium* (PBS) atau *tris-buffered saline* (TBS) murni.
- g) Media yang mengandung serum yaitu *Serum free medium*, *fetal serum* (20%), *new born serum* (NBS).
- h) Bahan untuk perlakuan kultur yaitu H₂O₂, *cuture great* dari sigma.

E. Prosedur Penelitian

Penelitian dikerjakan dalam tiga tahapan utama. Tahap pertama dengan topik ekstraksi dan standarisasi spesifik ekstrak seledri, pegagan dan kumis kucing dengan senyawa marker. Tahapan kedua dengan topik formulasi dan optimasi sediaan nanopolimerik kombinasi ekstrak seledri, pegagan dan kumis kucing. Tahap ketiga terkait studi *in vitro* penghambatan *Advanced Glycation End Product* (AGEs).

1. Proses ekstraksi

Penyiapan sampel dilakukan dengan cara mendapatkan daun seledri (*A. graveolens*), pegagan (*C. asiatica*) dan kumis kucing (*O. stamineus*) dengan *Certificate of Analysis* (CoA) yang terdiri dari uji organoleptis, penetapan bobot

jenis, penentuan kelarutan etanol 70% dan standarisasi ekstrak menggunakan metode densitometri.

a) Ekstraksi daun seledri (*A. graveolens*).

Daun seledri dibersihkan dari pengotor, dicuci, dikering anginkan, dirajang kecil - kecil dan ditimbang sebanyak 500 gram, lalu dimaserasi dengan etanol destilat. Selanjutnya maserat diuapkan dengan didestilasi vakum dan dilanjutkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental (Nazir, 2020).

b) Ekstraksi daun pegagan (*C. asiatica*)

Simplisia pegagan ditimbang sebanyak 500 gram dimasukkan dalam wadah maserasi, tambahkan etanol 96% 750 ml (hingga simplisia tersebut terendam), biarkan selama 5 hari dalam bejana tertutup dan terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 5 hari, simplisia disaring dan ampasnya direndam lagi dengan cairan penyari yang baru. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali sampai didapat larutan yang jernih (kehijauan). Selanjutnya diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga memperoleh ekstrak pegagan (Marwati, 2015).

c) Ekstraksi daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*)

Bagian tanaman kumis kucing yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian daunnya. Satu kilogram daun kumis kucing dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel lalu

dikering anginkan. Sampel kering daun kumis kucing dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk halus. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, yaitu merendam 200 gram serbuk halus daun kumis kucing ke dalam toples kaca yang berisi 600 ml pelarut *n-heksana* selama 3 hari. Perlakuan yang sama untuk proses maserasi daun kumis kucing dengan pelarut methanol (Surahmaida *et al.*, 2019).

2. Pembuatan Nanopolimerik

Pada tahap ini mencakup formulasi, optimasi dan evaluasi formula optimum. Alur jalanya penelitian bagian kedua dapat dilihat pada gambar.

1. Orientasi formulasi

Orientasi dilakukan untuk mencari rentang konsentrasi dari masing-masing komponen yang sesuai. Tahap orientasi dilakukan berdasarkan data dari penelitian sebelumnya. Data orientasi digunakan dalam formulasi nanopolimerik dan optimasi menggunakan pendekatan *Simplex Lattice design* (SLD)

2. Optimasi pembuatan nanopartikel kombinasi ekstrak seledri, pegagan dan kumis kucing

Ekstrak kental seledri, pegagan dan kumis kucing dibuat menjadi ukuran nanometer (1-1000 nm) dengan menggunakan metode *botton up*, yakni dimulai dari atom-atom atau model molekul ekstrak kombinasi seledri,

pegagan dan kumis kucing yang telah diencerkan dengan senyawa target yang dikumpulkan membentuk partikel berukuran nanometer (Patil *et al.*, 2012).

3. Rancangan percobaan optimasi dan penentuan *run* metode *Simplex Lattice design* (SLD)

Penentuan formula optimum nanopolimerik kitosan-NaTPP pembawa kombinasi ekstrak seledri, pegagan dan kumis kucing menggunakan metode SLD. Rancangan percobaan, analisis pemodelan, prediksi dan verifikasi dari metode SLD menggunakan bantuan piranti lunak *design-expert* (DX[®]). Alasan pemilihan level minimum dan maksimum untuk setiap variabel bebas berdasarkan konsentrasi optimum kitosan-NaTPP dari berbagai referensi. Evaluasi sebagai respon dibatasi pada ukuran partikel, PDI, zeta potensial, mobilitas, efisiensi penyerapan dan stabilitas partikel.

Tabel 3. 1 Formulasi Sediaan Nano Polimerik

Bahan	Formula I	Formula 2	Formula 3
Ekstrak seledri (mg)	150	150	150
Ekstrak pegagan (mg)	300	300	300
Ekstrak kumis kucing (mg)	150	150	150
Kitosan 0,2% dalam asetat glasial	50	40	30

NaTPP 0,1% dalam aquades (ml)	10	20	30
-------------------------------	----	----	----

4. Preparasi larutan kitosan, NaTPP dan ekstrak seledri, pegagan dan kumis kucing

Larutan kitosan sebagai stok awal disiapkan dalam konsentrasi 1% serbuk kitosan sejumlah 1 g dilarutkan dalam 10 mL asam asetat 1%. Larutan NaTPP. Natrium tripolifosfat (Na-TPP) ditimbang sebanyak 200 mg kemudian dilarutkan dengan aquades hingga 100 mL, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga larut. ekstrak polih herbal ditimbang ekstrak seledri 150 mg, pegagan 300 mg dan ekstrak kumis kucing 150 mg.

5. Prosedur pembuatan nanopolimerik

Pembuatan nanopartikel kombinasi ekstrak seledri, pegagan dan kumis kucing dimulai dengan melarutkan 150 mg ekstrak seledri, 300 ekstrak pegagan dan 150 mg ekstrak kumis kucing dari hasil maserasi ke dalam (100) mL larutan kitosan dengan menggunakan pengaduk *magnetic stirrer*. Kemudian ditambah (40) mL larutan natrium tripolifosfat (NaTPP) 0,1% pada suhu kamar dibawah putaran homogenizer dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit hingga semua larutan NaTPP habis dan terbentuk suspensi nanopartikel.

Penggunaan NaTPP bertujuan untuk menghindari terbentuknya agregat dan sebagai penstabil nanoaprtikel yang terbentuk. Kemudian ditentukan

ukuran, morfologi dan kristalinitas partikel menggunakan SEM (Muchtaromah *et al.*, 2018).

6. Evaluasi ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial dan mobilitas elektroforesis.

Penentuan ukuran, partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial dan mobilitas partikel dilakukan menggunakan alat DLS-PSA. sampel berupa suspensi nanopartikel sejumlah 1 mL dimasukkan ke dalam kuvet dan pengukuran dilakukan dengan spesifikasi yang telah ditentukan. Media pendispersi air dengan refraktif indeks 1,330 keps. Analisis dibantu menggunakan piranti lunak zetasizer 7.12 sehingga didapatkan hasil berupa data-data diameter partikel (nm), PDI, zeta potensial (mV) dan mobilitas elektroforesis ($\mu\text{mcm/Vs}$).

7. Evaluasi morfologi partikel

Evaluasi morfologi partikel menggunakan alat SEM. Karakteristik dilakukan dengan alat *scanning electron microscope* (SEM). Sampel disiapkan dengan menaruh sampel pada carbon tape yang ditempelkan pada plat. Plat kemudian dimasukkan ke dalam alat SEM dan ditembakkan dengan elektron untuk penggambaran perbesaran.

8. Penetapan persen efisiensi enkapsulasi (%EE)

Penentuan persen efisiensi enkapsulasi (% EE) digunakan senyawa standar kombinasi ekstrak sebagai target. Analisa dan penetapan kadar

menggunakan instrument Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Kadar ekstrak pada masing-masing konsentrasi run ditetapkan kadarnya (kadar awal). Penentuan persen EE diawali dengan purifikasi nanopolimer dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 30 menit. Sampel yang dianalisa adalah bagian supernatan hasil sentrifugasi (kadar akhir). Sampel diinjeksikan dalam kolom HPLC untuk analisis penetapan Kombinasi ekstrak. Persen EE dihitung menggunakan perhitungan pada persamaan berikut.

$$\text{Persen EE (\%)} = \frac{\text{kadar awal} - \text{kadar akhir}}{\text{kadar awal}} \times 100\%$$

9. Profil interaksi bahan nanoenkapsulasi dengan *fourir transform infrared* (FTIR)

Analisis FTIR dilakukan pada nanopolimerik formula optimum, basis nanoenkapsulasi kitosan-NaTPP dan ekstrak polih herbal (seledri, pegagan dan kumis kucing). Selanjutnya dilakukan pembacaan pada bilangan gelombang antara 4000 cm⁻¹.

10. Stabilitas partikel

Uji dilakukan dengan menyimpan sampel nanopolimerik pada suhu ruangan 25°C-30°C selama 7 hari. monitoring partikel dengan evaluasi diameter partikel, indeks polidispersitas, zeta potesial dan mobilitas menggunakan instrument DSL-PSA. Uji stabilitas termodinamik

menggunakan metode *cooling cycle* dengan cara menyimpan formula pada suhu 4°C dan 45°C secara bergantian selama 24 jam (1 siklus) yang dilakukan sebanyak 6 siklus. setiap 1 siklus selesai dilihat ada tidaknya pemisahan fase untuk mengidentifikasi stabilitas fisik dari sediaan.

3. Uji *In vitro* Penghambatan ROS, MGO, AGEs, TNF, ICAM-1

1. Pengukuran kadar ROS intraselluler

a. Pengukuran ROS menggunakan *flow cytometri*

Mengikuti instruksi dari kit *dichlorofluorescein diacetate* (DCFDA) (Abcam, USA).

Sel HUVECs ditanam sebanyak 2×10^5 dalam 24 *well-plate* menggunakan DMEM-komplit, diinkubasi selama semalam dalam inkubator 37°C. Hari berikutnya, sel diamati dibawah mikroskop, dan apabila sudah menempel media dibuang dan dicuci dengan 1 x PBS. Sampel uji ditambahkan dalam *well-plate* dengan triplikasi. Kontrol positif dan kontrol negatif tidak diberi perlakuan, kemudian plate diinkubasi selama semalaman atau 20 jam dalam inkubator 37°C. Setelah semalaman atau 20 jam, media dibuang dan dicuci dengan 1 x PBS. Sel dipanen dengan cara ditambahkan tripsin-EDTA sebanyak 100 µL kemudian inkubasi selama 5 menit dalam inkubator 37°C. Sel diamati dibawah mikroskop, setelah sel lepas

ditambahkan buffer kedalam well dan dipindahkan ke *microtube* kemudian sentrifus.

Supernatan dibuang lalu endapan sel ditambahkan DCFA 45 μM sebanyak 50 μL kedalam *microtube*. *Microtube* dilapisi aluminium foil (DCFA bersifat fotosensitif), dan diinkubasi selama 30 menit dalam inkubator 37°C. Setelah 30 menit, pada *microtube* sampel uji, kontrol H_2O_2 dan vitamin C 500 μM ditambahkan H_2O_2 1200 μM sebanyak 450 μL kedalam well. *Microtube* diinkubasi dibaca menggunakan flowcytometri menggunakan Panjang gelombang eksitasi 488nm dan emisi 535 nm. Hasil intensitas fluoresensi dinyatakan dalam:

$$\text{ROS (\% of control)} = \frac{((\% \text{ fluoresensi sel target} - \% \text{ fluoresensi blanko}) \times 100)}{(\% \text{ fluoresensi H}_2\text{O}_2 - \% \text{ fluoresensi blanko})}$$

(Herisman, 2022)

b. Pengukuran Kadar ROS dengan *ELISA Reader*

Menyiapkan mikropelat U dan tempat sampel yang akan dimasukkan ditandai. Pengenceran sebanyak 2 ml *p-Nitro Blue Tetrazolium Chlorida* (NBT) dalam *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) bebas fenol red 0,9%. Pengenceran *Reactive oxygen species* (ROS) sebanyak 200 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam larutan HBSS bebas fenol red 0,9%. Sampel 100 μL dimasukkan ke dalam sumur mikropelat kemudian 100 μL *simoxan* 150 $\mu\text{g/ml}$ juga dimasukkan pada tiap sumuran yang terisi sampel dan diinkubasi selama 10 menit.

Terakhir 100 µl NTB dimasukkan pada setiap sumuran yang berisi sampel. Mikroplat ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Langkah terakhir dilakukan pembacaan hasil menggunakan ELISA reader dengan Panjang gelombang 450 nm dan diperoleh data nilai *Optical Density* (OD) dari superoksida (Bahari S, 2020).

2. Pengukuran kadar MGO dengan ELISA kit

a. Pembuatan MGO *conjugate-coated plate*

Reagen IX *conjugate diluent* disiapkan segera sebelum digunakan dengan melarutkan 100X *conjugate diluent* ke dalam 1 x PBS, kemudian tambahkan 50 µL ke dalam 4,95 ml PBS 1X. Sebelum digunakan, siapkan 500 ng / mL MG konjugat dengan mengencerkan 1,0 mg / mL Konjugat MG dalam *conjugate diluent*. Tambahkan 5 µL dari 1,0 mg / mL konjugat MG ke 995 µL PBS 1X, vortex secara menyeluruh, dan pindahkan 500 µL ke tabung lain yang berisi 4,5 mL *conjugate diluent* 1X. Tambahkan 100 µL konjugat MG 500 ng / mL ke setiap sumuran dan inkubasi semalaman pada suhu 4°C. Buang larutan pelapis konjugat MG dan cuci dua kali dengan 1X PBS. Tepuk-tepuk *plate* di atas tisu untuk menghilangkan kelebihan cairan. Tambahkan 200 µL larutan uji ke setiap sumur dan blokir selama 1 jam pada suhu kamar. Pindahkan *plate* ke suhu 4°C.

b. Cara Pengukuran MGO

Siapkan semua reagen, sampel, dan standar, yang akan digunakan lalu tambahkan 50 μ L standar atau sampel ke dalam sumur Methylglyoxal *Conjugate* pelat berlapis dan inkubasi selama 10 menit. Tambahkan 50 μ L antibodi anti-Methylglyoxal yang diencerkan dan inkubasi selama 1 jam. Langkah selanjutnya cuci dengan 250 μ L *wash buffer* 1x. Tambahkan 100 μ L konjugat antibodi-HRP sekunder yang diencerkan dan inkubasi selama 1 jam. Cuci seperti sebelumnya dengan *wash buffer* sebanyak 1x. Tambahkan 100 μ L larutan substrat hangat dan inkubasi selama 2-20 menit. Hentikan reaksi enzim dengan menambahkan 100 μ L larutan stop ke setiap sumur. Baca absorbansi segera pada pelat mikro pembaca menggunakan 450 nm

3. Pengukuran kadar TNF- α dengan metode imunohistokimia

Sel HUVEC yang sudah dikultur sebanyak 24 lembar difiksasi dengan formalin 4% lalu sel dicuci dalam larutan PBS. Sel ditetesi dengan 3% H₂O₂ selama 10 menit untuk memblokir aktivitas peroksidase endogen. Sel-sel kemudian bloking dengan bovin serum albumin (BSA) 5% selama 30 menit dan kemudian diinkubasi dengan TNF α (1:500) antibodi selama 120 menit pada 37°C. Sel-sel kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder konjugasi biotin TNF α selama 120 menit pada suhu kamar, dan pewarnaan divisualisasikan menggunakan 3,3-diaminobenzidin. Sel-sel

ditanggapi dengan hematoxylin dan gambar diambil menggunakan mikroskop dan perangkat lunak Image-Pro Plus 6.0. Sebagai kontrol, antibodi primer diganti dengan PBS.

4. Pengukuran kadar ICAM-1 dengan ELISA kit

Prinsip pengukuran ICAM-1 endotel secara ELISA adalah dengan teknik *sandwich* menggunakan enzim. Antibodi monoklonal spesifik untuk ICAM-1 telah dilapiskan pada microplate. Larutan standar, sampel, kontrol dan konjugat diaspirasi dan dibuang dari sumuran ICAM-1 yang ada diapit (*sandwich*) dengan *antibody immobile* dan *antibody monoclonal* terkait enzim yang spesifik untuk ICAM-1. Setelah langkah pencucian untuk menyingkirkan ICAM-1 yang tidak terikat, larutan substrat ditambahkan pada sumuran. Intensitas warna yang terbentuk secara proporsional berbanding lurus dengan banyaknya ICAM-1 yang terikat. Pembentukan warna dihentikan, kemudian intensitasnya diukur.

Pengukuran ICAM-1 menggunakan kit ELISA human sICAM-1/CD54 yang dikeluarkan dari freezer kemudian dihangatkan dalam suhu ruang dan dibuka isinya. Larutan wash buffer 25x dalam volume 20 ml diencerkan dengan distilled water dalam volume 480 ml, sehingga mencapai volume akhir 500 ml. *Destilled water* dalam volume 1 ml dimasukkan kedalam vial berisi serbuk ICAM-1 standar, sehingga didapatkan larutan stok ICAM-1 standar dalam konsentrasi 250 ng/ml; larutan stok ICAM-1 standar

didiamkan minimal selama 15 menit. Dilusi serial larutan stok ICAM-1 standar. Pembungkusan mikropate ELISA ICAM-1 dibuka dan microplate 96 sumuran ELISA telah dilapisi *immobilized antibody* terhadap ICAM-1 dikeluarkan. ICAM-1 konjugat dalam volume 100 µl dimasukkan dalam tiap sumuran. Larutan strander, balnko dan sampel dalam volume 100 µl masing-masing dimasukkan kedalam tiap sumuran yang sesuai. Mikropate ELISA ditutup dengan strip adhesif dan diinkubasi dalam suhu ruang dengan *shaking* 500 ±50 rpm selama 1,5 jam. Mikropate ELISA dicuci dengan wash buffer sebanyak 4x dan diakhiri dengan *decanting*. Larutan substrat solution dalam volume 200 µl dimasukkan ke dalam tiap sumuran. Mikropate ELISA ditutup dengan strip adhesif dan diinkubasi dalam kondisi tidak terkena cahaya (ditutup alumunium foil) selama 30 menit; pada akhir masa inkubasi sumuran berwarna biru. Stop solution dalam volume 50 µl dimasukkan ke dalam tiap sumuran; terjadi perubahan warna sumuran dari biru menjadi kuning. Mikropate diletakkan dimesin pembaca ELISA dan OD dibaca pada Panjang gelombang 450 nm dengan Panjang gelombang koreksi 570 nm. Hasil OD dikonversi menjadi konsentrasi ICAM-1 dengan *4-parameter logistic curve*.

4. Analisa Data

a) Analisis Optimasi Nanopolimer

Optimasi formula, cara analisis dengan menentukan model persamaan yang terintegrasi pada piranti lunak *design-expert*. Jika $p\text{-value} \leq 0,05$ maka dapat ditafsirkan terdapat perbedaan yang signifikan. Respon-respon hasil analisis statistik yang memiliki signifikansi positif selanjutnya digabungkan menjadi *overlay plots* sehingga diperoleh formula optimum. Karakteristik formula optimal, membandingkan nilai *desirability* tertinggi yang diperoleh.

b) Analisa Uji Penghambatan ROS, MGO, AGEs, TNF- α dan ICAM-1

Metode pengujian hipotesis menggunakan analisis Shapiro-Wilk untuk mengetahui kenormalan data. Jika data normal, analisis dilanjutkan dengan *one way anova* dan uji *least significant different* (LSD). bila hasil *one way anova* menunjukkan hasil yang signifikan yaitu adanya peningkatan dilanjutkan dengan uji *post hoc test* untuk mengetahui signifikansi antar kelompok perlakuan dengan nilai signifikansi 0,05. Data yang terdistribusi tidak normal, maka analisis dilakukan dengan *Kruskal-Wallis Test* dilanjutkan dengan *Mann Whitney* dengan taraf kepercayaan 95%.

c) Data hasil penelitian yang didapat diolah dengan uji analisa variasi (ANOVA). Uji analisis data yang dilakukan adalah uji homogenitas dan uji distribusi normal. Uji *normalitas* dilakukan dengan menggunakan uji *kolmogorov-smirnov* untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak. Sedangkan untuk uji homogenitas menggunakan uji *levane* untuk

mengetahui data homogen atau tidak. Apabila data yang diperoleh terdistribusi normal ($\text{sig} > 0,05$) dan homogen ($\text{sig} > 0,05$), maka analisis dapat dilanjutkan dengan uji statistik parametrik dengan uji Anova satu arah dengan taraf kepercayaan 95% dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* (LSD) untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar pasang kelompok perlakuan. Jika uji *Kolmogorov-Smirnov* dan uji *Levene* didapatkan data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu *Kruskal-Wallis* dengan taraf kepercayaan 95%. Apabila hasil signifikan $< 0,05$, maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* dengan taraf kepercayaan 95% untuk membandingkan antar dua kelompok dalam satu variabel. Apabila hasil signifikan $< 0,05$ berarti ada perbedaan yang bermakna.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Proses Ekstraksi

Simplisia daun seledri, kumis kucing dan pegagan dilakukan pengecilan ukuran selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% pada ekstrak seledri dan kumis kucing sedangkan ekstrak pegagan menggunakan etanol 96% (Rahmi *et al.*, 2017; Yunita & Sari, 2022). Penggunaan etanol 70% bertujuan agar dapat menarik senyawa yang terkandung dalam simplisia daun seledri dan kumis kucing baik senyawa polar maupun senyawa non polar (Rahmi *et al.*, 2017). Pemilihan pelarut etanol 96% tersebut didasarkan pada kemudahannya saat diuapkan serta sifatnya yang mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semi polar dan nonpolar (Sulastri & Oktaviani, 2015). Ekstraksi dengan cara maserasi adalah salah satu metode ekstraksi secara dingin yang dilakukan dengan pengadukan pada suhu ruangan. Kelebihan dari cara ini adalah mudah dan tidak dibutuhkan pemanasan yang bisa menyebabkan senyawa pada simplisia menjadi terurai atau rusak.

Maserasi dilakukan pergantian pelarut sebanyak tiga kali yang tujuannya untuk mencegah kejenuhan dari pelarut sehingga senyawa pada simplisia daun pegagan dapat tertarik (Putri *et al.*, 2024). Selanjutnya cairan yang diperoleh dari hasil maserasi (ekstrak cair) dimasukkan dalam vacuum rotary evaporator untuk dihasilkan ekstrak kental. Prinsip alat vacuum rotary evaporator adalah menguapkan pelarut ekstraksi dan akan menyisakan senyawa hasil ekstraksi yang dinamakan ekstrak dengan bekerja di

bawah tekanan atmosfer (vakum) sehingga pelarut akan menguap pada suhu di bawah titik didihnya. Hasil ekstraksi dapat dilihat pada tabel berikut ini.

Tabel 4. 1 Hasil Uji Rendemen Ekstrak Seledri, Kumis Kucing dan Pegagan

Sampel	Bobot simplisia (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendeman (%)	Standar FHI edisi 2
Seledri (<i>Apium graveolens</i>)	615	153	24,87	24,6
Kumis kucing (<i>Orthosiphon stamineus</i>)	697	84,02	12,05	8,7
Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	944	74,21	7,86	7,3

B. Hasil Uji Organoleptis Ekstrak Seledri, Kumis kucing dan Pegagan

Penilaian organoleptik adalah salah satu parameter spesifik yang dievaluasi menggunakan panca indera. Tujuan dari penilaian ini adalah untuk memberikan pengenalan awal yang sederhana dan subjektif terhadap ekstrak yang akan distandarisasi. Pemeriksaan organoleptik ekstrak yang meliputi bau, warna, rasa dan bentuk. Hasil uji organoleptik dari ekstrak kental dicantumkan dalam tabel berikut. Pada ekstrak didapatkan hasil yaitu ekstrak kental daun seledri, kumis kucing dan pegagan dalam dilihat pada tabel 4.9.

Tabel 4. 2 Hasil Uji Organoleptis Ekstrak Seledri, Kumis Kucing dan Pegagan

No	Parameter	Sampel		
		Seledri (<i>Apium graveolens</i>)	Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	Kumis kucing (<i>Orthosiphon stamineus</i>)
1.	Bentuk	Kental	Kental	Kental
2.	Warna	Hijau gelap	Hijau kehitaman	Hijau gelap
3.	Rasa	Agak pedas	Pahit ringan sedikit getir	Sedikit pahit agak getir
4.	Aroma	Khas seledri aromatik	Khas rumput basah	Khas herbal

C.

D. Hasil Uji Kadar Air Ekstrak Seledri, Kumis kucing dan Pegagan

Kadar air merupakan salah satu parameter standardisasi non spesifik yang dilakukan untuk memberikan batasan minimal atau range terkait banyaknya kandungan air dalam bahan. Range maksimal yang diperbolehkan berhubungan dengan kemurnian dan kontaminasi dalam bahan (Kemenkes RI, 2017). Metode yang digunakan untuk uji kadar air menggunakan metode gravimetri dengan proses pemanasan di dalam oven. Hasil penetapan kadar air ekstrak seledri, kumis kucing dan pegagan data dilihat pada Tabel 4.10. Hasil rata-rata kadar air ketiga ekstrak <10 % sesuai dengan persyaratan yang ditetapkan dalam FHI edisi II, kadar air ekstrak kental daun seledri, kumis kucing dan pegagan adalah kurang dari 10% (Kemenkes RI, 2017). Kadar air lebih dari 10% dapat menyebabkan degradasi kandungan senyawa akibat adanya reaksi enzimatis sehingga stabilitas ekstrak dapat berkurang dan mempercepat kerusakan ekstrak karena mudah ditumbuhi mikroba (Dewi, 2021).

Tabel 4. 3 Hasil Pengukuran Kadar Air Ekstrak Daun Seledri, Kumis Kucing dan Pegagan

No.	Ekstrak	Kadar air (b/b)	Standar nilai rujukan (FHI edisi II)
1.	Seledri (<i>Apium graveolens</i>)	6,72%	10%
2.	Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	6,93 %	10%
3.	Kumis kucing (<i>Orthosiphon stamineus</i>)	4,92%	≤ 10 % v/b

E. Hasil Uji Kadar Abu Ekstrak Seledri, Kumis kucing dan Pegagan

Pengujian kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak, dimana dipanaskan dalam temperatur yang menyebabkan senyawa organik beserta turunannya terdestruksi dan menguap sehingga meninggalkan unsur mineral dan anorganik saja. Hasil kadar abu menunjukkan bahwa ekstrak Seledri (*Apium graveolens*), Pegagan (*Centella asiatica*), dan Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus*) sesuai dengan persyaratan yang ditetapkan oleh FHI edisi II.

Tabel 4. 4 Hasil Pengukuran Kadar Abu Ekstrak Daun Seledri, Kumis Kucing dan Pegagan

No.	Ekstrak	Kadar abu (b/b)	Standar nilai rujukan (FHI edisi II)
1.	Seledri (<i>Apium graveolens</i>)	4,38%	16,1%.
2.	Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	1,94 %	16,6%
3.	Kumis kucing (<i>Orthosiphon stamineus</i>)	2,83%	≤ 10,2 % b/b

F. Skrining Fitokimia Ekstrak Seledri, Kumis Kucing dan Pegagan

Pada pengujian Skrining fitokimia ekstrak seledri (*Apium graveolens*), pegagan (*Centella asiatica*), dan kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) didapatkan hasil positif mengandung senyawa flavonoid dilihat dari pengujian dengan reagen $AlCl_3$ 1% menghasilkan warna kuning intens pada ketiga ekstrak (Supomo *et al.*, 2021). Flavonoid merupakan salah satu senyawa yang memiliki peran dalam pembentukan warna tanaman. Selain itu, flavonoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder pada tanaman yang memiliki berbagai aktivitas farmakologi diantaranya sebagai antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, antivirus, antimikroba, anti-aging dan anti jamur (Ullah *et al.*, 2020). Uji alkaloid dengan reagen Meyer menghasilkan endapan kuning pada ketiga ekstrak, yang menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Supomo *et al.*, 2021). Alkaloid sering dikaitkan dengan sifat antiinflamasi dan penghilang rasa sakit, serta memiliki potensi pengobatan untuk beberapa penyakit (Muhaimin *et al.*, 2021).

Pengujian saponin pada ketiga ekstrak didapatkan hasil positif dibuktikan dengan terbentuk busa yang stabil. Seperti halnya pengujian alkaloid, flavonoid dan saponin pada pengujian tanin juga didapatkan hasil positif dibuktikan terbentuknya warna biru kehijauan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu (A'yun & Laily, 2015). Tanin memiliki sifat antioksidan, antibakteri, dan antimikroba, yang berguna dalam berbagai pengobatan tradisional (Sunani & Hendriani, 2023). Hasil uji steroid sedikit berbeda dengan uji lainnya dimana kandungan steroid hanya ditemukan pada ekstrak

pegagan dan kumis kucing yang ditandai dengan terbentuknya cincin coklat sedangkan pada ekstrak seledri tidak ditemukan (Faramayuda *et al.*, 2021).

Tabel 4. 5 Hasil Uji Kualitatif Ekstrak Seledri, Kumis Kucing dan Pegagan

Ekstrak	Tipe uji	Reagen/metode	Perubahan yang terjadi	Hasil
Seledri (<i>Apium Graveolens</i>)	Flavonoid	AlCl ₃ 1%	Campuran berwarna kuning intensif	+
	Alkaloid	Meyer	Terbentuknya endapan kuning	+
	Tanin	Folin Ciocalteau	Campuran berwarna biru kehijauan	+
	Saponins	Froth	Terdapatnya busa yang stabil	+
	Steroids	Libermann Burchard's	Terbentuk cincin coklat	-
Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	Flavonoid	AlCl ₃ 1%	Campuran berwarna kuning intensif	+
	Alkaloid	Meyer	Terbentuknya endapan kuning	+
	Tanin	Folin Ciocalteau	Campuran berwarna biru kehijauan	+
	Saponin	Froth	Terdapatnya busa yang stabil	+
	steroid	Libermann Burchard's	Terbentuk cincin coklat	+
Kumis kucing (<i>Orthosipon stamineus</i>)	Flavonoid	AlCl ₃ 1%	Campuran berwarna kuning intensif	+
	Alkaloid	Meyer	Terbentuknya endapan kuning	+
	Tanin	Folin Ciocalteau	Campuran berwarna biru kehijauan	+
	Saponin	Froth	Terdapatnya busa yang stabil	+
	Steroid	Libermann Burchard's	Terbentuk cincin coklat	+

Penentuan total flavonoid ekstrak seledri, kumis kucing dan pegagan dilakukan secara kolorimetri dengan metode aluminium klorida (AlCl₃) serta menggunakan quersetin sebagai standar. Quersetin adalah senyawa flavonoid yang termasuk dalam senyawa flavonol yang di dalam strukturnya setelah flavon dan flavonol terdapat gugus

keto pada C4 dan gugus hidroksil pada atom C3 atau C5 (Azizah *et al.*, 2014). Prinsip penentuan flavonoid total dalam penelitian ini yaitu terbentuknya kompleks berwarna kuning yang disebabkan oleh reaksi antara AlCl₃ dengan gugus keto maupun gugus hidroksi dari flavon serta flavonol. Metode ini didasarkan pada terbentuknya kompleks antara AlCl₃ dengan gugus hidroksil pada C3 dan C5 dari senyawa flavon dan flavonol dan AlCl₃ dengan gugus keton pada C4 (Suryani *et al.*, 2016). Larutan standar quersetin dibuat pada konsentrasi (50 ppm) dari larutan induk quersetin 400 ppm. Digunakan alat spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 400-600 nm untuk mengukur absorbansi larutan standar quersetin, larutan sampel serta larutan blanko.

Tabel 4. 6 Hasil Uji Flavonoid Total Ekstrak Seledri, Kumis Kucing dan Pegagan

Sampel	Bobot (mg)	Konsentrasi	Absorbansi	Hasil (mg QE/gram ekstrak)
<i>Apium graveolens</i>	50.08	16.190	0.135	1.850±0.046
<i>Centella asiatica</i>	50.03	4,901	0,044	0,957±0,046
<i>Orthosipon stamineus</i>	50.08	9.395	0.080	3.216±0.046

Hasil pengujian diperoleh kadar total flavonoid yang dihitung sebagai kuersetin tertinggi dalam ekstrak kumis kucing sebesar 3.216 mg QE/gram ekstrak. Hasil ini menunjukkan bahwa tiap gram ekstrak mengandung kuersetin sebesar 3,216 mg. Hasil ini sejalan dengan peneltian yang dilakukan oleh Hardianti *et al* (2024) yang menyatakan bahwa total flavonoid pada ekstrak kumis kucing lebih tinggi

dibandingkan dengan ekstrak seledri. Selain itu penelitian serupa oleh Halim *et al* (2017) yang menyatakan bahwa kadar flavonoid total ekstrak kumis kucing sebesar 3,36 mg QE/ gram ekstrak. Menurut Hidayah & Anggarani (2022) semakin meningkatnya kadar senyawa flavonoid maka semakin besar pula aktivitas antioksidannya. Flavonoid yang ditemukan pada tanaman umumnya berbentuk glikosida akibat berikatan dengan gula sehingga mudah larut pada pelarut polar (Aminah *et al.*, 2017). Senyawa flavonoid yang terdapat dalam tanaman dapat berfungsi sebagai antioksidan yang dapat melindungi tubuh dari stress oksidatif (Simanjuntak, 2012). Aktivitas ini berperan dalam pencegahan penyakit kardiovaskular dengan mekanisme meningkatkan fungsi endotel sehingga dapat mengurangi pembentukan plak aterosklerotik pada pembuluh darah (Ciumărnean *et al.*, 2020).

G. Karakteristik Formula Optimum

1. Ukuran partikel

Diameter ukuran partikel hasil pengukuran pada formula optimum sebesar 186 ± 46.81 nm. Hasil pengukuran tersebut menunjukkan diameter tersebut menunjukkan bahwa partikel masih berada dalam rentang satuan nanopartikel (1 nm – 1000 nm). Ukuran partikel yang terbentuk sangat dipengaruhi oleh material tween 80, kitosan dan NaTPP yang digunakan. Hasil pengukuran diameter ukuran partikel secara keseluruhan memenuhi standar analisis menggunakan DLS-PSA.

Secara teori bioavailabilitas zat aktif dapat ditingkatkan dengan ukuran partikel dalam rentang nanopartikel. Diameter ukuran yang semakin kecil akan mempengaruhi proses absorpsi dan menentukan kecepatan serta tingkat pelepasan senyawa aktif yang terserap dalam sistem polimerik nanopartikel (Bilia *et al*, 2014).

2. Indeks polidispersitas (PDI)

Pengukuran indeks polidispersitas (*polydispersity index*; PDI) berjalan bersama dengan ukuran partikel. Nilai indeks polidispersitas pada formula optimum sebesar $0,87 \pm 0,04$. Secara teori nilai ini menunjukkan bahwa nilai $PDI \geq 0,3$ menunjukkan bahwa distribusi ukuran partikel pada sediaan yang dibuat kurang seragam. Nilai indeks polidispersitas menggambarkan distribusi ukuran partikel yang mewakili kesamaan antar partikel. Ketidakteraturan suatu distribusi ukuran partikel ditunjukkan dengan nilai indeks polidispersitas yang besar ($\geq 0,5$). Suatu partikel dikategorikan homogen jika memiliki nilai indeks polidispersitas mendekati nol, maka dapat diasumsikan distribusi ukuran partikel relatif seragam (Pratiwi *et al*, 2019). Keseragaman distribusi partikel atau homogenitas suatu partikel mempengaruhi stabilitas sistem nanopolimerik yang dikembangkan dan terbukti mampu meningkatkan bioavailabilitas (Nasr *et al*, 2016).

3. Zeta potensial

Zeta potensial adalah beda potensial antar permukaan partikel. Nilai zeta potensial berhubungan dengan gaya tolak menolak antar partikel yang berdekatan akibat jenis muatan yang sama dalam dispersi. Partikel atau molekul kecil dengan zeta

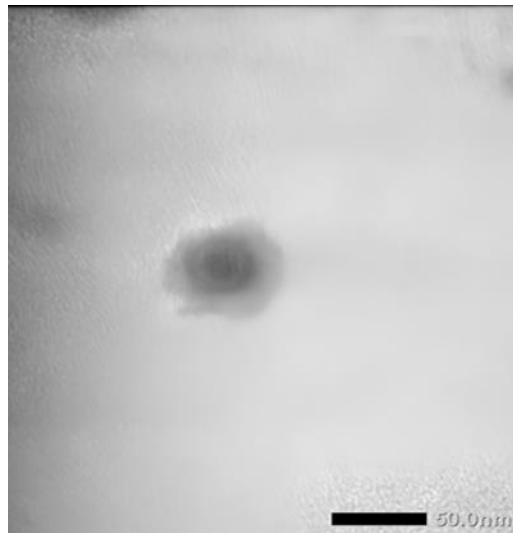
potensial yang tinggi maka dapat terjadi gaya tolak-menolak antar partikel dan tidak terjadi agregasi sehingga meningkatkan stabilitasnya dalam disperse. Ketika zeta potensial rendah, maka gaya Tarik-menarik lebih besar daripada gaya tolaknya yang menyebabkan disperse dapat pecah dan terjadi flokulasi partikel. Zeta potensial yang tinggi diharapkan dalam formulasi (positif atau negatif) karena mengindikasikan kestabilan sistem (Parmar *et al*, 2011).

Karakteristik zeta potensial dilakukan untuk mengetahui kestabilan dari formula nanopolimerik ekstrak SKP. Semakin besar (baik + maupun -) nilai zeta potensial menandakan gaya tolak antar partikel lebih besar dibandingkan gaya tarik-menariknya sehingga dapat mencegah terjadinya agregasi. Nilai prediksi dari piranti lunak menunjukkan nilai sebesar -30,08 mV dengan nilai *confident interval* (CI) sebesar -31.85 - -28.31 mV dan nilai *prediction interval* (PI) sebesar -38.37 --21.79 mV.

4. Morfologi Partikel

Transmission Electron Microscopy (TEM) digunakan sebagai alat untuk mengamati dan menganalisis ukuran nanopartikel. TEM adalah jenis mikroskop elektron yang memanfaatkan berkas elektron untuk menghasilkan gambar dengan resolusi sangat tinggi, yang memungkinkan pengamatan struktur internal objek pada skala nanometer. TEM sering digunakan dalam karakterisasi nanopartikel karena mampu menangkap detail morfologi, ukuran, dan distribusi partikel dengan akurat (Zhang & Wang, 2023). Hasil uji morfologi sediaan nanopartikel polimerik terlihat

bahwa partikel memiliki morfologi yang cenderung amorf, ditandai dengan bentuk yang tidak teratur dan tidak menunjukkan kristalinitas yang jelas. Ukuran partikel yang teramati berkisar pada skala nanometer, dengan bar skala menunjukkan ukuran 100 nm. Struktur partikel terlihat menyebar secara merata, menunjukkan bahwa proses pembuatan nanopartikel berhasil menghasilkan partikel dengan ukuran yang relatif seragam. Secara keseluruhan, hasil TEM menunjukkan bahwa sediaan nanopolimerik ini memiliki karakteristik morfologi yang baik, dengan partikel yang homogen, kecil, dan tersebar merata, menunjukkan potensi aplikasi yang optimal di bidang nanoteknologi, terutama dalam pengantaran obat atau aplikasi farmasi lainnya (Wilson & Prud'homme, 2021)



Gambar 4. 1 Hasil Pengamatan TEM

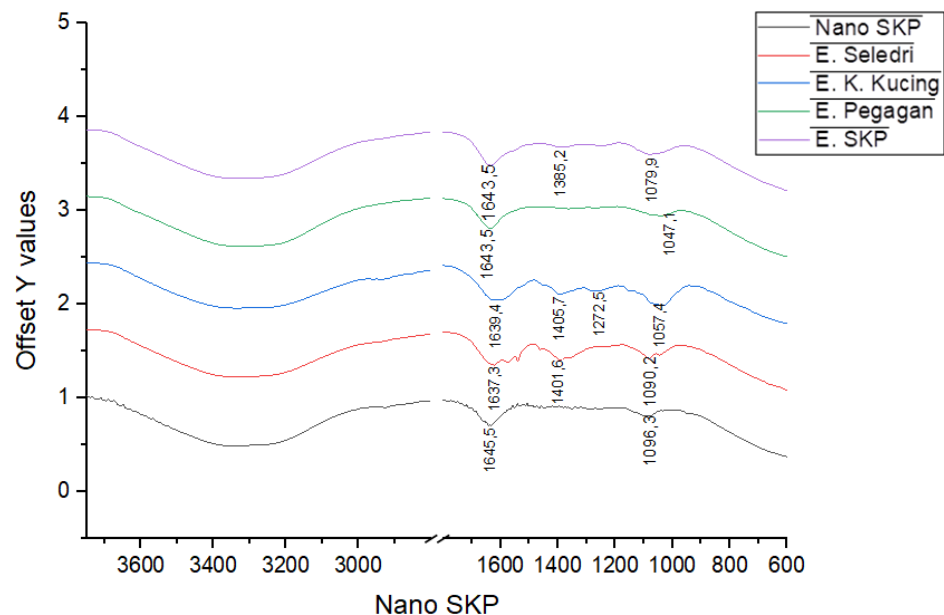
5. Analisis FTIR

Spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FTIR) merupakan teknik analisis untuk mengidentifikasi gugus fungsi dan interaksi molekul dalam suatu sampel sehingga diperoleh data mengenai komposisi kimia dan struktur biomolekul dari sampel tersebut (Eid, 2022). Hasil analisis FTIR menunjukkan puncak pita utama pada rentang $1650\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ merupakan puncak yang nampak gugus C=C aromatik pada ekstrak seledri, kumis kucing, pegagan, E SKP dan N. SKP. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Nomi *et al* (2024) dan Krysa *et al* (2022) yang menyatakan bahwa puncak pada bilangan gelombang sekitar $1600\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ dan $1700\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$ puncak ini mencerminkan adanya ikatan rangkap C=C dalam cincin siklik triterpenoid atau gugus karbonil (C=O) yang mungkin berada dalam bentuk konjugasi dengan struktur aromatik atau alifatik.

Pada puncak serapan lain pada rentang $1400\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ hal ini menunjukkan serapan dari bengkokan O-H yang masuk dalam golongan senyawa fenol. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Wulandari *et al* (2020) yang menyatakan bahwa pada puncak $1600\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, mengindikasikan vibrasi peregangan C=C pada cincin aromatik menunjukkan adanya senyawa fenolik dan flavonoid dari ekstrak seledri dan kumis kucing. Puncak $1272,5\text{ cm}^{-1}$ diidentifikasi sebagai uluran C-O dimana biasanya muncul pada daerah bilangan gelombang $1000\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ (Nilasari *et al.*, 2022). Selain itu puncak $1100\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan C–O stretching, C–C stretching yang khas pada flavonoid dan triterpenoid, senyawa bioaktif dengan

aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi yang ditemukan dalam ekstrak kumis kucing dan pegagan (Andriansyah et al., 2022; Rani et al., 2011).

Hasil lain dalam uji FTIR dilihat pada puncak serapan pada bilangan gelombang 1405 cm^{-1} dan 1274 cm^{-1} pada spektra nanopartikel polih herbal tidak terlihat ini berfungsi sebagai bukti bahwa ada perubahan ukuran partikel (Fitriyah & Cahyaningrum, 2023). Ukuran partikel secara signifikan mempengaruhi intensitas dan area pita inframerah dalam spektra sampel (Kova & Udvardi., 2006). Perbedaan intensitas puncak pada spektrum Nano SKP dibandingkan ekstrak tunggal menunjukkan interaksi antara senyawa aktif dengan matriks polimer, yang dapat meningkatkan stabilitas dan memperlambat pelepasan senyawa aktif (Jangde *et al.*, 2021).



Gambar 4. 2 Pola Spektra FTIR Nanopilimerik dan Komponen Penyusunnya

6. Stabilitas Partikel Nanopolimer Formula Optimum

Stabilitas adalah sifat produk untuk bertahan dalam batas yang telah ditetapkan sepanjang periode penyimpanan dan penggunaan, sifat dan karakteristiknya sama dengan yang dimilikinya pada saat pertama kali dibuat. Pengujian stabilitas nanopartikel dikerjakan menggunakan *dynamic light scattering* (DLS) dengan instrument Malvern. Formula optimum disimpan pada suhu ruang dan dilakukan pengukuran pada hari ke-1, 15, 30 dan 60. Stabilitas fisik diamati dari perubahan ukuran partikel, indeks polidispersitas dan nilai zeta potensial dari sampel.

Tabel 4. 7 Stabilitas Partikel Nanopolimerik Pada Suhu Ruang

Parameter	Hari ke-1	Hari ke-15	Hari ke-30	Hari ke-60
Perubahan warna	Bening kehijauan	Bening kehijauan	Bening kehijauan	Bening kehijauan
Endapan	ada	ada	ada	ada
Diameter partikel	186 ± 46.81	187,33±1,15	188,67±1,53	193, 67±4,04
PDI	0,62±0,04	0,63±0,03	0,64±0,03	0,69±0,01
Zeta potensial	-29,69±1,54	-29,37±0,40	-28,94±0,127	-28,12±0,37

Ukuran partikel mengalami peningkatan pada hari ke-15, 30 dan 60. Partikel-partikel kecil sangat dimungkinkan bergabung membentuk aglomerat seiring dengan bertambahnya waktu penyimpanan. Oleh karena itu, saat pengukuran hari ke 15, 30 dan 30 diameter partikel yang terukur semakin besar. Secara teori semakin bertambahnya waktu dapat membentuk endapan di bagian bawah sistem.

Indeks polidispersitas yang teramati pada hari ke 15, 30 dan 30 masih menunjukkan memenuhi rentang 95% PI dari nilai yang dipersyaratkan oleh *design expert*. Zeta potensial menunjukkan besarnya gaya tolak menolak antar partikel yang bermuatan didalam sistem partikel. Semakin besar gaya tolak menolak antar partikel menyebabkan sistem lebih stabil karena cenderung tidak terjadi aglomerasi partikel. Hasil peneltian menunjukkan bahwa baik dari nilai ukurn partikel, indeks polidispersitas, dan zeta potensial nanopolimerik esktrak SKP masih cukup stabil pada hari ke 14 dan 60 dengan kondisi penyimpanan pada suhu ruang.

Hasil penelitin ini sejalan dengn penelitian Fan *et al* (2012)mengenai pengaruh suhu terhadap ukuran nanokitosan yang memberikan hasil bahwa pada penyimpanan suhu yng rendah 10°C-25°C ukuran partikel masih relatif kecil. López-León *et al* (2005) mengevaluasi satbilitas larutan nanopartikel kitosan pada rentang suhu -10°C, 5°C dan 25°C. Larutan nanopartikel kitosan pada penyimpanan suhu -10°C diabaikan karena terjadi distabilitas. Diameter ukuran partikel secara signifikan mengalami peningkatan pada penyimpanan suhu 5°C dan 25°C yang diamati hari ke 7 dan 15.

7. Uji aktivitas Nanopolimerik polih herbal Terhadap Parameter AGEs, GST, Nrf2, NFκB dan TNFα

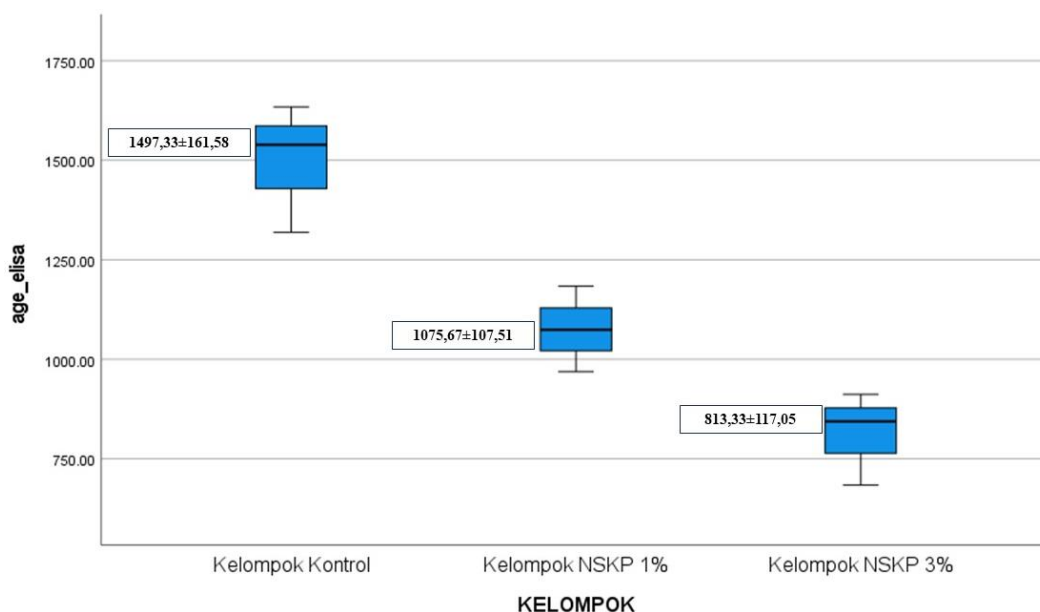
1. Aktivitas Nanopolimerik Polih herbal Terhadap AGEs

Aktivitas penghambatan pembentukan AGEs dilakukan menggunakan teknik ELISA untuk mengukur kadar AGEs pada sampel. Analisis data dilakukan melalui serangkaian uji statistik, yang meliputi uji normalitas, uji homogenitas, ANOVA satu

arah, dan uji lanjutan (LSD) untuk mengidentifikasi perbedaan signifikan antar kelompok kontrol dan perlakuan. Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data parameter AGEs terdistribusi normal dan homogen, sehingga analisis selanjutnya dapat dilakukan dengan uji ANOVA satu arah pada taraf kepercayaan 95%. Berdasarkan hasil uji ANOVA, ditemukan pengaruh yang signifikan dari pemberian sediaan nanopolimerik kombinasi herbal seledri, kumis kucing, dan pegagan (NSKP) terhadap pembentukan AGEs, dengan nilai $p < 0,002$ ($p < 0,005$). Hasil uji LSD menunjukkan bahwa pemberian NSKP 1% dan NSKP 3% secara signifikan menurunkan kadar AGEs dibandingkan dengan kelompok kontrol. Selain itu, perbandingan antara kelompok NSKP 1% dan NSKP 3% juga menunjukkan adanya penurunan kadar AGEs yang signifikan pada kelompok NSKP 1%. Hasil ini mengindikasikan bahwa sediaan nanopolimerik kombinasi herbal SKP memiliki potensi yang lebih besar dalam menghambat pembentukan AGEs pada konsentrasi tertentu, dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil uji dapat dilihat pada diagram box plot dibawah ini.

Hasil penelitian ini sejalan dengan temuan Zhou *et al* (2019) yang menunjukkan bahwa senyawa apigenin memiliki kemampuan untuk mengurangi stres oksidatif dan inflamasi akibat pembentukan AGEs dalam sel HUVECs. Selain itu, penelitian oleh Liu *et al* (2021) mengungkapkan potensi senyawa sinensetin dalam menghambat aktivitas α -glukosidase dan proses glikasi non-enzimatik, yang secara langsung berkontribusi pada pengendalian kadar gula darah dan pencegahan pembentukan AGEs pada penderita diabetes tipe 2. Lebih lanjut, penelitian Legiawati *et al* (2023)

mendukung peran *Centella asiatica* (CA) sebagai inhibitor AGEs melalui senyawa aktifnya, seperti *asiaticoside*, *madasiatic acid*, dan *madecassic acid*. Berdasarkan simulasi dinamika molekuler senyawa-senyawa tersebut terbukti efektif dalam menghambat pembentukan AGEs sehingga tidak terjadi interaksi AGEs dengan reseptor RAGE. Tidak terbentuknya ikatan AGEs-RAGE dapat mencegah aktivasi jalur pro-inflamasi dan stres oksidatif. Sinergi dari senyawa aktif ini menjadikan CA sebagai kandidat potensial dalam mencegah komplikasi yang terkait dengan AGEs.

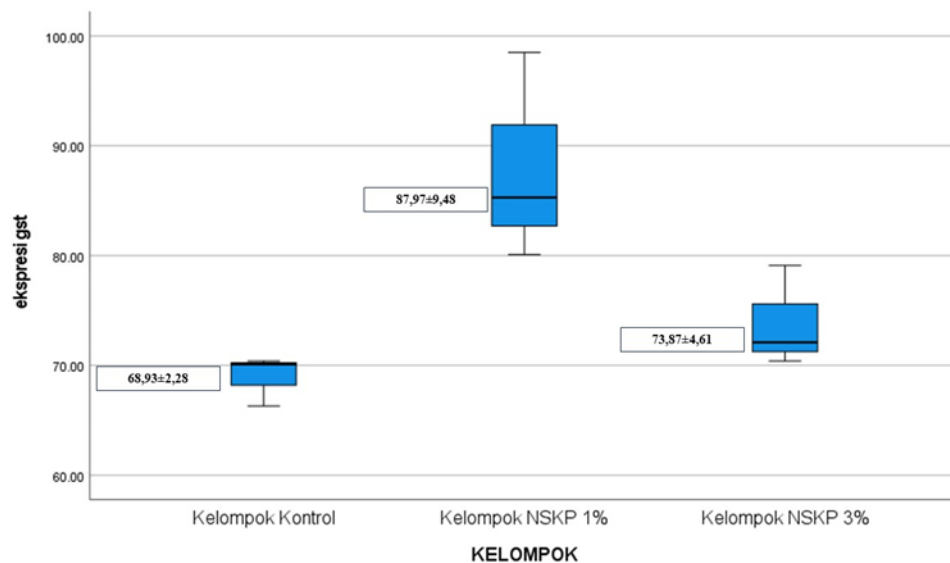


Gambar 4. 3 Diagram Box Plot Parameter AGEs

2. Aktivitas nanopolimerik Poliherbal Terhadap GST

Hasil analisis menggunakan statistik pada parameter GST menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen, hasil analisis ANOVA menunjukkan nilai signifikansi ($p < 0,023$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian nanopolimerik NSKP

1% dan 3% secara signifikan dapat meningkatkan kadar GST di dalam tubuh yang dapat mencegah terjadinya stress oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan sel endotel dan jaringan kardiovaskular. Hasil perbandingan aktivitas antar kelompok diperoleh data bahwa NSKP 1% memiliki kemampuan dalam meningkatkan kadar GST lebih tinggi dibandingkan dengan NSKP 3%.



Gambar 4. 4 Diagram Box Plot Parameter GST

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ali *et al* (2017) yang menunjukkan bahwa apigenin dapat meningkatkan aktivitas enzim Glutathione S-transferase (GST). Apigenin berperan dalam mendukung detoksifikasi senyawa berbahaya dan mengelola stres oksidatif yang berkontribusi pada peningkatan ekspresi GST dalam sel tubuh. Penelitian ini juga sejalan dengan temuan yang dilakukan oleh Ijaz *et al* (2024) yang membuktikan bahwa sinensetin senyawa aktif

dalam tanaman kumis kucing dapat meningkatkan aktivitas GST. Peningkatan ekspresi GST ini membantu mengurangi kadar *reactive oxygen species* (ROS) dan memperkuat kemampuan tubuh untuk melawan kerusakan akibat stres oksidatif. Selain itu, hasil penelitian ini juga mendukung temuan dari Samananda *et al* (2024) yang menunjukkan bahwa *Centella asiatica* melalui senyawa aktif seperti *asiaticoside*, *madecassic acid*, dan *madasiatic acid* dapat meningkatkan aktivitas GST. Senyawa-senyawa tersebut bekerja dengan memperkuat fungsi GST dan enzim antioksidan lainnya sehingga mengurangi kerusakan oksidatif dan peradangan serta memberikan perlindungan terhadap stres oksidatif.

GST memainkan peran yang krusial dalam patofisiologi penyakit kardiovaskular melalui mekanisme pengelolaan stres oksidatif yang merupakan faktor utama penyebab kerusakan jantung (Pahwa *et al.*, 2017). Sebagai enzim utama dalam sistem glutathione GST berfungsi untuk mendetoksifikasi senyawa berbahaya dan mengurangi akumulasi ROS yang berlebihan sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada sel-sel jantung dan memicu respons inflamasi serta apoptosis (M. Tan *et al.*, 2023). Penurunan aktivitas GST sering kali dikaitkan dengan peningkatan peroksidasi lipid dan stres oksidatif yang berkontribusi pada perkembangan penyakit kardiovaskular seperti infark miokard dan gagal jantung (Negm *et al.*, 2025). Oleh karena itu, peningkatan ekspresi dan aktivitas GST dapat memberikan perlindungan tambahan terhadap kerusakan jantung dengan mengurangi tingkat stres oksidatif, mencegah perburukan kondisi kardiovaskular, dan mendukung pemulihan sel-sel jantung yang terpapar kerusakan oksidatif.

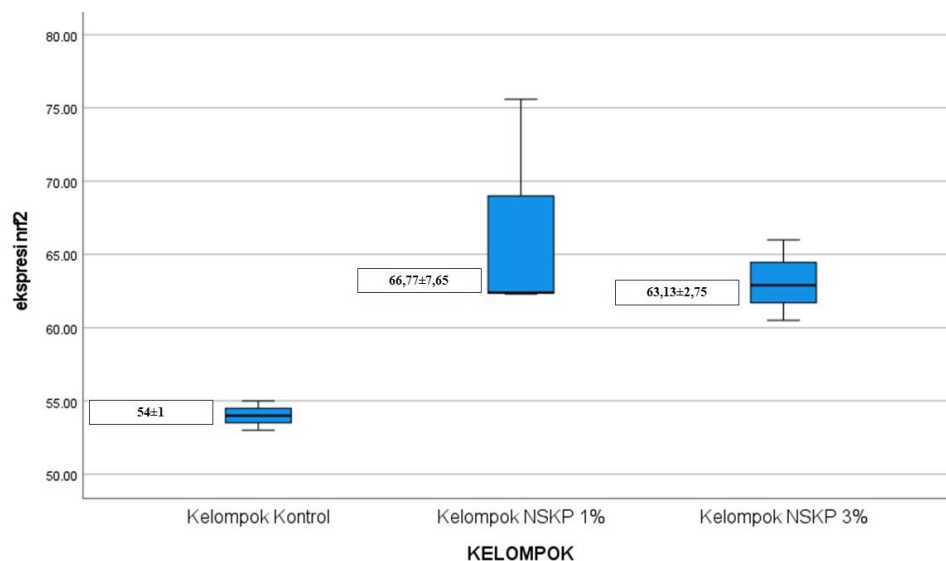
3. Aktivitas Nanopolimerik polyherbal Terhadap Nrf2

Faktor nuclear eritroid 2 terkait dengan faktor 2 (Nrf2) adalah protein pengatur transkripsi yang memainkan peran penting dalam melindungi sel dari stress oksidatif (Jiang *et al.*, 2010). Faktor ini bekerja dengan mengaktifkan ekspresi gen antioksidan dan enzim detoksifikasi yang membantu menetralkan radikal bebas dan melindungi sel dari kerusakan (Almeer *et al.*, 2018). Pada pasien DM kondisi hiperglikemia menyebabkan peningkatan produksi ROS yang memicu stres oksidatif dan inflamasi. Akumulasi ROS yang berlebihan berdampak pada kerusakan sel endotel, disfungsi vaskular, dan perkembangan komplikasi kardiovaskular seperti aterosklerosis, stroke, dan gagal jantung. Dalam hal ini, NRF2 berperan melindungi sel dengan mengaktifasi gen-gen yang terlibat dalam sistem pertahanan antioksidan, seperti glutathione S-transferase dan NAD(P) H:quinone oxidoreductase 1, yang bekerja menetralkan ROS. Selain itu, NRF2 juga menghambat aktivasi jalur AGEs-RAGE dan NF- κ B, yang merupakan jalur utama dalam proses inflamasi dan kerusakan vaskular pada diabetes. Aktivasi NRF2 telah terbukti menurunkan kadar sitokin proinflamasi, memperbaiki fungsi endotel, dan meningkatkan sensitivitas insulin, sehingga secara keseluruhan mampu mengurangi risiko dan progresivitas komplikasi kardiovaskular pada pasien DM. Namun, pada kondisi diabetes, ekspresi NRF2 sering menurun, yang melemahkan sistem pertahanan tubuh terhadap stres oksidatif. Oleh karena itu, pendekatan terapeutik yang menargetkan aktivasi NRF2, baik melalui agen alami maupun

farmakologis, menjadi strategi yang menjanjikan untuk mencegah kerusakan vaskular dan komplikasi kardiovaskular pada penderita diabetes.

Hasil ANOVA untuk ekspresi Nrf2 menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok dengan nilai signifikansi $p = 0.040$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian nanopolimerik NSKP 1% dan 3% secara signifikan dapat meningkatkan kadar Nrf2. Peningkatan ekspresi Nrf2 berperan penting dalam mengurangi kerusakan akibat stres oksidatif yang dapat menyebabkan komplikasi kardiovaskular seperti aterosklerosis dan hipertensi. Sebaliknya, penurunan ekspresi Nrf2 dapat meningkatkan risiko penyakit kardiovaskular. Hasil perbandingan aktivitas antar kelompok diperoleh data bahwa NSKP 1% memiliki kemampuan dalam meningkatkan kadar Nrf2 lebih tinggi dibandingkan dengan NSKP 3%.

Berdasarkan studi sebelumnya yang menyatakan bahwa aktivasi Nrf2 mencegah aterosklerosis dan kerusakan pembuluh darah dengan mengurangi stres oksidatif. Kekurangan Nrf2 dapat memperburuk kondisi tersebut. Jalur pensinyalan Nrf2/HO-1 juga berperan dalam melindungi endotelium dan menghambat perkembangan penyakit kardiovaskular, menjadikan aktivasi Nrf2 sebagai strategi potensial untuk mengurangi risiko stres oksidatif dan komplikasi kardiovaskular (Y. Tan *et al.*, 2021).



Gambar 4. 5 Diagram Box Plot Parameter Nrf2

4. Aktivitas Nanopolimerik Poliherbal Terhadap NFκB

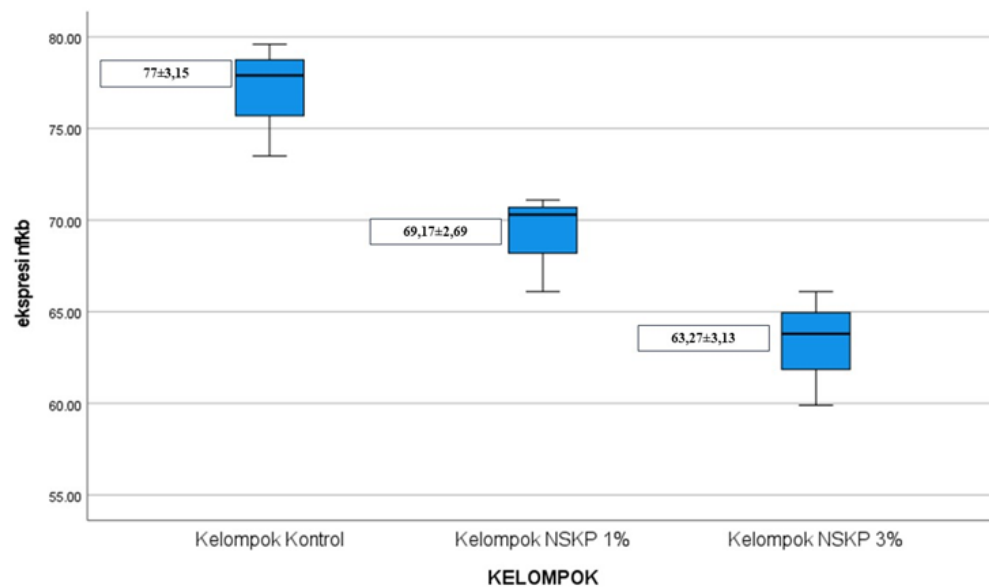
Nuclear Factor Kappa Beta (NFκB) merupakan mediator utama dalam inflamasi yang terkait dengan berbagai penyakit kardiovaskular dan resikonya termasuk diabetes (Fiordelisi *et al.*, 2019). Aktivasi NF-κB memicu produksi sitokin pro inflamasi (seperti TNFα dan Il-6) dan ROS. Baik sitokin inflamasi maupun ROS juga dapat menjadi stimulus untuk aktivasi NF-κB sehingga menyebabkan aktivasi terus menerus dari NF-κB. NF-κB berperan dalam komplikasi DM seperti disfungsi vaskuler, nefropati diabetes, neuropati diabetes. Salah satu mekanisme utama aktivasi NF-κB pada disfungsi vaskular adalah meningkatnya pembentukan AGEs akibat hiperglikemi. AGEs akan berikatan dengan reseptornya (RAGE) pada sel endotel, yang kemudian mengaktifkan NF-κB. Aktivasi ini menyebabkan peningkatan ekspresi molekul peradangan dan adhesi seperti TGF-β, ICAM-1, dan VCAM-1, serta

peningkatan sitokin inflamasi seperti TNF- α , IL-6, dan IL-1 β . Proses ini menyebabkan peradangan kronis dan kematian sel endotel. Aktivasi NF- κ B yang berlangsung terus-menerus berperan besar dalam munculnya komplikasi makrovaskular pada diabetes, seperti aterosklerosis, hipertensi, dan gagal jantung. Oleh karena itu, penghambatan jalur NF- κ B dianggap sebagai pendekatan terapi yang menjanjikan untuk mencegah kerusakan pembuluh darah dan mengurangi risiko komplikasi kardiovaskular pada pasien diabetes.

Hasil analisis data melalui uji statistik ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan konsentrasi 1% dan 3% dengan nilai signifikansi 0,004 ($< 0,005$). Hasil *Multiple Comparisons* menggunakan *LSD (Least Significant Difference)* untuk variabel antara kelompok (Kelompok Kontrol, NSKP 1%, dan NSKP 3%) menunjukkan bahwa NSKP 3% memiliki kemampuan menghambat ekspresi NF κ B paling baik dibandingkan dengan kelompok lainnya. Penghambatan aktivasi NF- κ B dapat mencegah komplikasi kardiovaskular dengan mengurangi peradangan, stres oksidatif, dan kerusakan pada pembuluh darah.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa Apigenin secara efektif mengurangi translokasi NF- κ B/p65, sehingga mampu menekan peradangan dan stres oksidatif yang menjadi penyebab utama disfungsi endotel (Shukla *et al.*, 2015). Selain itu, apigenin dapat mencegah aterosklerosis dengan menurunkan ekspresi gen inflamasi, seperti VCAM-1 dan ICAM-1, serta menghambat pembentukan inflammasom NLRP3 (Yamagata *et al.*, 2019). Sinensetin

menunjukkan aktivitas antiinflamasi dengan menghambat jalur NFκB sehingga dapat mencegah produksi mediator inflamasi. Penghambatan jalur NF-κB memiliki peran penting dalam mengurangi risiko komplikasi kardiovaskular (Lin *et al.*, 2023). Aktivasi NF-κB memicu ekspresi molekul proinflamasi seperti TNF-α, IL-6, MCP-1, ICAM-1, dan VCAM-1, yang berperan dalam peradangan vaskular, disfungsi endotel, dan aterosklerosis (Cai *et al.*, 2022). Hasil penelitian lain yang relevan dengan penelitian ini yang dilakukan oleh Zhang *et al* (2011) juga menunjukkan bahwa injeksi asiaticasida intraperitoneal pada kaki belakang tikus menurunkan serum NO, kadar TNF-α dan IL-1β, MDA, dan ekspresi iNOS, COX-2, serta NF-κB pada model edema kaki tikus.



Gambar 4. 6 Diagram Box Plot Parameter NFκB

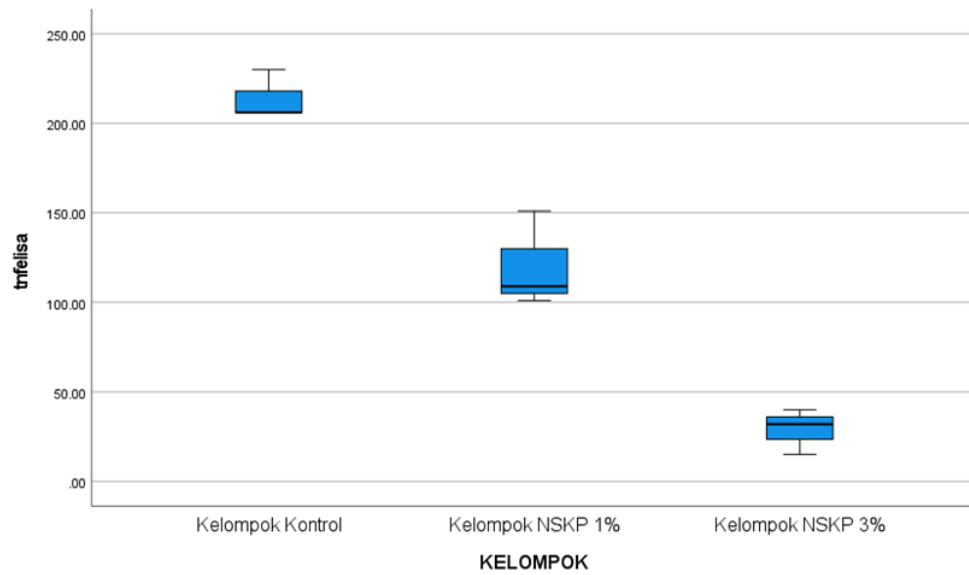
5. Aktivitas Nanopolimerik Poliherbal Terhadap TNF α

TNF α merupakan salah satu sitokin pro inflamasi yang berperan dalam inflamasi pada pasien DM dan resiko penyakit kardiovaskular (De Rosa *et al.*, 2018). TNF- α dapat memicu pembentukan *spesies oksigen reaktif* (ROS) yang mengakibatkan terjadinya stress oksidatif dan disfungsi endotel sehingga produksi nitrit oksida (NO) berkurang. Selain itu, TNF- α dapat meningkatkan ekspresi molekul adhesi seperti ICAM-1 dan VCAM-1 yang berperan dalam proses peradangan kronis dan mempercepat aterosklerosis (Majeed *et al.*, 2022). Pada hasil uji normalitas dan homogenitas diperoleh bahwa data pada parameter TNF α dinyatakan tidak normal dan homogen sehingga untuk uji selanjutnya menggunakan Uji Kruskal-Wallis. Hasil analisis data melalui uji statistik Krukal-Wallis menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan konsentrasi 1% dan 3% dengan nilai signifikansi 0,027 ($< 0,05$). Hasil *Multiple Comparisons* menggunakan *LSD (Least Significant Difference)* untuk variabel antara kelompok (Kelompok Kontrol, NSKP 1%, dan NSKP 3%) menunjukkan bahwa NSKP 3% memiliki kemampuan menghambat ekspresi TNF α paling baik dibandingkan dengan kelompok lainnya.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Chae *et al* (2017) dan Shin *et al* (2012) yang menyatakan bahwa sinensetin dapat menghambat aktivasi NF- κ B pada makrofag RAW 264.7 yang distimulasi oleh lipopolisakarida (LPS) dengan cara menjaga stabilitas I κ B- α dan mencegah degradasinya sehingga mengurangi inflamasi yang berlebihan tanpa mempengaruhi fosforilasi MAPK. Selain

itu sinensetin dapat menurunkan sekresi NO, ekspresi iNOS dan COX-2 serta mengurangi kadar sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α . Penelitian lain juga menyatakan bahwa senyawa asiaticasida dan mampu menghambat pembentukan TNF α sehingga mampu melindungi fungsi endotel pada keadaan inflamasi yang disebabkan oleh TNF α (Cai *et al.*, 2022; Fong *et al.*, 2015). Penelitian lain juga membuktikan senyawa apigenin berperan sebagai agen anti-TNF alpha dengan mengurangi kadar TNF- α , terutama bentuk larut (sTNF- α), yang terlibat dalam peradangan kronis. Apigenin menurunkan produksi TNF- α di sel dendritik dan makrofag, mengatur jalur NF- κ B, dan menghambat respons inflamasi yang berlebihan. Apigenin menghambat produksi TNF- α dan mengurangi aktivasi jalur NF- κ B. (Mulherkar *et al.*, 2021; Seo *et al.*, 2014).

TNF- α berperan dalam penyakit kardiovaskular dengan memicu peradangan vaskular, disfungsi endotel, dan aterosklerosis melalui jalur NF- κ B. Aktivasi TNF α juga mengurangi ketersediaan nitrogen oksida (NO) meningkatkan stres oksidatif, dan memperburuk kerusakan vascular (Clayton *et al.*, 2016; Harding *et al.*, 2024). Semua faktor ini berkontribusi pada perkembangan penyakit kardiovaskular, seperti infark miokard dan gagal jantung. Oleh karena itu, penghambatan TNF- α dapat menjadi strategi terapeutik yang efektif untuk mencegah dan mengatasi penyakit kardiovaskular.



Gambar 4. 7 Diagram Box Plot Parameter TNF α

DAFTAR PUSTAKA

- A'yun, Q., & Laily, A. N. (2015). Analisis Fitokimia Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) The Phytochemical Analysis of Papaya Leaf (*Carica papaya* L.) at The Research Center of Various Bean and Tuber Crops Kendalpayak, Malang. *Seminar Nasional Konversi Dan Pemanfaatan Sumber Daya Alam 2015*, 1341–137.
- Abdassah, M. (2017). Nanopartikel dengan gelas ionik. *Farmaka*, 15(1), 45–52.
- Ali, F., Rahul, Naz, F., Jyoti, S., & Siddique, Y. H. (2017). Health functionality of apigenin: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(6), 1197–1238. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1207188>
- Almeer, R. S., Soliman, D., Kassab, R. B., Albasher, G. I., Alarifi, S., Alkahtani, S., Ali, D., Metwally, D., & Moneim, A. E. A. (2018). Royal jelly abrogates cadmium-induced oxidative challenge in mouse testes: Involvement of the nrf2 pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms19123979>
- Alshaws, M. A., Abdulla, M. A., Ismail, S., Amin, Z. A., Qader, S. W., Hadi, H. A., & Harmal, N. S. (2012). Antimicrobial and immuno modulatory activities of orthosiphon stamineus benth. *Journal of Molecular Medicine*, 17(2), 538–539. <https://doi.org/10.3390/molecules17055385>
- Ameer, O. Z., Salman, I. M., Asmawi, M. Z., Ibraheem, Z. O., & Yam, M. F. (2012). Orthosiphon stamineus: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Journal of Medicinal Food*, 15(8), 678–690. <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.1973>
- Aminah, A., Tomayahu, N., & Abidin, Z. (2017). PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH ALPUKAT

- (*Persea americana* Mill.) DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 4(2), 226–230.
<https://doi.org/10.33096/jffi.v4i2.265>
- An, Y., Xu, B., Wan, S., Ma, X., Long, Y., Xu, Y., & Jiang, Z. (2023). The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction. *Cardiovascular Diabetology*, 22(1), 237. <https://doi.org/10.1186/s12933-023-01965-7>
- Andriansyah, I., Gumilar, H. F., Juanda, D., & Yuliantini, A. (2022). Analisis sidik jari herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) di daerah Jawa Barat menggunakan metode spektrofotometri FTIR dikombinasi dengan PCA. *Jurnal Agrotek Ummat*, 9(4), 287–297. <https://doi.org/10.31764/jau.v9i4.10949>
- Ashraf, K., Sultan, S., & Adam, A. (2018). *Orthosiphon stamineus* Benth. is an outstanding food medicine: Review of phytochemical and pharmacological activities. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 10(3), 109–118.
https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_253_17
- Azizah, D. N., Kumolowati, E., & Faramayuda, F. (2014). PENETAPAN KADAR FLAVONOID METODE $AlCl_3$ PADA EKSTRAK METANOL KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.). *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2), 45–49.
<https://doi.org/10.26874/kjif.v2i2.14>
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. (2010). *Pegagan (Centella asiatica (L) urban)*. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Bahari S, G. (2020). *Pengaruh Pemberian Natrium Laktat Hipertonik Terhadap Kadar Reactive Oxygen Species (ROS) Pada Tikus Albino Galur Wistar (Rattus Norvegicus) Dengan Cedera Otak*. Universitas Gajah Mada.
- Bansal, S., Burman, A., & Tripathi, A. K. (2023). Advanced glycation end products: Key mediator and therapeutic target of cardiovascular complications in diabetes.

World Journal of Diabetes, 14(8), 1146. <https://doi.org/10.4239/wjd.v14.i8.1146>

- Brinkhaus, B., Lindner, M., Schuppan, D., & Hahn, E. G. (2000). Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine*, 7(5), 427–448. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80065-3](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80065-3)
- Cai, S. Q., Tang, Z. M., Xiong, C., Wu, F. F., Zhao, J. R., Zhang, Q., Wang, L., Zhang, X. N., & Zhao, X. H. (2022). The anti-inflammatory effects of apigenin and genistein on the rat intestinal epithelial (IEC-6) cells with TNF- α stimulation in response to heat treatment. *Current Research in Food Science*, 5(March), 918–926. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.05.011>
- Chae, H.-S., Kim, Y.-M., & Chin, Y.-W. (2017). Sinensetin Inhibits Interleukin-6 in Human Mast Cell - 1 Via Signal Transducers and Activators of the Transcription 3 (STAT3) and Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Pathways. *Natural Product Sciences*, 23(1), 1–4.
- Chen, J., Arshi, B., Waqas, K., Lu, T., Bos, D., Ikram, M. A., Uitterlinden, A. G., Kavousi, M., & Zillikens, M. C. (2023). Advanced glycation end products measured by skin autofluorescence and subclinical cardiovascular disease: the Rotterdam Study. *Cardiovascular Diabetology*, 22(1), 326. <https://doi.org/10.1186/s12933-023-02052-7>
- Ciumărnean, L., Milaciu, M. V., Runcan, O., Vesa, S. C., Răchisan, A. L., Negrean, V., Perné, M. G., Donca, V. I., Alexescu, T. G., Para, I., & Dogaru, G. (2020). The effects of flavonoids in cardiovascular diseases. *Molecules*, 25(18), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules25184320>
- Clayton, K. N., Salameh, J. W., Wereley, S. T., & Kinzer-Ursem, T. L. (2016). Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics*, 10(5), 1–14.

<https://doi.org/10.1063/1.4962992>

De Rosa, S., Arcidiacono, B., Chiefari, E., Brunetti, A., Indolfi, C., & Foti, D. P. (2018). Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease: Genetic and epigenetic links. *Frontiers in Endocrinology*, 9(JAN), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00002>

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2008). *Farmakope Herbal Indonesia*.
Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Desu, B. S. R., & Sivaramakrishna, K. (2012). Anti-Depressant Activity of Methanolic Extract of Apium Graveolens Seeds. *International Journal Of Research In Pharmacy And Chemistry*, 2(4), 1124–1127.

Dewi, I. K. (2021). PARAMETER MUTU EKSTRAK HERBA SELEDRI (Apium graveolens L.) DENGAN METODE EKSTRAKSI MASERASI DAN DIGESTI. *Jurnal Jamu Kusuma*, 1(1), 22–26.
<https://doi.org/10.37341/jurnaljamukusuma.v1i1.6>

Dwinanda, A., Afriani, N., & Hardisman, H. (2019). Pengaruh jus seledri (Apium graveolens L.) terhadap gambaran mikroskopis hepar tikus (Rattus norvegicus) yang diinduksi diet hiperkolesterol. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 8(1), 68–75.
<https://doi.org/10.25077/jka.v8i1.972>

Eid, M. M. (2022). *Characterization of Nanoparticles by FTIR and FTIR-Microscopy*.

Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21–27.

Faramayuda, F., Riyanti, S., Pratiwi, A. S., Mariani, T. S., Elfahmi, E., & Sukrasno, S. (2021). Isolasi Sinensetin dari Kumis Kucing (Orthosiphon aristatus Blume

- miq.) Varietas Putih. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 6(2), 111–127. <https://doi.org/10.20961/jpscr.v6i2.48084>
- Fiordelisi, A., Iaccarino, G., Morisco, C., Coscioni, E., & Sorriento, D. (2019). NfκB is a key player in the crosstalk between inflammation and cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071599>
- Fitriyah, L., & Cahyaningrum, S. E. (2023). Indonesian Journal of Chemical Science Synthesis and Characterization of Gel Chitosan-Nanosilver-Extract of Pare Fruit (*Momordica Charantia*) as antibacteria against *Staphylococcus aureus*. *Indonesia Journal of Chemical Science*, 12(1), 81–93. <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/ijcs>
- Fong, L. Y., Ng, C. T., Zakaria, Z. A., Hakim, M. T. H. B. A. K. A. M. N., & Zuraini, A. (2015). Asiaticoside Inhibits TNF-α-Induced Endothelial Hyperpermeability of Human Aortic Endothelial Cells. *Phytotherapy Research*, 29(10), 1501–1508.
- Ghomrasni¹, N. B., Chivas-Joly¹, C., Devoille¹, L., Hochepped², J.-F., Nicolas, & Feltin¹. (2020). Challenges in sample preparation for measuring nanoparticles size by scanning electron microscopy from suspensions, powder form and complex media. *Powder Technology*, 359, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.10.022>
- Gour, A., & Jain, N. K. (2019). Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 844–851. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577878>
- Hafiz, Z. Z., Amin, M. ‘., Johari James, R. M., Teh, L. K., Salleh, M. Z., & Adenan, M. I. (2020). Inhibitory Effects of Raw-Extract *Centella asiatica* (RECA) on Acetylcholinesterase, Inflammations, and Oxidative Stress Activities via In Vitro and In Vivo. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 4).

<https://doi.org/10.3390/molecules25040892>

Hardianti, S., Mahdi, N., & Hamiddani, R. (2024). *UJI EFEKTIVITAS ANALGETIK KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN KUMIS KUCING (Orthosiphon stamineus Benth) DAN DAUN SELEDRI. 08(02), 179–185.*

Harding, D., Fanti, S., & Marelli-Berg, F. (2024). Tumour necrosis factor- α in cardiac inflammation: friend or foe? *Cardiovascular Research*, 120(1), 1–2.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvad180>

Haryanto, J., Indrati, A. R., & Rostini, T. (2022). Aspartate Aminotransferase to Platelet Ratio Index Score in Correlation with Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio to Predict Hepatic Cirrhosis in Hepatitis C Patients. *Althea Medical Journal*, 9(2), 106–110.
<https://doi.org/10.15850/amj.v9n2.2553>

Herisman, W. M. (2022). *Evaluasi Aktivitas Antioksidan In Vitro Rimpang Temu Mangga (Curcuma manga Val & Zijp) dan Pengukuran Kadar ROS Intraseluler Pada Sel RAW 264.7*. Universitas Gajah Mada.

Herliana, E. (2013). *Penyakit Asam Urat Kandas Berkat Herbal* (1st ed.). FMedia.

Hidayah, L. A., & Anggarani, M. A. (2022). Indonesian Journal of Chemical Science Determination of Total Phenolic , Total Flavonoid , and Antioxidant Activity of India Onion Extract. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 11(2), 124–135.

Higashi, Y. (2022). Roles of oxidative stress and inflammation in vascular endothelial dysfunction-related disease. *Antioxidants*, 11(10), 1958.
<https://doi.org/10.3390/antiox11101958>

Himani, B., Seema, B., Bhole, N., Mayank, Y., Vinod, S., & Mamta, S. (2013). Misai kushing: A glimpse of maestro. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 22(2), 55–59.

Hirai, T., Fujiyoshi, K., Yamada, S., Matsumoto, T., Kikuchi, J., Ishida, K., Ishida,

- M., Yamaoka-Tojo, M., Inomata, T., & Shigeta, K. (2022). Advanced glycation end products are associated with diabetes status and physical functions in patients with cardiovascular disease. *Nutrients*, *14*(15), 3032. <https://doi.org/10.3390/nu14153032>
- Ijaz, M. U., Manzoor, A., Hamza, A., & Khan, H. A. (2024). Ameliorative potential of sinensetin against paraquat induced renal damage by regulating oxidative, inflammatory, apoptotic and histopathological profile in male albino rats. *European Journal of Inflammation*, *22*, 1–9. <https://doi.org/10.1177/1721727X241233122>
- Iswandana, R., Anwar, E., & Jufri, M. (2013). Formulasi nanopartikel verapamil hidroklorida dari kitosan dan natrium tripolifosfat dengan metode gelasi ionik. *Jurnal Farmasi Indonesia. Vol*, *6*(4), 202.
- James, J. T., & Dubery, I. A. (2009). Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules*, *14*(10), 3922–3941. <https://doi.org/10.3390/molecules14103922>
- Jiang, T., Huang, Z., Lin, Y., Zhang, Z., Fang, D., & Zhang, D. D. (2010). The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes*, *59*(4), 850–860. <https://doi.org/10.2337/db09-1342>
- Jung, W. S., Chung, I. M., Kim, S. H., Kim, M. Y., Ahmad, A., & Praveen, N. (2011). In vitro antioxidant activity, total phenolics and flavonoids from celery (*Apium graveolens*) leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(32), 7022–7030.
- Kaur, S., Sharma, N., Krishn, S. R., Lakshmanan, I., Rachagani, S., Baine, M. J., Smith, L. M., Lele, S. M., Sasson, A. R., & Guha, S. (2014). MUC4-mediated regulation of acute phase protein lipocalin 2 through HER2/AKT/NF- κ B signaling in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, *20*(3), 688–700.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2174>

Kementrian Kesehatan RI. (2017). Farmakope Herbal Indonesia Edisi II Tahun 2017. *In Pills and the Public Purse*. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.

Khanmohammadi, M., Elmizadeh, H., & Ghasemi, K. (2015). Investigation of size and morphology of chitosan nanoparticles used in drug delivery system employing chemometric technique. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(3), 665–675.

Krysa, M., * M. S.-C. ', & Zdunek, A. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chemistry*, 393.

Kurniasari, D., & Atun, S. (2017). Pembuatan dan karakterisasi nanopartikel ekstrak etanol temu kunci (*boesenbergia pandurata*) pada berbagai variasi komposisi kitosan. *Jurnal Sains Dasar*, 6(1), 31–35.

Kurniawan, I., Efendi, E., & Purba, D. W. (2018). Effect of Organic NPK Fertilizer and Hantu Plant Growth Regulator (Pgr) Application on Growth and Yield Of Celery (*Apium graveolus* L.). *Bernas: Jurnal Penelitian Pertanian*, 14(3), 7–16. <https://doi.org/http://jurnal.una.ac.id/index.php/jb/article/view/367>

Kusumadewi, A. P., & Widiyastuti, Y. (2010). *Uji potensi antioksidan herba seledri (Apium graveolens L.) secara in vitro*.

Lawson, C., & Wolf, S. (2009). ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports*, 61(1), 22–32. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70004-0](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70004-0)

Legiawati, L., Fadilah, F., Bramono, K., & Pratama, A. I. (2023). In Silico Study of Centella asiatica Derivatives as Antioxidant: Enhancer of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Activity. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 16(1).

- Lin, L., Deng, K., Gong, Z., Fan, H., Zhang, D., & Lu, G. (2023). Sinensetin Attenuated Macrophagic NLRP3 Inflammasomes Formation via SIRT1-NRF2 Signaling. *ACS Omega*, 8(37), 33514–33525.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03319>
- Liu, D., Cao, X., Kong, Y., Mu, T., & Liu, J. (2021). Inhibitory mechanism of sinensetin on α -glucosidase and non-enzymatic glycation: Insights from spectroscopy and molecular docking analyses. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 259–267.
- López-León, T., Carvalho, E. L. S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J. L., & Bastos-González, D. (2005). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283(3), 244–351.
- Lu, L., Wei, P., Cao, Y., Zhang, Q., Liu, M., Liu, X. D., Wang, Z. L., & Zhang, P. Y. (2016). Effect of total peony glucoside pretreatment on NF- κ B and ICAM-1 expression in myocardial tissue of rat with myocardial ischemia-reperfusion injury. *Genet Mol Res*, 15(4), 1–10.
- Mahataranti, N., AStuti, I. Y., & Asriningdhiani, B. (2012). Formulasi shampo antiketombe ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens* L) dan aktivitasnya terhadap jamur *Pityrosporum ovale*. *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, 9(2), 128–138.
- Majeed, H. M. S., Abbas, A. A. H., & Khudair, M. S. (2022). The role of TNF α in type2 diabetes mellitus. *Bionatura*, 7(2), 1–6.
<https://doi.org/10.21931/RB/2022.07.02.32>
- Marwati, E. (2015). Efek Immunostimulasi Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centella asiatica* Urb.) dan Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) pada Mencit (*Mus musculus*). *SAINS*, 11(4), 28–37.

- Meng, R.-S., Cai, M., Jiang, J.-K., Liang, Q.-H., Sun, X., Yang, Q., Tan, C.-J., & Chen, X.-P. (2016). First principles investigation of small molecules adsorption on antimonene. *IEEE Electron Device Letters*, 38(1), 134–137.
- Mohamed, E. A. H., Lim, C. P., Ebrika, O. S., Asmawi, M. Z., Sadikun, A., & Yam, M. F. (2011). Toxicity evaluation of a standardised 50% ethanol extract of *Orthosiphon stamineus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.008>
- Muchtaromah, B., Ahmad, M., Romaidi, R., Nazilah, L. A., & Naja, N. A. (2018). Antibacterial activity of water and ethanol extract of *Allium sativum*, *Curcuma mangga*, and *Acorus calamus* combination. *Berkala Penelitian Hayati*, 24(1), 8–15. <https://doi.org/10.23869/30>
- Muhaimin, M., Irhash Shalihin, M., & Latief, M. (2021). Anti-Inflammatory Activity of an Indole Alkaloid Isolated from Bebuas (*Premna serratifolia*). *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research*, 10(2), 84–103. <https://doi.org/10.21776/ub.jpacr.2021.010.02.584>
- Mulherkar, T., Ginwala, R., Khan, Z. K., & Jain, P. (2021). Apigenin as Anti-TNF Alpha Agent. *Journal of AIDS and HIV Treatment*, 3(3), 49–53. <https://doi.org/10.33696/aids.3.023>
- N. H., H., N., P., S H R, H., A., S., Z., I., & K. S., M. (2017). Standardization of *Orthosiphon stamineus* Raw Material and Extracts for Anti-Uterine Fibroid. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(4), 512–515. <https://doi.org/10.25258/phyto.v9i4.8123>
- Nassef, Y. E., Hamed, M. A., & Aly, H. F. (2014). Inflammatory cytokines, apoptotic, tissue injury and remodeling biomarkers in children with congenital heart disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29, 145–149. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0341-0>

- Nazir, E. (2020). Efek Immunostimulan Ekstrak Etanol Daun Seledri terhadap Mencit Putih Jantan. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, 9(1), 1–7.
<https://doi.org/10.51887/jpfi.v9i1.788>
- Negm, A., Mersal, E. A., Dawood, A. F., Abd El-Azim, A. O., Hasan, O., Alaqidi, R., Alotaibi, A., Alshahrani, M., Alheraiz, A., & Shawky, T. M. (2025). Multifaceted Cardioprotective Potential of Reduced Glutathione Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity via Modulating Inflammation–Oxidative Stress Axis. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(7), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/ijms26073201>
- Nilasari, N., Rafi, M., & Mulyati, A. H. (2022). *Profil Metabolit (Fenol total dan Spektrum FT-IR) Pegagan (Centella asiatica) Berdasarkan Lokasi Tumbuh.* xx(xx), 1–9.
- Nomi, A. G., Handayani, H., Khuluk, R. H., Karomah, A. H., Wulansari, L., Yuliana, N. D., Rohaeti, E., & Rafi, M. (2024). Antioxidant activity and metabolite changes in *Centella asiatica* with different drying methods using FTIR- and quantitative HPLC-based metabolomics. *International Food Research Journal*, 31(1), 228–238. <https://doi.org/10.47836/ifrj.31.1.20>
- Noval, N., Kuncahyo, I., Pratama, A. F. S., Nabillah, S., & Hatmayana, R. (2021). Formulasi Sediaan Tablet Effervescent dari Ekstrak Etanol Tanaman Bundung (*Actionoscirpus grossus*) sebagai Antioksidan: Formulation Effervescent Tablets of Bundung Plants (*Actinoscirpus grossus*) Ethanol Extract as a Antioxidant. *Jurnal Surya Medika (JSM)*, 7(1), 128–139.
<https://doi.org/10.33084/jsm.v7i1.2649>
- Pahwa, S., Sharma, R., & Singh, B. (2017). Role of Glutathione S-Transferase in Coronary Artery Disease Patients with and Without Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 5–8.
<https://doi.org/10.7860/jcdr/2017/23846.9281>

- Pakki, E., Sumarheni, S., Aisyah, F., Ismail, I., & Safirahidzni, S. (2016). Formulasi Nanopartikel Ekstrak Bawang Dayak (*Eleutherine americana* (Aubl) Merr) dengan Variasi Konsentrasi Kitosan-Tripolifosfat (TPP). *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*, 3(4), 251–263. <https://doi.org/10.25026/jtpc.v3i4.113>
- Patil, S. V., Halikatti, S. I., Hiremath, S. M., Babalad, H. B., Sreenivasa, M. N., Hebsur, N. S., & Somanagouda, G. (2012). Effect of organics on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in vertisols. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 25(3), 326–331.
- Perrone, A., Giovino, A., Benny, J., & Martinelli, F. (2020). Advanced glycation end products (AGEs): biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–18.
- Pramono, S., & Ajiastuti, D. (2004). Standardisasi ekstrak herba Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) berdasarkan kadar asiaticosida secara KLT-densitometri. *Majalah Farmasi Indonesia*, 15(3), 119–123.
- Prasad, K. (2021). AGE-RAGE Stress and Coronary Artery Disease. *International Journal of Angiology*, 30(1), 4–14. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1721813>
- Putri, C. E., Wulandari, D. M., Hasyim, U. H., Hasyim, D. I., & Ramadhan, M. S. (2024). Optimasi Waktu Maserasi Pada Ekstraksi Daun Pegagan (*Centella Asiatica*) Terhadap Uji Aktivitas Antioksidan. *Seminar Nasional Sains Dan Teknologi*, 2(1), 1–10.
- R. K. Bachheti, L. A. Worku, Y. H. G. et al. (2022). *Retracted: Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases with Plant Phytochemicals: A Review. 2022.*
- Rahmi, I. A., Noviyanto, F., & Pratiwi, D. (2017). Uji Efektivitas Ekstrak Etanol 70% Herba Seledri (*Apium graveolens*, L.) Sebagai Diuretik Pada Tikus Putih Jantan Galur Sprague Dawley.

Farmagazine, IV(1), 42–49.

- Rani, I., Pradono, D. I., & Darusman, L. K. (2011). MIKROENKAPSULASI EKSTRAK FORMULA PEGAGAN-KUMIS KUCING-SAMBILOTO SEBAGAI INHIBITOR Angiotensin IConverting Enzyme SECARA In Vitro. *Cefars : Jurnal Agribisnis Dan Pengembangan Wilayah*, 3(1), 11–24.
<http://jurnal.unismabekasi.ac.id/index.php/cefars/article/view/84>
- Rubio, C. P., & Cerón, J. J. (2021). Spectrophotometric assays for evaluation of Reactive Oxygen Species (ROS) in serum: General concepts and applications in dogs and humans. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 226.
<https://doi.org/10.1186/s12917-021-02924-8>
- Rungratanawanich, W., Qu, Y., Wang, X., Essa, M. M., & Song, B.-J. (2021). Advanced glycation end products (AGEs) and other adducts in aging-related diseases and alcohol-mediated tissue injury. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(2), 168–188. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00561-7>
- Samananda, L., Waikhom, S., & Singh, S. (2024). Centella asiatica and its bioactive compounds : a comprehensive approach to managing hyperglycemia and associated disorders. *Discover Plants*. <https://doi.org/10.1007/s44372-024-00070-7>
- Samudra, A., Ramadhani, N., Sani, F. K., Lestari, G., & Nugroho, B. H. (2021). Formulasi Nanopartikel Kitosan Ekstrak Metanol Alga Laut Coklat (*Sargassum hystrix*) dengan Metode Gelasi Ionik. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 7(1), 92–99.
<https://doi.org/10.51352/jim.v7i1.428>
- Saputra, O., & Fitria, T. (2016). Khasiat daun seledri (*Apium graveolens*) terhadap tekanan darah tinggi pada pasien hiperkolestrolemia. *Jurnal Majority*, 5(2), 120–125.
- Seo, H. S., Sikder, M. A., Lee, H. J., Ryu, J., & Lee, C. J. (2014). Apigenin inhibits

tumor necrosis factor- α -induced production and gene expression of mucin through regulating nuclear factor- κ B signaling pathway in airway epithelial cells. *Biomolecules and Therapeutics*, 22(6), 525–531.

<https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.094>

Shaito, A., Thuan, D. T. B., Phu, H. T., Nguyen, T. H. D., Hasan, H., Halabi, S., Abdelhady, S., Nasrallah, G. K., Eid, A. H., & Pintus, G. (2020). Herbal Medicine for Cardiovascular Diseases: Efficacy, Mechanisms, and Safety. *Frontiers in Pharmacology*, 11(April), 1–32.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00422>

Sharma, C., Kaur, A., Thind, S. S., Singh, B., & Raina, S. (2015). Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 7561–7576.

<https://doi.org/10.1007/s13197-015-1851-y>

Shen, C. Y., Lu, C. H., Wu, C. H., Li, K. J., Kuo, Y. M., Hsieh, S. C., & Yu, C. L. (2020). The development of maillard reaction, and advanced glycation end product (Age)-receptor for age (rage) signaling inhibitors as novel therapeutic strategies for patients with age-related diseases. *Molecules*, 25(23).

<https://doi.org/10.3390/molecules25235591>

SHIN, H.-S., KANG, S.-I., YOON, S.-A., KO, H.-C., & KIM, S.-J. (2012). Sinensetin Attenuates LPS-Induced Inflammation by Regulating the Protein Level of I κ B- α . *Food & Nutrition Science Notes*, 76(4), 847–849.

Shukla, S., Shankar, E., Fu, P., MacLennan, G. T., & Gupta, S. (2015). Suppression of NF- κ B and NF- κ B-regulated gene expression by apigenin through I κ B α and IKK pathway in TRAMP mice. *PLoS ONE*, 10(9), 1–17.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138710>

Silva, L. B., dos Santos Neto, A. P., Maia, S. M. A. S., dos Santos Guimarães, C.,

- Quidute, I. L., Carvalho, A. de A. T., Júnior, S. A., & Leão, J. C. (2019). The role of TNF- α as a proinflammatory cytokine in pathological processes. *The Open Dentistry Journal*, 13(1). <https://doi.org/10.2174/1874210601913010332>
- Simanjuntak, K. (2012). PERAN ANTIOKSIDAN FLAVONOID DALAM MENINGKATKAN KESEHATAN. *Jurnal Bina Widya*, 23(3), 135–140. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.1988.tb00228.x>
- Singh, V., Kaur, R., Kumari, P., Pasricha, C., & Singh, R. (2023). ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. *Clinica Chimica Acta*, 548, 117487. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117487>
- Song, Q., Liu, J., Dong, L., Wang, X., & Zhang, X. (2021). Novel advances in inhibiting advanced glycation end product formation using natural compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 140(January), 111750. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111750>
- Sreekumar, S., Goycoolea, F. M., Moerschbacher, B. M., & Rivera-Rodriguez, G. R. (2018). Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23064-4>
- Sudarsono, D. G., Subagus, W., Imono, A. D., & Purnomo. (2002). *Tumbuhan Obat II*. Penerbit Pusat Studi Obat Tradisional UGM.
- Sulastri, E., & Oktaviani, C. (2015). Formulasi Mikroemulsi Ekstrak Bawang Hutan dan Uji Aktivitas Antioksidan. *Jurnal Pharmascience Research Article*, 2(2), 1–14. <http://jps.ppjpu.unlam.ac.id/>
- Sun, M., Chen, M., Dawood, F., Zurawska, U., Li, J. Y., Parker, T., Kassiri, Z., Kirshenbaum, L. A., Arnold, M., & Khokha, R. (2007). Tumor necrosis factor- α mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload

- state. *Circulation*, 115(11), 1398–1407.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.643585>
- Sunani, S., & Hendriani, R. (2023). Classification and Pharmacological Activities of Bioactive Tannins. *Indonesian Journal of Biological Pharmacy*, 3(2), 130–136.
<https://jurnal.unpad.ac.id/ijbp>
- Supomo, Idriana, Eka, A., Indra, Huda, M., & Warnida, H. (2021). AKTIVITAS ANTI JAMUR FRAKSI AKTIF EKSTRAK ETANOL UMBI BAWANG RAMBUT (*Allium chinense* G.Don) TERHADAP JAMUR *Candida albicans*. *Jurnal Ilmu Kesehatan*, 4(2), 45–49.
- Surahmaida, S., Umarudin, U., & Junairiah, J. (2019). Senyawa Bioaktif Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus*). *Jurnal Kimia Riset*, 4(1), 81–88.
<https://doi.org/10.20473/jkr.v4i1.13176>
- Suryani, N. C., Permana, D. G. M., & Jambe, A. A. G. N. A. (2016). PENGARUH JENIS PELARUT TERHADAP KANDUNGAN TOTAL FLAVONOID DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN MATOA (*Pometia pinnata*). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 5(1), 1–10.
- Tan, M., Yin, Y., Ma, X., Zhang, J., Pan, W., Tan, M., Zhao, Y., Yang, T., Jiang, T., & Li, H. (2023). Glutathione system enhancement for cardiac protection: pharmacological options against oxidative stress and ferroptosis. *Cell Death and Disease*, 14(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05645-y>
- Tan, Y., Zhang, Z., Zheng, C., Wintergerst, K. A., Keller, B. B., Cai, L., & Pediatric, C. (2021). Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nature Reviews Cardiology*, 17(9), 585–607. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0339-2>.Mechanisms
- Tanaka, N., Yonekura, H., Yamagishi, S., Fujimori, H., Yamamoto, Y., & Yamamoto, H. (2000). The receptor for advanced glycation end products is

induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor- α through nuclear factor- κ B, and by 17 β -estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25781–25790.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M001235200>

Twarda-Clapa, A., Olczak, A., Biłkowska, A. M., & Koziołkiewicz, M. (2022). Advanced glycation end-products (AGEs): Formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs. *Cells*, 11(8), 1312.
<https://doi.org/10.3390/cells11081312>

Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A. H., & Jaremko, M. (2020). Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*, 25(22), 1–39. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>

Wijayakusuma, H. (2011). *Penyembuhan dengan Temu Putih (Curcuma zedoaria (Berog)Rosc)*. Indocamp.

Wilson, B. K., & Prud'homme, R. K. (2021). Nanoparticle size distribution quantification from transmission electron microscopy (TEM) of ruthenium tetroxide stained polymeric nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 604, 208–220.

Wulandari, L., Permana, B. D., & Kristiningrum, N. (2020). Determination of total flavonoid content in medicinal plant leaves powder using infrared spectroscopy and chemometrics. *Indonesian Journal of Chemistry*, 20(5), 1044–1051.
<https://doi.org/10.22146/ijc.47047>

Yamagata, K., Hashiguchi, K., Yamamoto, H., & Tagami, M. M. (2019). Dietary Apigenin Reduces Induction of LOX-1 and NLRP3 Expression, Leukocyte Adhesion, and Acetylated Low-Density Lipoprotein Uptake in Human Endothelial Cells Exposed to Trimethylamine-N-Oxide. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 74(6), 558–565.

- Yunita, E., & Sari, D. R. A. P. (2022). Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Fraksi Etil Asetat dan Fraksi N-Heksan Daun Pegagan (*Centella Asiatica* L.). *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 8(1), 58–66.
<https://doi.org/10.35311/jmpi.v8i1.167>
- Zhang, L., Zheng, J., Zhang, L., Gong, X., Huang, H., Wang, C., Wang, B., Wu, M., Li, X., Sun, W., Liu, Y., & Wan, J. (2011). Protective effects of asiaticoside on septic lung injury in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(6), 519–525.
- Zhang, S., & Wang, C. (2023). Precise Analysis of Nanoparticle Size Distribution in TEM Image. *Methods and Protocols*, 6(4), 1–6.
<https://doi.org/10.3390/mps6040063>
- Zhang, Z., Fan, W., Yang, G., Xu, Z., Wang, J., Cheng, Q., & Yu, M. (2017). Risk of tuberculosis in patients treated with TNF- α antagonists: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*, 7(3), e012567.
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-012567>
- Zheng, C., & Qin, L. (2007). Chemical components of *Centella asiatica* and their bioactivities. *PubMed*, 5(3), 348–351. <https://doi.org/10.3736/jcim20070324>
- Zhou, Q., Cheng, K.-W., Gong, J., Li, E. T. S., & Wang, M. (2019). Apigenin and its methylglyoxal-adduct inhibit advanced glycation end products-induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 166(August), 231–241.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.05.027>