

AKTIVITAS ANTIGENOTOKSIK EUGENOL DI TINGKAT SELULER: STUDI PADA KHAMIR *Schizosaccharomyces pombe*

ALDY MUHAMMAD ZULFIQRI



MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Aktivitas Antigenotoksik Eugenol di Tingkat Seluler: Studi pada Khamir *Schizosaccharomyces pombe*” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Desember 2024

Aldy Muhammad Zulfiqri
NIM. G3501222023



RINGKASAN

ALDY MUHAMMAD ZULFIQRI. Aktivitas Antigenotoksik Eugenol di Tingkat Seluler: Studi pada Khamir *Schizosaccharomyces pombe*. Dibimbing oleh RIKA INDRI ASTUTI dan M. EKA PRASTYA.

Genotoksin merupakan agen senyawa yang dapat merusak materi genetik sel (RNA dan DNA) sehingga menyebabkan mutasi genetik. Paparan senyawa genotoksin dapat memicu akumulasi radikal bebas berupa molekul *Reactive Oxygen Species* (ROS) seluler. Produksi ROS seluler dan paparan ROS dari lingkungan yang berlebih mengakibatkan kerusakan pada struktur dan fungsi DNA. Kerusakan DNA dapat menyebabkan kelainan struktur kromosom yang diikuti dengan kesalahan dalam replikasi DNA. Paparan senyawa genotoksin pada sistem seluler tubuh manusia dapat berdampak negatif pada fungsi DNA yang dapat memicu terjadinya penyakit degeneratif. Strategi yang efektif untuk menanggulangi toksisitas ROS adalah aplikasi senyawa dengan aktivitas antioksidan. Senyawa tersebut diketahui mampu berinteraksi dengan radikal bebas sehingga dapat menghentikan reaksi berantai dari ROS sebelum merusak sel dengan menginduksi reaksi molekuler resistensi terhadap cekaman oksidatif. Salah satu tanaman yang menjadi sumber antioksidan alami adalah cengkeh (*Syzygium aromaticum*).

Eugenol merupakan senyawa bioaktif alami yang menjadi penyusun utama minyak bunga dan daun cengkeh. Eugenol diketahui memiliki beragam bioaktivitas seperti antioksidan, antiinflamasi, antitumor, dan antimikroba. Penelitian terkait aktivitas antigenotoksik dari eugenol asal cengkeh (*S. aromaticum*) belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan menentukan aktivitas antigenotoksik senyawa bioaktif eugenol asal cengkeh (*S. aromaticum*) di level seluler dan molekuler dengan analisis transkriptomik pada khamir *Schizosaccharomyces pombe* sebagai organisme model.

Penelitian ini diawali dengan menguji aktivitas antioksidan dari eugenol secara *in vitro* menggunakan radikal 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Eugenol kemudian diuji efek antigenotoksiknya pada organisme model khamir *S. pombe*. Uji antigenotoksik pada khamir ini dilakukan dengan memberikan perlakuan genotoksik berupa paparan sinar ultraviolet (UV) dan senyawa *Ethyl methanesulfonate* (EMS) dengan konsentrasi tertentu. Efek antigenotoksik dari eugenol diamati dari viabilitas sel *S. pombe* setelah diberi paparan genotoksin tersebut. Efek antigenotoksik dari eugenol kembali diuji secara *in vitro* menggunakan metode DNA *Nicking Assay*. Uji tersebut dilakukan menggunakan materi genetik berupa plasmid pBR322 yang diinduksi genotoksik berupa reagen fenton dan diberi perlakuan eugenol. Efek antigenotoksik dari eugenol selanjutnya dianalisis secara transkriptomik pada sel khamir *S. pombe* dengan metode *Principal Component Analysis* dan *Heatmap*. Analisis ini dilakukan berdasarkan respons dari sel khamir tersebut terhadap cekaman oksidatif dan perbedaan pola transkriptomik akibat pengaruh perlakuan eugenol.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa eugenol memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar $26 \pm 0,4 \mu\text{g. mL}^{-1}$ yang termasuk kelompok antioksidan yang sangat kuat. Aktivitas antioksidan yang sangat kuat ini dapat menangkal efek dari radikal bebas karena senyawa tersebut dapat mendonorkan atom hidrogen

melalui mekanisme transfer elektron. Pengamatan viabilitas sel *S. pombe* setelah diberi perlakuan agen gentoksin berupa UV dan EMS menunjukkan bahwa penambahan eugenol pada konsentrasi 10, 20, dan 40 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam kultur dapat meningkatkan viabilitas sel *S. pombe*. Viabilitas sel khamir tersebut meningkat sebanyak 1,94 kali lipat dibandingkan dengan kontrol pada jam ke-0 ($2 \times 10^6 \pm 5,94 \times 10^5 \text{ CFU.mL}^{-1}$) dan 3,20 kali lipat dibandingkan kontrol pada jam ke-12 ($2,5 \times 10^6 \pm 8,6 \times 10^6 \text{ CFU.mL}^{-1}$) setelah perlakuan UV, dan meningkat sebanyak 4,2 kali lipat dan 3,4 kali lipat dibandingkan kontrol ($1,3 \times 10^6 \pm 4,2 \times 10^4 \text{ CFU. mL}^{-1}$) setelah diberi perlakuan EMS pada konsentrasi 0,25 dan 0,5%. Hasil uji antigenotoksik berdasarkan metode DNA *nicking assay* menunjukkan bahwa perlakuan eugenol pada konsentrasi 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ mampu menjaga stabilitas struktur plasmid uji ditunjukkan dengan dengan ketebalan pita hasil elektroforesis yang lebih tebal dibandingkan dengan kontrol atau konsentrasi eugenol yang lain. Perbedaan konsentrasi DNA ini dipengaruhi oleh kemampuan berbagai konsentrasi eugenol dalam menetralkan toksisitas reagen yang digunakan.

Hasil analisis PCA berdasarkan ontologi gen berhasil mengelompokkan gen-gen terkait mekanisme perbaikan DNA (*DNA damage repair*) yang menurun (*down*) dan meningkat (*up*) ekspresinya terhadap pemberian eugenol. Eugenol dapat meregulasi berbagai ekspresi gen yang berkaitan dengan peningkatan kemampuan *S. pombe* dalam mengurangi dampak kerusakan DNA akibat paparan ROS di lingkungan. Perubahan ekspresi gen berkaitan dengan tiga respon meliputi DNA *mismatch repair*, *base excision repair* dan *nucleotide excision repair*. Hasil analisis PCA dan *Heatmap* menunjukkan perlakuan eugenol dapat memengaruhi ekspresi gen terkait *DNA Damage Response* antara lain gen *exo1*, *mlh1*, *dpb2*, *rad16*, dan *tfb1*. Gen yang terekspresi tersebut berkaitan dengan memperbaiki kesalahan pencocokan DNA pada proses replikasi DNA, menjaga kestabilan genom, dan memperbaiki kerusakan DNA.

Kata Kunci: Antioksidan, Cengkeh, *Syzygium aromaticum*, *Principal Component Analysis*, Transkriptomik



SUMMARY

ALDY MUHAMMAD ZULFIQRI. Antigenotoxic Activity of Eugenol at the Cellular Level: Study on the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Supervised by RIKA INDRI ASTUTI and M. EKA PRASTYA.

Genotoxins are compound agents that can damage cell genetic material (RNA and DNA), causing genetic mutations. Exposure to genotoxin compounds can trigger the accumulation of free radicals in the form of cellular Reactive Oxygen Species (ROS) molecules. The production of cellular ROS and excessive exposure to ROS from the environment result in damage to the structure and function of DNA. DNA damage can cause chromosomal structural abnormalities followed by errors in DNA replication. Exposure to genotoxin compounds in the cellular system of the human body can have a negative impact on DNA function that can trigger degenerative diseases. An effective strategy to mitigate ROS toxicity is the application of compounds with antioxidant activity. These compounds are known to be able to interact with free radicals so that they can stop the chain reaction of ROS before damaging cells by inducing molecular reactions of resistance to oxidative stress. One plant that is a source of natural antioxidants is clove (*Syzygium aromaticum*).

Eugenol is a natural bioactive compound that is the main constituent of clove flower and leaf oil. Eugenol is known to have various bioactivities such as antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, and antimicrobial. Research related to the antigenotoxic activity of eugenol from clove (*S. aromaticum*) has not been widely conducted. This study aims to determine the antigenotoxic activity of bioactive compounds of eugenol from clove (*S. aromaticum*) at the cellular and molecular levels by transcriptomic analysis on the yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a model organism.

This study was initiated by testing the antioxidant activity of eugenol in vitro using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical. Eugenol was then tested for its antigenotoxic effect on the yeast model organism *S. pombe*. The antigenotoxic test on this yeast was carried out by giving genotoxic treatment in the form of exposure to ultraviolet light (UV) and Ethyl methanesulfonate (EMS) compounds with certain concentrations. The antigenotoxic effect of eugenol was observed from the viability of *S. pombe* cells after being exposed to the genotoxin. The antigenotoxic effect of eugenol was again tested in vitro using the DNA *Nicking Assay* method. The test was carried out using genetic material in the form of plasmid pBR322 which was induced genotoxic in the form of fenton reagent and treated with eugenol. The antigenotoxic effect of eugenol was then analyzed transcriptomically on *S. pombe* yeast cells with Principal Component Analysis and Heatmap methods. This analysis was carried out based on the response of the yeast cells to oxidative stress and differences in transcriptomic patterns due to the effect of eugenol treatment.

The results showed that eugenol has antioxidant activity with an IC_{50} value of $26 \pm 0.4 \mu\text{g. mL}^{-1}$ which belongs to the group of very strong antioxidants. This very strong antioxidant activity can counteract the effects of free radicals because the compound can donate hydrogen atoms through an electron transfer mechanism.

Observation of cell viability of *S. pombe* after being treated with genotoxin agents such as UV and EMS showed that the addition of eugenol at concentrations of 10, 20, and 40 $\mu\text{g/mL}$ into the culture can increase the cell viability of *S. pombe*. The viability of the yeast cells increased by 1.94-fold compared to the control at hour 0 ($2 \times 10^6 \pm 5.94 \times 10^5 \text{ CFU.mL}^{-1}$) and 3.20-fold compared to the control at hour 12 ($2.5 \times 10^6 \pm 8.6 \times 10^6 \text{ CFU.mL}^{-1}$) after UV treatment, and increased by 4.2-fold and 3.4-fold compared to the control ($1.3 \times 10^6 \pm 4.2 \times 10^4 \text{ CFU.mL}^{-1}$) after being treated with EMS at concentrations of 0.25 and 0.5%. Antigenotoxic test results based on DNA nicking assay method showed that eugenol treatment at a concentration of 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ was able to maintain the stability of the test plasmid structure indicated by the thickness of the electrophoresis band which was thicker than the control or other eugenol concentrations. The difference in DNA concentration is influenced by the ability of various concentrations of eugenol in neutralizing the toxicity of the reagents used.

The results of PCA analysis based on gene ontology successfully grouped genes related to DNA damage repair mechanisms that decreased (down) and increased (up) their expression to eugenol. Eugenol can regulate various gene expressions related to increasing the ability of *S. pombe* to reduce the impact of DNA damage due to exposure to ROS in the environment. Changes in gene expression are related to three responses including DNA mismatch repair, base excision repair and nucleotide excision repair. The results of PCA and Heatmap analysis show that eugenol treatment can affect the expression of genes related to DNA Damage Response including *exo1*, *mlh1*, *dpb2*, *rad16*, and *tfb1* genes. The expressed genes are related to repairing matching errors in the DNA replication process, maintaining genome stability, and repairing DNA damage.

Keywords: Antioxidants, Clove, *Syzygium aromaticum*, Principal Component Analysis, Transcriptomics



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2024
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.

**AKTIVITAS ANTIGENOTOKSIK EUGENOL DI TINGKAT
SELULER: STUDI PADA KHAMIR *Schizosaccharomyces pombe***

ALDY MUHAMMAD ZULFIQRI

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister pada
Program Studi Mikrobiologi

**MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





@Hak cipta milik IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tim Penguji pada Ujian Tesis:
1 Dr. Syaefudin, S.Si., M.Si.

Judul Tesis : Aktivitas Antigenotoksik Eugenol di Tingkat Seluler: Studi pada Khamir *Schizosaccharomyces pombe*
Nama : Aldy Muhammad Zulfiqri
NIM : G3501222023

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Dr. Rika Indri Astuti, S.Si.,M.Si

Pembimbing 2:
Dr. M. Eka Prastya, S.Si.,M.Si.


Digitally signed by:
Rika Indri Astuti
Date: 19 Dec 2024 09:26:26 WIB
Verify at [dsign.ipb.ac.id](#)


Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini MS.
NIP.196203271987032001

Dekan Fakultas MIPA:
Dr. Berry Juliandi S.Si., M.Si
NIP. 19780723 2007011001.


Digitally signed by:
Anja Meryandini
Date: 19 Dec 2024 16:32:02 WIB
Verify at [dsign.ipb.ac.id](#)

Digitally signed by:
Berry Juliandi
Date: 19 Dec 2024 10:32:02 WIB
Verify at [dsign.ipb.ac.id](#)

Tanggal Ujian: 25 November 2024

Tanggal Lulus:

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan September sampai bulan Mei 2024 ini dengan judul “Aktivitas Antigenotoksik Eugenol di Tingkat Seluler: Studi pada Khamir *Schizosaccharomyces pombe*”.

1. Dr. Rika Indri Astuti, S.Si.,M.Si. selaku dosen pembimbing pertama saya dan Dr. M. Eka Prastya, S.Si.,M.Si. selaku dosen pembimbing kedua saya atas segala dukungan, nasehat, saran yang membangun dan selalu menemani saya selama pengerjaan dan penulisan tesis.
2. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada penguji tesis saya yang telah memberikan koreksi dan saran demi perbaikan tesis ini.
3. Dosen dan Staff Departemen Biologi IPB University.
4. Laboran di Laboratorium Penelitian Bioprospeksi Mikrob Pusat Penelitian Bioteknologi IPB dan Laboratorium *Biotechnology Research Indonesian-The Netherlands* (BIORIN)
5. Ibu, Ayah, Kakak, Adik dan keluarga besarku atas segala kasih sayang, doa, dan dukungannya selama penyusunan tesis saya
6. Teman-teman tersayang yang telah mendukung dan menyemangati saya untuk menyelesaikan studi saya

Aldy Muhammad Zulfiqri

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Fenomena Genotoksik dan Genotoksin.....	4
2.2 Eugenol sebagai Agen Antioksidan dan Agen Antigenotoksik.....	5
2.3 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	7
2.4 <i>Reactive Oxygen Species</i> dan Antioksidan.....	8
2.5 Transkriptomik.....	9
III METODE	10
3.1 Kerangka Penelitian.....	10
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	10
3.3 Alat dan Bahan.....	11
3.4 Prosedur Kerja.....	11
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	13
4.1 Analisis Transkriptomik berbasis <i>Principal Component Analysis</i> (PCA).....	13
4.2 Analisis Data Transkriptomik: Analisis Gen berbasis <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway</i>	14
4.3 Aktivitas Antioksidan.....	18
4.4 Uji Antigenotoksik.....	18
4.5 Uji Antigenotoksik: <i>DNA Nicking Assay</i>	21
V SIMPULAN DAN SARAN	23
5.1 Simpulan.....	23
5.2 Saran.....	23
DAFTAR PUSTAKA	24
LAMPIRAN.....	31

DAFTAR TABEL

1	Potensi aktivitas eugenol	7
2	Nilai aktivitas antioksidan (IC ₅₀)	1

DAFTAR GAMBAR

Resiko genotoksik pada tingkat seluler dan potensinya dalam resiko kejadian penyakit	4
Struktur kimia eugenol (C ₁₀ H ₁₂ O ₂ ; 2-metoksi-4-2-propenil fenol)	5
Alur penelitian	10
Grafik pengelompokkan gen yang mengalami perubahan ekspresi setelah pemberian eugenol pada seluruh kelompok respon <i>Mismatch repair</i> (perbaikan kesalahan pasangan), <i>Base excision repair</i> (Perbaikan eksisi basa), dan <i>Nucleotide excision repair</i> (Perbaikan eksisi nukleotida).	13
Perubahan tingkat ekspresi gen-gen <i>S. pombe</i> yang diberi perlakuan eugenol (EU) 10 µg.mL ⁻¹ . Perubahan tingkat ekspresi terjadi gen-gen yang terlibat dalam mekanisme perbaikan DNA melalui <i>Mismatch Repair</i> . Sel khamir yang dikultur tanpa eugenol disebut kontrol (CN)	14
Perubahan tingkat ekspresi gen-gen <i>S. pombe</i> yang diberi perlakuan eugenol (EU) 10 µg.mL ⁻¹ . Perubahan tingkat ekspresi terjadi gen-gen yang terlibat dalam mekanisme perbaikan DNA melalui <i>Base Excision Repair</i> . Sel khamir yang dikultur tanpa eugenol disebut kontrol (CN).	16
Perubahan tingkat ekspresi gen-gen <i>S. pombe</i> yang diberi perlakuan eugenol (EU) 10 µg.mL ⁻¹ . Perubahan tingkat ekspresi terjadi gen-gen yang terlibat dalam mekanisme perbaikan DNA melalui <i>Nucleotide excision repair</i> . Sel khamir yang dikulturkan tanpa eugenol merupakan perlakuan kontrol (CN).	17
Pengaruh paparan (A) sinar UV dan (B) <i>ethyl methylsulfonate</i> terhadap pertumbuhan sel <i>S. pombe</i> dengan perlakuan eugenol (10, 20, 40 µg. mL ⁻¹) <i>S. pombe</i> yang dikultur tanpa eugenol dirancang sebagai perlakuan kontrol (C). Viabilitas sel dihitung dengan metode <i>Total Plate Count</i> (TPC) sebelum perlakuan UV dan setelah perlakuan UV	19
Pengaruh pemberian eugenol (10, 20, 40 µg.mL ⁻¹) terhadap plasmid pBR322 yang diberikan paparan reagen Fenton. Perlakuan plasmid yang hanya diberikan reagen Fenton digunakan sebagai kontrol.	21

DAFTAR LAMPIRAN

1	Komposisi media YES	32
2	Data Penelitian Anwar (2021)	32
3	Pengukuran dan Perhitungan Nilai IC ₅₀	32
4	Komposisi Reagen Fenton	38