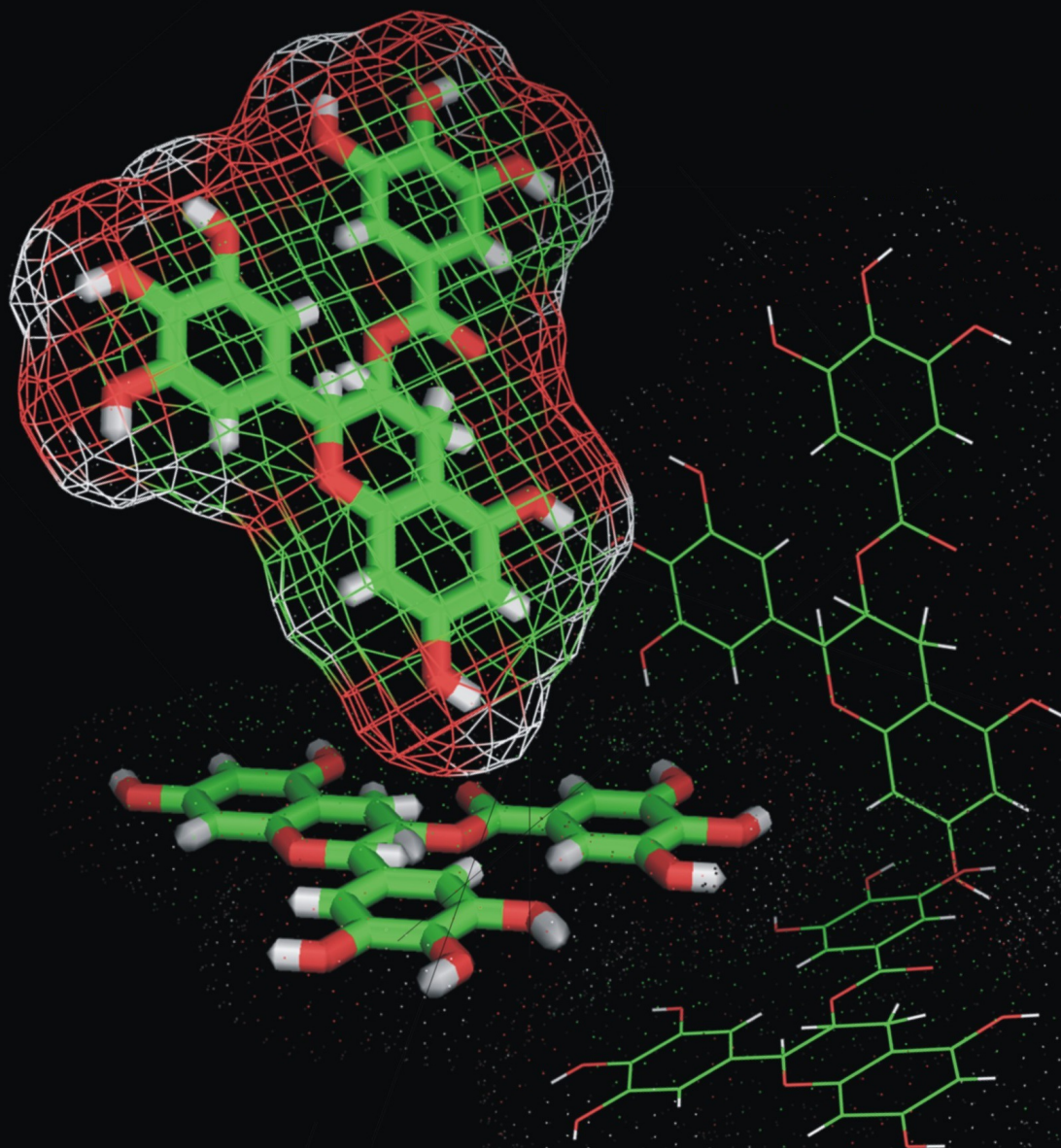


The Journal of
Experimental
Life Science

Discovering Living System Concept through Nano, Molecular and Cellular Biology



J. Exp. Life Sci.

Vol. 1

No. 1

Hal. 1-55

2011

Diterbitkan oleh
Program Pascasarjana Universitas Brawijaya
bekerjasama dengan
Masyarakat Nano Indonesia (MNI)

The Journal of Experimental Life Science

Discovering Living System Concept through Nano, Molecular and Cellular Biology

Dewan redaksi

Ketua Penyunting

M. Sasmito Djati, Dr. Ir. MS.

Anggota Penyunting

Aida Sartimbul, M.Sc. Ph.D - UB

Adi Santoso, M.Sc. Ph.D - LIPI

Nurul Taufiq, M.Sc. Ph.D - BPPT

Arifinnur Sugiharto, M.Sc. Ph.D -UB

Sukoso, Prof. MSc. Ph.D-UB

Etik Mardiyati, Dr. - BPPT

Soemarno, Ir., MS., Dr., Prof. - UB

Reviewer

Ahmad Faried, MD. Ph.D – UNPAD

Trinil Susilawati, Ir., MS., Dr., Prof. - UB

Muhaimin Rifai, Ph.D - UB

Rer.nat. Ronny Martien, Dr. – UGM

Moch. Ali, Dr. - UNRAM

Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D MED Sc - UB

Irwandi Jaswir, Prof. – UII Malaysia

Sarjono, Dr. - ITB

Muhammad Askari, Dr. – UTM Malaysia

Sutiman Bambang S., Dr., Prof. - UB

Moh. Aris Widodo, Sp.FK., Ph.D., Prof. - UB

Yanti, Dr. – UNIKA ATMAJAYA

Brian Yulianto, Dr. - ITB

Bambang Prijambudi, Dr. - ITB

Arief Boediono, drh., PhD., Prof. - IPB

M. Yedi Sumaryadi, Ir., Dr., Prof. - UNSOED

Wasmen Manalu, Dr., Prof. - IPB

Moch. Syamsul Arifin Zein, Ir., M.Si. - LIPI

Gono Semiadi, Ir. MSc. PhD. - LIPI

Yaya Rukayadi, MS., Dr. – Yonsei University Seoul

Muhaimin Rifa'i, Ph.D - UB

Widjiati, drh.,MS.,Dr. – UNAIR

Amin Setyo Leksono, S.Si.,M.Si.,Ph.D - UB

Editor Pelaksana

Afidatul Muji Astuti, S.Si.

Illustrator

Tegas Iman Prasojo, M.Si

Alamat Redaksi

Redaksi The Journal of Experimental Life Science
Gedung A, Lt.2, Program Pascasarjana Universitas Brawijaya
Jl. Mayor Jenderal Haryono 169, Malang, 65145
Telp: (0341) 571260 ; Fax: (0341) 580801
Email: jels@ub.ac.id
Web: <http://www.jels.org>

Daftar Isi

- Identifikasi Protein Adhesi Pili Proteus Mirabilis P355 dan Protein Reseptor pada Vesika Urinaria Kelinci** (Dian Chusna Mufida, Sumarno Sumarno, Sanarto Santoso) 1-6
DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2011.001.01.01>
- Identifikasi Molekul Adhesi Pili Pseudomonas aeruginosa pada Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Culture** (Dwi Yuni Nur Hidayati) 7-14
DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2011.001.01.02>
- Pengaruh Pemberian Kalsium terhadap Pertumbuhan Plasmodium falciparum in Vitro** (Verry Asfirizal, Soebaktiningsih Soebaktiningsih, Sudjari Sudjari, Sumarno Sumarno, Loeki Enggar Fitri) 15-19
DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2011.001.01.03>
- Pengaruh Outer Membrane Protein Helicobacter Pylori terhadap Perubahan Histopatologi Mukosa Lambung dan S-IgA pada Mus musculus Outbred Balb/C** (Yuniati Yuniati, Harijono Achmad, Sumarno Sumarno) 20-27
DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2011.001.01.04>
- Peran Puerarin terhadap Aktivitas Intra dan Ekstraseluler pada Kultur Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Pasca Induksi Leptin** (Mochamad Sasmito Djati, Satuman Satuman, Retty Ratnawati, Sri Widyarti, Erly Nur Aisyah, Noer Hasanah, Eko Puji Astuti, Ririn Rochmawati) 28-42
DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2011.001.01.05>
- Perkembangan Sel T Regulator Perifer dan Mekanisme Supresi in vitro** (Muhaimain Rifa'i) 43-47
DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2011.001.01.07>
- Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L.) Terhadap Aktivasi NF- κ B dan Ekspresi Protein (TNF- α , ICAM-1) pada Kultur Sel Endotel (HUVECs) Dipapar Ox-LDL** (Endah Kusuma Rastini, Mohammad Aris Widodo, Mohammad Saifur Rohman) 48-55
DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2011.001.01.06>

Identifikasi Protein Adhesi Pili *Proteus Mirabilis* P355 dan Protein Reseptor pada Vesika Urinaria Kelinci

Diana Chusna Mufida^{1*}, Sumarno², Sanarto Santoso³

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Negeri Jember, Jember

²Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

³Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Infeksi saluran kemih (ISK) merupakan infeksi nosokomial yang sering terjadi di rumah sakit. Penyebab ISK nosokomial ini diantaranya adalah *Proteus mirabilis* p355 dan sering dijumpai pada pasien yang memakai kateter. *Proteus mirabilis* mempunyai berbagai macam faktor virulensi, diantaranya adalah fimbria atau pili. Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi protein pili *Proteus mirabilis* (molekul adhesin) serta mencari protein reseptor bakteri tersebut pada epitel vesika urinaria kelinci. Penelitian ini dilakukan dengan isolasi protein pili, selanjutnya dilakukan uji hemaglutinasi dan uji hambat adhesi. Uji hambat adhesi mempergunakan protein pili yang telah dielektroelusi dan didialisa, disalutkan pada sel epitel vesika urinaria kelinci dengan dosis 400 µl, 200 µl, 100 µl, 50 µl, 25 µl, 12,5 µl dan 0 µl sebagai kontrol. Selanjutnya dilakukan identifikasi protein reseptor dengan cara menyalut bakteri *Proteus mirabilis* dengan matriks ekstra seluler dari epitel vesika urinaria kelinci. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya reaksi hemaglutinasi dari protein pili dengan berat 35,2 kDa dengan titer tertinggi 1/521. Hasil uji hambat adhesi epitel vesika urinaria yang disalut protein pili dengan berat 35,2 kDa menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis protein yang diberikan, semakin sedikit bakteri yang melekat pada epitel vesika urinaria. Penurunan ini terjadi secara signifikan dengan indeks regresi (r) = 0,95 dan p -value = 0,00. Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa protein pili *Proteus mirabilis* dengan berat molekul 35,2 kDa merupakan protein adhesin, sedangkan protein reseptor *Proteus mirabilis* diprediksi mempunyai berat molekul, 36 kDa, 24,5 kDa dan 24 kDa.

Kata kunci : adhesi, pili, protein reseptor, *Proteus mirabilis*

PENDAHULUAN

Infeksi saluran kemih (ISK) merupakan penyakit yang sering didiagnosa pada pasien yang pulang dari rumah sakit dan merupakan infeksi nosokomial yang sering terjadi. Menurut *National Nosocomial Infection Surveillance* (NNIS), jumlah penderita ISK sekitar 35% dari seluruh infeksi nosokomial [1]. Tingkat infeksi saluran kemih yang tinggi karena infeksi nosokomial berhubungan dengan pemakaian kateter (*indwelling catheter*). Pemakaian kateter ini dapat menyebabkan bakteriuria yang asimtomatik dan selanjutnya dapat menyebabkan bakteremia lebih dari 5% [1]. Studi yang dilakukan oleh Daifuku dan Stamm, menunjukkan bahwa pada pasien yang memakai kateter adhesi *Proteus mirabilis* ke sel vesika urinaria mengalami peningkatan [2].

Proteus mirabilis termasuk dalam tribe *Proteae*, famili *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini merupakan salah satu Gram negatif penyebab

terbanyak infeksi saluran kemih. Infeksi saluran kemih yang disebabkan *Proteus mirabilis* bersifat persisten, sulit diterapi dan dapat berakibat fatal. Bakteri ini dapat menimbulkan komplikasi antara lain *pyelonephritis* akut dan kronik, *cystitis*, pembentukan batu di ginjal dan vesika urinaria [3]. *Proteus mirabilis* mempunyai beberapa faktor virulensi, yaitu fimbria atau pili, hemolisin, *flagella*, *immunoglobulin A protease deaminase* serta *urease* [3].

Proses infeksi mikroorganisme dapat melalui beberapa tahap, yaitu dimulai dengan pelekatan atau adhesi pada permukaan sel inang, dan selanjutnya dapat terjadi invasi dan menyebar secara lokal atau sistemik. Molekul adhesi (perantara pelekatan bakteri ke inang) pada bakteri bisa terletak di pili atau di *outer membrane protein* (OMP). Pelekatan bakteri ke sel inang ini bersifat spesifik [4].

Molekul adhesi pada setiap bakteri mempunyai berat molekul yang berbeda-beda. Sumarno, berhasil mengisolasi molekul adhesi pili *V. cholera* dengan berat molekul 38 kDa dan dari OMP dengan berat molekul 76 kDa [5].

Reseptor dari sel inang pada umumnya merupakan residu dari karbohidrat yaitu gliko-

* Alamat korespondensi penulis:

Diana Chusna

e-mail : chusna_diana@yahoo.com

Alamat : Jl. Kalimantan 37 Jember, Jawa Timur, 68121

protein atau glikolipid. Sumarno, menemukan molekul reseptor *Vibrio cholera* pada enterosit tikus putih mempunyai berat molekul 62 kDa, 28,9 kDa, 13,5 kDa, 12,7 kDa dan 10 kDa [5]. Berdasarkan uraian diatas, maka penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi protein pili *Proteus mirabilis* (molekul adhesin) serta mencari protein reseptor bakteri tersebut pada epitel vesika urinaria kelinci.

METODE PENELITIAN

Metode kultur *Proteus mirabilis*

Bakteri yang dipergunakan adalah *Proteus mirabilis* galur lokal yang berasal dari urin pasien bakteriuria. Bakteri ini diisolasi menu-rut metode Ehara [6]. Berdasarkan metode ini, bakteri dibiakkan pada media media TCG yang memperkaya pertumbuhan pili *Proteus mirabilis*. Media ini megandung 0,02% *thioprolone*, 0,3% NaHCO_3 , 0,15 *bactotrytonr*, 0,2% *yeast extract*, 0,5% NaCl , 2% *bacto agar* dan 1 mM EGTA. Media agar dibuat dalam botol berkapasitas 250 ml secara miring sebanyak 50 ml agar. *Proteus mirabilis* yang dipilih ditanam pada media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang dieramkan pada suhu 37 °C selama empat jam. Kemudian suspensi bakteri sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam setiap botol yang mengandung media TCG. Selanjutnya dilakukan pengeraman pada suhu 37 °C selama 48 jam.

Metode Isolasi Pili *Proteus mirabilis*

Pili dipanen dari 50 botol biakan bakteri. Hasil koleksi bakteri ditambahkan *Trichloro Acetic Acid* (TCA) sampai konsentrasi 3%. Setelah dikocok rata kemudian diletakkan pada suhu kamar selama satu jam dan setiap 15 menit dikocok. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Pelet diambil dan diresuspensi dengan cairan PBS pH 7,4 dengan perbandingan 1:10. Bakteri dicukur dengan menggunakan *mixer* buatan sendiri. Bakteri dicukur dengan kecepatan penuh selama satu menit, diulang sampai lima kali dengan masa istirahat satu menit. Hasil pencukuran tersebut dilakukan sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 12000 rpm suhu 4 °C. Pili yang terletak dibagian atas diambil, endapan disuspensi dengan larutan dan cara yang sama kemudian dikumpulkan dengan cara mencukur ulang beberapa kali, sampai dihasilkan supernatan yang menunjukkan tes aglutinasi negatif.

***Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)**

Monitoring berat molekul dikerjakan menggunakan SDS-PAGE metode Laemli [7]. Sampel

protein dipanaskan pada suhu 100 °C selama lima menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris HCl pH 6,8, *2-mercapto ethanol* 5%, *sodium dodecyl sulfate* 2,5%, gliserol 10% dengan warna pelacak *bromophenol blue*. Dipergunakan *mini slab gel* 12,5% dengan *stacking gel* 4%. Voltase yang digunakan 125 mV. Bahan yang digunakan adalah *coomasive brilliant blue* dan molekul standar *Sigma low range marker*.

Metode Pemurnian Protein Hemaglutinin Pili *Proteus mirabilis*

Metode yang dilakukan seperti yang telah dikerjakan oleh Ehara dengan modifikasi Sumarno [5]. Gel hasil SDS-PAGE dari pili hasil koleksi, dipotong lurus pada berat molekul yang diinginkan dan potongan pita tersebut dikumpulkan kemudian dimasukkan ke dalam membran dialisa memakai cairan penyangga elektroforesis, yaitu *running buffer*. Selanjutnya dilakukan elektroelusi dengan menggunakan elektroforesis ontal apparatus aliran 125 mV selama 25 menit. Hasil elektroforesis didialisa dengan cairan penyangga PBS pH 7,4 selama 2 kali 24 jam masing-masing 1 liter dan diganti dua kali. Cairan dialisa tersebut selanjutnya diuji hemaglutinasi.

Metode Uji Hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi dikerjakan menurut petunjuk dari Li, *et al.* [9]. Pengenceran sampel dibuat konsentrasi ½ pada mikroplat V, tiap sumur volumenya 50 µl. Ditambahkan suspensi darah merah mencit konsentrasi 0,5% dengan volume sama pada setiap sumur mikroplat V. Kemudian digoyang dengan *rotator plate* selama satu menit. Selanjutnya diletakkan dalam suhu kamar selama satu jam. Besar titer ditentukan dengan pengamatan aglutinasi darah merah pada pengenceran yang terendah. Sampel yang diuji adalah *crude* pili dan protein pili *Proteus mirabilis*. Darah yang dipakai adalah darah mencit dan darah manusia.

Isolasi Sel Epitel Vesika Urinaria Kelinci

Kelinci yang dipergunakan adalah kelinci sehat dengan berat badan 1,5 kg. Kelinci dianestesi dengan menggunakan kloroform, kemudian diambil bagian vesika urinaria. Vesika urinaria dipotong dan dibuka. Vesika urinaria dicuci dengan PBS pH 7,4 yang mengandung 1 mM *dithiothretiol* pada suhu 4 °C sampai bersih. Setelah itu, vesika urinaria dimasukkan ke dalam cairan yang mengandung 1,5 mM KCl, 9,6 mM NaCl , 27 mM *Na Citrat*, 8 mM KH_2SO_4 dan 5,6 mM Na_2HPO_4 dengan pH 7,4. Jaringan diinkubasi pada *shaking incubator* selama 15 menit, dengan suhu 37 °C. Supernatan dibuang

dan jaringan dipindahkan dalam cairan yang mengandung 1,5 mM EDTA dan 0,5 mM *dithiothreitol*, digojok kuat selama 15 menit pada suhu 37 °C, kemudian supernatan dibuang. Jaringan dicuci dengan PBS dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1000 rpm, tahap ini diulang sebanyak tiga kali. Sel Epitel vesika urinaria diisolasi dengan melakukan suspensi pada jaringan dengan menggunakan PBS steril. Selanjutnya dilakukan penghitungan sel epitel vesika urinaria dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 560 nm sampai konsentrasi 10^6 ml^{-1} . Epitel vesika urinaria ini kemudian dipergunakan untuk uji adhesi, uji hambat adhesi dan diambil bagian ECM.

Uji Adhesi

Uji adhesi dilakukan menurut modifikasi Nagayama *et al.* [8]. Bakteri *Proteus mirabilis* dibiakkan dalam media *laktosa broth* pada suhu 37 °C. Selanjutnya bakteri dipanen dengan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Endapan disuspensi dengan PBS. Kandungan bakteri dibuat 10^8 ml^{-1} menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Diambil 1 ml bakteri dan 1 ml sel epitel vesika urinaria kemudian dihomogenasi. Homogenat diinkubasi pada *shaking waterbath* dengan goyangan pelan selama 30 menit pada suhu 37 °C. Dilakukan sentrifugasi pada campuran bakteri dan epitel vesika urinaria tersebut sebanyak dua kali dengan rotasi 1000 rpm masing-masing selama lima menit. Suspensi diambil sebanyak 10 µl dengan dua kali ulangan dan dilakukan preparasi dan pewarnaan Gram serta dilanjutkan penghitungan indeks adhesi pada pengamatan dengan mikroskop.

Matrik Ekstra Seluler Epitel Vesika Urinaria

Metode isolasi matrik ekstra seluler epitel vesika urinaria yang dipakai merujuk pada Sumarno. Epitel vesika urinaria dicuci dengan PBS steril sebanyak tiga kali dan ditambahkan NOG 0,05% sebanyak 2 ml kemudian dihomogenasi selama satu menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan hasil sentrifugasi diambil dan dilakukan dialisa selama 2 kali 24 jam dengan PBS steril. Profil protein hasil isolasi ditentukan dengan metode SDS-PAGE [5].

Uji Protein Reseptor

Cara yang dipakai seperti pada penelitian Sumarno [5]. Sel bakteri dikultur sehingga konsentrasi mencapai 10^8 ml^{-1} . Selanjutnya 1 ml bakteri dicuci dengan PBS pH 7,4 dengan sentrifugasi kecepatan 6000 rpm selama lima

menit pada suhu 4 °C. Endapan disuspensikan dengan suspensi protein MES vesika urinaria. Dilakukan inkubasi dalam *water bath* dengan suhu 37 °C dengan goyangan sedang selama 30 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama lima menit pada suhu 4 °C. Endapan dipisahkan dari supernatan kemudian disuspensi dengan PBS pH 7,4 volume 1 ml. Dilakukan SDS-PAGE untuk supernatan dan suspensi endapan. Sebagai kontrol dipakai suspensi *Proteus mirabilis* dan protein MES epitel vesika urinaria. Selanjutnya dilakukan analisis untuk mengetahui protein yang berperan sebagai reseptor.

Pengecatan Gram

Sediaan dari uji adhesi dan uji hambat adhesi pada kaca benda difiksasi. Kemudian preparat dituangi dengan kristal violet selama satu menit, sisa cat dibuang dan dibilas dengan air. Selanjutnya dituangi lugol selama satu menit, sisa cat dibuang dan dibilas dengan air. Preparat dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai cat luntur, kemudian dibilas dengan air. Sampel ditetesi dengan safranin selama 30 detik kemudian dibilas dengan air. Sampel dikeringkan, selanjutnya diamati dengan mikroskop dengan pembesaran 100 kali.

Teknik Analisis Data

Data dianalisis menggunakan uji statistik satu jalur (*oneway ANOVA*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

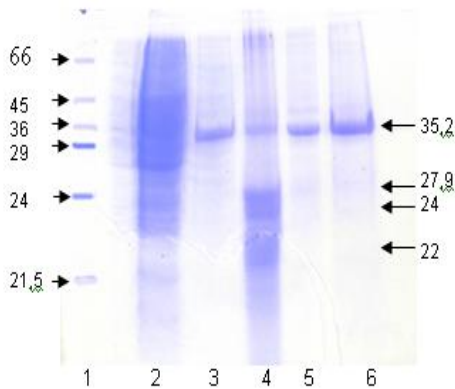
Berdasarkan hasil uji hemaglutinasi potongan pili bakteri *Proteus mirabilis* (Tabel 1), menunjukkan bahwa pada potongan pili ke-2 menunjukkan titer tertinggi yaitu $\frac{1}{16}$. Selanjutnya potongan pili dilakukan SDS-PAGE untuk memprediksi berat molekul protein, dengan hasil seperti pada Gambar 1. Profil protein pada SDS-PAGE dari beberapa potongan pili *Proteus mirabilis* (Gambar 1) menunjukkan protein yang menonjol yaitu protein dengan berat molekul 35,21 kDa, 27,9 kDa, 24 kDa dan 22 kDa.

Tabel 1. Uji hemaglutinasi pili *Proteus mirabilis* pada eritrosit mencit

Materi	Sumur									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
P1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
P3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Selanjutnya protein yang menonjol dipotong dan dilakukan elektroelusi dan dialisa, sehingga

diperoleh protein larutan. Hasil elektroelusi dan dialisa protein pili tersebut selanjutnya diuji hemaglutinasi pada eritrosit mencit, dengan hasil seperti pada Tabel 2.



Gambar 1. Hasil SDS-PAGE *whole cell* dan potongan pili *Proteus mirabilis*

Keterangan :

- Sumur 1: protein perunut
- Sumur 2: *whole cell*
- Sumur 3: potongan pili 1
- Sumur 4: potongan pili 2
- Sumur 5: potongan pili 3
- Sumur 6: potongan pili 4

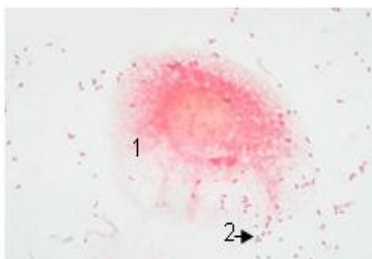
Tabel 2. Hasil uji hemaglutinasi protein pili dengan menggunakan eritrosit mencit

Berat protein	Sumur									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
35,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
27,9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Berdasarkan Tabel 2, dapat diketahui bahwa protein dengan berat molekul 35,2 kDa mempunyai titer tertinggi dan diduga merupakan protein hemaglutinin.

Uji Adhesi

Hasil uji adhesi *Proteus mirabilis* pada sel epitel vesika urinaria ditampilkan pada Gambar 2.

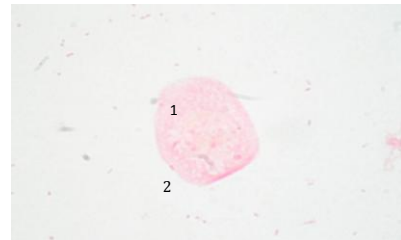


Gambar 2. Hasil uji adhesi *Proteus mirabilis* pada epitel vesika urinaria kelinci

Keterangan :

- 1. sel epitel vesika urinaria
- 2. *Proteus mirabilis*

Uji hambat adhesi dilakukan dengan menggunakan protein pili dengan berat molekul 35,2 kDa. Protein dengan berat molekul 35,2 kDa ini dilakukan pengenceran secara bertingkat untuk menghambat adhesi *Proteus mirabilis* ke epitel vesika urinaria. Hasil uji hambat adhesi *Proteus mirabilis* pada epitel vesika urinaria adalah sebagai berikut (Gambar 3).

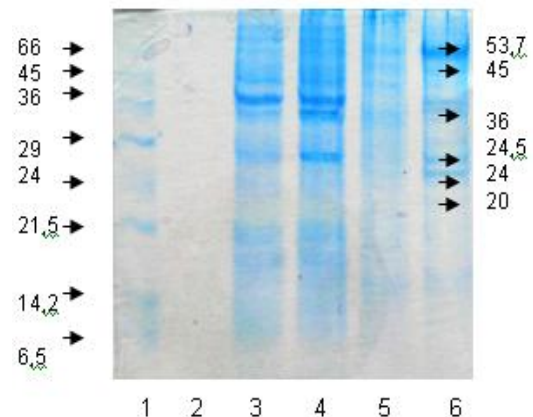


Gambar 3. Hasil uji hambat adhesi dengan konsentrasi 400 µl. Gambar direkam dengan foto mikroskop Olympus dengan perbesaran 1000 kali.

Keterangan :

- 1. sel epitel vesika urinaria
- 2. *Proteus mirabilis*

Hasil uji adhesi dan uji hambat adhesi dianalisis dengan analisis varian satu jalur. Berdasarkan analisis varian satu jalur (*One Way ANOVA*) diketahui bahwa dosis pengenceran berpengaruh nyata terhadap indeks adhesi *Proteus mirabilis* ke sel epitel vesika urinaria kelinci dengan taraf signifikansi (*p value*) adalah 0,00 dengan tingkat kepercayaan 95%.



Gambar 4. Hasil SDS PAGE Matriks ekstraseluler yang telah disalut bakteri

Keterangan :

- Sumur 1: protein perunut
- Sumur 3: *whole cell Proteus mirabilis*
- Sumur 4: pelet
- Sumur 5: supernatan
- Sumur 6: matrik ekstra seluler

Uji Reseptor

Hasil SDS PAGE untuk uji reseptor diperoleh data pada Gambar 4. Sumur ke-5 menggambar-

kan matriks ekstraseluler, matriks mempunyai protein dengan berat molekul 53,7 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 24,5 kDa, 24 kDa dan 20 kDa. Pelet dari bakteri yang disalut matriks ekstraseluler protein yang muncul dengan berat molekul 62 kDa, 56,3 kDa, 53,7 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 35,8 kDa, dan 24,5 kDa. Dari supernatan berat molekul yang didapat adalah 53,7 kDa, 45 kDa dan 20 kDa. Protein yang tidak muncul di supernatan yaitu protein dengan berat molekul 36 kDa, 24,5 kDa dan 24 kDa.

Kemampuan pili dalam menggumpalkan sel darah merah ada dua tipe, yaitu *Mannose Sensitive Hemagglutinin* (MSHA) dan *Mannose Resisten Hemagglutinin* (MRHA). MRHA berubah menjadi MSHA apabila sel darah merah diberi asam tannat 0,01%. Penelitian yang dilakukan oleh Sareneva, menunjukkan bahwa *Proteus mirabilis* mempunyai pili yang bersifat *manosa resisten* (MR/P) dengan berat molekul 21 kDa [10].

Pada penelitian ini diperoleh protein hemagglutinin pili dengan berat molekul 22 kDa. Kemungkinan protein hemagglutinin dengan berat molekul 22 kDa tersebut sama dengan MR/P yang ditemukan oleh Sareneva dengan berat molekul 21 kDa [10]. Namun hal tersebut perlu pembuktian lebih lanjut. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rozalski terhadap bakteri *Proteus mirabilis*, juga diketahui bahwa bakteri tersebut mempunyai protein hemagglutinin pili, yang hanya mampu mengaglutinasi eritrosit, setelah diberi asam tannat, dan disebut dengan MR/K. Subunit pili ini mempunyai berat molekul 19,5 kDa [11]. Sedangkan protein hemagglutinin dengan berat molekul 35,2 kDa, 27,9 kDa dan 24 kDa, belum ada yang melaporkan.

Identifikasi adanya protein adhesi pili *Proteus mirabilis* pada sel epitel vesika urinaria, maka dilakukan uji adhesi dan hambat adhesi dengan menggunakan protein hemagglutinin dengan titer tertinggi, yaitu protein dengan berat molekul 35,2 kDa. Berdasarkan uji adhesi diperoleh hasil seperti pada Gambar 2. Berdasarkan gambar tersebut tampak adanya bakteri yang menempel pada sel epitel vesika urinaria dan ada beberapa bakteri yang sudah masuk ke sel epitel.

Sedangkan pada hambat adhesi dengan menggunakan protein hemagglutinin dengan berat molekul 35,2 kDa, tampak pada Gambar 3. Pada Gambar 3, dapat diketahui tidak ada bakteri yang melekat pada sel epitel, hal ini disebabkan oleh sebagian besar reseptor *Proteus mirabilis* telah dijenuhi oleh protein hemagglutinin pili, sehingga *Proteus mirabilis* P355 tidak dapat melakukan adhesi ke sel epitel. Ketika pengen-

ceran protein hemagglutinin pili yang lebih besar maka reseptor yang dijenuhi oleh protein tersebut berkurang sehingga lebih banyak bakteri dapat menempel ke sel epitel. Semakin besar dosis protein yang diberikan menunjukkan semakin besar hambatan adhesi *Proteus mirabilis* P355 ke sel epitel dibandingkan dengan yang tanpa dihambat oleh protein hemagglutinin dengan nilai regresi (r^2) = 0,932 dan p value = 0,000.

Berdasar uji regresi tersebut menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara protein pili dengan berat 35,2 kDa dengan indeks adhesi *Proteus mirabilis* P355 pada epitel vesika urinaria. Fenomena ini menunjukkan bahwa protein hemagglutinin pili *Proteus mirabilis* P355 dengan berat molekul 35,2 kDa merupakan protein adhesin.

Protein adhesi *Proteus mirabilis* dengan berat molekul 35,2 kDa belum ada yang melaporkan, oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai bentuk dari protein tersebut (monomer atau polimer), identifikasi gen penyandi dan *N-asam amino terminal*. Sedangkan protein hemagglutinin dengan berat molekul 27,9 kDa, 24 kDa dan 22 kDa perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, untuk mengetahui apakah protein tersebut merupakan protein adhesin.

Berdasarkan hasil SDS-PAGE (Gambar 4), yang bertujuan untuk mengetahui protein reseptor, dapat diketahui bahwa sumur ke-3 menggambarkan protein *Proteus mirabilis* P355 dengan berat molekul 61,8 kDa, 56,3 kDa, 43 kDa, 36 kDa, 35,3 kDa, 24 kDa, 21,5 kDa dan 15,4 kDa. Sumur ke-6 menggambarkan protein membran epitel vesika urinaria, protein tersebut mempunyai berat molekul 53,7 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 35,3 kDa, 24,5 kDa dan 24 kDa.

Pelet dari bakteri yang disalut protein membran epitel yang muncul dengan berat molekul 62 kDa, 56,3 kDa, 53,7 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 35,3 kDa, 24,5 kDa, 21,5 kDa dan 15,4 kDa (sumur ke-4, Gambar 4). Berat molekul yang didapat dari supernatan adalah 53,7 kDa dan 45 kDa. Protein yang tidak muncul di supernatan yaitu protein dengan berat molekul 36 kDa, 35,3 kDa, 24,5 kDa dan 24 kDa.

Berdasarkan hasil protein yang muncul pada tiap sumuran tersebut, dapat dianalisis dan diperkirakan bahwa molekul reseptor *Proteus mirabilis* P355 mempunyai berat molekul 36 kDa, 35,3 kDa 24,5 kDa dan 24 kDa. Hal ini terbukti pada supernatan tidak dijumpai protein dengan berat molekul tersebut, dan diperkirakan protein tersebut pindah ke sel bakteri. Kepastian protein

tersebut sebagai molekul reseptor diperlukan penelitian lebih lanjut, yaitu dengan cara protein yang diprediksi sebagai molekul reseptor, dimurnikan dengan cara elusi dan eluat tersebut digunakan untuk uji hambat adhesi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Proteus mirabilis P355 mempunyai protein hemagglutinin pili dengan berat molekul 35,2 kDa, 27,9 kDa, 24 kDa dan 22 kDa. Protein hemagglutinin pili *Proteus mirabilis* P355 dengan berat molekul 35,2 kDa mempunyai titer tertinggi 1/512 merupakan protein adhesin. *Proteus mirabilis* P355 mempunyai protein reseptor di epitel vesika urinaria kelinci dengan prediksi berat molekul, 36 kDa, 35,3 kDa, 24,5 kDa dan 24 kDa.

Saran

Perlu penelitian lebih lanjut tentang tipe serta identifikasi N-asam amino terminal protein hemagglutinin. Selain itu juga diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai tipe dari protein adhesin dengan berat molekul 35,2 kDa dan menentukan bentuk protein pili tersebut merupakan suatu monomer atau polimer, serta mengidentifikasi gen penyandinya. Perlu pembuktian lebih lanjut protein reseptor dengan berat molekul 36 kDa, 35,3 kDa, 24,5 kDa dan 24 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gales, C.A., N.R. Jones, A.K. Gordon, S.H. Sader, W.W. Wilke, L.M. Beach, A.M. Pfaller, V.G. Doern. 2000. Activity and Spectrum of 22 Antimicrobial Agent Tested Against Urinary Tract Infection Pathogens in Hospitalized patient in Latin America: report from the second year of the Sentry Antimicrobial Surveillance Program. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45:295-303.
2. Daifaku, Stamm. 1986. Bacterial Adherence to Bladder Uroepithelial Cells in catheter-associated Urinary Tract Infection. *NEJM*. 314:1208-1213.
3. Wassif, W.S., T.J. Peters. 1995. Familial isolated primary hyperparathyroidism. *Clinical endocrinology*. 42:441-442.
4. Salyers, A.A., D. Whitt. 1994. Bacterial Pathogenesis. ASM Press. Washington DC.
5. Sumarno. 2000. Karakterisasi Molekuler Protein Adhesi *Vibrio cholerae* O1 M094V dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih, Studi Patogenitas *V. cholerae* O1 M094V. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
6. Ehara, M., M. Ishibashi, Y. Ichinose, M. Iwanaga, S. Shimotori, T. Naito. 1987. Purification and Partial Characterization of Pili of *Vibrio cholerae* O1. *Vaccine*. 5:283-288.
7. Laemli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Protein During Assembly of The Head of Bacteriophage T.4. *Nature*. 227:680-685.
8. Nagayama, K., T. Oguchi, M. Arita, T. Honda. 1995. Purification and characterization of a cell-associated hemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*. 05 1995. Vol 63. No. 5:1987-1992.
9. Li, X., H. Zhao, L. Geymonat, F. Bahrani, D.E. Johnson. 1997. *Proteus mirabilis* Manosa-Resistant, Proteus-Like Fimbriae: Mrp G is Located at the Fimbrial Tip and Is Required for Fimbrial Assembly. *Infection and Immunity*. 65:1327-1334.
10. Sareneva, T., H. Holtthofer, R.S. Cotran. 1990. Tissue binding affinity of *Proteus mirabilis* fimbriae in the human urinary tract. *Infection and Immunity*. 58:3330-3336.
11. Rozalski, A., Z. Sidorczyk, K. Kotelko. 1997. Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Mar 1997. Vol 61. No. 1:65-89.

Identifikasi Molekul Adhesi Pili *Pseudomonas aeruginosa* pada Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Culture

Dwi Yuni Nur Hidayati*

Program Studi Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Pseudomonas aeruginosa merupakan salah satu penyebab Gram negatif bakteremia yang bisa berlanjut menjadi sepsis. Bakteri ini banyak menginfeksi penderita di rumah sakit dengan membentuk koloni pada pembuluh darah melalui proses adhesi (pelekatan). Pili dan bagian *Outer Membrane Protein* (OMP) adalah faktor yang mempengaruhi pelekatan bakteri *P. aeruginosa*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui berat molekul protein hemagglutinin yang terdapat pada pili dan membuktikan peran protein hemagglutinin pada pili dalam pelekatan bakteri *P. aeruginosa*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolasi protein pili *P. aeruginosa* secara bertingkat, dilanjutkan dengan uji hemagglutinasi (metode mikrotiter) dan uji adhesi menggunakan protein pili hasil elektroelusi yang disalutkan pada kultur sel endotel (HUVECs) (konsentrasi 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 dan 0 [kontrol]). Hasil penelitian menunjukkan adanya reaksi hemagglutinasi pada potongan pili ketiga dengan titer tertinggi (1/128). Protein hemagglutinin dengan berat molekul 38,19 kDa memberikan titer tertinggi (1/16). Hasil uji adhesi protein hemagglutinin yang disalutkan pada sel endotel menunjukkan bahwa semakin tinggi pengenceran maka adhesi bakteri menunjukkan peningkatan secara signifikan dengan konstanta regresi ($r= 0,98$ dan $p\ value= 0,00$). Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa protein hemagglutinin pili merupakan protein adhesin. Protein adhesin dengan berat molekul 38,19 kDa berperan pada pelekatan bakteri *P. aeruginosa* 9064 dengan kultur sel endotel (HUVECs).

Kata kunci: adhesi, hemagglutinasi, pili, *Pseudomonas aeruginosa*

PENDAHULUAN

Peningkatan kejadian dan problema penyakit infeksi yang biasanya dikaitkan dengan keadaan negara berkembang dan kebersihan yang kurang, ternyata tidak seluruhnya benar. Di Amerika Serikat, kematian akibat sepsis tiap tahunnya mencapai 70.000 orang. Sekitar 50-60% sepsis disebabkan oleh bakteremia Gram negatif. Penyebab Gram negatif bakteremia yang paling sering terjadi adalah famili *Enterobacteriaceae* dan *Pseudomonaceae*, terdiri dari *Escherichia coli* (35%), *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* (38%) dan *Pseudomonas aeruginosa* (12 %) [1].

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang, bergerak dengan flagel, dan bersifat aerob. Bakteri ini banyak menginfeksi penderita di rumah sakit dengan predisposisi tertentu. Banyak faktor-faktor penentu patogenitas dari bakteri ini diantaranya yang berhubungan dengan struktur sel seperti pili (*fimbriae*) dan bahan yang dikeluarkan seperti exotoxin A dan protease [2].

Kontak langsung antara agen infeksi dengan sel inang diawali dengan proses adhesi (perlekatan) [3]. Bakteri *P. aeruginosa* dapat melakukan adhesi dan membentuk koloni pada bermacam-macam tipe sel yaitu epitel sel *buccal*, paru, ginjal dan sel endotel [3]. Adhesin bakteri Gram negatif diperankan oleh suatu protein yang mampu mengaglutinasi eritrosit mamalia protein ini disebut dengan protein hemagglutinin, salah satu contoh adalah protein adhesin *Klebsiella pneumoniae* yang diperankan oleh protein hemagglutinin 29 kDa [4].

Penemuan bahwa adhesi merupakan tahap awal proses infeksi pada sebagian besar bakteri, menunjukkan bahwa protein adhesin tersebut memiliki potensi sebagai komponen vaksin yang baik. Salah satu contoh adalah *Fim H vaccine* yang sedang dikembangkan untuk mencegah infeksi saluran kemih yang disebabkan *E. coli* [5]. Kemampuan bakteri untuk melekat dan menembus sel endotel merupakan akibat dari interaksi adhesin-reseptor antara bakteri dan permukaan sel endotel [6]. Molekul reseptor tergantung pada jenis bakteri. Molekul reseptor terdapat di enterosit epitel vesica urinaria atau endotel. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* melekat selektif terhadap sel-sel endotel manusia [7].

* Alamat korespondensi penulis:

Dwi Yuni Nur Hidayati

e-mail : hidayati@yahoo.co.id

Alamat : Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang, 65154

Penelitian mengenai pengaruh protein adhesin yang terdapat pada pili sebagai faktor virulensi pada proses adhesi dengan sel endotel *Human Umbilical Vein Endothelial Cells Culture* (HUVECs) sebagai tempat pelekatan bakteri *P. aeruginosa* belum ada yang melaporkan. Berdasarkan uraian di atas diharapkan dapat dilakukan identifikasi protein adhesin dengan menentukan besarnya berat molekul protein hemagglutinin bakteri *P. aeruginosa*.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari bahan pemeriksaan klinik yang diperoleh di Laboratorium Klinik Mikrobiologi Rumah Sakit Saiful Anwar (RSSA) Malang yang mempunyai titer aglutinasi tinggi. Jenis Penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorik, dengan desain *Posttest Only Kontrol Group Design*. Setiap unit percobaan terdiri satu *well* kultur endotel yang didalamnya terdapat *cover slip*. Masing-masing perlakuan diinkubasi dengan *P. aeruginosa*. Kelompok kontrol adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang dilakukan uji adhesi tanpa penambahan konsentrasi protein pili. Sedangkan kelompok perlakuan adalah bakteri *P. aeruginosa* yang dilakukan uji adhesi dengan penambahan konsentrasi protein pili yang berbeda.

Metode Kultur *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri yang digunakan berasal dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi RSSA. Bakteri ditumbuhkan pada media TCG. Sebelum bakteri ditumbuhkan dalam media TCG, bakteri terlebih dahulu ditumbuhkan dalam media TCBS dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 24 °C. Biakan yang telah tumbuh diambil dan ditanam pada media TCBS (inkubasi 24 jam suhu 24 °C). Biakan yang tumbuh diambil dengan cara dikerok, sebelumnya dituangkan PBS steril pH 7,4 secukupnya. Suspensi bakteri tersebut dimasukkan ke dalam botol yang berisi 1000 ml larutan *Brain Heart Infusion Broth* (BHI). Suspensi tersebut dikocok kuat selama 30 menit pada penangas air 37 °C. Suspensi bakteri diambil sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam media TCG dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C.

Metode Isolasi Pili *Pseudomonas aeruginosa*

Metode isolasi pili bakteri ini merujuk dari Ehara [8]. Bakteri dipanen dari botol biakan bakteri dan selanjutnya hasil koleksi ditambahkan *Tri Chloroacetic Acid* (TCA) sampai

konsentrasi 3% dan dihomogenasi. Suspensi kemudian disimpan pada suhu kamar selama satu jam dan dilanjutkan dengan sentrifugasi kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C. Pelet diambil dan diresuspensi dengan cairan PBS pH 7,4 dengan perbandingan antara pelet dan cairan 1:10. Bakteri kemudian dicukur menggunakan *mixer* yang telah dirancang khusus untuk pencukuran pili di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Universitas Brawijaya Malang. Bakteri dicukur dengan kecepatan penuh selama satu menit, diulang sampai lima kali dengan masa istirahat satu menit. Hasil yang diperoleh dari pencukuran pili bakteri kemudian disentrifugasi selama 30 menit, kecepatan 12.000 rpm, pada suhu 4 °C. Pili yang terletak pada bagian supernatan diambil. Endapan (pelet) diresuspensikan dengan larutan dan cara yang sama, kemudian dikumpulkan dengan mencukur ulang beberapa kali sampai dihasilkan supernatan yang menunjukkan tes aglutinasi negatif.

Metode Isolasi Protein Hemagglutinin Pili *P. aeruginosa*

Pili yang telah dikoleksi selanjutnya dilakukan SDS-PAGE. Sel dipotong lurus pada berat molekul yang diinginkan dan potongan pita tersebut dikumpulkan dan dimasukkan pada tabung membran. Selanjutnya pita dianalisis menggunakan larutan penyangga elektroforesis (*running buffer*). Kemudian dilanjutkan dengan analisis *elektroelusion* menggunakan sistem elektroforesis *horizontal apparatus* dengan aliran 125 mV selama 25 menit. Hasil elektroforesis dielusi dengan larutan pengangga PBS pH 7,4 selama 48 jam masing-masing dua liter dan diganti tiga kali. Cairan hasil elusi, yang berasal dari potongan pita SDS-PAGE tersebut dilakukan uji hemagglutinas.

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Monitoring berat molekul dikerjakan menggunakan SDS-PAGE metode Laemmli [9]. Sampel protein dipanaskan 100 °C selama lima menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris HCl pH 6,8, 5% *2-mercapto ethanol*, 2,5% *sodium dodecyl sulfate*, 10% *glyserol* dengan warna pelacak *bromophenol blue*. Dipergunakan 12,5% *mini slab gel* dengan *tracking gel* 4%. Voltase yang digunakan 125 mV. Sebagai bahan pewarna adalah *coomassie brilliant blue* dan molekul standar *sigma low range marker*.

Metode Uji Hemagglutinas

Uji hemagglutinas dikerjakan menurut Hanne and Finkelstein [10]. Sel darah merah dicuci sebanyak tiga kali menggunakan PBS dengan cara

sentrifugasi, kecepatan 3000 rpm masing-masing selama 10 menit. Pengenceran sampel dibuat kon-sentrasi $\frac{1}{2}$ dan volume 50 μ l pada tiap sumur mikroplat V. Tiap sumur ditambahkan suspensi darah merah mencit konsentrasi 0,5% dengan volume sama. Kemudian digoyang dengan menggunakan *rotator plate* selama satu menit. Selanjutnya diletakkan pada suhu kamar selama satu jam. Besarnya titer ditentukan dengan pengamatan adanya aglutinasi darah merah pada pengenceran yang terendah. Sampel yang diuji adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, protein pili. Jenis darah merah yang digunakan adalah darah manusia dan tikus. Aglutinasi dibaca apabila terlihat hasil aglutinasi (aglutinat) pada dasar sumuran *plat titer micro* dengan kontrol negatif. Titer hemaglutinasi dihitung berdasarkan angka kebalikan pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan aglutinasi. Setiap uji dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

Isolasi dan Pembuatan Kultur Sel Endotel

Semua bahan yang akan digunakan dihangatkan hingga 37 °C. Umbilikus dibersihkan dari debris sel dengan *tissue*. Masing-masing ujung umbilikus dipotong transversal sehingga terlihat dua arteri dan vena (dinding yang lebih tebal, lebih besar dan lentur). Selanjutnya kanul dimasukkan pada satu ujung vena (klem) kemudian diikat dengan erat. Vena dibersihkan dengan PBS A melalui kanul yang terpasang dengan menggunakan *sprit* 20 cm. Ujung umbilikus yang tidak memiliki kanul diikat kuat. Selanjutnya kolagenase dimasukkan ke dalam vena seperti cara memasukkan kanul dan dibiarkan *sprit* terpasang pada kanul. Selanjutnya umbilikus didekap dengan tangan (agar suhu mencapai 37 °C) selama 8 menit.

Kolagenase (mengandung sel endotel) dikeluarkan dengan cara diambil dengan *sprit* yang masih terpasang dan dipindahkan pada tabung sentrifugasi steril. Cara seperti pemberian kolagenase diulang tetapi dengan menggunakan 8 ml PBS A. Larutan tersebut kemudian diambil kembali seperti pada cara sebelumnya. Larutan yang mengandung sel endotel disentrifugasi dengan kecepatan 1300 rpm selama 8 menit. Sentrifugasi diulang sebanyak dua kali dengan ditambahkan 2 ml media. Supernatan yang terbentuk dipisahkan dan pelet diresuspensi dengan 4 ml media kultur. Supernatan yang diperoleh diinkubasi dalam inkubator (5% O dan 95% CO₂).

Pada hari berikutnya media diambil dan dicuci dengan menggunakan *serum free media*, kemudian diisi lagi dengan 4 ml media kultur. Setiap dua hari sekali setengah dari media

diambil dan diganti dengan yang baru. Sel endotel akan berbentuk sebagai *monolayer* pada hari ke-3 dan selanjutnya di subkultur.

Metode Pengecatan Struktur

Pengecatan struktur endotel dilakukan dengan menggunakan cat warna Gram (kristal violet, lugol, aseton-alkohol 96% dan safranin) dan Giemsa (*Wright* dan *buffer sample*). Kaca benda yang berisi sel endotel dalam *well* dicuci bersih dan dikeringanginkan dalam inkubator dengan suhu 37 °C. Selanjutnya ditetesi dengan larutan *Wright* secara merata diatas *cover slip* selama 3 menit. Larutan selanjutnya diambil dengan jarum suntik dan dibilas dengan *buffer sample* selama 10 menit. *Buffer* diangkat dengan jarum suntik kemudian *cover slip* dikeringanginkan dalam inkubator 37 °C. Dilakukan pengamatan struktur endotel pada mikroskop *inverted* dan mikroskop DIC (*Different Inferent Contrast*) dengan perbesaran 200 kali, 400 kali dan 1000 kali.

Metode Uji Adhesi

Uji adhesi menggunakan metode modifikasi Nagayama *et al.* [11]. Biakan cair bakteri *P. aeruginosa* disentrifugasi (6.000 rpm, 10 menit, suhu 4 °C). Suspensi bakteri diambil sebanyak 100 μ l (kandungan bakteri sekitar 10⁸ ml⁻¹) dan dimasukkan *well* yang didalamnya terdapat kaca benda berisi sel endotel. *Well* dimasukkan dalam *shaking* inkubator dengan pergerakan rotor 60 kali per menit, selama 30 menit, dengan suhu 37 °C, kemudian kaca benda dalam *well* dicuci sebanyak tiga kali dengan PBS steril (*calcium free*). Kaca benda dengan kristal violet dibilas dengan air selama satu menit, kemudian dicuci dengan lugol selama satu menit, dibilas dengan air dan dicuci dengan aseton-alkohol 96% selama satu menit, dibilas dengan air dan dicuci dengan safranin. Preparat dibilas lagi dengan air, kemudian dikeringanginkan. Dilakukan pengamatan model adhesi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada sel endotel, dan model struktur sel endotel. Model adhesi diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 200 kali, 400 kali, dan 1000 kali, serta dilakukan perhitungan indeks adhesi yaitu jumlah rata-rata bakteri yang menempel tiap 100 sel endotel.

Metode Uji Hambatan Adhesi

Metode uji hambatan adhesi merujuk pada Sumarno [12]. Bakteri *P. aeruginosa* diencerkan hingga *Optical Density* (OD) 1. Sampel protein pili hasil elektroelusi diencerkan dengan seri pengenceran masing-masing $\frac{1}{2}$ kali dengan menggunakan PBS steril pH 7,4 sebanyak 500 ml dan

selanjutnya dimasukkan ke dalam sumuran yang berisi *cover slip* kultur endotel (inkubasi pada *water bath* dengan suhu 37 °C, *shaker* dengan pergerakan rotor 60 kali tiap menit selama 30 menit). Bakteri *P. aeruginosa* OD 1 dimasukkan sebanyak 200 µl pada masing-masing *cover slip* yang berisi endotel. Dilakukan inkubasi dengan *shaker incubator* dengan kecepatan rotor 60 kali tiap menit, pada suhu 37 °C selama 30 menit. *Cover slip* yang berisi endotel diangkat dengan pinset, difiksasi, dan dilakukan pengecatan Giemsa Gram. Masing-masing pewarnaan dilakukan selama satu menit. *Cover slip* dikeringanginkan dan dilakukan penghitungan uji hambatan adhesi.

Teknik Analisis Data

Data dianalisis menggunakan analisis korelasi antara perubahan indeks adhesi dan perubahan konsentrasi protein pili hemaglutinin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

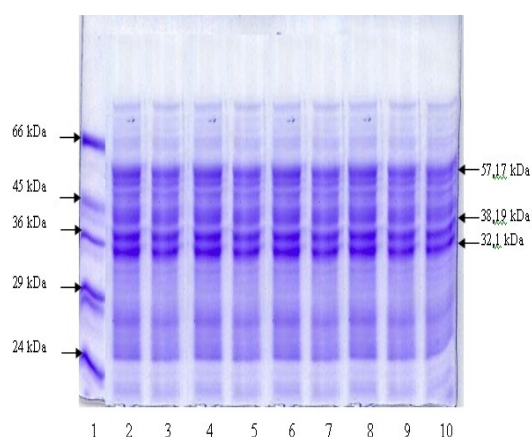
Uji Hemaglutinasi & SDS-PAGE

Uji hemaglutinasi dilakukan untuk mencari protein hemaglutinin *P. aeruginosa* dengan titer tertinggi yang berasal dari sepuluh isolat dan protein hemaglutinin yang berasal dari pili (*fimbriae*) setelah biakan bakteri dipotong dengan alat *omnimixer* modifikasi [8]. Pada uji saring mencari protein hemaglutinin dari 10 isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diperoleh isolat *Pseudomonas aeruginosa* 9064 dengan titer 1/64 dan fraksi pili (*fimbriae*) diperoleh titer 1/128 pada uji hemaglutinasi menggunakan eritrosit mencit (Tabel 1). Selain itu, dari hasil uji hemaglutinasi protein pili *P. aeruginosa* menunjukkan titer hemaglutinasi dari potongan pili ketiga (P3) paling tinggi dengan titer 1/128. Berdasarkan kedua data tersebut diketahui

bahwa bakteri *P. aeruginosa* 9064 memiliki protein hemaglutinin (HA) yang berasal dari pili (*fimbriae*).

Hasil SDS-Page Isolasi Bertingkat Protein Pili *P. aeruginosa* 9064

Berdasarkan hasil analisis SDS PAGE potongan pili yang memiliki sifat aglutinasi eritrosit mencit, diperoleh tiga gambaran berat molekul pita protein yang paling menonjol dari potongan protein pili ketiga, yaitu 57,17 kDa, 38,19 kDa dan 32,1 kDa. Gambaran ketiga protein yang menonjol tersebut dipotong untuk dikoleksi, selanjutnya dilakukan pemurnian untuk elektroelusi sehingga didapatkan protein larutan. Protein untuk elektroelusi seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis SDS-PAGE protein Pili potongan ke-3 untuk Elektroelusi

Keterangan : 1 : protein perunut
2 – 10 : potongan Pili 3

Tabel 1. Titer Hemaglutinasi dari berbagai isolat bakteri *P. Aeruginosa*

Materi	Sumur											
	1 (1/2)	2 (1/4)	3 (1/8)	4 (1/16)	5 (1/32)	6 (1/64)	7 (1/128)	8	9	10	11	12 K
Ps0865	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps9475	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps0670	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps1019	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ps0881	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps0614	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps9476	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps9064*	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Ps0871	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps3418	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Uji Hemaglutinasi terhadap Berbagai Jenis Eritrosit

Uji hemaglutinasi ini bertujuan untuk mengamati hemaglutinasi terhadap eritrosit manusia golongan darah A, B, AB, O dan darah mencit. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan data yang diperoleh dapat diketahui bahwa titer hemaglutinasi protein pili 38,19 kDa memberikan hasil positif dengan eritrosit manusia golongan darah O ($\frac{1}{16}$) dan eritrosit mencit ($\frac{1}{32}$) sedangkan dengan eritrosit manusia golongan A, B dan AB memberikan hasil negatif.

Uji Adhesi Protein Hemaglutinin

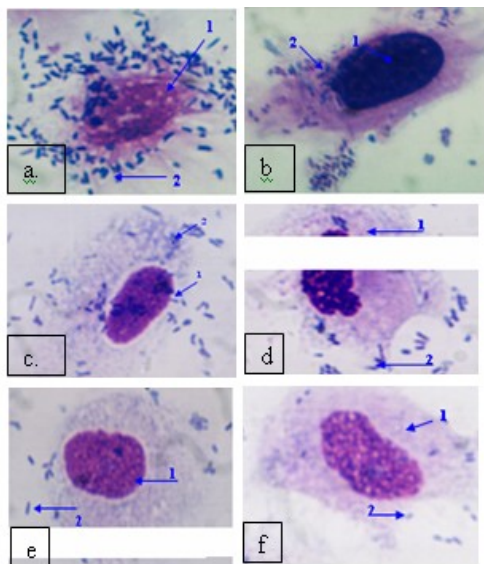
Uji adhesi bertujuan untuk membuktikan bahwa protein hemaglutinin pili 38,19 kDa merupakan protein adhesin, sebagai faktor virulensi yang memiliki kemampuan untuk melekatkan bakteri *P. aeruginosa* pada sel hospes, dalam hal ini adalah sel endotel (HUVECs). Berdasarkan pengamatan terhadap uji adhesi protein hemaglutinin pada enam perlakuan (Gambar 2) dan berdasarkan hasil perhitungan indeks adhesi *P. aeruginosa* pada sel endotel (HUVECs) yang disalut protein hemaglutinin 38,19 kDa tersebut memberikan gambaran bahwa, semakin tinggi konsentrasi protein hemaglutinin yang diberikan maka akan menurunkan indeks adhesi.

- konsentrasi $\frac{1}{4}$
- e. perlakuan protein hemaglutinin 38,19 kDa konsentrasi $\frac{1}{2}$
- f. perlakuan protein hemaglutinin 38,19 kDa konsentrasi 1
- 1. Sel endotel HUVECs
- 2. Sel bakteri *P. Aeruginosa*.

Analisis lebih lanjut dengan menggunakan analisis regresi dan varian ($\alpha = 0.05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada masing-masing perlakuan yang diberikan. Kecenderungan peningkatan konsentrasi protein hemaglutinin terhadap indeks adhesi, dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan hasil analisis varian satu jalur (ANOVA) diketahui bahwa dosis pengenceran protein hemaglutinin berpengaruh signifikan terhadap indeks adhesi *P. aeruginosa* pada sel endotel HUVECs dengan signifikansi F hitung (p) = 0,00 dan tingkat kepercayaan 95%. Hasil analisis perbandingan masing-masing perlakuan melalui (*Tukey's test*), menunjukkan bahwa masing-masing dosis pengenceran memberikan hasil yang berbeda secara signifikan dengan tingkat kepercayaan 95%, jika dibandingkan semua perlakuan. Berdasarkan hal tersebut, diketahui bahwa pemberian protein hemaglutinin pili 38,19 kDa dapat menurunkan indeks adhesi.

P. aeruginosa mempunyai dua tipe protein adhesi yaitu protein adhesi yang terdapat pada pili dan yang terdapat pada permukaan sel (*non pillus adhesins*). Pili *P. aeruginosa* yang digunakan pada penelitian ini merupakan pili tipe 4 yang hampir sama dengan pili yang dimiliki bakteri *Nesseria gonorrhoeae* dan *Vibrio cholera* [2]. Bakteri Gram negatif berinteraksi dengan lingkungan luar menggunakan faktor virulensi termasuk toksin ekstraseluler, pili, flagella, *autotransporter*, dan *crystallin S-layers* [13]. Hal ini membuktikan bahwa *P. aeruginosa* mempunyai protein adhesin dari pili potongan ketiga dengan berat molekul 38,19 kDa.

Adhesi *P. aeruginosa* pada sel endotel HUVECs ditentukan oleh faktor virulensi berupa pili. Penelitian lain menyebutkan bahwa bahwa *Pseudomonas aeruginosa* juga mengaktifasi sel M manusia untuk menginduksi migrasi neutrophil transendothelial melalui sel M yang berasal dari IL-1 α dan IL-1 β [14]. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui kemungkinan penggunaan mekanisme adhesi oleh HUVECs untuk menginfeksi endotel. Diduga adhesi *P. aeruginosa* terhadap endotel ditentukan oleh sekresi protein dengan *general secretory pathway* (GSP) yang merupakan dua bagian

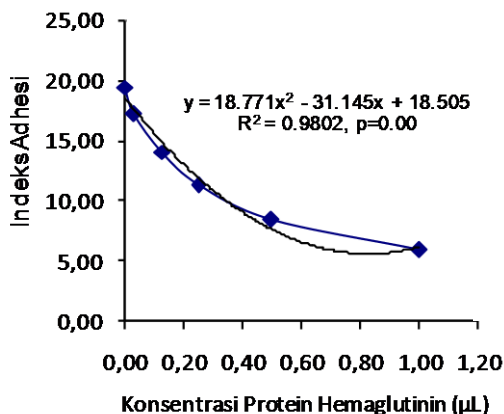


Gambar 2. Uji adhesi protein hemaglutinin (Foto mikroskop Nikon pembesaran 1000 kali)

Keterangan:

- a. kontrol (*P. aeruginosa* pada sel endotel)
- b. perlakuan protein hemaglutinin 38,19 kDa konsentrasi $\frac{1}{16}$
- c. perlakuan protein hemaglutinin 38,19 kDa konsentrasi $\frac{1}{8}$
- d. perlakuan protein hemaglutinin 38,19 kDa

proses yang membutuhkan *Sec translocase* didalam *inner membrane* dan suatu substrat pemisah sekresi spesifik aparatus selama sekresi menyeberangi *outer membran*. Salah satu faktor virulensi *P. aeruginosa* untuk berinteraksi dan komunikasi dengan inang yang termasuk dalam GSP adalah pili [2, 13].



Gambar 3. Kecenderungan peningkatan konsentrasi protein hemagglutinin terhadap indeks adhesi

Pili tipe IV *P. aeruginosa* merupakan *pseudopilin* yang didisain oleh protein PulG, PulH, Pull, dan PulJ. Semua protein termasuk *prepilin peptidase cleavage* dan bagian *metilasi* dan hampir semuanya terletak pada periplasma. Struktur pili ini merupakan pilus yang menyeberangi periplasma (tabung sekresi), berfungsi untuk memfasilitasi transport Pula menuju *Outer Membran* (OM). Dalam hal ini pili seperti protein, merupakan sistem sekresi *pullulanase* yang melibatkan tipe 4 *prepilin* seperti signal peptidase yang disusun oleh PilO yang sangat penting untuk sekresi protein Pula.

Comer *et al.*, menjelaskan *P. aeruginosa* strain 1244 mempunyai *pilin glycan* yang berikatan secara kovalen terhadap residu serin [15]. Hasil sequencing N-terminal dari fraksi pilin dihasilkan dari perlakuan endopeptidase dan diidentifikasi dengan reaksi monoklonal antibodi spesifik *glycan* yang terindikasi bahwa *glycan* berada diantara residu 75 dan *terminus pilin karboksil*. Bagian *karboksil-proksimal* pada *pilin glycan*, merupakan epitop sel B linear utama, ini sebagai epitop peptida.

Pili dari *P. aeruginosa* pada dasarnya merupakan protein fiber yang memanjang dari satu atau kedua sel *pole*. Proses ini merupakan faktor penting untuk virulensi yang mem-

perantarai proses adhesi pada jaringan sel inang. Pili mampu meluas dan beretraksi, sebuah bagian yang mempengaruhi kolonisasi dan memfasilitasi proses *twitching*, sebuah bentuk motilitas yang sangat penting dalam *desiminasi* patogen. Pili *P. aeruginosa* merupakan bentuk tetap dari sebuah subunit monomerik, pili yang mempunyai berat molekuler antara 15 kDa hingga 17 kDa dan mempunyai karakteristik yang berhubungan dengan pili tipe IV. Salah satu karakteristik ini adalah adanya *methylated amino-terminal phenylalanine*. Hal ini menunjukkan bahwa, pada modifikasi *post translasional* pili *P. aeruginosa* 1244 merupakan glikosilasi dan modifikasi ini membutuhkan adanya fungsi dari gen *PilO*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa berat molekul potongan pili ketiga adalah 38,19 kDa. Seperti dijelaskan oleh peneliti terdahulu bahwa pili *P. aeruginosa* merupakan pili sub unit monomerik tetapi berat molekulnya adalah 15 kDa sampai 17 kDa, setelah ditentukan ternyata gen penyandinya adalah *PilO*. Diduga berat molekul 38,19 kDa merupakan berat molekul sub unit monomerik dengan jenis gen penyandi yang berbeda, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan bentuk protein dengan berat molekul tersebut. Selain itu, diperlukan penelitian lebih lanjut tentang jenis protein dan analisis gen penyandi protein *P. aeruginosa*.

Castric *et al.*, juga menjelaskan bahwa pili *P. aeruginosa* merupakan pili somatik, filamen protein yang meluas seperti benang dari satu atau kedua sel poles, yang merupakan faktor virulensi utama, memicu adhesi pada sel inang dan proses invasi pada sel inang [16]. Berat molekul protein pili ini berkisar antara 16 kDa. Bentuk *mature* dari protein ini dihasilkan oleh pergerakan dari suatu *six-residue leader sequence* sebuah proses yang diatur oleh metilasi pada *nascent amino-terminal phenylalanine*. Determinasi proses ini tergantung jenis gen penyandi *PilO*, yaitu sebuah gen yang terletak pada bagian operon yang juga mengandung pili struktural gen *PilA*. Berat molekul kisaran 16 kDa diketahui sebagai berat molekul penentu patogen oportunistik pada bakteri Gram negatif *P. aeruginosa*. Berdasarkan kajian literatur tersebut perlu ditentukan apakah berat molekul protein dari hasil penelitian potongan pili ketiga 38,19 kDa isolat Ps 9064 juga merupakan patogen oportunistik terhadap sel inang khususnya sel endotel HUVEC.

Mekanisme invasi *P. aeruginosa whole cell* pada sel endotel HUVEC normal berdasarkan

hasil penelitian menunjukkan bahwa struktur morfologi sel endotel kultur yang dicat dengan pewarnaan *Wright Giemsa* dan pengamatan dengan mikroskop merk Nikon menunjukkan bahwa tampak bentuk sel pipih, dengan struktur sitoplasma dan inti sel yang masih jelas, dan secara morfologis belum menunjukkan adanya perubahan morfologis secara nyata.

Gambaran adhesi bakteri *P. aeruginosa* menunjukkan pola agregat dan ada pula yang berpola *diffuse* atau menyebar pada permukaan sel endotel. Kultur sel endotel yang telah diperlakukan dengan adhesi *P. aeruginosa* dan disalut dengan protein pili hemagglutinin pada potongan pili ketiga dengan berat molekul 38,19 kDa dengan berbagai dosis pengenceran menunjukkan bahwa semakin besar dosis protein hemagglutinin yang disalut pada sel endotel kultur menunjukkan adanya tingkat penghambatan adhesi yang semakin besar. Semakin besar pengenceran yang diberikan, memberikan gambaran adhesi yang lebih besar dibandingkan dosis pemberian protein hemagglutinin tanpa pengenceran. Kecenderungan peningkatan konsentrasi protein hemagglutinin terhadap indeks adhesi, dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan Gambar 3, diketahui bahwa semakin besar tingkat pengenceran maka terjadi peningkatan adhesi bakteri secara signifikan dengan nilai *regresi* (r) = 0,98 dan p value= 0,00. Hal ini diduga terdapat hubungan yang signifikan antara pili dengan berat molekul 38,19 kDa dengan adhesi *P. aeruginosa* pada sel endotel kultur normal. Berdasarkan titer tertinggi pada pengenceran protein pili potongan protein hemagglutinin pada dosis $\frac{1}{16}$ adhesi *P. aeruginosa* menunjukkan adhesi yang meningkat bila dibandingkan dengan dosis 1 dan dosis pengenceran $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ dan $\frac{1}{8}$. Hasil ini menunjukkan adanya pengaruh pemberian protein hemagglutinin terhadap indeks adhesi bahwa semakin besar konsentrasi protein adhesin pili (*fimbriae*) yang disalut pada sel endotel kultur makin kecil indeks adhesi bakteri *P. aeruginosa*. Hasil penghitungan indeks adhesi *P. aeruginosa* pada sel endotel juga menunjukkan semakin besar dosis pengenceran protein pili (*fimbriae*) yang disalut pada sel endotel maka indeks adhesi bakteri juga semakin besar.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan analisis hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa hasil pemoangan pili pada bakteri *P. aeruginosa* 9064 didapatkan protein

hemagglutinin dengan berat molekul 38,19 kDa. Semakin besar dosis protein hemagglutinin yang disalut pada sel endotel (HUVECs), maka semakin kecil nilai adhesi bakteri *P. aeruginosa*.

Saran

Perlu dilakukan analisis molekuler lebih lanjut terhadap protein hemagglutinin pili *P. aeruginosa* dengan berat molekul 38,19 kDa. Hal ini bertujuan untuk membuktikan kemungkinan pili potongan ketiga dengan berat 38,19 kDa merupakan salah protein hemagglutinin dan merupakan satu faktor virulensi pada sel endotel normal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Virella, G. 1997. Gram-negative Rods III: Opportunistic and Zoonotic Bacteria; Microbiology and infectious disease 3rd edition. Williams and Willins awaverly Company. Philadelphia.
2. Salyers, A.A., D. Whitt. 1994. Bacterial Pathogenesis. ASM Press. Washington DC.
3. Comolli, J.C., L.L. Waite, K.E. Mostov, J.N. Engel. 1999. Pili Bending to Asialo-GM 1 on Epithelial Cells Can Mediate Cytotoxicity or Bacterial Internalisation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*. 67: 7:3207–3214.
4. Martino, P.D., Y. Bertin, J.P. Girardeau, V. Livrelli, B. Joly. 1995. Molecular Characterization and Adhesive Properties of CF29K an Adhesin of *Klebsiella pneumoniae* Strain Involved in Nosocomial Infection. *Infection and Immunity* 67:700–707.
5. Witzemann, T.M., J.E. Adamoum, S. Langermann. 1999. Adhesins as Targets for Vaccine Development. Centers for Disease Control and Prevention. USA.
6. Tompkins D.C., V.B. Hatcher, D. Patel, G.A. Orr, C.L. Higgins, F.D. Loury. 1985. A Human Endothelial Cell Membrane Protein that Binds *Staphylococcus aureus* In Vitro. *J.Clin Invest*. 65:1248-1254.
7. Plotkowski, M.C., A.M. Saliba, S.H. Pereira, M.P. Cervante, O. Bajolet-Laudinat. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* selective adherence to and entry into human endothelial cells. *Infection and Immunity*. Dec. 62:5456-5463.
8. Ehara, M., M. Ishibashi, Y. Ichinose, M. Iwanaga, S. Shimotori, T. Naito. 1987. Purification and Partial Characterization of Pili of *Vibrio cholerae* O1. *Vaccine* 5:283-288.
9. Laemli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Protein During Assembly of The Head of Bacteriophage T.4. *nature* 227:680-685.

10. Hanne, L.F., R.A. Finkelstein. 1982. Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*. April. 36. 1:209–214.
11. Nagayama, K., T. Oguchi, M. Arita, T. Honda. 1995. Purification and Characterization of A Cell Associated Haemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*. 63. 5:1987–1992.
12. Sumarno. 2000. Karakterisasi Molekuler Protein Adhesi *Vibrio Cholerae* O1 M094V dan Protein reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih (Wistar). Tesis. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
13. Stathopoulos, C., D.R. Hendrixson, D.G. Thanassi, S.J. Hultgreen. 2000. Secretion of Virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story. *Microbes and infection*. 2:1061–1072.
14. Lin-Tong, J., G. Rafael, R.T.M. Boudreau, A.C. Issekutz. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Activates Human Mast Cells to Induce Neutrophil Trans-endothelial Migration Via Mast Cell-Derived IL-1 α and IL-1 β ¹. *Journal Immunology*. 169:4522-4530
15. Comer, J.E., M.A. Marshal, V.J. Blanch, C.D. Deal. 2002. Identification of the *Pseudomonas aeruginosa* 1244 Pili glycosylation Sit. *Infection and Immunity*. 70. 6:2837–2845.
16. Castric, P., F.J. Cassels, R.W. Carlson. 2001. Structural Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 1244 Pili Glycan. *Journal of Biological Chemistry*. 270. 28:26479 – 26485.

Pengaruh Pemberian Kalsium terhadap Pertumbuhan *Plasmodium falciparum* in Vitro

Verry Asfirizal^{1*}, Soebaktiningsih², Sudjari², Sumarno², Loeki E. Fitri²

¹ Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Mulawarman, Samarinda

² Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Peningkatan permeabilitas sel eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum* terhadap ion dan makromolekul diketahui sebagai mekanisme parasit untuk memenuhi nutrisi dalam proses pertumbuhan. Peningkatan permeabilitas terhadap kalsium masih merupakan hal yang kontradiktif dalam peranannya meningkatkan pertumbuhan *Plasmodium falciparum* dalam sel eritrosit. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui peningkatan pertumbuhan *Plasmodium falciparum* dalam sel eritrosit pasca pemberian kalsium. Biakan primer *Plasmodium falciparum* dalam medium biakan RPMI 1640 yang menghasilkan parasitemia 15%, dilakukan inokulasi untuk pembuatan subkultur yang menghasilkan parasitemia 2% dan dilakukan pembagian untuk kelompok perlakuan pemberian kalsium dan kontrol (ML 10%) dengan replikasi 3 kali. Pengamatan dilakukan hari pertama sampai hari ke-6 setelah perlakuan. Pengamatan pertumbuhan dilakukan dengan parameter parasitemia, bentuk skizon, hemolisis dan kalsium intraseluler. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian kalsium menghasilkan peningkatan tertinggi jumlah total rerata parasitemia ($11,09 \pm 4,01$) (Rerata \pm SD), bentuk skizon ($23,52 \pm 10,83$), hemolisis ($0,278 \pm 0,03$) dan kalsium intraseluler ($6,55 \pm 1,88$), dibandingkan dengan media biakan kontrol (ML 10%). Analisis T-test ($\alpha = 0,05$) menghasilkan perbedaan yang signifikan pada parameter parasitemia, bentuk skizon, hemolisis tetapi tidak memberikan perberbedaan yang signifikan pada parameter kalsium intraseluler.

Kata kunci: glukosa, hemolisis, kalsium, kalsium intraseluler, parasitemia, skizon

PENDAHULUAN

Malaria adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh protozoa obligat intraseluler dari genus *Plasmodium*. Penularan malaria dilakukan oleh nyamuk betina dari *Tribus anopheles*. Saat ini telah ditemukan sekitar 400 spesies nyamuk *Anopheles* dan telah diteliti bahwa 67 spesies dapat menularkan malaria, dari jumlah tersebut 24 spesies diantaranya ditemukan di Indonesia. Dari berbagai spesies *Plasmodium*, *Plasmodium falciparum* dilaporkan telah banyak menyebabkan kematian karena mempunyai masa inkubasi paling pendek, kemampuan menginfeksi paling berat dan menghasilkan parasitemia paling tinggi walaupun masa infeksinya paling pendek [1]. Konsentrasi kalsium didalam sitoplasma sangat rendah dibanding diluar sel, yaitu $0,1 \mu\text{M}$, pada kondisi sel eritrosit yang terinfeksi parasit *Plasmodium falciparum* konsentrasi kalsium dalam sel meningkat [2]. Hal ini disebabkan peningkatan pengambilan kalsium oleh sel eritrosit karena peningkatan permeabilitas anion

dan metabolit didalam sel atau untuk kebutuhan partumbuhan parasit.

Rendahnya konsentrasi kalsium intraseluler dipertahankan oleh suatu mekanisme Ca^{2+} pump, pada eritrosit yang terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum* fungsi dari Ca^{2+} pump ini sebagian besar masih normal [3]. Pada penderita malaria *Plasmodium falciparum* banyak dijumpai kondisi anemia. Anemia disebabkan adanya gangguan fragilitas sel eritrosit yang menyebabkan eritrosit lisis. Penyebab lisisnya eritrosit bersifat multifaktorial, peristiwa pelisisan eritrosit merupakan akibat respon imun dari hospes [1]. Beberapa penelitian mengemukakan bahwa peningkatan konsentrasi kalsium yang menstimulasi enzim transglutaminase menyebabkan deformitas sel eritrosit yang memudahkan sel lisis [4]. Berdasarkan hal tersebut maka pada penelitian ini diamati faktor lain yang diduga dapat menyebabkan sel eritrosit lisis yaitu peningkatan pertumbuhan parasit dalam sel eritrosit dengan pemberian ion kalsium.

METODE PENELITIAN

Pengamatan Lisis Sel Eritrosit

Pemeriksaan konsentrasi hemoglobin pada larutan supernatan dilakukan dengan instrumen

* Alamat korespondensi penulis:

Verry Asfirizal

e-mail : asfirizal@yahoo.com

Alamat : Jl. Krayan Kampus Unmul Gn. Kelua
Samarinda, Kalimantan Timur, 75119

Microplate reader Birad model 550, dengan panjang gelombang yang spesifik terhadap hemoglobin yaitu 540 nm. Nilai satuan absorbansi cm M.

Perhitungan Kalsium Intraseluler dengan Pengecatan Von Kossa

Penghitungan kalsium intraseluler dengan pengecatan Von Kossa dilakukan dengan cara ditambahkan larutan silver nitrat 5% pada apusan darah tipis sampai semua permukaan hapusan tertutupi oleh larutan silver nitrat 5%. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali, dihitung jumlah sel yang terdapat bercak hitam setiap 200 sel eritrosit yang diamati.

Pemeriksaan pertumbuhan *P. falciparum*

Setiap well dilakukan pengambilan 20 µL sel eritrosit untuk membuat hapusan darah tipis, fiksasi dengan methanol dan lakukan pewarnaan dengan Giemsa 25%. Dihitung parasitemia dengan menggunakan estimasi mikroskop yaitu persentase jumlah parasit yang menginfeksi eritrosit per 1000 jumlah eritrosit yang diamati serta penghitungan fase maturasi skizon.

Analisis Data

Data yang diperoleh pada kelompok perlakuan pemberian kalsium 15 µM kalsium dan kontrol (ML 10%), dianalisis perbedaan hasil pada setiap parameter yang ditentukan, yaitu parasitemia, bentuk skizon, hemolisis dan konsentrasi kalsium dengan uji beda menggunakan analisis T-test dengan uji beda nyata jujur pada taraf signifikansi 95%.

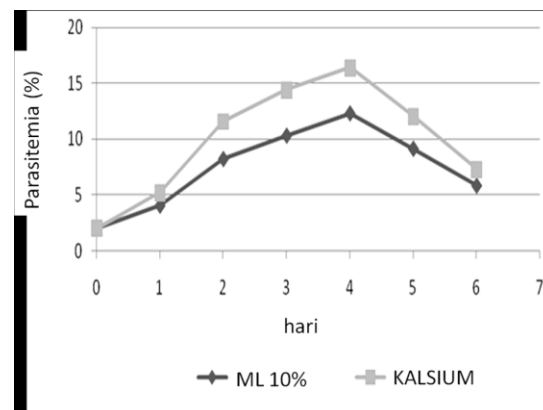
HASIL DAN PEMBAHASAN

Parasitemia

Berdasarkan perhitungan parasitemia pada media biakan diketahui terdapat peningkatan yang cukup tajam pada hari pertama sampai hari kedua. Pada hari ke-3 sampai ke-4 semua media mengalami peningkatan parasitemia meskipun peningkatan ini tidak setajam pada hari pertama dan hari ke-2. Pada hari ke-4 pengamatan, terjadi penurunan nilai parasitemia sampai pada hari ke-5 sampai ke-6 (Gambar 1). Peningkatan parasitemia pada perlakuan pemberian kalsium sebagai *second messenger* memberikan peningkatan parasitemia yang lebih tinggi (11,09 ± 0,38) (Rerata ± SD) dibanding dengan media biakan dasar ML 10% (8,28 ± 2,82). Secara keseluruhan terdapat perbedaan yang bermakna pada analisis T-test (α = 0,05).

Peningkatan parasitemia sampai pada hari ke-4 (Gambar 1) menunjukkan bahwa kalsium berpengaruh terhadap peningkatan jumlah

eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum* (parasitemia). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya tentang nilai parasitemia dihasilkan dari suatu proses invasi dan pertumbuhan atau maturasi parasit dalam sel eritrosit, menyatakan bahwa semakin baik dan cepat suatu proses invasi dan maturasi tersebut maka akan meningkatkan jumlah eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum*.



Gambar 1. Rata-rata parasitemia (%) dengan pemberian kalsium dan kontrol (ML 10 %) hari ke-1 sampai ke-6.

Tabel 1. Rerata total parasitemia (%) pada media biakan dasar ML 10% dengan pemberian kalsium (15 µM) dan kontrol

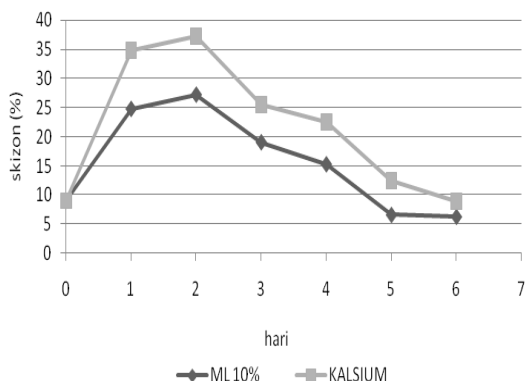
Media Biakan	Parasitemia (Rerata ± SD)	Uji t test (p < 0.05)
Kontrol (ML 10%)	8,28 ± 2,82	0,000
Kalsium	11,09 ± 4,01	

Kirk (2001) [5] dan Wasserman (1999) [6], menyatakan bahwa kalsium berperan penting dalam proses invasi merozoit dan proses maturasi dalam sel eritrosit. Selain itu masuknya kalsium ke dalam sel eritrosit selama proses invasi parasit akan menyebabkan peningkatan konsentrasi kalsium pada sitoplasma merupakan *second messenger* dalam menstimulasi suatu aktifitas molekuler yang mengakibatkan sel eritrosit semakin mudah terinfeksi parasit.

Skizon

Hasil pengamatan pada hari ke-1 dan hari ke-2 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah skizon tertinggi yakni pada media yang mengandung kalsium sebanyak 37,22 ± 2,96, sedangkan pada kontrol (ML 10%) 27,38 ± 6,99. Setelah hari kedua, rerata jumlah skizon yang

dihasilkan oleh semua media biakan mengalami penurunan sampai hari ke-6 (Gambar 2).



Gambar 2. Rerata skizon (%) dengan pemberian kalsium dan media biakan dasar ML 10% (kontrol) hari ke-1 sampai ke-6

Hasil pengamatan skizon dengan pemberian kalsium menunjukkan adanya peningkatan maturasi. Nilai rerata skizon pada media biakan mengandung kalsium ($23,52 \pm 1,09$) dan kontrol ML 10% ($16,55 \pm 2,00$). Secara keseluruhan dapat ditunjukkan adanya perbedaan bermakna pada uji statistik T-test ($\pm 0,05$) (Tabel 2).

Kalsium berperan penting dalam pertumbuhan normal parasit dalam sel eritrosit. Kalsium ditemukan lebih tinggi pada sel eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum*. Selain itu terjadi peningkatan kalsium pada fase maturasi trophozoit yang akan mengalami perubahan menjadi skizon [7]. Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa konsentrasi kalsium pada fase skizon jam ke-36 terlihat adanya perbedaan 3 kali lebih tinggi pada kalsium sitosol dibandingkan dengan kelompok kontrol dan mencapai puncak pada fase skizon jam ke-44, yaitu terlihat perbedaan 4 kali lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini juga didukung oleh penelitian Kirk (2001) [5], yang menyatakan bahwa pada fase awal trophozoit konsentrasi kalsium sitosol parasit mencapai 40-44 nM dan meningkat menjadi 110-125 nM pada fase akhir trophozoit atau fase skizon. Salah satu mekanisme fungsi kalsium yang berhubungan dengan proses maturasi parasit *Plasmodium falciparum* dalam sel eritrosit adalah peran kalsium dalam menstimulasi aktifnya enzim protein kinase dari *Plasmodium falciparum* yaitu PfCDPK1. PfCDPK1 berperan dalam proses biogenesis yaitu proses pembentukan membran vakuola *parasitophorus* pada fase trophozoit, sistem *vacuolar tubular* didalam sitosol eritrosit, vakuola yang bersifat dinamik pada fase trophozoit dan skizon, serta

pembentukan membran pada merozoit yang belum matur. Proses tersebut merupakan mekanisme yang menunjang proses maturasi [8].

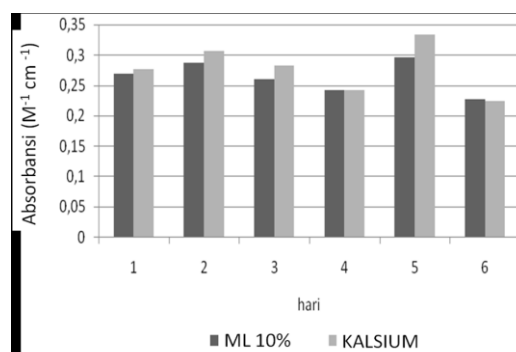
Tabel 2. Rerata total bentuk skizon (%) pada media biakan dasar ML 10% dengan pemberian kalsium ($15 \mu\text{M}$) dan kontrol

Media Biakan	Skizon (Rerata \pm SD)	Uji t'test ($p < 0.05$)
Kontrol (ML 10%)	$16,55 \pm 8,80$	0,000
Kalsium	$23,52 \pm 10,83$	

Hemolisis

Hasil rerata pengamatan hemolisis pada media biakan menunjukkan bahwa pada hari ke-2 terjadi perbedaan, yaitu pada biakan kontrol (ML10%) sebesar $0,28 \pm 0,01$ dan pada biakan kalsium sebesar $0,30 \pm 0,01$ (sampai pada hari ke-4). Sedangkan pada hari ke-5 menunjukkan adanya peningkatan nyata, yaitu pada media biakan kontrol (ML10%) sebesar $0,29 \pm 0,01$ dan kalsium sebesar $0,33 \pm 0,01$ (Gambar 3).

Hasil analisis pada hari ke-5 dan ke-6 (Gambar 4) menunjukkan bahwa terdapat sel eritrosit tidak normal. Sel eritrosit ini mengalami *crenation* pada media kontrol (ML 10%). *Crenation* terlihat pada sel eritrosit yang tidak terinfeksi *Plasmodium falciparum* dan tidak terlihat pada sel yang terinfeksi. Hal ini menjelaskan bahwa tingginya nilai absorbansi pada hari ke-5 dapat disebabkan oleh lisisnya sel eritrosit disebabkan karena kondisi eritrosit yang tidak normal akibat lama waktu perlakuan.



Gambar 3. Rerata absorbansi (cm M) dengan pemberian kalsium pada media biakan dasar ML 10% dan kontrol (ML 10%) hari ke-1 sampai ke-6

Hasil analisis statistik dengan T-test ($\alpha = 0,05$) diketahui bahwa secara keseluruhan media biakan kalsium ($0,278 \pm 0,012$) terdapat perbe-

daan yang signifikan terhadap kelompok media biakan kontrol ML 10% ($0,265 \pm 0,007$).

Tabel 3. Rerata total absorbansi (cm M) pada media biakan dasar ML 10% dengan pemberian glukosa kalsium ($15 \mu\text{M}$) dan kontrol (ML 10%)

Media Biakan	Absorbansi (Rerata \pm SD)	Uji t'test ($p < 0.05$)
Kontrol (ML 10%)	$0,265 \pm 0,02$	0,000
Kalsium	$0,278 \pm 0,03$	

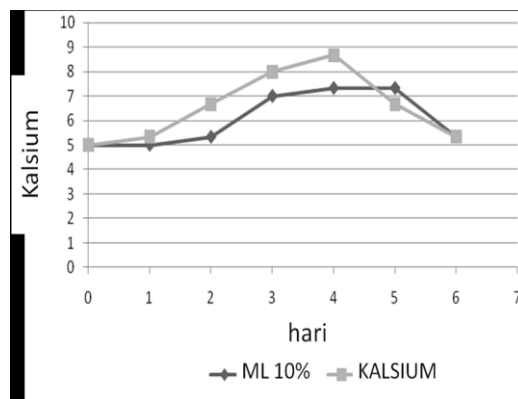
Hasil penelitian terhadap hemolisis menunjukkan bahwa penambahan kalsium memberikan nilai absorbansi lebih tinggi dibandingkan dengan media biakan kontrol (Tabel 3). Hal ini memberikan suatu gambaran yang sama terhadap peningkatan nilai parasitemia dan bentuk skizon. Menurut Gracia (1999) [9], peningkatan level kalsium sitosol bagi parasit merupakan hal penting untuk terjadinya proses invasi, sinkronisasi dan ekspresi gen yang menyebabkan membran sel eritrosit *ruptur* oleh maturnya skizon. Hal ini didukung oleh Wessermert (1999) [6] yang menjelaskan bahwa pemberian kalsium menyebabkan konsentrasi kalsium intraseluler meningkat sebesar 30% dan enzim transglutaminase pada sel eritrosit terinfeksi *P. falciparum* terlihat lebih dominan pada tahap akhir fase skizon. Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa perubahan rigiditas dan perubahan bentuk sel eritrosit pada akhir fase maturasi parasit merupakan suatu mekanisme dikeluarkannya merozoit hasil maturasi dengan lisisnya sel eritrosit. Pada kelompok kontrol eritrosit yang tidak terinfeksi *Plasmodium falciparum* tidak terlihat adanya fenomena diatas.

Konsentrasi Kalsium

Hasil pengamatan terhadap konsentrasi kalsium menunjukkan adanya perbedaan nilai rerata konsentrasi kalsium pada hari ke-3 dan hari ke-4 yaitu terhadap media yang mengandung kalsium ($6,66 \pm 0,57$) dengan media biakan kontrol ML 10% ($5,66 \pm 1,15$). Pada hari ke-4 konsentrasi kalsium mengalami peningkatan yang signifikan pada semua media yakni media biakan kontrol ML 10% ($8,66 \pm 0,57$) dan kalsium ($8,66 \pm 1,52$) (Gambar 4).

Terjadinya peningkatan kalsium ke dalam sel eritrosit yang terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum* terjadi pada media biakan dengan kalsium (Gambar 4 dan Tabel 3). Hal ini

menunjukkan bahwa masuknya kalsium ke dalam eritrosit mengakibatkan adanya pengaruh nilai konsentrasi kalsium yang berbeda pada media biakan dengan kalsium maupun kontrol. Masuknya kalsium ke dalam parasit sangat penting untuk proses invasi normal, terlihat 2 jam setelah invasi parasit kedalam eritrosit terjadi peningkatan konsentrasi kalsium 10 kali dari sel eritrosit normal [10].



Gambar 4. Rerata sel eritrosit yang terdapat bercak kalsium dari 200 sel eritrosit yang diamati, dengan pemberian kalsium dan media biakan dasar ML 10% (kontrol) hari ke-1 sampai ke-6.

KESIMPULAN

Pemberian kalsium dapat meningkatkan pertumbuhan *P. falciparum*. Peningkatan pertumbuhan *P. falciparum* yang signifikan dapat dilihat dari peningkatan jumlah sel eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum*, maturasi parasit *P. falciparum*, peningkatan hemolisis dan peningkatan konsentrasi kalsium dalam sel eritrosit pasca pemberian kalsium.

DAFTAR PUSTAKA

1. Harijanto, P.N. 2000. Malaria: Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Penanganannya, Edisi pertama. Penerbit EGC. Jakarta.
2. Desai, S.A., E.W. McCleskey. 1996. A Novel Pathway for Ca^{2+} Entry into *Plasmodium falciparum*-Infected Blood Cell. *Am J Trop Med Hyg.* 54. 5:464-470.
3. Tiffert, T., H.M. Staines. 2000. Functional State The Plasma Membrane Ca^{2+} Pump in *Plasmodium falciparum* Infected Human Red Blood Cells. *J Physiol.* 525. 1:125-134.
4. Krogstad, D.J. 1991. Physiologic Rate of Carrier-Mediated Ca^{2+} Entry Matches Active Extrusion in Human Erythrocytes. *The journal of general physiology.* 98:349-364.

5. Kirk, K. 2001. Membrane Transport in The Malaria-Infected Erythrocyte. *Physiological Reviews*. Vol.81. 2:495-537.
 6. Wasserman, M., A.M. Marquez, M. Urquiza, P. Jimenez. 1999. Increase of a Calcium Independent Transglutaminase Activity in The Erythrocyte during The Infection with *Plasmodium falciparum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94. 1:95-100.
 7. Kramer, R., H. Ginsburg. 1991. Calcium Transport and Compartement Analysis of Free and Exchangeable Calcium in *Plasmodium falciparum* Infected Red Blood Cells. *J. Protozool*. 38. 6:594-601.
 8. Kappes, B. 2001. Calcium-Dependent Protein Kinase of *Plasmodium falciparum*: Protein kinase as Drug Target for Parasitic Protozoa. COST. Paris.
 9. Garcia, C.R.S., 1999. Calcium Homeostasis and Signaling in the Blood-Stage Malaria Parasite. *Parasitology Today*. 15. 12:488-491.
- Wasserman, M., Vernet, J.P. 1990. Role of Calcium and Erythrocyte Cytoskeleton Phosphorylation in the Invasion of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res*. 76. 8:681-688.

Pengaruh Outer Membrane Protein *Helicobacter Pylori* terhadap Perubahan Histopatologi Mukosa Lambung dan S-IgA pada *Mus musculus* Outbred Balb/C

Yuniati^{1*}, Harijono Achmad², Sumarno²

¹ Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Mulawarman, Samarinda
² Program Studi Biomedik, Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Helicobacter pylori (*H. pylori*) merupakan bakteri penyebab inflamasi mukosa lambung. Faktor virulensi bakteri berperan pada patogenesis penyakit infeksi oleh bakteri yang pada umumnya dapat merangsang sistem imun. Secara umum antigen yang merupakan faktor virulensi ini terdapat dalam *Outer Membrane protein* (OMP). Pemberian antigen secara per oral mampu menginduksi respon imun mukosal dengan cara membentuk *Secretory IgA* (S-IgA). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh OMP *H. pylori* terhadap histopatologi mukosa lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C dan peningkatan konsentrasi S-IgA pada *Mus musculus* Outbred Balb/C. Metode Penelitian yang digunakan adalah *Post-test only kontrol group design*. Bakteri *H. pylori* dikultur kemudian dilakukan isolasi OMP dengan menggunakan bahan *n-Octyl-β-D-Glucoopyranoside* (NOG) 0,5% melalui isolasi bertahap dan dilakukan SDS-PAGE. Setelah itu dilakukan *coupling* dengan CTB dan diberikan ke mencit secara intragastrik dengan dosis 100 µgml⁻¹ setiap minggu. Pada akhir minggu ke-2, ke-4, ke-6 dan ke-8 dilakukan pemeriksaan histopatologis dan kadar S-IgA. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) pada perhitungan jumlah sel polimorfonuklear (PMN), jumlah sel Mononuklear (MN) dan kadar S-IgA antara kelompok kontrol dan perlakuan. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa OMP *H. pylori* dapat menyebabkan kerusakan mukosa lambung menginduksi S-IgA *Mus musculus* Outbred Balb/C.

Kata Kunci : *Helicobacter pylori*, *n-Octyl-β-D-Glucoopyranoside*, *outer membrane protein* (OMP)

PENDAHULUAN

Pada tahun 1983, Marshall dan Waren berhasil mengisolasi *Campylobacter pylori* yang sekarang dikenal sebagai *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) dari mukosa lambung penderita gastritis kronis aktif. *H. pylori* telah diterima secara universal sebagai penyebab utama inflamasi mukosa lambung di seluruh dunia dan akhir-akhir ini dilaporkan sebagai faktor resiko terjadinya penyakit jantung koroner [1]. *H. pylori* merupakan organisme penting yang dapat menyebabkan infeksi kronik yang tersebar luas di seluruh dunia. Hampir separuh populasi dunia dewasa dibuktikan secara serologi terinfeksi penyakit ini [2,3,4]. Beberapa laporan terbaru menyokong hubungan antara infeksi ini dengan mayoritas penyakit gastrointestinal bagian atas seperti gastritis, ulkus peptik, adenokarsinoma gaster [3,4,5] serta *mucosal-associated lymphoid tumor* (suatu jenis limfoma gaster) [5,6,7].

Diketahui 72%-98% pasien dengan *mucosal-associated lymphoid tumor* telah terinfeksi *H. pylori*. Kanker gaster merupakan penyebab kematian nomor dua dari seluruh kematian yang disebabkan oleh kanker, dan telah terbukti bahwa *H. pylori* meningkatkan resiko terjadinya kanker gaster [6].

Bukti *Helicobacter pylori* sebagai patogen gastrointestinal sekarang ini sangat banyak sekali. Sebagai contoh, *H. pylori* telah diisolasi 95% dari mukosa gaster pasien dengan penyakit ulkus lambung dan 100% dari pasien dengan gastritis kronik tetapi tidak ditemukan dari jaringan sehat [1]. Hasil penelitian pengujian anti-*H. pylori* dengan metode *Passive Haemagglutinin* (PHA) di Malang, didapatkan angka prevalensi gastritis kronik pada penderita dispepsia sebesar 90,3%, sedangkan pada kultur mukosa antrum ditemukan bakteri *H. pylori* sebesar 69% [8]. Studi yang dilakukan di Korea yang merupakan negara dengan transformasi dari negara non industri menuju negara industri pada dua dekade yang lalu menunjukkan bahwa insiden infeksi *H. pylori* pada dewasa sama dengan negara yang sedang berkembang. Berdasarkan status sosial ekonomi, angka kejadian infeksi *H. pylori* di Korea lebih

* Alamat korespondensi penulis:
Yuniati
e-mail : yuni_ati@yahoo.com
Alamat : Jl. Krayan Kampus Unmul Gn. Kelua
Samarinda, Kalimantan Timur, 75119

tinggi pada masyarakat ekonomi rendah [9]. Berdasarkan hal tersebut diketahui bahwa potensi kejadian infeksi *H. Pylori* di Indonesia besar. Menurut Sanarto, OMP dari *Salmonella typhi* mampu menginduksi respon imun mukosal protektif dengan cara membentuk *Secretory Immunoglobulin-A* (S-IgA) membantu penghambatan atau proteksi proses adhesi dan kolonisasi *Salmonella typhi* pada enterosit mencit [10].

Mekanisme *H. pylori* dalam menyebabkan peradangan dan kerusakan mukosa masih belum dapat dipastikan dan masih sedikit dimengerti [2,11]. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa bakteri menginvasi sel-sel epitel permukaan sampai batas tertentu. Bakteri menghasilkan toksin dan lipopolisakarida yang dapat merusak sel-sel mukosa, dan dibentuk ammonia oleh aktivitas urease yang secara langsung merusak sel-sel juga [11]. Respon imun terhadap antigen oral berbeda jika dibandingkan respon imun terhadap antigen di tempat lain. Perbedaan utama disebabkan oleh adanya produksi kadar IgA yang tinggi di jaringan mukosa. Immunoglobulin-A ditemukan dalam serum dengan jumlah sedikit tetapi kadarnya dalam cairan sekresi saluran nafas, saluran cerna, saluran kemih, air mata, keringat, ludah dan air susu ibu lebih tinggi dalam bentuk IgA sekretori (S-IgA) [12]. Secretory IgA akan mengikat mikroba dan diperlukan untuk mencegah penempelan mikroorganisme pada epitel serta bersama komplemen diperlukan untuk fagositosis bakteri *H. pylori* sehingga memblokir masuknya *H. pylori* [13]. *H. pylori* diketahui berada di luar sel mukosa lambung, tetapi OMP *H. pylori* dapat menyebabkan kerusakan di mukosa lambung oleh karena itu perlu diketahui mekanisme kerusakan yang ditimbulkan OMP *H. pylori* terhadap mukosa lambung dan peningkatan konsentrasi S-IgA pada mukosa lambung.

METODE PENELITIAN

Koleksi Bakteri *H. pylori*

H. pylori yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari penderita gastritis kronik dewasa yang berobat jalan ke Poliklinik Rumah Sakit Umum (RSU) Mataram kemudian dilakukan endoskopi.

Medium Transpor

Medium transpor yang digunakan adalah medium *tioglikolat broth*. Medium ini terdiri dari *charcoal pharmaceutical neutral* 10 g l⁻¹, *sodium chloride* 3 g l⁻¹, *sodium hydrogen phosphat* 1,15 g l⁻¹, *potassium dihydrogen phosphat* 0,2 g l⁻¹, *potassium chloride* 0,2 g l⁻¹, *sodium thioglycollate*

1 g l⁻¹, *calcium chloride* 0,1 g l⁻¹, *magnesium chloride* 0,1 g l⁻¹ dan 1 g l⁻¹ agar.

Pewarnaan Gram

Untuk pewarnaan Gram dibuat sediaan (*smear*) bakteri pada gelas obyek terlebih dahulu. Sesudah kering di udara, difiksasi dengan panas api lampu spiritus. Kemudian diwarnai dengan urutan sebagai berikut, sediaan dituangi dengan larutan kristal violet, dan didiamkan selama satu menit. Larutan kristal violet dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dituangi dengan lugol, kemudian didiamkan selama satu menit. Kemudian sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dituangi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dituangi dengan Safranin, didiamkan selama 30 detik. Sisa Safranin dibuang dan dibilas dengan air. Selanjutnya sediaan dikeringkan menggunakan kertas penghisap. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 100 kali. Bakteri yang tampak berwarna merah dikatakan Gram negatif.

Uji Urease

Pembuatan media urea adalah sebagai berikut *urea Agar Base* CM53 ditimbang sebanyak 2,4 g kemudian dilarutkan dengan 95 ml akuades steril dengan autoklaf 115 °C selama 20 menit. Setelah suhu media mencapai 50 °C kemudian ditambah dengan 5 ml urea *Oxoid SR 20* 40%. Media selanjutnya dibagikan ke dalam tabung steril lalu dimiringkan.

Uji Oksidase

Reagen oksidase dibuat dengan melarutkan 50 mg *paraamino dimetil aniline oxalate* dalam 5 ml akuades steril. Reagen oksidase diteteskan dengan menggunakan pipet pada koloni yang dicurigai. Jika terjadi Perubahan warna koloni yang ditetesi menjadi merah menjadi hitam dikatakan uji oksidase positif.

Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan medium cair *Mueller Hinton* yang terdiri dari *beef infusion* dari 300 g l⁻¹, *casein hydrolysate* 17,5 g l⁻¹, *starch* 1,5 g l⁻¹. Sebanyak 25 g medium *Mueller Hinton* dilarutkan dalam satu liter air suling. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml tiap tabung reaksi. Kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit dan selanjutnya didinginkan pada suhu kamar. Sesudah dingin diuji sterilitasnya dengan cara dieramkan dalam lemari pengeram pada suhu 37 °C selama semalam. Dilakukan inokulasi bakteri di medium cair *Mueller Hinton* yang tetap steril. Bakteri

subyek penelitian ditanam pada medium cair *Mueller Hinton* dan dieramkan secara mikro-aerofilik selama 5x24 jam pada suhu 37 °C. Pertumbuhan bakteri yang terjadi ditetesi dengan 0,5 ml larutan H₂O₂ 3% lalu dikocok. Bila timbul gelembung-gelembung gas dari dasar tabung reaksi menuju ke permukaan biakan cair dikatakan uji katalase positif.

Uji Gula

Pengujian glukosa dilakukan dengan melarutkan glukosa 2 g *Oxoid L71* dengan air pepton 200 ml, kemudian ditambahkan *Endrades* 2 ml, dan selanjutnya dibagi dalam tabung-tabung serologi Durham. Media tersebut disterilisasi dengan suhu 115 °C selama 10 menit.

Pengujian laktosa, dilakukan dengan melarutkan sebanyak 2 gram laktosa *Oxoid L70* dengan air pepton 200 ml, ditambahkan *Endrades* 2 ml. Media kemudian dibagi dalam tabung serologi Durham dan disterilkan pada suhu 115 °C selama 10 menit.

Pengujian maltosa, dilakukan dengan melarutkan sebanyak 2 gram maltosa *BBL 12029* dengan air pepton sebanyak 200 ml, kemudian ditambahkan *Endrades* 2 ml. Media selanjutnya dibagi dalam tabung serologi Durham dan disterilkan pada suhu 115 °C selama 10 menit.

Suasana Mikroaerofilik

Suasana mikroaerofilik (O₂ 5-6%, CO₂ 8-10%, N₂ 80-85% dan kelembaban relatif 95%) diperoleh dengan menggunakan *gas generating kit* BR 38 yang diletakkan di dalam sungkup anaerob. Tiap kantong *gas generating kit* mengandung tablet *sodium borohydrida*, asam tartarat dan natrium bikarbonat. Bila ditambahkan 10 ml air ke dalam kantong *gas penetrating kit* tersebut maka akan dihasilkan 1.800 ml gas H₂ dan 350 ml gas CO₂.

Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan mencit jantan dari jenis *Mus musculus* Outbred Balb/C yang berumur 4 minggu, sebanyak 28 ekor dari Pusvetma Waru-Surabaya. Mencit dipilih yang sehat dengan indikator pada hasil kultur tinja mencit tidak terdapat pertumbuhan *H. pylori*.

Isolasi Protein Hemaglutinin Outer Membrane Protein (OMP) *H. pylori*

Penelitian ini dikerjakan dalam 2 tahap. Pertama pemisahan pili dan kedua pemisahan OMP. Tahap pertama merujuk metode dari Ehara [14]. Pili dipanen dari 50 botol biakan bakteri. Hasil koleksi bakteri ditambahkan *Trichloroacetic acid* (TCA) sampai konsentrasi 3%. Setelah itu dikocok rata maka diletakkan pada suhu kamar selama satu jam. Selanjutnya dilakukan

sentrifugasi 6.000 rpm selama 30 menit suhu 4 °C. Pelet diambil, diresuspensi dengan cairan PBS pH 7,4 perbandingan 1:10. Bakteri dicukur dengan menggunakan *mixer* yang didesain oleh Laboratorium Politeknik Universitas Brawijaya Malang. Bakteri dicukur dengan kecepatan penuh selama satu menit, diulang sampai 5 kali dengan masa istirahat satu menit. Hasilnya dilakukan sentrifugasi selama 30 menit kecepatan 12.000 rpm suhu 4 °C selama 30 menit. Pili yang terletak pada bagian supernatan diambil. Endapan disuspensikan dengan larutan dan cara yang sama dan dikumpulkan dengan cara mencukur ulang sampai beberapa kali hingga diperoleh supernatan yang menunjukkan tes aglutinasi negatif. Tahap kedua, isolasi protein hemaglutinin OMP dengan metode modifikasi dari Evan's [15]. Modifikasi dilakukan pada bagian sampel yang digunakan yaitu bagian endapan dari perlakuan pemotongan pili pada putaran yang terakhir. Pelet disuspensikan dengan PBS pH 7,4 sampai volumenya mencapai 15 kali, kemudian ditambah *N-Octyl-β-D-glucopyranoside* (NOG) konsentrasi mencapai 0,5%. Dilakukan homogenisasi dengan vortek kecepatan penuh selama satu menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi kecepatan 12.000 rpm suhu 4 °C selama 30 menit. Selanjutnya supernatan diambil dan dilakukan dialisa pada 24 jam pertama dengan menggunakan dH₂O dan pada 24 jam kedua dipakai PBS pH 7,4. Perlakuan ini diulangi sampai lima kali. Kemudian dilakukan SDS-PAGE.

Elektroforesis dengan Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Sampel protein dipanaskan 100 °C selama lima menit dalam larutan penyangga yang mengandung 5 mM Tris HCl pH 6,8, 5% 2-mercapto ethanol, 2,5% Sodium Dodecyl Sulfate, 10% glycerol dengan warna pelacak *bromophenol blue*. Dipilih 10% mini slab gel dengan tracking gel 4%. Voltase yang digunakan 125 mV, 120 mA, selama 130 menit. Sebagai bahan pewarna adalah *coomasie brilliant blue* dan dipergunakan molekul standar *sigma wide range marker* dengan menggunakan metode Laemmli dengan modifikasi Winarsih et al. [15].

Coupling OMP *H. pylori* dengan Cholerae Toxin B (CTB)

OMP yang dihasilkan kemudian di-coupling dengan *Cholerae Toxin B* (CTB). Hasil dari coupling OMP *H. pylori* dengan CTB tersebut baru diberikan ke masing-masing mencit perlakuan dengan dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu secara intragastrik dengan menggunakan sonde.

Sebelum diberi perlakuan, mencit diberi larutan natrium bikarbonat 0,2 M sebanyak 0,3 ml untuk menetralkan asam lambung. Pada akhir minggu ke 2, 4, 6, dan 8 dibandingkan perubahan gambaran histopatologi dan *Secretory Immunoglobulin A* (S-IgA) antara mencit kontrol dan perlakuan.

Pembuatan Slide Pemeriksaan Patologi Anatomi

Mencit dimatikan pada akhir minggu ke-2, ke-4, ke-6 dan ke-8 kemudian diambil lambungnya dan dibuat sediaan patologi anatomi dan diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin eosin. Pengamatan perubahan patologi anatomi lambung dilakukan dengan metode skoring.

Pemeriksaan Kadar *Secretory IgA* Metode ELISA

Pemeriksaan kadar S-IgA dikerjakan menurut metode Sanarto, yakni dengan memotong usus kemudian dicuci dengan PBS dingin yang mengandung *protease inhibitor* (25 µg ml⁻¹ *inhibitor cocktail*) dan 1,0 mM EDTA. Lapisan mukus diambil dengan cara *scraping* secara longitudinal menggunakan *spatel* dan ditampung di dalam tabung yang berisi PBS steril dan *protease inhibitor*. Suspensi dikocok kemudian disentrifugasi 12.000 rpm pada 4 °C selama 10 menit. Supernatan diambil dan digunakan sebagai sampel mukus untuk pemeriksaan S-IgA dengan metode ELISA [10].

Pemeriksaan ELISA dilakukan dengan metode Harlow and Lane. Tahap pertama adalah dimasukkan antigen OMP *H. pylori* 100 µl dalam sumuran lempeng mikrotiter untuk ELISA, diinkubasi semalaman pada suhu 4 °C. Kemudian sumur dicuci dua kali dengan *washing solution* (larutan PBS yang mengandung 0,05% Tween-20). Ditambahkan larutan 1% *Bovine Serum Albumin* (BSA) di dalam PBS dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam. Sumur dicuci sebanyak dua kali dengan *washing solution*. Selanjutnya ditambahkan antibodi primer yang berasal dari mukus sebanyak 100 µl. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama dua jam. Sumur dicuci sebanyak dua kali dengan *washing solution* dan ditambahkan antibodi sekunder (konjugat anti IgA mencit yang dilabel enzim *alkali-phosphatase*) sebanyak 100 µl, dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam. Sumur dicuci sebanyak dua kali menggunakan *washing solution*. Kemudian ditambahkan larutan substrat (campuran *p-nitrophenyl-phosphat*, *diethanol amine* dan MgCl₂) sebanyak 100 µl, diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam. Setelah terlihat warna kuning, ditambahkan *stop solution* (3M NaOH) dan segera diamati

Optical Density (OD) larutan pada panjang gelombang 405 nm menggunakan *ELISA reader*.

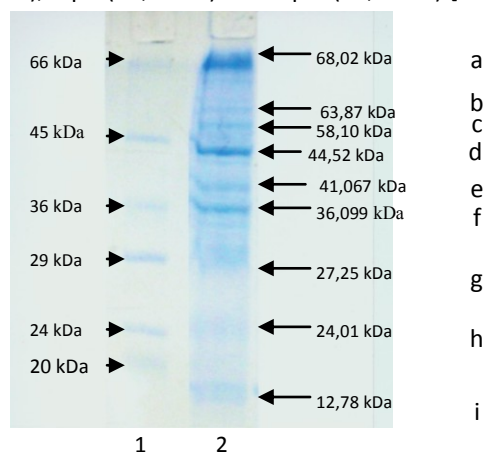
Analisa Data

Data yang diperoleh ditabulasi sesuai dengan kelompok perlakuan kemudian dianalisa dengan analisa sidik ragam satu arah (*Oneway ANOVA*) dan Uji Tukey.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Elektroforesis dengan *Sodium Dodecyl Silfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

Hasil elektroforesis OMP *H. pylori* dan marker dengan menggunakan metode SDS-PAGE, diperoleh data seperti pada Gambar 1. Hasil pengukuran pita protein pada OMP *H. pylori* diperoleh berat molekul protein pada kisaran 12,78 kDa, 24,01 kDa, 27,25 kDa, 36,099 kDa, 41,067 kDa, 44,52 kDa, 58,10 kDa, 63,87 kDa dan 68,02 kDa. Winarsih *et al.*, menemukan bahwa telah ditemukan protein hemagglutinin 32 kDa dan protein 20 kDa adalah *cell surface associated* dan merupakan faktor adhesi pada *H. pylori* galur lokal HP7M [16]. Peck menemukan bahwa protein 48 kDa disebut HopA (*Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein A), 49 kDa disebut HopB, 50 kDa disebut HopC, 67 kDa disebut HopD dan 31 kDa disebut HopE [17]. O'Toole mengemukakan bahwa protein yang terdapat pada *outer membrane* dan berperan sebagai faktor adhesi adalah HopZ (74,2 kDa), BabA (80,6 kDa), AlpA (56,4 kDa) dan AlpB (56,7 kDa) [18].



Gambar 1. Hasil elektroforesis OMP *H.pylori* dengan metode SDS-PAGE.

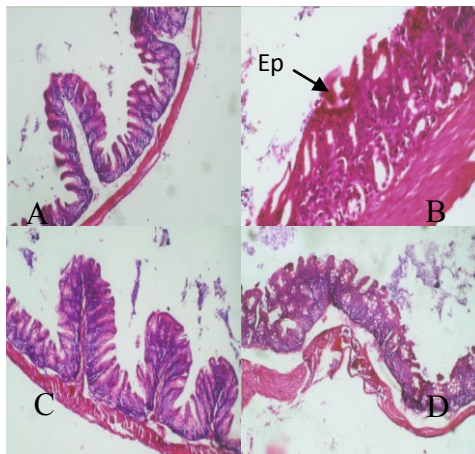
Keterangan:

1. Marker (Protein perunut)
2. OMP *H.pylori*

Analisis histopatologi pada lambung hewan coba pasca pemaparan OMP *H. pylori* dengan menggunakan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Pengaruh pemaparan dengan OMP *H. pylori* pada hewan model menunjukkan kondisi

histologi lambung diperoleh data seperti pada Gambar 2.

Menurut modifikasi Humphreys, gambaran histopatologi berdasarkan tingkat peradangan pada mukosa lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C normal (Gambar 2A dan 2C) mempunyai skor 0 (nol) yaitu epitel dalam batas normal, asinus kelenjar dalam batas normal, sebulan sel radang sangat minimal, pada kelompok yang dipapar OMP mempunyai skor histopatologis 0 (Gambar 2B) dan 1 pada kelompok 2 (Gambar 2D).



Gambar 2. Potongan lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C kelompok 1 dan 2 dengan pewarnaan hematoxililn eosin, perbesaran 100 kali.

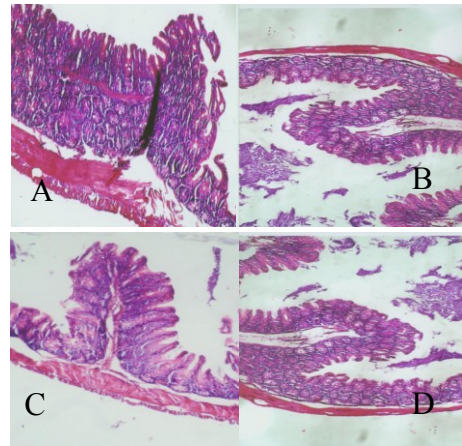
Keterangan:

- A. lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C kontrol
- B. lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C yang dipapar OMP *H. Pylori*
- C. lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C kontrol
- D. lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C yang dipapar OMP *H. Pylori*

Pemeriksaan Histopatologis

Menurut modifikasi Humphreys, gambaran histopatologi berdasarkan tingkat peradangan pada mukosa lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C normal pada kelompok 3 dan 4 (Gambar 3A dan 3C) mempunyai skor 0 (nol) sampai satu yaitu epitel dalam batas normal, asinus kelenjar dalam batas normal, sebulan sel radang minimal berjumlah 0 (nol) sampai lima, pada kelompok yang dipapar OMP, pada kelompok 3 (Gambar 3B) mempunyai skor histopatologis 2 sampai 3, pada bagian ini mulai terlihat epitel sebagian terkelupas, asinus kelenjar mengalami vakuolisasi, edema di antara jaringan periglandular dan sebulan sel radang berjumlah 8 sampai 10. Pada kelompok 4, (Gambar 3D) skor histopatologis yang ditemukan adalah 3 sampai 4, disini terlihat

epitel sebagian terkelupas, asinus kelenjar mengalami vakuolisasi dan atrofi, sebulan sel radang bertambah yaitu lebih dari 10.



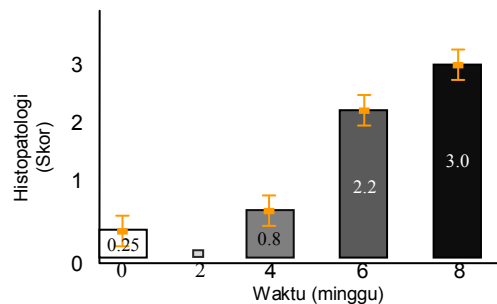
Gambar 3. Potongan lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C kelompok 3 dan 4 dengan pewarnaan hematoxililn eosin.

Keterangan:

A dan C adalah lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C kontrol sedangkan B dan D adalah lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C yang dipapar OMP *H. pylori*. A,C,D perbesaran 100 kali, B perbesaran 400 kali.

Pemeriksaan Patologi Anatomi (Skor Histopatologis)

Hasil analisa mengenai perbandingan skor histopatologis, antara kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada Gambar 4.



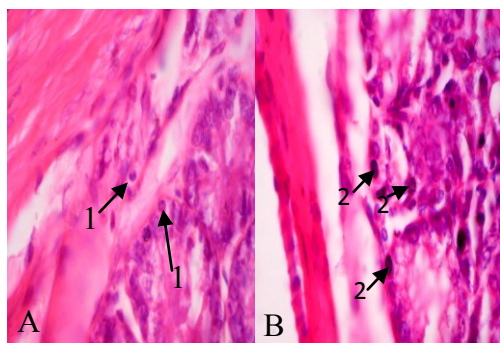
Gambar 4. Skor kerusakan histologi kontrol dan perlakuan

Keterangan :

- Kontrol
- ▒ Dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 2 minggu
- ▓ Dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 4 minggu
- Dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 6 minggu
- Dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 8 minggu

Pada Gambar 4, diperoleh rerata skor histopatologis pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol dan yang paling tinggi pada kelompok perlakuan yang dipapar OMP *H. pylori* 100 µg ml⁻¹ tiap minggu

selama 8 minggu. Semakin lama pemaparan dengan OMP *H. pylori* maka semakin berat kerusakan mukosa lambung yang terjadi. Hasil analisis statistika ANOVA menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan ($P < 0.05$) skor histopatologis antara kontrol dan perlakuan. Hasil uji lanjut *Tukey* menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan ($P < 0.05$) antara kelompok kontrol dengan perlakuan. Hal ini disebabkan pada kelompok perlakuan, OMP *H. pylori* merusak mukosa lambung (*gaster*) menciit sedangkan pada kontrol tidak terdapat kerusakan. Hal ini dapat dijelaskan karena di dalam *outer membrane protein H. pylori* Phospholipase A (OMP-A) yang dilibatkan dalam virulensi dari strain *Campylobacter* dan *Helicobacter* [19].

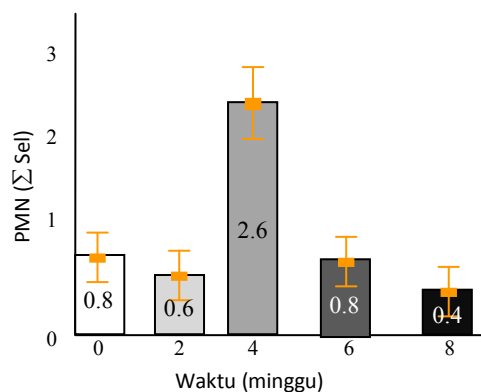


Gambar 5. Sel-sel PMN dan MN dalam sediaan potongan lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C kelompok 2 (A) dan kelompok 4 (B) dengan pewarnaan haematoksilin eosin, perbesaran 1000 kali. Tanda panah menunjukkan sel PMN (1) dan sel MN (2).

Jumlah Sel-Sel Polimorfonuclear (PMN)

Histologi sel PMN dan MN pada lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C kelompok 2 (A) dan kelompok 4 (B) dengan pewarnaan haematoksilin eosin dapat dilihat pada Gambar 5. Hasil perhitungan mengenai perbandingan jumlah PMN antara kontrol dan perlakuan yang dipapar dengan menggunakan OMP *H. pylori* diperoleh data yang dapat dilihat pada Gambar 6. Pada Gambar 6, diperoleh rerata jumlah sel polimorfonuclear (PMN) pada kelompok perlakuan yang dipapar OMP *H. pylori* 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tiap minggu selama 4 minggu yaitu kelompok perlakuan yang dimatikan pada akhir minggu ke-4 lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan lainnya. Jadi semakin lama pemaparan dengan OMP *H. pylori* maka jumlah PMN semakin rendah. Hasil analisa statistika menggunakan ANOVA, diketahui terdapat perbedaan yang signifikan terhadap rerata jumlah PMN antara kontrol dan perlakuan ($p < 0,05$). Uji

lanjutan *Tukey* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan secara nyata terjadi pada kelompok kontrol dan perlakuan. Hal ini dapat dijelaskan karena sel polimorfonuclear merupakan sel-sel radang akut jadi meningkat pada keadaan infeksi akut sedangkan pada minggu ke-8 jumlah sel menurun.



Gambar 6. Perbandingan Jumlah MPN pada kontrol dan perlakuan

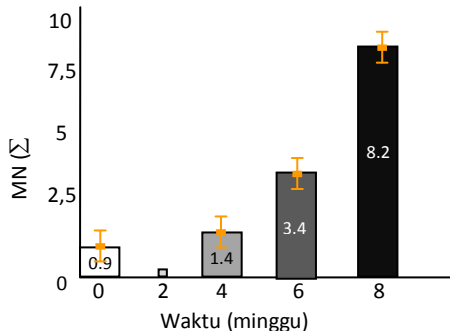
Keterangan :

- Kontrol
- ▒ Dosis 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tiap minggu selama 2 minggu
- ▓ Dosis 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tiap minggu selama 4 minggu
- Dosis 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tiap minggu selama 6 minggu
- Dosis 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tiap minggu selama 8 minggu

Jumlah Sel-Sel Mononuklear (MN)

Hasil pengamatan jumlah sel-sel mononuklear pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan metode skoring histopatologi sel-sel mononuklear diperoleh data seperti pada Gambar 7. Pada Gambar 7, menunjukkan rata-rata jumlah sel Mononuklear (MN) pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol dan yang paling tinggi pada kelompok perlakuan yang dipapar OMP *H. Pylori* 100 μgml^{-1} setiap minggu selama 8 minggu yaitu kelompok perlakuan yang dimatikan pada akhir minggu ke-8. Jadi semakin lama pemaparan dengan OMP *H. pylori* maka jumlah sel MN akan semakin meningkat. Hasil analisa statistik menggunakan ANOVA memperlihatkan adanya perbedaan secara signifikan ($P < 0.05$) rerata jumlah MN antara kontrol dan perlakuan ($p < 0,05$). Analisa lanjutan *Tukey* memperlihatkan perbedaan yang signifikan antara kontrol dan perlakuan. Hal ini dimungkinkan karena sel mononuklear merupakan sel-sel radang kronik sehingga berpotensi meningkat pada infeksi kronik. *H. pylori* dapat berikatan kuat dengan sel epitel dengan menggunakan komponen permukaan bakteri yang multipel yang dikenal

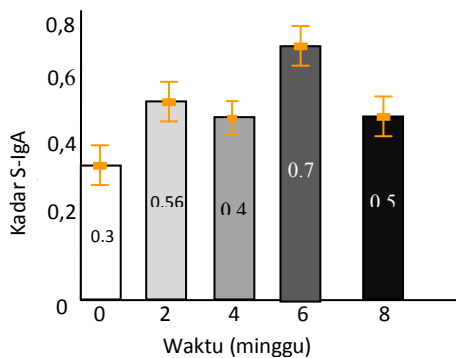
secara khusus sebagai adhesin, *BabA* adalah *outer membrane protein* 78 kD yang berikatan ke *fucosylated Lewis B blood-group antigen*. Terutama *BabA* relevan dengan penyakit yang berhubungan dengan *H. pylori* dan diduga dapat mempengaruhi tingkat keganasan penyakit [6].



Gambar 7. Perbandingan jumlah MN antara kontrol dan perlakuan

Keterangan :

- Kontrol
- ▒ Dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 2 minggu
- ▓ Dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 4 minggu
- Dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 6 minggu
- Dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 8 minggu



Gambar 8. Perbandingan kadar S-IgA antara kontrol dan perlakuan

Keterangan :

- Kontrol
- ▒ Dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 2 minggu
- ▓ Dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 4 minggu
- Dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 6 minggu
- Dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 8 minggu

Hasil Pemeriksaan S-IgA

Hasil pemeriksaan kadar S-IgA antara kelompok kontrol dan perlakuan dengan menggunakan metode ELISA diperoleh data seperti pada Gambar 8. Hasil penelitian pada Gambar 8, diperoleh rerata kadar Secretory IgA pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol dan yang paling tinggi pada kelompok mencit perlakuan yang dipapar

OMP *H. pylori* 100 µg ml⁻¹ tiap minggu selama 6 minggu. Hasil analisis statistik menggunakan ANOVA memperlihatkan adanya perbedaan secara signifikan (P<0.05) rerata kadar S-IgA antara kontrol dan perlakuan (p<0,05). Kadar *Secretory Ig-A* dari keempat kelompok perlakuan juga meningkat secara signifikan pada kelompok perlakuan yang dipapar OMP dibandingkan kelompok kontrol. Efek pro-tektif S-IgA dalam lumen saluran cerna diketahui berfungsi untuk menetralkan secara biologi antigen aktif seperti proteksi terhadap toksin dan virus dengan membentuk kompleks imun intraluminal dan kemampuan S-IgA untuk melapisi bakteri sehingga dapat mencegah perlekatan sel bakteri ke epitel [20].

Peran antibodi humoral dalam gastritis masih belum jelas. Penelitian menunjukkan bahwa bakteri-bakteri yang melekat pada epitel lambung diliputi oleh S-IgA, tetapi antibodi tersebut bersifat tidak efektif dalam membunuh bakteri atau mencegah adhesi bakteri pada epitel lambung [8]. Pada penelitian sebelumnya dijelaskan bahwa kadar S-IgA yang tinggi juga dapat berpotensi merusak sel mukosa pada organ lambung. Menurut Goto, antibodi lokal S-IgA berperan utama dalam proteksi terhadap infeksi *H. Pylori* [11]. Beberapa peneliti berpendapat bahwa vaksinasi oral dengan antigen *whole-cell H. pylori* atau antigen yang dipurifikasi dapat mencegah infeksi dari spesies *Helicobacter*. Vaksinasi oral dengan dosis lebih besar dari 200 µg *H. pylori whole-cell sonicate* selama lima minggu efektif melindungi mencit 57BL terhadap infeksi bakteri *H. pylori* [21]. Pada penelitian ini dipergunakan dosis 100 µg ml⁻¹ tiap minggu dengan lama waktu pemberian 2, 4, 6 dan 8 minggu. Pada penelitian ini diketahui bahwa perubahan histopatologis yang mulai terlihat setelah pemberian dosis 100 µg l⁻¹ tiap minggu dalam 6 minggu dan dosis 100 µg l⁻¹ tiap minggu dalam 8 minggu, sama dengan hasil dari penelitian di atas. Czinn, mengemukakan bahwa terjadi peningkatan kadar S-IgA pada lambung mencit pasca dipapar dengan *H. Pylori* [22]. Pernyataan tersebut memberikan hasil yang sama dengan penelitian ini yaitu OMP *H. pylori* yang diberikan secara intragastrik pada mencit juga meningkatkan kadar S-IgA.

KESIMPULAN

Protein OMP *H. pylori* adalah 12,78 kDa, 24,01 kDa, 27,25 kDa, 36,099 kDa, 41,067 kDa dan 44,52 kDa, 58,10 kDa, 63,87 kDa dan 68,02 kDa berpotensi menimbulkan kerusakan pada

mukosa lambung *Mus musculus* Outbred Balb/C. Semakin lama pemaparan dengan OMP *H. pylori* dengan dosis yang sama pada hewan coba maka semakin berat kerusakan mukosa lambung yang terjadi. Protein OMP *H. pylori* 12,78 kDa, 24,01 kDa, 27,25 kDa, 36,099 kDa, 41,067 kDa dan 44,52 kDa, 58,10 kDa, 63,87 kDa dan 68,02 kDa dapat menginduksi peningkatan S-IgA pada *Mus musculus* Outbred Balb/C.

DAFTAR PUSTAKA

1. Prescott, L.M., A.K. Donald, P.H. John. 2002. Microbiology 5th edition. Mc Graw Hill Company. New York.
2. Lee, A. 1999. Animal Models of *Helicobacter* Infection. *Molecular Medicine*. 5:500-505.
3. Mach, F. 2002. Influence of *Helicobacter pylori* Infection During Atherogenesis In Vivo in Mice. *Circulation Respiration*. 90:e1-e4.
4. Keenan, J., T. Day, S. Neal, B. Cook, G. Perez-Perez, R. Allardyce, P. Bagshaw. 2000. A Role for The Bacterial Membrane in The Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *FEMS Microbiol. Lett*. 182:259-264.
5. Enders, K.W.NG., S.A. Thompson, G.I. Perez, I. Kansau, V.D.E.A Arie, Labigne, J.J.Y. Sung, S.C.S. Chung, M.J. Blaser. 1999. *Helicobacter pylori* Heat Shock Protein A: Serologic Responses and Genetic Diversity. *Clin. And Diagn. Lab. Immunology*. Vol.6. No. 3:377-382.
6. Suerbaum, S., M. Pierre. 2002. *Helicobacter pylori* Infection. *N. Engl. J. Med*. 347. 15:1175-1186.
7. Kawahara, T., Y. Yokota, K. Mizuno. 1999. Antibodies to Human Gastric Epithelial Cells and Heat Shock Protein 60 in *Helicobacter pylori* Positie Mucsa Associated Lymphoid tissue Lymphoma. 45:20-23.
8. Harijono, A. 1996. Peran Stresor pada Imun Mukosa dalam Patogenesis Gastritis Kronik karena *Helicobacter pylori*. Disertasi. Program Pasca-sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
9. Harijono, A. 2002. Aspek Sero Epidemiologi *Helicobacter pylori* di Indonesia dan di Dunia, Patogenesis dan Respon Penjamu pada Infeksi *Helicobacter pylori* dalam 4th Course on Immunology: Tropical Infectious Disease. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
10. Sanarto, S. 2002. Protein Adhesin *Salmonella typhi* sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Imunogenik pada Produksi S-IgA Protektif. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
11. Brooks, G.F., S.B. Janet, Morse, A. Stephen. 2001. *Vibrios, Campylobacter, Helicobacter, and Associated Bacteria* in: Jawetz, Melnick, Adelberg's. *Medical Microbiology*. 22nd Edition. Lange Medical Books. Mc Graw-Hill. New York.
12. Bratawidjaya, K.G. 2001. *Immunologi Dasar*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
13. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, Pober, Jordan. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*, 4th edition. W.B. Saunders Company. Pennsylvania.
14. Ehara, M., M. Ishibashi, Y. Ichinose, M. Iwanaga, S. Shimotori, T. Naito. 1987. Purification and Partial Characterization of Pili of *Vibrio cholerae* O1. *Vaccine*. 5:283-288.
15. Sumarno. 2000. Karakterisasi Molekuler Protein Adesi *Vibrio cholerae* O1 MO94V dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel Usus Halus Tikus Putih (Wistar). Studi Patogenesis *Vibrio cholerae* O1 MO94V. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
16. Winarsih, S., Sumarno, Roekistiningsih. 1997. Fungsi dan Sifat imunogenitas Protein Hema-glutinin 32 KD dan 20 KD pada *Helicobacter pylori*. *Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya*. vol. XIII. No. 3:135-141.
17. Peck, B. 1999. Conservation, Localization and Expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acid Research*. 27. 16:3325-3333.
18. O'Toole, P.W., M. Clyne. 2001. Cell Envelope dalam Mobley, H.L.T., G.L. Mendz, S.L. Hazell., *Helycobacter pylori: physiology and Genetics*. ASM Press. New York.
19. Koebnik, R., Locher, P. Kaspar, P. Gelder. 2000. Micro review: Structure and Function of Bacterial Outer Membrane Proteins : Barrels in a Nutshell. *Molecular Microbiology*. 37. 2:239-253.
20. Mestecky, J., P. N. Fultz. 1999. HIV-1 Infection, Mucosal Immunity and Pathogenesis. *Mucosal Immune System of The Human Genital Tract*. Vol.179. Supplement 3:S470-S474.
21. Goto, T., K. Haruma, Y. Kitadai, M. Ito, M. Yoshihara, K. Sumii, N. Hayakawa, G. Kajiyama. 1999. Enhanced Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine in Gastric Mucosa of gastric Cancer Patient. *Clin cancer Res* 5:1411-1415.
22. Ciznn, S. J., J.G. Nedrud. 1991. Oral Immunization Against *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. July. 2359-2363.

Peran Puerarin terhadap Aktivitas Intra dan Ekstraseluler pada Kultur Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Pasca Induksi Leptin

M. Sasmito Djati¹, Satuman², Retty Ratnawati², Sri Widyarti¹, Erly Nur Aisyah¹,
Noer Hasanah¹, Eko Puji Astuti¹, Ririn Rochmawati¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

²Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Beberapa penelitian terkini menyebutkan bahwa leptin merupakan salah satu penyebab disfungsi endotel yang merupakan salah satu penyebab aterosclerosis. Antioksidan puerarin diduga memiliki kemampuan untuk mencegah mekanisme aterosclerosis yang distimulasi oleh beberapa sitokin. Berdasarkan hal tersebut, maka tujuan penelitian ini adalah membuktikan dan mengetahui potensi puerarin untuk menghambat ekspresi dan aktivitas intra dan ekstraseluler VCAM-1, PPAR- γ , SOD dan H₂O₂, apoptosis dan nekrosis pada kultur *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) yang diinduksi 25 ng ml⁻¹ leptin. Penelitian ini mempergunakan sel kultur primer HUVECs yang dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok 0 ng ml⁻¹ dan 0 μ M puerarin, kelompok sel yang diinduksi 25 ng ml⁻¹ leptin selama 12 jam, kelompok induksi puerarin 5, 25, 200 dan 525 μ M puerarin selama enam jam tanpa leptin, kelompok induksi leptin dan puerarin dengan konsentrasi 5, 25, 200 dan 525 μ M selama enam jam. Aktivitas VCAM-1 dan PPAR- γ diketahui dengan analisis imunositokimia, metode ELISA digunakan untuk analisis aktivitas SOD dan H₂O₂. Apoptosis dan nekrosis sel dianalisis setelah HUVECs diberi penanda BrdU selama 20 jam. Data dianalisis dengan analisis satu jalur (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Tukey. Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi 25 ng ml⁻¹ dapat meningkatkan ekspresi VCAM-1 (2,68 \pm 0,15)% dibandingkan dengan perlakuan 0 ng ml⁻¹ (0,54 \pm 0,15)%. Perlakuan induksi puerarin 5, 25, 200, 525 μ M memberikan dampak negatif terhadap ekspresi VCAM-1 meskipun pengaruh ini tidak signifikan. Puerarin dapat menekan apoptosis dan nekrosis sel, 525 μ M puerarin secara efektif dapat menekan ekspresi PPAR- γ . Puerarin tidak memberikan dampak yang signifikan terhadap aktivitas ekstraseluler berdasarkan hasil analisis aktivitas SOD dan H₂O₂.

Kata kunci: apoptosis, H₂O₂, HUVECs, nekrosis, leptin, puerarin, VCAM-1, PPAR- γ , SOD

PENDAHULUAN

Obesitas merupakan penimbunan lemak dalam jumlah besar yang akan menimbulkan berat tubuh yang berlebihan (*overweight*) [1]. Obesitas merupakan faktor resiko terjadinya diabetes, hipertensi dan aterosclerosis [2].

Aterosclerosis adalah keadaan arteri yang dicirikan oleh penebalan bagian dinding pembuluh arteri yang berdekatan dengan lumen dengan sejumlah sel otot polos abnormal, makrofag, limfosit, berkumpulnya kolesterol dan zat lemak lainnya pada sel ini secara ekstraseluler dan penebalan lapisan matrik jaringan konektif [1]. Aterosclerosis terjadi karena kerusakan pada sel endotel (disfungsi endotel) vaskular. Kerusakan ini disebabkan oleh gangguan mekanik, biokimia dan inflamasi [3, 4].

Penderita obesitas memiliki kadar plasma leptin yang tinggi dalam darah yang disebabkan oleh penumpukan sel adiposit penghasil leptin. Jaringan adiposit bertindak sebagai sumber mediator proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, leptin, resisten dan *C-reactive protein* (CRP), yang dapat menginduksi terjadinya disfungsi endotel, resistansi insulin dan akhirnya aterosclerosis [2]. Menurut Singh *et al.*, tingkat leptin yang tinggi juga dapat meningkatkan kadar *C-reactive protein* (CRP) [5]. Selanjutnya CRP dapat menginduksi ekspresi *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1) melalui jalur sinyal NF- κ B dalam HUVECs [6, 7].

Puerarin merupakan senyawa isoflavon yang bersifat antiinflamasi. Puerarin dapat mencegah disfungsi endotel yang diinduksi oleh banyak faktor [8]. Di dalam pembuluh darah sel endotel membentuk barier yang selektif dalam usaha mencegah transfer berbagai substansi yang ada dalam sistem pembuluh darah [9]. Sel endotel menyokong regulasi tekanan darah dan aliran darah dengan melepaskan vasodilatator *nitric oxide* (NO) dan *prostacyclin* (PGI₂) dan vaso-

* Alamat korespondensi:

M. Sasmito Djati

E-mail : msdjati@yahoo.co.id

Alamat : Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang

konstriktor *endothelin* (ET) dan *platelet activatory factor* [10]. Menurut Sanyin et al., puerarin dapat menginduksi ekspresi eNOS. *Endothelial nitric oxide synthase* dapat menghasilkan endogenous vasodilator *nitric oxide* (NO) [11]. NO (*nitric oxide*) bersifat menahan aktivasi inflamasi pada sel endotel, misalnya menurunkan ekspresi VCAM-1 dengan meningkatkan produksi penghambat faktor transkripsi intraseluler NF- κ B (I κ B α) [3].

Namun belum diketahui apakah pemberian puerarin dalam jangka pendek berpengaruh terhadap disfungsi endotel. Oleh karena itu, kajian pada studi ini adalah pengujian pengaruh puerarin terhadap ekspresi intra seluler VCAM-1, PPAR- γ , dan aktifitas ekstraseluler SOD dan H₂O₂, apoptosis serta nekrosis pada kultur sel endotel (HUVECs) yang diinduksi leptin.

METODE PENELITIAN

Isolasi dan Kultur Sel Endotel

Metode yang digunakan ini menurut Khotimah [12]. Umbilikus dalam *cord solution* diperoleh dari Rumah Bersalin di Malang, melalui persalinan *Caesar*. Umbilikus dibersihkan dengan tisu yang telah dibasahi dengan alkohol 70%. *Canul* dimasukkan pada salah ujung vena (\pm 1 cm), kemudian diikat dengan benang. Vena umbilikus dibersihkan dengan mengalirkan 10 ml PBSA untuk menghilangkan sisa darah dari jaringan, kemudian ujung umbilikus yang lain disumbat dengan klem dan 5 ml *collagenase* dimasukkan melalui *canul* yang dipasang. Selanjutnya umbilikus dihangatkan dengan cara didekap dengan kedua tangan selama tujuh menit. *Collagenase* yang telah mengandung endotel dikeluarkan dari umbilikus kemudian dimasukkan dalam tabung sentrifugasi steril 15 ml. Umbilikus dibilas dengan 8 ml larutan PBSA untuk membilas sel endotel yang masih tersisa dan ditambahkan ketabung sentrifugasi yang berisi larutan *collagenase* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit. Selanjutnya pelet yang diperoleh diresuspensi dengan medium kultur (TCM 199-sigma) sebanyak 4 ml, kemudian ditransfer ke 24 *well culture plate* yang sebelumnya telah dilapisi gelatin 0,2% kemudian dimasukkan dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37 °C selama 30 menit. *Culture plate* diamati di bawah mikroskop, jika sel sudah menempel pada dasar *plate*, medium kultur diambil dan sel dibilas dengan 3 ml larutan *serum free media* dan ditambahkan medium baru. Selanjutnya *plate* dimasukkan

dalam inkubator sampai terbentuk monolayer kurang lebih 3-4 hari dan setiap dua hari sekali dicuci dengan *serum free media* serta ditambahkan medium baru.

Perlakuan Induksi Leptin pada HUVECs

Kultur sel yang telah *confluent* dicuci dengan *serum free media* dan ditambahkan medium baru. Kemudian, dipapar leptin dengan konsentrasi leptin yang digunakan 0 ng ml⁻¹ dan 25 ng ml⁻¹. Leptin yang telah tersedia dicampur dengan media lengkap. Masing-masing *well* diisi dengan 500 μ l kemudian sel endotel diinkubasi 37 °C selama enam jam.

Perlakuan Puerarin

Setelah diinkubasi leptin, sel dicuci dan diperlakukan dengan puerarin hasil ekstraksi. Senyawa puerarin didapatkan dari ChemExper. Kadar puerarin terdiri dari lima konsentrasi yaitu 0 (kontrol), 5 μ M, 25 μ M, 200 μ M dan 525 μ M. Sel diinkubasi pada 37 °C, 5% CO₂ dan kelembaban udara 95% selama enam jam.

Identifikasi protein VCAM-1 Menggunakan Imunositokimia

Kultur endotel dicuci dengan PBS (Sigma) pH 7,4 tiga kali, kemudian difiksasi dengan metanol absolut 10% dalam PBS pH 7,4 selama 20 menit. Sel dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali masing-masing lima menit. Sel ditetesi dengan 0,02% *sodium azide*. Sel dicuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali selama lima menit. Sel ditetesi dengan larutan H₂O₂ dalam PBS selama 10 menit. Sel ditetesi dengan *blocking serum* 5% FBS yang mengandung Triton-X 0,25% selama satu jam. Sel dicuci dengan PBS. Inkubasi antibodi primer dalam serum 1:200 selama 24 jam. Sel disimpan pada suhu 4 °C. Sel dikeluarkan pada suhu ruang selama 15 menit. Sel dicuci dengan PBS tiga kali masing-masing selama 5 menit. Sel diinkubasi dengan antibodi sekunder 1:400 selama satu jam pada suhu ruang. Sel dicuci dengan PBS tiga kali selama masing-masing lima menit. Sel ditetesi dengan SA-HRP selama 40 menit, dicuci dengan PBS tiga kali selama masing-masing lima menit. Sel ditetesi dengan kromogen DAB (3,3 *Diaminobenzidine tetrahydrochloride*). Sel ditetesi dengan *counterstains* dengan hematoxilen selama 10 menit. Sel dicuci dengan air mengalir kemudian akuades selama 10 menit. Sel dibiarkan pada suhu kamar. Jaringan diletakkan pada *object glass* dan ditetesi dengan entelan.

Pengukuran ELISA dan Fotometrik Coating Microplates (MP)

Langkah awal dalam pengukuran apoptosis dan nekrosis dengan metode ELISA adalah

menentukan jumlah *well* yang digunakan pada *microplates*. Sebelumnya dilakukan *coating microplates* yaitu dipipet 100 µl *anti-DNA coating solution (solution 3)* ke dalam *well* yang telah ditentukan, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Kemudian *coating solution* dalam masing-masing *well* dibuang dengan cara aspirasi atau *inverting*.

Prosedur Blocking

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

Pengukuran ELISA dan Fotometrik

Microplates yang telah di-*coating* dan *diblocking*, diisi masing-masing sampel (masing-masing sampel untuk apoptosis dan nekrosis sebanyak 100 µl), kemudian MP ditutup dengan *adhesive cover foil* dan diinkubasi pada suhu 15-25 °C selama 90 menit, dan selanjutnya *solution* dibuang dengan cara aspirasi atau *inverting*. Masing-masing *well* selanjutnya dicuci dengan *washing solution (solution 4)* 250 µl sebanyak tiga kali masing-masing selama tiga menit, sementara cucian yang terakhir dibiarkan, dan *microplate* tanpa tutup diletakkan diatas *beaker glass* 500 ml yang sudah diisi 300 ml air pada *microwave oven*, di-*irradiate* selama 5 menit pada 500 W, kemudian didinginkan pada suhu -20 °C selama 10 menit. Selanjutnya *fluid* dibuang dengan cara aspirasi atau *inverting*. Masing-masing *well* kemudian ditambah 100 µl *anti-BrdU-POD conjugate solution (solution 6)*, dan ditutup dengan *adhesive cover foil* dan diinkubasi pada suhu 2-8 °C *overnight* (ON), kemudian masing-masing *well* dicuci dengan *washing solution (solution 4)* 250 µl sebanyak tiga kali masing-masing selama tiga menit. *Substrate solution* dipipet sebanyak 100 µl dan dimasukkan pada masing-masing *well*, selanjutnya *microplate* di-*shaker* dalam keadaan gelap sampai terjadi perubahan warna. *Stop solution (solution 8)* sebanyak 25 µl ditambahkan pada masing-masing *well* selama lima menit. Pembacaan nilai absorbansi dilakukan pada λ 450 nm setelah penambahan *stop solution*.

Identifikasi protein PPAR γ dengan imunositokimia

Hasil kultur sel endotel masing-masing perlakuan difiksasi dengan formalin 10% dalam PBS pH 7,4 selama 20 menit. Sel dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali selama masing-masing lima menit. Sel ditetesi dengan 0,02% *sodium azide*. Jaringan dapat disimpan dalam lemari pendingin untuk beberapa hari. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali selama lima menit. Jaringan ditetesi dengan larutan H₂O₂ dalam PBS selama 10 menit. Sel ditetesi dengan *blocking serum* 5% FBS yang mengandung Triton-X 0,25% selama satu jam. Sel dicuci dengan PBS. Inkubasi antibodi primer PPAR γ dalam serum 1:200 selama 24 jam. Jaringan disimpan pada suhu 4 °C. Jaringan dikeluarkan pada suhu ruang selama 15 menit. Jaringan dicuci dengan PBS dua kali masing-masing selama lima menit. Sel diinkubasi dengan antibodi sekunder *biotin-goat-anti rabbit* 1:400 selama satu jam pada suhu ruang. Jaringan dicuci dengan PBS dua kali selama masing-masing lima menit. Sel ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horseradish Peroxidase*) 1:500 selama satu jam kemudian dicuci dengan PBS sebanyak dua kali masing-masing selama lima menit. Sel ditetesi dengan DAB (*Diamino Benzidine*) dalam buffer DAB. Sel ditetesi dengan *courstexin* selama 10 menit. Jaringan dicuci dengan akuades selama 10 menit. Jaringan ditetesi dengan *Mayer Hematoxilen* selama 10 menit. Jaringan dicuci dengan PBS selama tiga kali masing-masing 10 menit. Jaringan dicuci dengan akuades selama 10 menit. Jaringan dibiarkan pada suhu kamar. Jaringan diletakkan pada *object glass* dan ditetesi dengan entelan. Setelah itu dibiarkan semalam. Kemudian diamati.

Pengukuran kadar H₂O₂ dengan Colorimetric Hidrogen Peroxide Kit (Assay Design)

Pengukuran kadar H₂O₂ dari medium kultur menggunakan *Colorimetric Hidrogen Peroxide Kit (Assay Design)*. Larutan standar dibuat dengan melarutkan 34 µl stok *Hydrogen Peroxide Standar* dengan 966 µl *diluent* dan disebut sebagai larutan standar I. Larutan standar II dibuat dengan melarutkan 500 µl larutan standar I dengan 500 µl *diluent*. Dibuat hingga larutan standar 6 dengan cara yang sama. Kemudian dimasukkan 50 µl *diluent* pada *well* pertama sebagai larutan *blanko*, 50 µl larutan standar I-IV ke dalam *well* selanjutnya. Masing-masing larutan sampel di-ambil 50 µl dimasukkan ke dalam *well*. Selanjutnya semua *well*

ditambahkan 100 μ l *Color Reagent* dan dihomogenasi menggunakan pipet selama satu detik. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya dibaca dengan *Elisa Reader* pada panjang gelombang 450 nm.

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

Pengukuran kadar SOD dari medium kultur menggunakan *Superoxide Activity Assay Kit*. Sampel sebanyak 20 μ l dimasukkan dalam *well*, dan larutan *blanko* (H_2O) dua *well* masing-masing sebanyak 20 μ l. Kemudian pada masing-masing *well* ditambahkan 200 μ l WST (*Working Solution*). *Blank 2* ditambahkan 20 μ l dilution buffer. Lalu pada masing-masing *well* kecuali *blank 2* ditambahkan 20 μ l *enzyme working solution*. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37 °C. Kemudian dibaca pada panjang gelombang 450 nm. Dilakukan tiga kali ulangan.

Analisis Data

Jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 dan PPAR- γ tiap 100 sel, sedangkan pengukuran apoptosis dan nekrosis pada setiap perlakuan kultur sel endotel dilakukan dengan metode ELISA. Setiap unit percobaan diulang tiga kali. Data yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan metode analisis satu jalur (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji *tukey*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

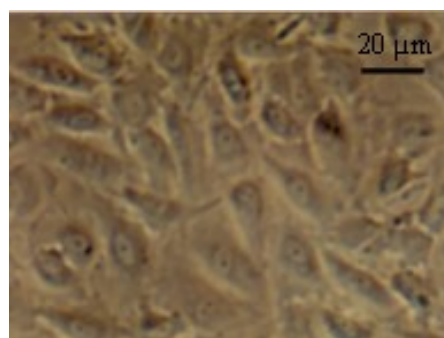
Kultur Human Umbilikus Vein Endothelial Cells (HUVECs)

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

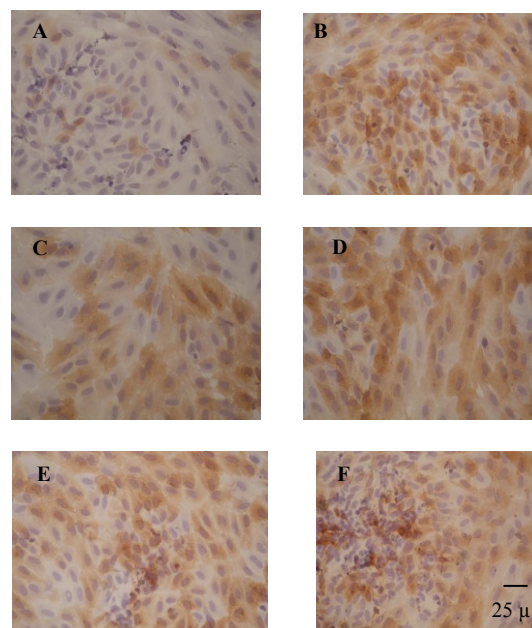
Umbilikus yang didapat dari hasil persalinan disimpan dalam media transport (*cord solution*) dengan komposisi NaBic, M199 dan *gentamycin*. Penyimpanan dalam medium ini bertujuan untuk mempertahankan kondisi fisiologi umbilikus sebelum dilakukan kultur. Umbilikus harus segera ditumbuhkan paling lama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

reseptor fungsional terhadap leptin yang merupakan produk dari *ob gene* [13].

Sel endotel ditumbuhkan dalam medium komplet yang terdiri dari M199 yang mengandung FBS 10 %. Hasil yang diperoleh dari kultur endotel yang *confluent* pada hari ke-4 (Gambar 1). Sel *confluent* dicirikan dengan populasi sel yang memenuhi tempat *attachment* dan saling bersentuhan antar sel menandakan adanya hubungan komunikasi agar sel tumbuh. Dalam keadaan ini, sel siap diperlakukan untuk keperluan penelitian



Gambar 1. Kultur endotel *normal confluent* hari ke-4 pada perbesaran 400 kali



Gambar 2. Hasil imunositokimia ekspresi VCAM-1 pada kultur sel endotel berbagai perlakuan (perbesaran 400 kali)

Keterangan:

- A. Leptin 0 ng ml⁻¹ + puerarin 0 μ M
- B. Leptin 25 ng ml⁻¹
- C. Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 5 μ M
- D. Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 25 μ M
- E. Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 200 μ M
- F. Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 525 μ M

Analisis ekspresi VCAM-1

Pada kultur sel endotel, ekspresi VCAM-1 dapat dilihat dengan menggunakan metode imunositokimia dengan menggunakan kromogen DAB yang akan berikatan dengan SA-HRP-antibodi sekunder (*anti mouse*)-antibodi primer (*mouse monoclonal VCAM-1*) terhadap VCAM-1 pada sel endotel. Kompleks avidin-biotin terbentuk antara SA-HRP dengan antibodi sekunder. Substrat DAB membentuk kompleks dengan peroksidase pada SA-HRP membentuk kromogen yang tervisualisasi sebagai warna coklat. Ekspresi VCAM-1 pada kultur sel endotel dengan berbagai perlakuan dapat dilihat pada gambar 2.

Rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 dituliskan dalam bentuk persentase (Tabel 1). Data pada Tabel 1, menunjukkan bahwa pada kultur sel endotel dengan leptin 0 ng ml⁻¹ dan puerarin 0 μM rata-rata jumlah sel sebesar (0,54 ± 0,15)%, sedangkan pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin 25 ngml⁻¹ rata-rata jumlah sel sebesar (2,86 ± 0,15)%. Hasil uji statistika menunjukkan bahwa induksi leptin pada kultur sel endotel berpengaruh signifikan (p<0.05) terhadap jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 dibandingkan dengan leptin 0 ng ml⁻¹ dan puerarin 0 μM. Keadaan ini menunjukkan bahwa sel endotel yang diinduksi dengan leptin dapat meningkatkan ekspresi VCAM-1. Menurut Bouloumie *et al.*, kultur sel endotel yang distimulasi leptin dapat meningkatkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) [13]. Selanjutnya ROS dapat menyebabkan disfungsi sel endotel dengan cara menstimulasi aktivitas selular seperti sitokin dan mengaktifkan faktor transkripsi NF-κB [14].

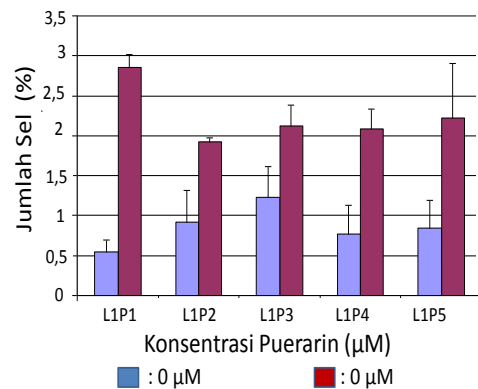
Tabel 1. Persentase jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin dan puerarin.

Dosis Puerarin (μM)	Jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 (%)	
	Leptin 0 ngml ⁻¹	Leptin 25 ngml ⁻¹
0	0,54 ± 0,15 ^a	2,86 ± 0,15 ^d
5	0,92 ± 0,40 ^{ab}	1,92 ± 0,05 ^{bcd}
25	1,23 ± 0,38 ^{abc}	2,12 ± 0,26 ^{cd}
200	0,77 ± 0,36 ^a	2,08 ± 0,25 ^{cd}
525	0,85 ± 0,34 ^a	2,22 ± 0,69 ^{cd}

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata (α 0,05)

Perlakuan leptin 0 ng ml⁻¹ dengan puerarin 5, 25, 200 dan 525 μM tidak berpengaruh signifikan terhadap leptin 0 ng ml⁻¹ dan puerarin 0 μM.

Pada Gambar 3, dapat dilihat dosis puerarin 5 dan 25 μM cenderung mengalami kenaikan jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 (0,92 ± 0,40)% dan (0,85 ± 0,34)%. Hal ini diduga disebabkan oleh perubahan ekspresi eNOS dapat mengakibatkan gangguan sintesis NO sehingga ekspresi NF-κB meningkat dan menyebabkan ekspresi VCAM-1. Menurut Lawrence, radikal bebas NO dihasilkan oleh tiga *isoform nitric oxide synthase* (NOS) yaitu *neuronal NOS* (nNOS), *inducible NOS* (iNOS) dan *endothelial NOS* (eNOS). eNOS merupakan komponen yang paling berperan dalam menjaga homeostasis vaskuler dan terlibat langsung pada patobiologi disfungsi endotel. eNOS akan mengkatalisis produksi NO dari endotel bila dalam keadaan *di-coupled* oleh *tetrahydrobiopterin* (BH₄) dan L-arginin. Dalam keadaan *uncoupled state*, eNOS kekurangan L-arginin atau BH₄ sehingga terjadi produksi O₂^{*} dan H₂O₂ yang terjadi pada disfungsi endotel sehingga menurunkan bioavailabilitas NO [15]. Sedangkan untuk dosis 200 dan 525 μM, jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 cenderung mengalami penurunan, dengan jumlah penurunan yang paling besar ada pada dosis puerarin 200 μM.



Gambar 3. Hubungan konsentrasi puerarin dengan jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1

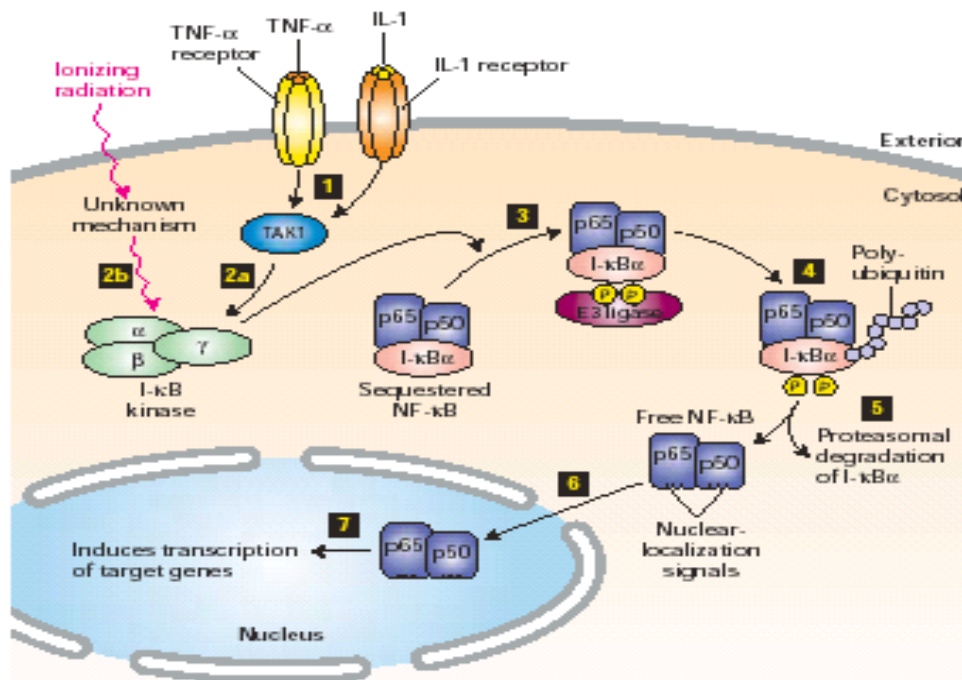
Perlakuan leptin 25 ng ml⁻¹ dengan penambahan puerarin 5, 25, 200 dan 525 μM tidak menunjukkan hasil yang signifikan, tetapi ada kecenderungan penurunan jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 pada puerarin 5 μM. Hal ini menandakan bahwa puerarin dapat menghambat ekspresi VCAM-1 pada sel endotel yang disebabkan oleh efek antioksidan puerarin sehingga mencegah inflamasi. Tetapi pada penelitian ini, dosis puerarin tidak menurunkan ekspresi VCAM-1 mendekati kondisi leptin 0 ng ml⁻¹ (Gambar 3). Hal ini disebabkan

pemberian puerarin terlambat dalam mencegah aktivasi gen yang mengkode VCAM-1. Menurut Bouloumie *et al.*, dalam jangka waktu 30 menit (10 ng ml^{-1}) leptin sudah mampu meningkatkan level NF- κ B, namun dalam penelitian ini, puerarin diberikan setelah enam jam inkubasi dengan leptin [15]. Sedangkan menurut Ding *et al.*, puerarin mampu menurunkan level NF- κ B setelah 24 jam [16].

Penelitian ini mengkaji tentang pengaruh puerarin terhadap sel endotel yang diinduksi leptin 25 ng ml^{-1} dengan melihat adanya penurunan ekspresi pada VCAM-1 yang merupakan *biomarker* terjadinya disfungsi endotel. Leptin merupakan sitokin yang dihasilkan oleh sel adiposit, dalam jumlah tinggi, leptin dapat menyebabkan terbentuknya ROS dalam sel endotel. ROS melalui aktivasi ERK $\frac{1}{2}$ akan meng-induksi CRP. Selanjutnya CRP menginduksi ekspresi VCAM-1 melalui protein kinase C (PKC), p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), tyrosin kinase dan NF- κ B [6].

Pada Gambar 4, dalam bentuk tidak aktif NF- κ B akan berikatan dengan I κ -B dimana NF- κ B mempunyai dua sub-unit yaitu P65 dan P50.

Molekul tunggal I κ -B menempel pada domain N-terminal dari setiap unit heterodimer p50/p65, karenanya menutupi *nuclear localization* signal. Protein kinase kompleks yang disebut I κ -B kinase merupakan titik berkumpulnya semua sinyal ekstraselular yang mengaktifasi NF- κ B. Dalam hitungan menit, stimulasi I κ -B kinase menjadi teraktifasi dan memfosforilasi dua N-terminal *serine residues* pada I κ -B. E3 ubiquitin ligase kemudian berikatan terhadap *phosphoserines* dan mem-*polyubiquitin* I κ -B kemudian memicu dengan segera degradasi oleh *proteasome*. Akibat I κ -B terdegradasi, *nuclear-localization* signal pada NF- κ B menjadi terekspos sehingga dapat bertranslokasi kedalam inti sel dan mengaktifasi transkripsi dari berbagai macam gen target. Pensinyalan NF- κ B dihentikan oleh *negatif feedback loop*, dimana setiap satu gen yang ditranskripsinya diinduksi langsung oleh NF- κ B juga mengkodekan I κ -B. Akhirnya level protein I κ -B yang tinggi menonaktifkan NF- κ B aktif di dalam sel dan mengembalikannya ke sitosol. Dengan pemberian puerarin dapat mencegah terjadinya disfungsi endotel.



Gambar 4. Jalur sinyal NF- κ B [17]

Keterangan:

(1) stimulasi oleh TNF- α atau IL-1 menginduksi aktivasi TAK-1 kinase. (2a) aktivasi trimerik I κ -B kinase. (2b) radiasi pengion dan stress lainnya dapat secara langsung mengaktifasi I κ -B kinase dengan mekanisme yang belum diketahui. (3) fosforilasi I κ -B oleh I κ -B kinase dan pengikatan E3 ubiquitin ligase. (4) poliubiquitinase I κ -B (5) target degradasi proteasome. (6) hilangnya I κ -B membuka *nuclear localization* dari ke dua sub unit NF- κ B. (7) NF- κ B mengaktifasi transkripsi dari beberapa target gen termasuk sub unit α dari I κ -B yang bertindak untuk menghentikan sinyal.

Puerarin akan menginduksi *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) sehingga menghasilkan NO yang merupakan vasodilatator dan dapat meningkatkan ekspresi Iκ-B dan menurunkan ekspresi VCAM-1 [3]. Namun dosis puerarin yang digunakan pada penelitian ini kurang bervariasi sehingga sulit untuk menentukan dosis optimumnya dalam mengurangi resiko inflamasi dan disfungsi endotel, selain itu ada perbedaan waktu pemberian puerarin dengan leptin sehingga puerarin baru bekerja setelah leptin menginduksi ekspresi VCAM-1 pada sel endotel.

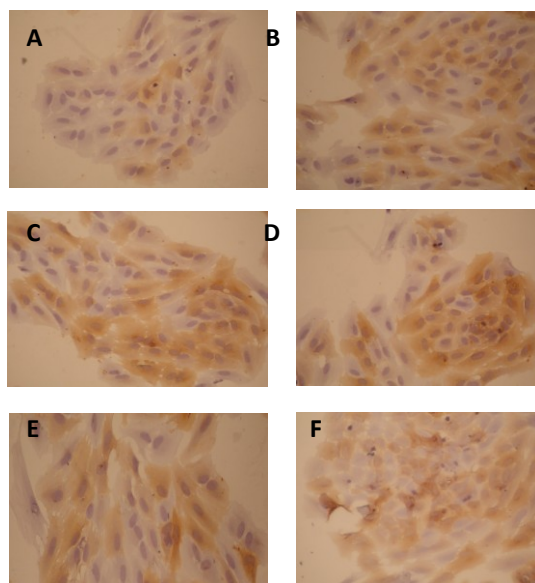
Pendugaan terhadap puerarin sebagai terapi disfungsi endotel yaitu puerarin dapat secara langsung mempengaruhi ekspresi VCAM-1 dimana puerarin merupakan *scavenger* dari VCAM-1. Berdasarkan hasil penelitian Prasain diketahui bahwa puerarin dapat diabsorpsi secara cepat dan sempurna dengan hipotesis bahwa puerarin diduga ditransportasikan menyeberangi dinding intestinal dan diabsorpsi secara sempurna tanpa metabolisme [18]. Selain itu berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sun *et al.*, puerarin diketahui sebagai terapi penyakit kardiovaskular tetapi mekanisme puerarin terhadap disfungsi endotel belum diketahui [19].

Analisis Ekspresi PPARγ

Analisis ekspresi PPAR-γ pada kultur sel endotel (HUVECs) dapat dilakukan *in vivo* dengan teknik imunositokimia yang menggunakan antibodi primer PPAR-γ dalam serum 1:200 dan antibodi sekunder *biotin-goat-anti rabbit* 1: 400. Ekspresi PPAR-γ dideteksi dari warna coklat pada sitoplasma sel endotel. Ekspresi PPAR-γ pada kultur sel endotel dengan berbagai perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.

Berdasarkan hasil perhitungan menunjukkan bahwa pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin 25 ng ml⁻¹, terjadi peningkatan jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ sebanyak (3,37 ± 0,35)%. Sedangkan pada leptin 0 ng ml⁻¹, jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ hanya sebanyak (0,9 ± 0,22)%. Hasil uji statistik menyatakan bahwa induksi leptin 25 ng ml⁻¹ berpengaruh signifikan (p < 0,05) terhadap jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ dibandingkan leptin 0 ng ml⁻¹. Hal ini menunjukkan bahwa leptin 25 ng ml⁻¹ mampu meningkatkan jumlah ekspresi PPAR-γ (Gambar 6). Pada dasarnya PPAR-γ juga telah diekspresikan di sel endotel (normal) tetapi dalam jumlah yang sedikit sehingga dengan induksi leptin 25 ng ml⁻¹ mampu meningkatkan

ekspresi PPAR-γ bila dibandingkan dengan perlakuan tanpa leptin (leptin 0 ng ml⁻¹). Menurut Dadogo *et al.*, menyatakan bahwa konsentrasi leptin dalam darah mencakup 2-10 ng ml⁻¹ dan wanita obesitas 10-100 ng ml⁻¹ dimana pada batas tersebut leptin dapat meningkatkan jumlah sel [20]. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini bahwa induksi leptin 25 ng ml⁻¹ dapat meningkatkan jumlah ekspresi PPAR-γ. Rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ pada tiap perlakuan, ditampilkan pada Gambar 6.



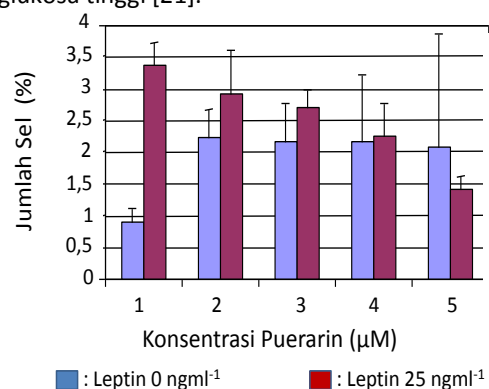
Gambar 5. Hasil imunositokimia PPAR-γ pada kultur sel endotel (HUVEC'S) dengan berbagai perlakuan

Keterangan:

- A. Leptin 0 ng ml⁻¹ + puerarin 0 μM
- B. Leptin 25 ng ml⁻¹
- C. Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 5 μM
- D. Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 25 μM
- E. Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 200 μM
- F. Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 525 μM

Pada perlakuan leptin 0 ng ml⁻¹ dengan penambahan puerarin masing-masing 5, 25, 200 dan 525 μM tidak berpengaruh signifikan (p < 0,05), tetapi ada kecenderungan peningkatan ekspresi PPAR-γ dibandingkan leptin 25 ng ml⁻¹, yang ditunjukkan pada Gambar 6. Hal ini diduga disebabkan oleh konsentrasi puerarin yang kurang tinggi dan kurang bervariasi dalam menurunkan ekspresi PPAR-γ. Kenaikan ekspresi PPAR-γ ini dapat berpengaruh pada kenaikan faktor-faktor transduksi yang lain yang dapat memicu terjadinya disfungsi endotel. Menurut Delerive *et al.*, peningkatan PPAR-γ dapat menyebabkan aterosklerosis, resistensi insulin, hipertensi dan diabetes tipe 2. Aktivasi PPAR-γ

dalam sel dapat meningkatkan faktor-faktor seperti proliferasi sel endotel, AT-II (*angiotensin-II*), PAI-1 (*plasminogen-1*), ET-1 (*endothelin-1*), VCAM-1 dan E-selectin, sebagai awal terjadinya aterosklerosis. Kemungkinan kedua disebabkan oleh puerarin sebagai antioksidan, ketika dalam jumlah yang berlebih di dalam sel justru akan menyebabkan prooksidan. Puerarin berpotensi untuk menginduksi diferensiasi preadiposit, mem-promote glukosa uptake dari adiposit yang kemudian menginduksi resistensi insulin oleh glukosa tinggi [21].



Gambar 6. Hubungan konsentrasi puerarin dengan jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ

Pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin 25 ng ml⁻¹ dengan penambahan puerarin masing-masing 5, 25, 200 dan 525 μM jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ berurutan masing-masing sebanyak (2,93 ± 0,68)%, (2,72 ± 0,27)%, (2,26 ± 0,51)%, (1,42 ± 0,20)%. Hasil uji statistik menyatakan bahwa antara induksi leptin 25 ng ml⁻¹ dengan masing-masing puerarin 5, 25, 200 μM menunjukkan penurunan terhadap jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ, tetapi tidak signifikan. Namun pada konsentrasi puerarin 525 μM ada kecenderungan penurunan ekspresi PPAR-γ. Konsentrasi puerarin 525 μM adalah konsentrasi yang mampu menurunkan ekspresi PPAR-γ hampir mendekati kondisi sel endotel yang diinduksi leptin 0 ng ml⁻¹ (sel endotel normal) (Gambar 6). Namun pada penelitian ini tidak dilakukan penggunaan dosis atau konsentrasi puerarin yang lebih tinggi dan bervariasi lagi sehingga dapat diketahui konsentrasi puerarin yang optimal dalam menurunkan jumlah ekspresi PPAR-γ serta aman untuk digunakan. Menurut Hill *et al.*, puerarin dilaporkan mempunyai efek mencegah disfungsi endotel yang diinduksi oleh banyak faktor [8]. Penelitian menggunakan isoflavon ini juga dilaporkan telah mempunyai efek antidiabetik melalui jalur PPAR pada tikus obese, diabetes

tipe 2 dan penyakit kardio-vaskuler [22]. Injeksi puerarin dapat menurunkan kerusakan oksidatif pada sel dan menghambat apoptosis [23].

Senyawa aktif puerarin menyebabkan penurunan ekspresi PPAR-γ memiliki kemungkinan jalur penghambatan, yaitu melalui penghambatan ROS. Puerarin juga melakukan penghambatan jalur signal transduksi (*down regulation*) jalur MAPK khususnya Erk 1/2 [8]. Selain itu diduga puerarin bertindak sebagai *Scavenger* terhadap penurunan ekspresi PPAR-γ. Mekanisme kerja senyawa aktif puerarin kemungkinan langsung memblokir aktivasi PPAR-γ pada *binding site* tempat ligan berikatan pada PPAR-γ dan hal ini masih memerlukan penelitian secara *in vitro* lebih lanjut. Pada penelitian ini induksi puerarin digunakan sebagai agen terapi untuk disfungsi endotel. Apabila ekspresi dan aktivasi dari PPAR-γ terhambat atau menurun oleh adanya induksi puerarin, proses akhir dalam hal ini disfungsi endotel juga akan terhambat dan secara tidak langsung dapat menurunkan tahapan disfungsi endotel.

Pada penelitian ini, kultur sel endotel yang diinduksi leptin 25 ng ml⁻¹ mampu meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ. Hal ini disebabkan karena peran leptin sebagai faktor penginduksi (*inducer*) dan kemampuan leptin dalam meningkatkan ekspresi PPAR-γ. Leptin yang tinggi didalam sel endotel meningkatkan LDL teroksidasi yang menyebabkan kerusakan endotel. Pada kondisi tersebut terjadi peroksidase lipid, inflamasi dan peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) sebagai *second messenger* dan kemungkinan mengaktifkan proses atherogenik, seperti halnya sitokin *proinflammatory* [13]. ROS sebagai *second messenger*, bertindak dalam transduksi stimuli ekstraseluler dan intraseluler, sebagai contoh jalur Erk 1/2 (*extracellular-regulated kinases*). Peningkatan Erk 1/2 ini berasosiasi dengan peningkatan proliferasi sel dan diferensiasi [24]. Leptin dapat meningkatkan PPAR-γ melalui jalur MAP kinases (*Mitogen Activated Protein Kinases*) khususnya Erk 1/2. Jalur MAP Kinase meregulasi dari berbagai proses penting seperti proliferasi, diferensiasi hingga apoptosis. Selanjutnya menginduksi dan mengaktifasi pembentukan protein c-jun dan c-fos yang merupakan komponen (protein) penyusun utama faktor transkripsi AP-1. Faktor transkripsi AP-1 adalah faktor transkripsi yang dapat diaktifkan dan diregulasi pada *level* transkripsional maupun protein [25]. AP-1 berikatan dengan C/EBPα (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*), yang dapat

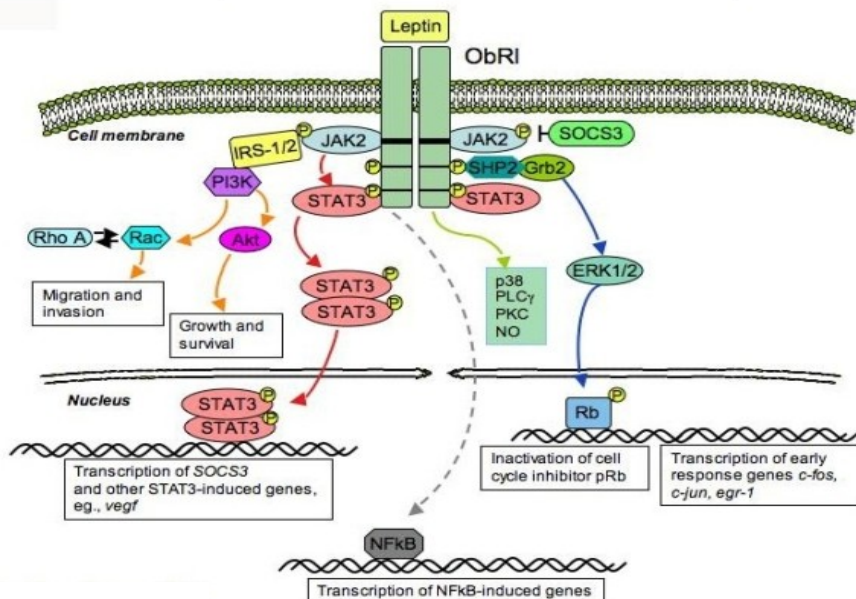
mengaktivasi faktor transkripsi seperti PPAR γ di nukleus [26]. Jalur MAPK ini merupakan jalur responsibel untuk leptin dalam menginduksi aktivasi c-fos. Pada akhirnya mengaktivasi faktor transkripsi [27]. Model leptin *signaling* dapat dilihat pada Gambar 7.

Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)

Pengukuran aktivitas enzim SOD ditandai dengan terjadinya peningkatan kadar SOD pada medium kultur sel endotel (HUVECs). Deteksi kadar SOD menggunakan ELISA Kit karena dianggap lebih sensitif (pengukuran hingga kadar nano gram [10⁻⁹]) sehingga hasil yang didapat dapat lebih akurat. Obyek yang diukur pada penelitian ini adalah *extracellular SOD* (EC-SOD) yang terkandung dalam medium kultur. Menurut Grayck *et al.*, EC-SOD mayoritas diekspresikan di beberapa jaringan termasuk jaringan vaskuler, paru-paru, dan uterus. EC-SOD tersusun dari 70% dari total aktivitas SOD pada manusia [28].

Hasil perhitungan kadar SOD dengan tiga kali ulangan didapatkan rata-rata kadar SOD seperti digambarkan pada Gambar 8. Data dianalisis menggunakan uji statistik. Berdasarkan hasil pengukuran diketahui bahwa aktivitas SOD

terukur pada semua perlakuan. Berdasarkan konsentrasi puerarin yang diperlakukan (pada Gambar 8), pada puerarin 0 μM , paparan leptin 0 ng ml⁻¹ menunjukkan kadar SOD yang sedikit lebih tinggi yaitu 0,027% jika dibandingkan dengan paparan leptin 25 ng ml⁻¹ yaitu 0,025%. Hal ini juga ditunjukkan pada perlakuan puerarin 5 μM dimana paparan leptin 0 ng ml⁻¹ kadar SOD yang terukur lebih tinggi yaitu sebesar 0,031% jika dibandingkan dengan leptin 25 ng ml⁻¹ sebesar 0,026. Demikian juga pada perlakuan leptin 25 μM , kadar SOD pada paparan leptin 0 ng ml⁻¹ lebih tinggi yaitu 0,030%, sedangkan paparan leptin 25 ng ml⁻¹ kadar SOD sebesar 0,028%. Kadar SOD lebih tinggi pada paparan leptin 25 ng ml⁻¹ jika dibandingkan dengan paparan leptin 0 ng ml⁻¹ ditemukan pada perlakuan puerarin 525 μM . Dimana paparan leptin 25 ng ml⁻¹ kadar SOD sebesar 0,033% sedangkan leptin 0 ng ml⁻¹ sebesar 0,031%. Pada perlakuan puerarin 200 μM kadar SOD yang terukur antara paparan leptin 0 ng ml⁻¹ dan leptin 25 ng ml⁻¹ hampir sama, yaitu sebesar 0,0306 dan 0,0309.



Gambar 7. Leptin *signaling* mengaktivasi faktor transkripsi melalui jalur Erk 1/2. Aktivasi dari jalur Erk 1/2 akan mengaktivasi c-jun dan c-fos di nukleus, yang selanjutnya dapat mengaktivasi faktor transkripsi yang lain seperti PPAR γ [29]

Tabel 3. Jumlah fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada sitoplasma (apoptosis) dan supernatan (nekrosis).

Konsentrasi Puerarin (μM)	Jumlah fragmen-fragmen DNA yang dilabel <i>BrdU</i>			
	Apoptosis		Nekrosis	
	Non Leptin	Leptin	Non Leptin	Leptin
0	1,6 \pm 0,3	1,2 \pm 0,1	2,2 \pm 0,5	2,1 \pm 0,2
5	1,2 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	1,7 \pm 0,3
25	1,3 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	1,9 \pm 0,4	1,5 \pm 0,2
200	1,2 \pm 0,2	1,4 \pm 0,6	1,6 \pm 0,3	1,9 \pm 0,6
525	1,3 \pm 0,1	1,8 \pm 0,3	2,3 \pm 0,6	1,9 \pm 0,3

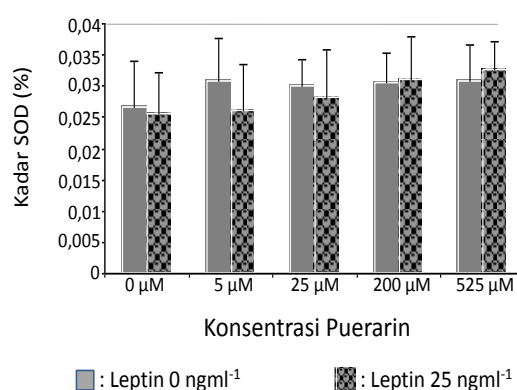
Hasil uji statistik (p value > 0,05) menyatakan bahwa variasi konsentrasi puerarin (0, 5, 25, 200, 525 μ M) tidak menunjukkan beda nyata terhadap kontrol (tanpa paparan leptin). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi leptin 25 ng ml⁻¹ pada kultur sel endotel selama 12 jam belum dapat mempengaruhi aktivitas SOD ekstraselular. Dimana radikal yang dihasilkan dalam mitokondria ini merupakan ROS primer yaitu superoksida (O₂^{*}) [29]. Sehingga jika jumlah superoksida tinggi, maka superoksida yang ditangkap oleh SOD dan diubah menjadi H₂O₂ meningkat sehingga aktivitas SOD juga diharapkan meningkat. Namun aktivitas SOD dalam penelitian ini menunjukkan perbedaan yang tidak nyata.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi antara puerarin dan leptin tunggal belum dapat mempengaruhi aktivitas SOD secara signifikan. Sedangkan menurut pernyataan Yamagishi *et al.*, yang menyatakan bahwa kadar leptin 10 ng ml⁻¹ dalam plasma darah telah dapat menginduksi over produksi ROS. Sedangkan interaksi antara 25 ng ml⁻¹ leptin dan peningkatan konsentrasi puerarin secara bertahap tidak mempengaruhi aktivitas SOD ekstraselular [30]. Dari hasil tersebut diduga pengukuran kadar SOD ekstraselular belum dapat mempresentasikan jumlah super-oksida karena keberadaan SOD intraselular tidak dapat diabaikan jika dilihat dari kadar pengukuran H₂O₂. Hal ini dijelaskan oleh Hayden and Tyagi, bahwa adanya Parameter Status Antioksidan Total (SAT) diperlukan untuk dapat menggambarkan status keseimbangan redoks, dan untuk mewakili aktivitas menyeluruh suatu oksidan dan anti-oksidan [31]. Dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa puerarin bekerja sinergis dengan SOD dalam menangkap radikal superoksida melalui proses *scavenger* secara langsung. Hal ini dijelaskan oleh Nijveldt, bahwa flavonoid bertindak sebagai antioksidan untuk mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dengan penangkapan oksidan secara langsung (*direct scavenging*) [32]. Mekanismenya menurut Korkina *et al.*, sebagai berikut, yaitu flavonoid dioksidasi oleh radikal menghasilkan bentuk radikal yang lebih stabil dan kurang reaktif. Dengan kata lain, flavonoid menyetabilkan ROS dengan bereaksi bersama komponen reaktif radikal. Reaktivitas flavonoid bergantung pada gugus hidroksil flavonoid tersebut, yang menyebabkan radikal menjadi inaktif. Pernyataan ini dapat menjelaskan bahwa cara kerja antioksidan flavonoid tidak mengaktivasi antioksidan endo-gen, namun

flavonoid (puerarin) bekerja sinergis dengan antioksidan endogen (SOD) dalam menangkap radikal bebas [33]. Selain itu menurut Grayck *et al.*, SOD berperan dalam memodulasi reaksi NO dengan menghambat reaksi antara superoksida dan NO, karena superoksida bereaksi cepat dengan NO menginaktivasi aktivitas vasodilator NO dan membentuk oksidan sekunder kuat yaitu peroksinitrit (OONO⁻) [28].

Kadar Hidrogen Peroksida (H₂O₂)

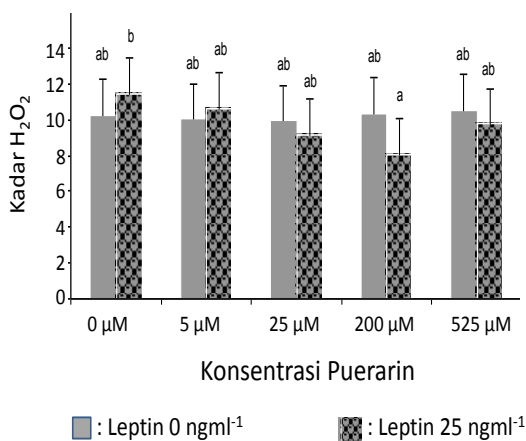
Pengukuran kadar H₂O₂ dapat diukur sebagai produk dari aktivitas enzim SOD. H₂O₂ dibentuk dari dismutasi superoksida secara spontan pada pH rendah yang dikatalisis oleh SOD [34].



Gambar 8. Histogram hubungan konsentrasi puerarin pada kultur sel endotel yang diinduksi 0 ng ml⁻¹ leptin dan 25 ng ml⁻¹ leptin terhadap aktivitas SOD

Hasil pengukuran kadar H₂O₂ menggunakan Elisa, diketahui bahwa H₂O₂ terukur pada semua perlakuan dengan kadar yang digambarkan pada Gambar 9. Berdasarkan variasi konsentrasi puerarin yang diperlakukan (Gambar 9), pada perlakuan puerarin 0 μ M dan 5 μ M menunjukkan kadar H₂O₂ yang lebih tinggi pada paparan leptin 25 ng ml⁻¹ jika dibandingkan dengan leptin 0 ng ml⁻¹. Yaitu berurutan pada puerarin 0, puerarin 25 μ M dan leptin 25 μ M kadar H₂O₂ sebesar 11,42 ng ml⁻¹ sedangkan pada paparan leptin 0 ng ml⁻¹ kadarnya sebesar 10,25 ng ml⁻¹, leptin 25 ng ml⁻¹ kadar H₂O₂ sebesar 10,6 ng ml⁻¹ sedangkan leptin 25 ng ml⁻¹ kadar H₂O₂ sebesar 10,01 ng ml⁻¹. Pada tiga perlakuan puerarin lainnya yaitu 25 μ M, 200 μ M dan 525 μ M menunjukkan kadar H₂O₂ lebih tinggi pada paparan leptin 0 ng ml⁻¹ jika dibandingkan dengan paparan leptin 25 ng ml⁻¹, yang artinya puerarin menurunkan kadar H₂O₂. Yaitu masing-masing berurutan berdasarkan konsentrasi paparan leptin 0 dan 25 ng ml⁻¹

adalah 9,92 ng ml⁻¹ lebih tinggi jika dibandingkan dengan 9,12 ng ml⁻¹, 10,32 ng ml⁻¹ lebih tinggi jika dibandingkan 8,08 ng ml⁻¹ dan 10,5 lebih tinggi jika dibandingkan dengan 9,75 ng ml⁻¹. Hasil uji statistik (berdasarkan perhitungan pada lampiran 6.) menyatakan bahwa penambahan konsentrasi leptin 25 ng ml⁻¹ tidak mempengaruhi secara signifikan kadar H₂O₂ yang diproduksi jika dibandingkan dengan sel normal (tanpa paparan leptin). Sedangkan variasi konsentrasi puerarin (0, 5, 25, 200, 525 μM) menunjukkan beda nyata terhadap kontrol. Berdasarkan uji lanjut BNJ, didapatkan adanya konsentrasi optimum puerarin dalam menurunkan kadar H₂O₂ yaitu 200 μM. Sedangkan konsentrasi puerarin di atasnya (525 μM) menyebabkan kadar H₂O₂ meningkat.

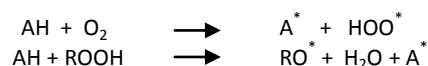


Gambar 9. Histogram hubungan konsentrasi puerarin pada kultur sel endotel yang diinduksi 0 ngml⁻¹ leptin dan 25 ng ml⁻¹ leptin terhadap kadar H₂O₂.

H₂O₂ merupakan hasil dari konversi superoksida (O₂^{*}) dari reaksi dismutasi yang dikatalis oleh SOD. H₂O₂ selanjutnya ditransformasi menjadi radikal hidroxil (OH^{*}) dengan keberadaan ion metal melalui reaksi Fenton atau Haber-Weiss [31]. Kadar H₂O₂ dalam penelitian ini dipengaruhi oleh perlakuan kombinasi 25 ng ml⁻¹ leptin dan puerarin, sesuai dengan pernyataan *Zmijewski et al.*, yang menyatakan bahwa jumlah H₂O₂ dalam sel dipengaruhi oleh produksi superoksida dari mitokondria [35].

Perlakuan kombinasi 25 ng ml⁻¹ leptin dan puerarin menunjukkan konsentrasi optimum puerarin dalam menurunkan kadar H₂O₂ yaitu 200 μM. Sedangkan konsentrasi di atasnya yaitu 525 μM kembali meningkatkan kadar H₂O₂. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi antioksidan yang berlebihan jika dibandingkan dengan kadar ROS akan menyebabkan efek negatif yaitu antioksidan

dianggap sebagai oksidan dalam sel yang menyebabkan over produksi H₂O₂. Hal ini dijelaskan oleh Gordon, bahwa konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, akti-vitas antioksidan sering lenyap, bahkan berubah sifatnya menjadi prooksidan. Sifat antioksidan yang berubah menjadi prooksidan dijelaskan pada gambar 10 [36].



Gambar 10. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi [36]

Berdasarkan persamaan Gambar 10, dapat dimengerti bahwa keberadaan antioksidan yang tidak dibutuhkan (berlebih) akan terdisosiasi dan bersifat radikal. Radikal yang terbentuk akan menangkap oksigen (O₂) dan hidroperoksida (ROOH) stabil menghasilkan radikal HOO^{*} dan radikal lipida (RO^{*}). Keberadaan H₂O₂ yang menurun pada konsentrasi flavonoid optimum (200 μM) dan naik pada konsentrasi di atas optimum (525 μM) mengindikasikan dosis yang berlebih (di atas optimum) meningkatkan produksi radikal superoksida yang menghasilkan peningkatan produksi H₂O₂.

Apoptosis dan Nekrosis

Pengukuran apoptosis pada kultur sel endotel dilakukan berdasarkan banyaknya fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada sitoplasma (lisat), sedangkan pengukuran nekrosis dilakukan berdasarkan banyaknya fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada supernatan. Deteksi fragmen-fragmen DNA baik pada apoptosis maupun pada nekrosis menggunakan metode ELISA kit yang dibaca oleh ELISA reader pada λ 450 nm pada masing-masing perlakuan kultur sel endotel dengan adanya *substrate solution* (TMB). Penggunaan metode ELISA kit ini karena dianggap lebih sensitif sehingga hasil yang didapatkan lebih akurat, dan dapat digunakan pada sampel dalam jumlah yang banyak. Sedangkan λ 450 nm menunjukkan banyak sedikitnya fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada sitoplasma (apoptosis) dan fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada supernatan (nekrosis). Semakin tinggi nilai absorbansinya menunjukkan semakin banyak DNA yang terlabel *BrdU*. Untuk apoptosis, hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak sel yang mengalami apoptosis. Demikian juga halnya pada nekrosis

menunjukkan bahwa semakin banyak sel yang mengalami nekrosis.

BrdU merupakan analog *thymidine* yang sering digunakan dalam studi proliferasi sel. Dalam kultur, *BrdU* biasanya melakukan korporasi dengan DNA selama sintesis DNA [37]. Adapun tahapan pelabelan dan deteksi *BrdU* (Gambar 9) yaitu (1) MP *dicoated* dengan antibodi *Anti-DNA*, kemudian (2 dan 3) Antibodi *Anti-DNA* yang telah berikatan dengan MP menangkap fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* yang sudah didenaturasi dengan *microwave irradiation*. Selanjutnya (4) fragmen-fragmen DNA yang diberi label *BrdU* dideteksi dengan antibodi *Anti-BrdU-POD conjugate (anti-BrdU)* yang dikonjugasikan dengan *POD*, yang kemudian divisualisasikan dengan menambahkan *substrate solution (TMB)* untuk menghasilkan warna [38].

Berdasarkan hasil penelitian, rata-rata fragmen-fragmen DNA setiap perlakuan yang dilabel *BrdU* pada sitoplasma (apoptosis) dan supernatan (nekrosis) ditampilkan pada Tabel 3. Dari hasil pengukuran diketahui bahwa pada kultur sel endotel normal (tanpa induksi leptin dan puerarin), leptin 25 ng ml⁻¹, dan puerarin 5, 25, 200 dan 525 µM tanpa leptin, serta leptin 25 ng ml⁻¹ dan puerarin 5, 25, 200 dan 525 µM, rata-rata fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada sitoplasma (apoptosis) (Gambar 9 A) secara berurutan masing-masing adalah 1,600 ± 0,290 ; 1,175 ± 0,112 ; 1,155 ± 0,147 ; 1,275 ± 0,233 ; 1,222 ± 0,221 ; 1,343 ± 0,064 ; 1,065 ± 0,111 ; 1,124 ± 0,145 ; 1,359 ± 0,579 dan 1,757 ± 0,255. Sedangkan rata-rata fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada supernatan (nekrosis) (Gambar 9 B) secara berurutan masing-masing adalah 2,155 ± 0,466 ; 2,077 ± 0,189 ; 1,920 ± 0,131 ; 1,876 ± 0,426 ; 1,529 ± 0,299 ; 2,264 ± 0,610 ; 1,678 ± 0,292 ; 1,526 ± 0,173 ; 1,857 ± 0,597 dan 1,863 ± 0,307. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa leptin 25 ng ml⁻¹, dan puerarin 5, 25, 200 dan 525 µM tanpa leptin, serta leptin 25 ng ml⁻¹ dan puerarin 5, 25, 200 dan 525 µM tidak berpengaruh signifikan ($p > 0,05$) terhadap apoptosis dan nekrosis. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi puerarin tidak berpengaruh terhadap apoptosis dan nekrosis pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin 25 ng ml⁻¹. Hal ini dikarenakan pada awal kultur sel endotel densitas selnya sudah tinggi, dan terjadi kematian sel secara spontan karena secara fisiologis sel endotel memerlukan ruang untuk hidupnya. Menurut Yasaka *et al.*, densitas sel

yang tinggi dapat menyebabkan kematian sel (apoptosis) [39], dan didukung oleh Roche Applied Science, bahwa semakin tinggi kepadatan sel, maka sel akan lebih cenderung mengalami apoptosis dibandingkan dengan nekrosis [38]. Selain densitas selnya yang tinggi, juga dipengaruhi oleh ROS akibat induksi leptin. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa pada mekanisme intraseluler, leptin dapat menginduksi apoptosis [40, 41], dan didukung oleh Bouloumie *et al.*, bahwa sel endotel (HUVECs) yang distimulasi dengan leptin akan meningkatkan akumulasi ROS intraseluler [13], serta Artwohl *et al.*, bahwa leptin juga *mentrigger* apoptosis pada jaringan lemak vaskulatur [42].

Mekanisme intraseluler leptin pada sel endotel dalam menginduksi apoptosis adalah dengan meningkatkan akumulasi ROS yang merupakan radikal bebas. Leptin berikatan dengan reseptor leptin (Ob-Rb) pada sel, kemudian leptin meng-aktivasi AMPK yang merupakan enzim *fuel sensing* yang akan teraktivasi apabila terjadi peningkatan rasio AMP/ATP. Fosforilasi AMPK mengaktivasi fosforilasi ACC (*Acetyl-CoA Carboxylase*) dan kemudian mengaktivasi Acetyl-CoA. Acetyl-CoA selanjutnya menghambat sintesis *Malonyl-CoA*, mengaktifkan CPT 1 (*Carnitine Palmitoyltransferase 1* yang merupakan enzim kunci dalam oksidasi asam lemak). Hal ini mengakibatkan peningkatan oksidasi asam lemak di mitokondria sehingga meningkatkan produksi ROS berupa radikal mitokondrial, akibatnya terjadi kondisi stress oksidatif [43, 44], akumulasi ROS pada sel-sel endotel sebagai akibat dari induksi leptin tersebut mengakibatkan terjadinya kondisi stress oksidatif, yang akhirnya dapat menyebabkan kematian sel (apoptosis atau nekrosis) secara langsung [44, 45]. Tetapi dengan adanya puerarin yang berperan sebagai antioksidan dapat menekan kematian sel akibat induksi leptin tersebut. Menurut Winarsi, reaktivitas oksidan (ROS) dapat dihambat dengan puerarin (anti-oksidan) dengan cara ketika isoflavon berinteraksi dengan senyawa oksidan, maka senyawa isoflavon memberikan satu gugus H kepada senyawa oksidan. Sehingga seketika itu juga, senyawa isoflavon berubah menjadi radikal isoflavon, sementara senyawa oksidan menjadi senyawa yang stabil. Meskipun isoflavon berubah menjadi senyawa radikal, namun senyawa tersebut tidak memiliki potensi untuk melakukan propagasi [46]. Radikal tersebut akan di non-aktifkan oleh senyawa radikal lain, sehingga

kembali menjadi senyawa stabil. Menurut Xiong *et al.*, puerarin dapat mencegah ROS sehingga menekan apoptosis [47], dan didukung juga oleh Nijveldt, bahwa flavonoid bertindak sebagai antioksidan untuk mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dengan penangkapan oksidan secara langsung (*direct scavenging*) [34]. Disatu sisi akibat dari induksi leptin yang dapat menyebabkan peningkatan kematian sel, dan disisi lain puerarin yang berperan sebagai *scavenger* yang dapat menurunkan kematian sel, sehingga interaksi antara dua faktor tersebut pada semua perlakuan (leptin 25 ng ml⁻¹, dan puerarin 5, 25, 200 dan 525 µM tanpa leptin, serta leptin 25 ng ml⁻¹ dan puerarin 5, 25, 200 dan 525 µM) pengaruhnya tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Selain itu, puerarin akan memberikan efek apabila diinduksi bersamaan dengan leptin dalam waktu lebih dari 6 jam. Menurut Semetisari, puerarin dengan konsentrasi 200 µM yang diinduksi bersamaan dengan leptin 25 ng ml⁻¹ selama 12 jam akan memberikan efek dalam menurunkan konsentrasi TNF-α (*Tumor Necrosis Factor-α*) pada kultur HUVECs secara signifikan [48], penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa puerarin dengan konsentrasi 200 µM yang diinduksi ber-samaan dengan leptin 25 ng ml⁻¹ selama 12 jam juga menurunkan kadar H₂O₂ pada kultur HUVECs secara signifikan.

Pada gambar 4.2.A dan B menunjukkan bahwa kultur sel endotel lebih cenderung mengalami nekrosis daripada apoptosis karena rata-rata fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada supernatan (nekrosis) yang terukur lebih tinggi dibandingkan dengan fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada sitoplasma (apoptosis). Hal ini dikarenakan jumlah sel yang terlalu banyak (*overloading* diatas rata-rata) dan kekurangan medium sebagai sumber energi (ATP) sehingga sel lebih cenderung mengalami nekrosis daripada apoptosis. Menurut Tsujimoto, nekrosis merupakan kematian sel yang tidak membutuhkan ATP (Gambar 9), yang ditandai dengan adanya pembengkakan pada mitokondria dan retikulum endoplasma yang menyebabkan volume sel bertambah sehingga terjadi kerusakan fungsi plasma membran [49] dan akhirnya sel mengalami lisis [50]. Kematian sel pada apoptosis merupakan mekanisme proses aktif yang membutuhkan energi (ATP), dimana sel itu sendiri aktif dalam proses destruksi. Apoptosis disebut sebagai kematian sel yang terprogram dan merupakan suatu bentuk fisiologi normal

yang memegang peranan penting dalam homeostasis jaringan dewasa dan perkembangan embrio. Kematian sel pada apoptosis secara umum ditandai dengan terjadinya kondensasi kromatin, fragmentasi DNA dan pembentukan badan apoptotik (*apoptotic bodies*), yang akhirnya difagositosis oleh sel-sel didekatnya [49].

KESIMPULAN

Induksi 25 ng ml⁻¹ dapat meningkatkan ekspresi VCAM-1 (2,68 ± 0,15)% dibandingkan dengan perlakuan 0 ng ml⁻¹ (0,54 ± 0,15)%. Perlakuan induksi puerarin 5, 25, 200, 525 µM memberikan dampak negatif terhadap ekspresi VCAM-1 meskipun pengaruh ini tidak signifikan. Puerarin dapat menekan apoptosis dan nekrosis sel, 525 µM puerarin secara efektif dapat menekan ekspresi PPAR-γ. Puerarin tidak memberikan dampak yang signifikan terhadap aktivitas ekstraseluler berdasarkan hasil analisis aktivitas SOD dan H₂O₂.

DAFTAR PUSTAKA

1. Vander, A., J. Sherman., D. Luciano. 2001. Human Physiology: The Mecanisms of Body Function. McGraw-Hill Higher Education. New York.
2. Lau, D. C W., B. Dhillon., H. Yang., P. E. Szmilko., S. Verma. 2004. Adipokines: Molecular Links Between Obesity and Atherosclerosis. University of Toronto. Canada.
3. Libby, P., P. M. Ridker., A. Maseri. 2002. Inflammation and Aterosklerosis. *Circulation*. 105:1135-1143.
4. Ross, R. 1999. Aterosklerosis-An Inflammatory Disease. *N Engl J Medd*. 340:115-126.
5. Singh, P., M. Hoffmann., R. Wolk., Shamsuzzaman, S.M. Abbu., K. V. Somers. 2007. Leptin Induces C-Reactive Protein Expression in Vascular Endothelial Cells. American Heart Association, Inc. New York.
6. Kawanami D., K. Maemura., N. Takeda., T. Harada., T. Nojiri., T. Saito., I. Manabe., Y. Imae., R. Nagai. 2007. C-reactive protein induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB activation in vascular endothelial cells. University of Tokyo. Japan.
7. Liang Y.J., K.G. Shyu ., BW. Wang ., LP. Lai . 2007. C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB pathway and induces vascular cell adhesion molecule-1 expression through CD32 in human umbilical vein endothelial cells and aortic endothelial cells. National Taiwan University. Taiwan.

8. Hill, J. O., H. R. Wyatt., G. W. Reed., J. S. Peters. 2003. Obesity and The Environment: where do we go from here?. *Science*. 299:853-855.
9. Born V. dan J. Schwartz. 1997. *Vascular Endothel Physiology, Pathology and Therapeutic Oppurtunities*. Schattauer. Stuttgart. Berlin.
10. Marks, D.S., J. A. Vita., J. F. Keuney., G. N. Welch., J. Loscalzo. 1995. Inhibition of Neointimal Proliferation in Rabbit Following Vascular Injury by a Single Treatment With a Protein Adduct of Nitric Oxide. *J. Clin Invest*. 96:2630.
11. Sanyin, Z., C. Shilin., S. Yingjun., Y. Dajian., L. Xijing., S. Albert., X. Hongxi. 2007. Puerarin Induces Angiogenesis in Myocardium of Rat with Myocardial Infarction(Pharmacology). National Institute of Informatic. Japan.
12. Khotimah, H. 2003. Keterkaitan Pengaruh Pemberian Vitamin E dan C Terhadap Bioavailabilitas Endothelial-Derived Nitric Oxide (EDNO), Malondealdehyde (MDA) dan Kepadatan Sel Endotel Kultur HUVECs Kondisi Glukosa Tinggi. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang.
13. Boulomie, A., T. Marumo., M. Lafontan., R. Busse.1999. Leptin Induce Oxidative Stress in Human Endotelial Cells. *The FASEB Journal* Vol 13.hal:1231-1237.
14. Brian R., BR. Clapp., GM.Hirschfield. 2005. Inflammation and Endothelial Function Direct Vascular Effects of Human C-Reactive Protein on Nitric Oxide Bioavailability. *Circulation*. 111:530-1536.
15. Lawrence, G. S. 2007. Implikasi Klinis Disfungsi Endotel dan Radikal Bebas. Universitas Hasanudin. Makasar.
16. Ding, M.P., F. Feng, H.T. Hu. 2007. Effects of puerarin on expression of nuclear factor kappaB after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. Dec. 32. 23:2515-2518.
17. Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell. 2003. *Molecular Cell Biology*. 5th Edition. W.H. Freeman and Company. New York.
18. Prasain, J.K., K. Jones, N. Brissie, D.R. Moore, J.M. Wyss, S. Barnes. 2004. Identification of puerarin and its metabolites in rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 52:3708-3712.
19. Sun, X.H., J.P. Ding, H. Li, N. Pan, L. Gan, X.L. Yang, H.B. Xu. 2007. Activation of Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels by Puerarin: The Underlying Mechanism of Puerarin-Mediated Vasodilation. *JPET*. October. 323. 1:391-397.
20. Dadogo Jack S, Fanelli C, Paramore D, Brothers dan J, Landt M. 1996. Plasma leptin and insulin relationships in obese and non obese humans. *Diabetes*. 45:695-698.
21. Delerive P., Martin-Nizard F., Chinetti G., Trottein F., Fruchart JC., Najib J., Duriez P dan Staels B. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production. *Circ Res*. Sep 3. 85. 5:394-402.
22. Mdidea. 2007. What is Pueraria root (kudzu root)? Value of Pueraria root (kudzu root) and Pueraria root (kudzu root) extracts?. <http://www.mdidea.com/.../herbextract/kudzu/data.html>. Tanggal akses 12 Juni 2007.
23. Jia G.F., H.M. Xie. 1999. *New Usage of Clinical Medicine*. 1sted. People's Health Publishing House. Beijing.
24. Cimino, F., F. Esposito, R. Ammendola, T. Russo. 1997. Gene regulation by reactive oxygen species. *Curr. Top. Cell. Regul*. 35:123-147.
25. Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E., dan Woodgett, J. R. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature (London)*. 353:670-674.
26. Weaves, R.F. 2003. *Molecular Biology*, second edition. Mc-Graw Hill Companies, Inc. New York.
27. Banks A.S., S.M. Davis, S.H. Bates, M.G.Jr. Myers. 2000. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem*. 275:14563-14572.
28. Grayck, E.N., C.S. Dieterle., C.A. Piantadosi., J.J. Enghild., T.D. Oury. 2000. Secretion of extracellular superoksida dismutase in neonatal lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279:977-984
29. Brooks, P.S., Y. Yoon., J.L. Robotham., M.W. Anders., S.S. Sheu. 2004. Calcium, ATP, and ROS : a itochondroal love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287:C817-C833.
30. Yamagishi, S., D. Edelstein, X.L. Du, Y. Kaneda, M. Guzmán, M. Brownlee. 2001. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. Department of Medicine, Diabetes Research Center, Albert Einstein College of

- Medicine, Bronx. www.jbc.org. Tanggal 6 Agustus 2007
31. Hayden, M.R., S.C. Tyagi. 2002. Intimal Redox Stress: Accelerated Atherosclerosis in Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus. *Atherosclerosis. Cardiab.* 1:1- 27.
 32. Nijveldt R. J., Els van Nood, D.E.C. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren, P.A.M. van Leeuwen. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Society for Clinical Nutrition.* 74:418-425.
 33. Korkina L.G., I.B. Afanas'ev. 1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol.* 38:151-163.
 34. Hancock, J.T., R. Desikan, S.J. Neill. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *J. Biochemical Society Transactions.* Vol29. part 2.
 35. Zmijewski, J.W., A. Landar, N. Wanatabe, D.A Dickinson, N. Noguchi, V.M Darler-Usmr. 2005. Cell signaling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochemical Society Transactions.* Vol 33, part 6.
 36. Gordon, M.H. 1990. The mechanism of antioxidants action in vitro. dalam B.J.F. Hudson, editor. *Food Antioxidants.* Elsevier Applied Science. London.
 37. Biocompare. 2009. BrdU In-Situ Detection Kit From BD Biosciences. Biocompare.
 38. Roche Applied Science. 2005. Cellular DNA Fragmentation ELISA. Cat. No. 1 585 045. Instruction Manual. Version August 2005.
 39. Yasaka, T., S. Ichisaka., T. Katsumoto., H. Maki., M. Saji., G. Kimura., dan K. Ohno. 1996. Apoptosis Involved in Density-dependent Regulation of Rat Fibroblastic 3Y1 Cell Culture. *Cell Structure and Function.* 21: 483-489.
 40. Qian, H., G. J. Hausman., M. M. Compton., M. J. Azain., D. L. Hartzel, C. A. Baile. 1998. Leptin Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma, Tumor Necrosis Factor, and Uncoupling Protein-2 Expression in Adipose Tissues. *Biochem and Biophys Res Commun.* 246:660-667.
 41. Qian, H., M. J. Azain., M. M. Compton., D. L. Hartzel., G. J. Hausman, C. A. Baile. 1998. Brain Administration of Leptin causes Deletion of Adipocytes by Apoptosis. *Endocrinology.* 139:791-794.
 42. Artwohl M., M. Roden., H. Hölzenbein., A. Freudenthaler., W. Waldhäusl, S.M. Baumgartner-Parzer. 2002. Modulation by Leptin of Proliferation and Apoptosis in Vascular Endothelial Cells. *International Journal of Obesity.* 26:577-580.
 43. Minokoshi Y and B. B. Kahn. 2003. Role of AMP-Activated Protein Kinase in Leptin-Induced Fatty Acid Oxidation in Muscle. *Biochemical Society Transactions.* 31. 1:196-201
 44. Lum, H. dan K. A. Roebuck. 2001. Oxidant Stress and Endothelial Cell dysfunction. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 280:C719-C741.
 45. Halliwell, B., J. M. C. Gutteridge. 1996. *Antioxidant In Nutrition, Health and Disease.* Oxford University Press Inc. New York
 46. Winarsi, H. 2005. *Isoflavon.* Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
 47. Xiong, F. L., X. H. Sun., L. Gan., X. L. Yang, H. B. Xu. 2006. Puerarin Protects Rat Pancreatic Islets from Damage by Hydrogen Peroxide. *Eur J Pharmacol.* 529:1-7.
 48. Semetisari, R. 2008. Studi Efek Puerarin Dalam Menurunkan Konsentrasi *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) Pada Kultur *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) Yang Diinduksi Leptin. Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
 49. Tsujimoto, Y. 1997. Apoptosis and Necrosis: Intracellular ATP Level as A Determinant for Cell Death Modes. *Cell Death and Differentiation.* 4:429-434.
 50. Bezvenyuk, Z. 2001. Multiple Pathways of DNA Disintegration During Neuronal Apoptosis. Department of Neuroscience and Neurology. Series of Reports. No 56:1-59.

Perkembangan Sel T Regulator Periferal dan Mekanisme Supresi *in vitro*

Muhaimin Rifa'i*

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

Abstrak

Sel T regulator yang ditandai dengan $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ memegang peranan kunci pada sistem toleran tubuh. Sel T regulator ini diperlukan untuk mengendalikan sel efektor yang teraktivasi. Sel T regulator melakukan fungsinya sebagai pengendali sel efektor dan pembentuk sistem toleran dengan cara tidak hanya sebagai supresor namun juga pengatur sistem homeostasis. Sel T regulator mempunyai daya kendali terhadap sel lain yang terlibat pada sistem imun. Kemampuan mengendalikan sel lain ini mutlak diperlukan untuk menghindari terjadinya penyakit autoimun dan penolakan transplantasi. Kerja sel T regulator mempengaruhi respon imun terhadap alergen namun melemahkan sel efektor melawan sel tumor dan patogen. Di samping itu pada beberapa kasus diketahui bahwa sel T regulator juga menyebabkan sel efektor kehilangan fungsinya. Sampai sekarang mekanisme kerja sel T regulator secara seluler dan molekuler belum sepenuhnya diketahui, namun ada bukti tentang pentingnya sel ini dari banyak aspek biologi. Pengetahuan tentang adanya strategi mengaktifkan dan menginduksi munculnya sel T regulator dari sel T konvensional membuka kemungkinan untuk melakukan rekayasa *in vivo* sebagai langkah imunoterapi khususnya pada model penyakit autoimun. Bahasan saat ini merangkum pengetahuan tentang sel T regulator sebagai imunoterapi dan harapan dimasa depan terhadap pemanfaatan sel ini.

Kata kunci: autoimun, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, sel efektor, Sel T regulator

PENDAHULUAN

Terjadinya toleransi terhadap *self antigen* ketika sistem imun melakukan tugasnya merupakan persyaratan mutlak yang harus dipenuhi agar tidak terjadi kerusakan pada setiap individu yang sehat. Proses pembentukan reseptor sel T (*T Cell Receptor* atau TCR) dengan *genetic rearrangement* memungkinkan terjadinya resiko yaitu terjadinya sel yang lolos sehingga terdapat sel T yang bersifat autoreaktif. Mekanisme terbentuknya toleransi berdasarkan penghapusan klon sel T yang bersifat reaktif pada organ timus diketahui merupakan mekanisme yang paling mungkin untuk mencegah terjadinya autoagresif pada *peripheral*, sehingga timus dikenal sebagai pusat toleran sekaligus sebagai organ limfoid primer [1]. Namun, karena penghapusan klonal dalam timus tidak sempurna, sel T autoreaktif dapat lolos dari seleksi dan bersirkulasi pada individu yang sehat [2]. Diduga ada mekanisme yang mengontrol secara ketat sel-sel autoreaktif yang lolos dari seleksi negatif [3, 4, 5, 6, 7]. Banyak peneliti yang berhasil menunjukkan potensi besar sel spesifik yang mempunyai peran

sebagai pengatur dan mencegah terjadinya respon imun pada *self-antigen*. Sel tersebut selanjutnya dikenal sebagai sel T regulator. Sel T regulator mencegah terjadinya penyakit autoimun akibat sel T autoreaktif [3], melindungi terjadinya penolakan pada transplantasi [8], mencegah terjadinya reaksi GVHD [9] dan mencegah terjadinya reaksi alergi [10]. Defisiensi sel T regulator banyak berkaitan dengan timbulnya penyakit *multiple sclerosis*, *diabetes tipe-1*, *rheumatoid arthritis* dan kejadian alergi [11, 12, 13]. Namun, peningkatan jumlah sel T regulator mengakibatkan lumpuhnya sel-sel efektor pada pasien kanker dan infeksi mikroba [14, 15]. Usaha menyeimbangkan sistem kontrol agar tubuh tetap terjaga dari infeksi namun juga bebas dari penyakit autoimun merupakan usaha yang dilakukan oleh kalangan ilmuwan pada bidang imunologi dalam konsep imunoterapi terhadap penyakit kanker, autoimun, infeksi, dan trans-plantasi.

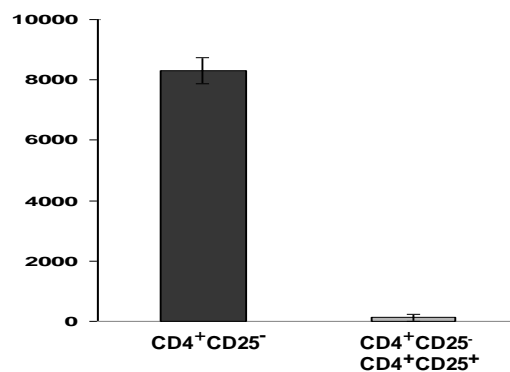
Sel T regulator telah diketahui mempunyai asal-usul yang berbeda. Secara garis besar sel T regulator dibedakan menjadi dua jenis yakni sel T regulator natural (profesional) dan sel T regulator hasil induksi. Sel T regulator natural (profesional) merupakan populasi sel T yang mengekspresikan molekul CD25. Molekul CD25 adalah rantai *alfa* dari reseptor IL-2. Sel T regulator natural ditandai dengan $CD4^+CD25^+$ (*nT reg*). Sel ini muncul dan mengalami pemasakan pada organ timus saat

* Alamat korespondensi penulis:
Muhaimin Rifa'i
e-mail : rifa123@ub.ac.id

Alamat : Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya,
Jl. Veteran, Malang, 65145

perkembangan awal suatu individu [16]. Pada mencit yang dilakukan *thymectomy* sejak awal kelahiran akan mengalami defisiensi sel T regulator sehingga mencit tersebut akan menderita berbagai penyakit autoimun yang ditandai dengan kerusakan jaringan akibat reaksi sel T *auto-regresif* [17] dan hilangnya homeostasis yang ditandai dengan terjadinya sel T autoreaktif [18]. Sel T regulator natural ini berkembang di timus dan mempunyai karakteristik yang sangat berbeda dengan sel T konvensional yang lain [19]. Sel T regulator mengisi sekitar 4-10% sel T populasi CD4 perifer [4]. Sel T regulator mempunyai beberapa penanda pada permukaan sel atau intra sel. Penanda tersebut meliputi ekspresi positif CD25, CTLA-4, GITR, OX40, dan L-selektin (CD62L), sehingga memungkinkan isolasi *nT reg* untuk menunjukkan perannya *in vitro* [6] dan *in vivo* [5]. Namun demikian, sampai saat ini masih terjadi banyak kontroversi dari para ilmuwan pada bidang imunologi, sehingga pentingnya molekul permukaan yang berupa rantai alfa reseptor IL-2 tetap saja belum terjelaskan secara lengkap [20, 21]. Sampai saat ini ada satu keyakinan bahwa molekul intra-nukleus, Foxp3 merupakan penanda terpenting dari sel T regulator. Foxp3 merupakan faktor transkripsi yang keberadaannya mutlak diperlukan agar suatu individu hidup normal. Bukti ini diperoleh dari penelitian menggunakan mencit *knockout* (*knockout mice*). Penghapusan gen Foxp3 pada mencit menyebabkan mencit akan kehilangan sel T regulator. Meskipun pada mencit *Foxp3-knockout* ekspresi CD25 nampak normal, namun sel-sel yang mengekspresikan molekul tersebut tidak menunjukkan sebagai sel regulator maupun supresor. Pada mencit *Foxp3-knockout* akan terjadi penyakit autoimun yang parah, *lymphoproliferative* fatal, yang menyebabkan kematian mencit tersebut pada umur sekitar 4-5 minggu setelah kelahiran [22]. Pada manusia mutasi gen Foxp3 dapat menyebabkan penyakit IPEX (*Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropati, sindrom X-linked*). Penyakit ini tergolong langka dan muncul fenotipnya sejak anak-anak yang dicirikan oleh autoimun yang parah [23]. Analisis terhadap pasien IPEX disimpulkan bahwa hilangnya Foxp3 menyebabkan cacatnya sel T regulator dan hilangnya aktivitas supresi terhadap sel-sel efektor. Hal yang sangat menarik bahwa mencit yang mengalami autoimun bisa diselamatkan dengan mentransfer sel T regulator CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ [24]. Pada mencit, Foxp3 secara eksklusif hanya

diekspresikan pada sel T regulator [20]. Informasi ini jelas menunjukkan bahwa pada mencit gen Foxp3 penting bagi perkembangan dan fungsi sel T regulator. Temuan Foxp3 ini memberikan peran yang besar dalam mengidentifikasi sel T regulator. Molekul CD25 dan GITR meskipun menjadi penanda sel T regulator namun tidak bersifat mutlak karena molekul tersebut juga diekspresikan oleh sel-sel yang teraktivasi. Penelitian lebih lanjut mengenai Foxp3 pada sel T manusia, menunjukkan adanya perbedaan yang besar dibandingkan dengan mencit, sehingga beberapa mekanisme yang terjadi pada mencit belum tentu sama dengan manusia. Berbeda dengan yang ada pada mencit, Foxp3 pada manusia juga mengalami peningkatan setelah sel T CD4 konvensional distimuli melalui jalur TCR, hal ini menunjukkan bahwa sel T regulator pada manusia lebih mudah diinduksi daripada yang ada pada mencit [25, 26].



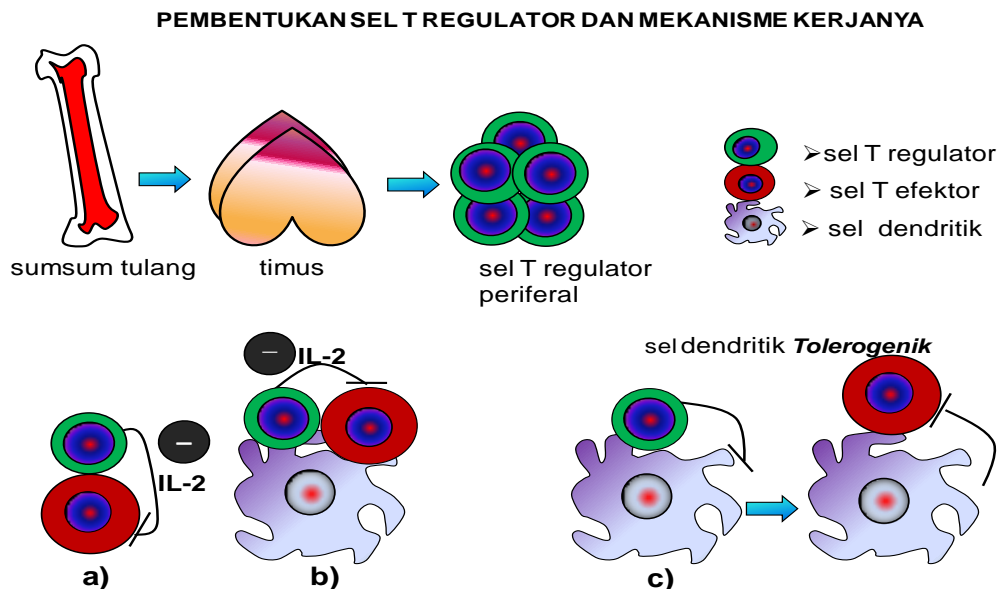
Gambar 1. Sel T regulator dapat menghambat proliferasi sel target atau responder *in vitro*. Sel T konvensional CD4⁺CD25⁻ dari mencit diisolasi dan dikultur terpisah atau dicampur dengan sel T regulator. Kultur dilakukan pada 96-well plate dengan adanya APC yang berasal dari sel spleen yang diradiasi dosis letal. Kultur ditambah anti-CD3 untuk menstimulasi dan mengaktivasi sel dalam kultur. Analisis dilakukan tiga hari setelah kultur dengan menggunakan deteksi thymidine.

MEKANISME KERJA T reg IN VITRO DAN PEMBENTUKAN T reg

Sejauh ini diyakini bahwa kerja sel T regulator terjadi melalui mekanisme kontak antar sel. Kontak antar sel ini memberikan sinyal yang dapat mengaktifkan sel *T reg* melalui jalur TCR (*T cell receptor*). Semua penelitian yang menggunakan hewan dan manusia sebagai bahan percobaan telah melaporkan bahwa mekanisme kerja sel *T reg* memerlukan kontak antara sel *T reg* dengan sel responder. Sel responder yang dikultur tanpa kehadiran *T reg* akan berproliferasi

sangat cepat, namun dengan adanya *T reg* proliferasi dapat dihentikan secara sempurna (Gambar 1). Para ilmuwan menduga kontak antar sel yang menimbulkan sinyal melalui TCR akan mempengaruhi sel *T reg* mengekspresikan molekul pada permukaannya yang digunakan untuk melakukan *suppressor*. Namun, meskipun para ilmuwan berusaha dengan untuk mengetahui molekul yang terkspresi pada permukaan sel, sejauh ini masih belum diketahui jawabannya. Sementara ini diyakini *T reg* menghambat aktivasi dan proliferasi sel responder dengan menekan sintesis IL-2 sel [26]. Sel T regulator diyakini mempunyai asal yang berbeda-beda. Salah satu sel T regulator yang disebut sebagai "natural atau profesional" diketahui terbentuk di dalam organ timus dan mempunyai molekul yang ditandai dengan $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. CD25 merupakan rantai α dari reseptor IL-2 [16]. *Thymectomy* yang dilakukan pada mencit yang berumur kurang dari tiga hari akan kehilangan *T reg* pada darah maupun organ limfoid perifer. Ketiadaan sel *T reg* ini akan mengakibatkan munculnya penyakit autoimun yang ditandai dengan kerusakan

auto aggressive [17]. Hilangnya sel *T reg* dari sirkulasi juga menimbulkan hilangnya homeostasis dan rusaknya mekanisme kekebalan [18]. Sel T regulator yang dibentuk oleh timus ini mempunyai karakter yang sangat berbeda dengan sel konvensional yang umumnya mempunyai TCR dengan sifat autoreaktif [19]. Sel T regulator mempunyai proporsi 5-10% pada populasi CD4 yang berada pada sirkulasi darah maupun yang *homing* pada organ limfoid sekunder. Secara morfologi sel T regulator tidak menunjukkan perbedaan yang besar dibanding sel T konvensional yang lain, namun secara umum sel *T reg* mempunyai ukuran sedikit lebih kecil dari sel limfosit lainnya. *Foxp3* mempunyai peran sebagai faktor perkembangan sel T regulator dan sekaligus mengendalikan fungsinya [20, 21]. Mencit yang dihapus gen *Foxp3*-nya akan mengalami autoimun yang parah meskipun ekspresi molekul CD25 dalam keadaan normal. Mencit *Foxp3*^{-/-} akan mati pada umur 4-5 minggu setelah kelahiran oleh adanya autoimun yang sangat parah yang ditandai dengan hilangnya *homeostasis* dan terjadi proliferasi sel-sel limfosit yang melebihi keadaan normal [22].



Gambar 2. Pembentukan dan Mekanisme Kerja Sel T Regulator

Keterangan:

Sel T regulator dapat terbentuk dengan berbagai cara. *T reg* dapat terbentuk dari perkembangan sel T pada organ timus. *T reg* yang berkembang pada timus dikenal dengan nama "*professional regulatory T cell*" atau "*natural occurring regulatory T cell*", sedangkan yang terbentuk di daerah perifer disebut *induced regulatory T cells*. a) *T reg* mempunyai potensi melakukan supresi terhadap sel efektor. Salah satu mekanisme supresi adalah mencegah produksi IL-2 disamping menghambat proliferasi sel target atau responder. *T reg* dapat secara langsung melakukan regulasi melalui kontak antar sel tanpa intervensi APC. b) *T reg* mencegah sekresi IL-2 oleh efektor dengan intervensi sel dendritik. c) Sel dendritik yang telah berinteraksi dengan *T reg* mempunyai daya supresi terhadap sel efektor sehingga disebut sel dendritik "*tolerogenik*".

Cacat genetik yang terkait dengan Foxp3 adalah IPEX (*immunodysregulation, polyendocrinopathy, Enteropati, sindrom X-linked*) merupakan penyakit langka pada manusia. IPEX terpaut oleh kromosom X (*X-linked*). Cacat genetik IPEX ada anak-anak, dicirikan oleh penyakit autoimun yang disebabkan oleh mutasi gen Foxp3 [23]. Analisis yang sangat teliti pada pasien IPEX dan mencit knockout gen Foxp3 menunjukkan bukti kurangnya sel T regulator dari dua model tersebut. Kurangnya sel T regulator mengakibatkan hilangnya daya penekanan (*suppression*) terhadap sel-sel autoreaktif. Mencit Foxp3^{-/-} dapat disembuhkan dengan mentransfer sel T regulator CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ yang berasal dari mencit normal [24, 25, 26]. Secara eksklusif, Foxp3 pada mencit dipresentasikan oleh sel T CD4⁺CD25⁺ dan mempunyai daya tekan terhadap sel T konvensional CD4⁺CD25⁻. Pada mencit, Foxp3 penting untuk perkembangan sel T regulator sekaligus menentukan adanya fungsi sebagai sel represor [20]. Temuan Foxp3 ini membedakan sel T regulator dari sel T konvensional, karena penanda lain berupa molekul CD25 maupun GITR tidak hanya diekspresikan oleh sel T regulator namun juga sel lain yang mengalami aktivasi. Dari data penelitian sekarang telah diketahui bahwa ekspresi Foxp3 pada mencit berbeda dibandingkan dengan yang ada pada manusia. Foxp3 pada mencit tidak dapat diinduksi oleh aktivasi melalui TCR, tetapi pada manusia Foxp3 dapat diinduksi oleh aktivasi TCR. Penemuan ini menjadi informasi penting sebagai strategi untuk memperoleh sel T regulator *in vitro* [25]. Perkembangan dan mekanisme kerja sel T reg pada manusia dapat dilihat pada Gambar 2.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chai, J.G., S.A. Xue, D. Coe, C. Addey, I. Bartok, D. Scott, E. Simpson, H.J. Stauss, S. Hori, S. Sakaguchi, J. Dyson. 2005. Regulatory T cells, derived from naive CD4⁺CD25⁻ T cells by *in vitro* Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation*. 79:1310–1316.
2. Akbari, O, P. Stock, R.H. DeKruyff, D.T. Umetsu. 2003. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol*. 15:627–633.
3. Viglietta, V, C. Baecher-Allan, H.L. Weiner, D.A. Hafler. 2004. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*. 199:971–979.
4. Lindley, S, C.M. Dayan, A. Bishop, B.O. Roep, M. Peakman, T.I. Tree. 2005. Defective suppressor function in CD4⁺CD25⁺ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 54:92–99.
5. Ehrenstein, M.R., J.G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D.A. Isenberg, C. Mauri. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF alpha therapy. *J Exp Med*. 200:277–285.
6. Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 10:942–949.
7. Endharti, A.T., M. Rifa'I, Z. Shi, Y. Fukuoka, Nakahara, Y. Kawamoto, K. Takeda, K. Isobe, H. Suzuki. 2005. Cutting edge: CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8⁺ T cells. *Journal of immunology*, 175 (11):7093–7097.
8. Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, S. Sakaguchi. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*. 162: 5317–5326.
9. Hsieh, C.S, Y. Liang, A.J. Tzgnik, S.G. Self, D. Liggitt, A.Y. Rudensky. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺CD4⁺ T cell receptors. *Immunity*. 21: 267–277.
10. Hori, S., T. Nomura, S. Sakaguchi. 2003. Kontrol of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 299: 1057–1061.
11. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, A.Y. Rudensky, 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 4: 330–336.
12. Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paepers, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 27:68–73.
13. Wildin, R.S, F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J.L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F.D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, M.E. Brunkow. 2001. X-linked

- neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endo-crinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* 27: 18–20.
14. Nishimura, E, T. Sakihama, R. Setoguchi, K. Tanaka, S. Sakaguchi. 2004. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol.* 16: 1189–1201.
 15. Ziegler, S.F. 2005. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol.* 25:342-349.
 16. Shevach, E.M., R.S. McHugh, C.A. Piccirillo, A.M. Thornton. 2001. Kontrol of T-cell activation by CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev.* 182:58–67.
 17. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 192:303–310.
 18. Zhao, D.M., A.M. Thornton, R.J. Dipaolo, E.M. Shevach. 2006. Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood.* 33:675-680.
 19. Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi, R.J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 174:1783–1786.
 20. Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M.C. Nussenzweig, H. von Boehmer. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol.* 6:1219–1227.
 21. Stassen, M, S. Fondel, T. Bopp, C. Richter, C. Muller, J. Kubach, C. Becker, J. Knop, A.H. Enk, S. Schmitt, E. Schmitt, H. Jonuleit. 2004. Human CD25⁺ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4⁺ T helper cells. *Eur J Immunol.* 34:1303–1311.
 22. Rifa'i, M., Y. Kawamoto, I. Nakashima, H. Suzuki. 2004. Essential Roles of CD8⁺CD122⁺ Regulatory T cells in the Maintenance of T Cell Homeostasis. *J Exp Med.* 200. 9:1123-1134.
 23. Rifa'i, M., Z. Shi, Y. Lee, H. Shiku, K. Isobe, H. Suzuki. 2008. CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I- $\alpha\beta$ TCR interaction and become IL-10 producing active regulatory cells. *J International Immunologi.* 20. 7:937-947.
 24. Rifa'i, M., Z. Shi, K. Isobe, H. Suzuki. 2007. Essential role of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.:1950) 2008. 180. 2:825-32.
 25. Shi, Z., M. Rifa'i, Y. Lee, K. Isobe, H. Suzuki. 2007. Importance of CD80/CD86-CD28 interaction in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Journal Immunology.* 2008. 124. 1:121-128.
 26. Shi, Z., Y. Okuno, M. Rifa'i, A.T. Endharti, K. Akane, K. Isobe, H. Suzuki. Human CD8⁺CXCR3⁺ T cells have the same function as murine CD8⁺CD122⁺ T reg. *Eur. J. Immunol.* 39. 08:2106-2119.

Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Terhadap Aktivasi NF- κ B dan Ekspresi Protein (TNF- α , ICAM-1) pada Kultur Sel Endotel (HUVECs) Dipapar Ox-LDL

Endah Kusuma Rastini^{1*}, M. Aris Widodo², M. Saifur Rohman³

¹Program Studi Biomedik Universitas Brawijaya

²Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

³Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh dan mekanisme kerja mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 dalam menghambat proses aterosklerosis. Penelitian dilakukan secara *in vitro* menggunakan kultur sel endotel vena umbilikal manusia (HUVECs). Dibuat dua kelompok kontrol pada kultur sel endotel yaitu kontrol negatif tanpa perlakuan, kelompok yang dipapar Ox-LDL 40 μ g ml⁻¹, Kelompok perlakuan yaitu kultur sel endotel dengan pemberian dosis ekstrak mengkudu 2,5 μ g ml⁻¹, 5 μ g ml⁻¹ dan 10 μ g ml⁻¹ selama dua jam. Masing-masing sistem kultur dipapar Ox-LDL 40 μ g ml⁻¹. Pemaparan Ox-LDL dilakukan selama 30 menit untuk mengetahui aktivasi NF- κ B dan 24 jam untuk mengetahui ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1. Pengukuran aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 menggunakan imunohistokimia. Hasil penelitian menunjukkan, ekstrak mengkudu dengan dosis 2,5 μ g ml⁻¹, 5 μ g ml⁻¹ dan 10 μ g ml⁻¹ dapat menghambat aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 pada kultur sel endotel manusia (HUVECs) dipapar Ox-LDL 40 μ g ml⁻¹ sebagai agen inflamasi yang dapat menimbulkan aterosklerosis. Melalui analisis ANOVA ($p < 0,01$) diketahui terdapat hubungan negatif pada perlakuan antar dosis ekstrak mengkudu dalam menghambat aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 menggunakan analisis Spearman's ($p < 0,01$).

Kata kunci: aterosklerosis, ICAM-1, mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), NF- κ B, Ox-LDL, TNF- α

PENDAHULUAN

Penyakit aterosklerosis merupakan suatu penyakit kompleks. Aterosklerosis berawal dari penumpukan kolesterol terutama ester kolesterol-LDL (lipoprotein densitas rendah) di dinding arteri. *Low Density Lipoprotein* (LDL) secara normal bisa masuk dan keluar dari dinding arteri melalui endotel. Masuknya lipoprotein ke lapisan dalam dinding pembuluh darah meningkat seiring tingginya jumlah lipoprotein dalam plasma (hiperlipidemia), ukuran lipoprotein dan tekanan darah (hipertensi). Peningkatan semua itu akan meningkatkan permeabilitas dinding pembuluh darah, sehingga lipoprotein dan ester kolesterol mengendap di dinding arteri.

Salah satu penyakit yang berhubungan dengan terjadinya aterosklerosis adalah penyakit kardiovaskuler, yang diketahui menye-

babkan kematian terbesar di negara maju seperti Amerika Serikat. Di Indonesia sendiri mulai terjadi pergeseran angka kematian dari penyakit infeksi kepada penyakit metabolik dan degeneratif termasuk juga penyakit jantung koroner dan pembuntuan pembuluh darah otak yang diantaranya disebabkan oleh aterosklerosis. Berdasarkan data penelitian terdahulu telah banyak dibuktikan bahwa aterosklerosis merupakan proses inflamasi atau peradangan kronis. Zat yang merangsang inflamasi maupun protein dihasilkan sel radang terlibat secara langsung sejak awal hingga proses terjadinya komplikasi dari aterosklerosis. Perubahan fungsi endotel akan mengubah perjalanan aterosklerosis.

Pembentukan awal aterosklerosis bermula dari sel darah putih, yang disebut monosit dan T Limfosit, yang mengalami penumpukan pada dinding pembuluh darah arteri dan dipicu oleh modifikasi LDL. Salah satu modifikasi LDL yang menyebabkan aterosklerosis adalah Ox-LDL [1]. Ox-LDL dapat mengaktifkan faktor transkripsi NF- κ B yang terlibat dalam ekspresi imun dan

* Alamat Korespondensi:

Endah Kusuma Rastini

E-mail : rastini@gmail.com

Alamat : Program Studi S2 Biomedik Universitas Brawijaya,
Jl. Veteran, Malang, 65145

inflamasi gen. NF- κ B yang aktif dapat menginduksi terbentuknya protein pada sistem imun seperti protein sitokin (TNF- α , IL-1), adesi molekul (VCAM-1, ICAM-1), dan zat vasoaktif (eNOS, NO). Keadaan ini meningkatkan progresifitas aterosklerosis sehingga mengakibatkan pembuntuan arteri koroner [2].

Salah satu bahan yang dapat mencegah terjadinya aterosklerosis dalam tubuh adalah antioksidan, yang dapat diperoleh dari sayur dan buah. Mengkudu dalam berbagai penelitian diketahui dapat digunakan sebagai antiinflamasi, antibakteri, dan antikanker, di mana memiliki berbagai macam zat aktif.

Mengkudu merupakan tanaman tropis termasuk dalam familia *Rubiaceae*. Tinggi tanaman mengkudu antara empat sampai enam meter, berdaun hijau lebar dan berbuah sepanjang tahun. Mengkudu sudah sejak lama dikenal sebagai tanaman yang berkhasiat [3]. Mengkudu mengandung zat aktif utama yaitu polisakarida, *scopoletin*, *ascorbic acid*, *beta carotene*, l-arginin, dan enzim proxeronase dari suatu alkaloid *pro-xeronin*. Zat aktif utama dalam buah mengkudu lebih berperan dibandingkan dengan zat aktif lain dalam buah mengkudu. Menurut Kamiya, dalam mengkudu, selain antioksidan, zat bioaktif yang diketahui dapat menghambat *Ox-LDL* pada proses atero-sklerosis adalah senyawa polifenol (*3,3'-bisdemethyl-pinoresinol*, *americanoid acid A*, *morindolin*, *americanol A*, *americanin A*, dan *isoprincepin*). Bioaktif antioksidan dan poli-fenol tersebut dapat menekan teraktivasinya NF- κ B sehingga ekspresi protein inflamasi (TNF- α , ICAM-1) tidak terbentuk dan proses aterosklerosis dapat dihambat[4].

Mengetahui mekanisme dan pengaruh ekstrak buah mengkudu pada kultur sel endotel (HUVECs) terhadap aktivasi NF- κ B, penurunan ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 yang memediasi terjadinya aterosklerosis.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan eksperimen murni melalui percobaan di laboratorium, dengan tiga kali pengulangan terhadap empat kelompok perlakuan pada kultur sel HUVECs yang diinkubasi dengan Ox-LDL dan satu kultur sel normal.

Pembuatan Kultur Sel Endotel (HUVECs)

Vena Umbilikus dibersihkan dengan larutan PBSA dan diberi larutan *Collagenase*. *Collagenase* dikeluarkan dari umbilikus, disentrifugasi kece-

patan 1000 rpm selama 8 menit. Supernatan dibuang, ditambahkan 4 ml medium kultur dan dipindahkan ke dalam *plate well* 24. *Plate* dimasukkan ke dalam inkubator sampai monolayer (membentuk *cobblestone*) kurang lebih 3-4 hari dan media diganti setiap 2 hari sekali.

Pembuatan Ekstrak Mengkudu

Bubuk buah mengkudu dimasukkan dalam kertas saring dan diikat kedua ujungnya, direndam dalam gelas ekstraksi *sokhlet* 250 ml berisi etanol 80% sampai pekat dan dilakukan ekstraksi. Hasil ekstraksi kemudian dievaporasi (memisahkan antara pelarut etanol dan ekstrak kasar mengkudu).

Pemberian Ekstrak Mengkudu untuk menekan aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1

Kultur primer sel endotel monolayer diinkubasi dengan dan tanpa ekstrak buah mengkudu selama 2 jam berbagai dosis, kemudian ditambahkan Ox-LDL dan diamati pengaruhnya terhadap aktivasi NF- κ B setelah 30 menit sampai 1,5 jam. Dibuat kultur primer yang sama dengan perlakuan di atas dan diamati peningkatan ekspresi gen TNF- α , ICAM-1 setelah 24 jam.

Pengukuran imunohistokimia untuk mengetahui aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1

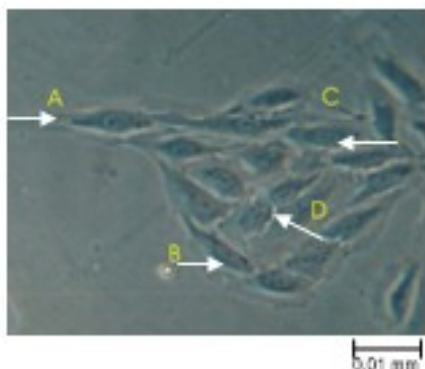
Kultur sel endotel yang telah diberi ekstrak mengkudu dan dipapar Ox-LDL dicuci dengan HEPES *buffer* selama 30 menit dan difiksasi dengan *methanol* selama 5 menit. Preparat dikeringanginkan dan dicuci dengan PBS pH 7,4. Diaplikasikan 3% H₂O₂ selama 10 menit dan cuci dengan PBS pH 7,4 pada preparat. Digunakan serum 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100 dan inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang untuk *blocking*. Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 dan ditetesi dengan *monoclonal anti p50-p65*, *monoklonal anti TNF- α* , *monoklonal anti ICAM-1* dan diinkubasi semalam. Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4, ditetesi dengan antibodi sekunder berlabel biotin dan diinkubasi selama satu jam. Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 dan ditetesi dengan SA-HRP (*Strep-Avidin horse radis peroxidase*) selama 40 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 dan diaplikasikan kromogen untuk HRP, yaitu DAB (3-3'-diamino benzidine). *Counterstain* dilakukan dengan *Mayer hematoxilen* selama 10 menit, dibilas dengan air mengalir dan dicuci dengan dH₂O. Preparat dikeringkan dan ditutup *coverglass*. Hasil diamati

dengan mikroskop Olympus cx21 perbesaran 1000 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur Sel Endotel (HUVECs) Normal

Kultur sel endotel (HUVECs) dalam kondisi normal memiliki ciri-ciri antara lain bentuk sel *cobblestone*, dengan spesifisitas sel pada bagian tengah tampak bulat dan jelas. Selain itu bentuk sel pipih, jarak antar sel teratur dan permukaan sel ditandai dengan kejelasan inti sel, membran plasma, sitoplasma, dan *extra cellular matrix* (ECM) [5]. Hasil kultur sel endotel dalam kondisi pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kultur Sel Endotel (HUVECs) Dalam Kondisi Normal pada hari ke 4 kultur. Preparat diamati dengan mikroskop *inverted* nikkon, perbesaran 400 kali

Keterangan:

- | | |
|----------------|---------------------------------------|
| A. membran sel | B. sitoplasma |
| C. inti sel | D. <i>extra cellular matrix</i> (ECM) |

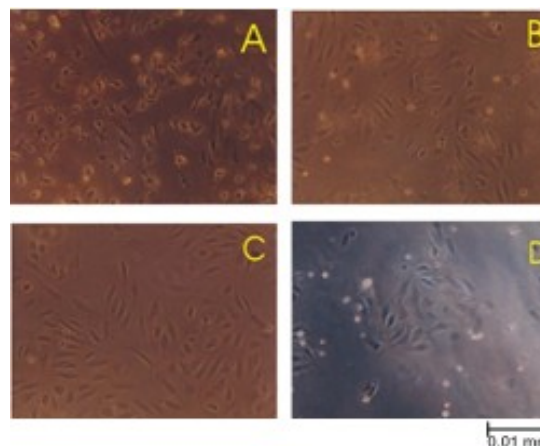
Optimalisasi Dosis Ekstrak Mengkudu Pada Kultur Sel Endotel

Hasil eksplorasi atau pemaparan dosis ekstrak mengkudu selama dua jam pada kultur sel endotel normal hari ke-4 menunjukkan bahwa pada dosis tertinggi, yaitu 20 mg ml^{-1} , merupakan dosis yang toksik untuk sel endotel (HUVECs). Keadaan ini ditandai dengan kematian sel (Gambar 2), sel membulat dan terlepas dari media kultur. Beberapa sel yang masih hidup juga mulai mengalami kematian ditandai dengan terjadinya *shrinkage* (sel mengkerut), jarak antar sel melebar dan sel membulat. Oleh karena itu dosis ekstrak mengkudu yang dapat digunakan adalah 10 mg ml^{-1} , 5 mg ml^{-1} , dan $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$.

Optimalisasi Dosis Ox-LDL Pada Kultur Sel Endotel

Optimalisasi Dosis dilakukan dengan merujuk penelitian terdahulu, yaitu range Ox-LDL yang sesuai pada kultur adalah antara $10-50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Hasil penelitian menunjukkan, pada penentuan aktivasi faktor transkripsi $NF-\kappa\beta$, setelah kultur

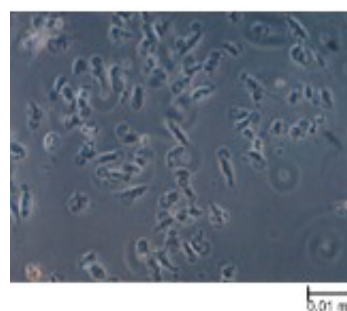
sel endotel ditambah dengan ekstrak mengkudu selama dua jam dan kemudian dipapar dengan Ox-LDL $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ selama 30 menit, sel tetap hidup. Ekspresi protein $TNF-\alpha$ dan $ICAM-1$ ketika dilakukan pengukuran setelah dua jam pemberian dosis ekstrak mengkudu dan dipapar dengan Ox-LDL $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ selama 24 jam, sel menunjukkan penurunan viabilitas (Gambar 3). Berdasarkan hasil uji optimalisasi penggunaan kadar Ox-LDL, maka digunakan kadar Ox-LDL sebesar $40 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ dan dosis ekstrak mengkudu $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$, 5 mg ml^{-1} , dan 10 mg ml^{-1} dalam penelitian ini.



Gambar 2. Kultur Sel Endotel (HUVECs) hari ke 4 dipapar dosis ekstrak mengkudu 2 jam. Diamati dengan mikroskop *inverted* nikkon, perbesaran 400 kali.

Keterangan:

- | |
|--|
| A. ekstrak mengkudu 20 mg ml^{-1} |
| B. ekstrak mengkudu 10 mg ml^{-1} |
| C. ekstrak mengkudu 5 mg ml^{-1} |
| D. ekstrak mengkudu $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ |

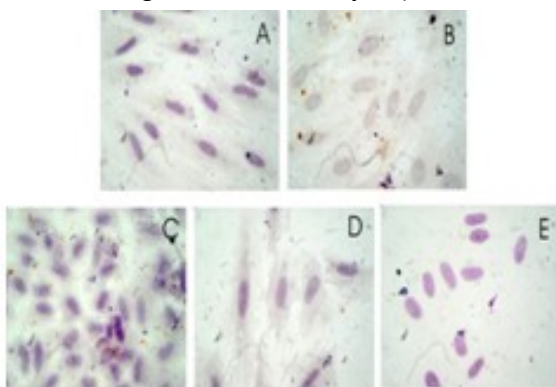


Gambar 3. Kultur sel Endotel setelah diberi ekstrak mengkudu dosis tertinggi 2 jam dan dipapar Ox-LDL $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ selama 24 jam. Sel tampak mulai mengalami kematian diamati dengan mikroskop *inverted* nikkon, perbesaran 400 kali.

Imunohistokimia Aktivasi Faktor Transkripsi $NF-\kappa\beta$ Pada Kultur Sel Endotel (HUVECs)

Berdasarkan hasil pengecatan imunohistokimia pada kultur sel endotel (HUVECs yang telah diberi ekstrak mengkudu dosis $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$, 5

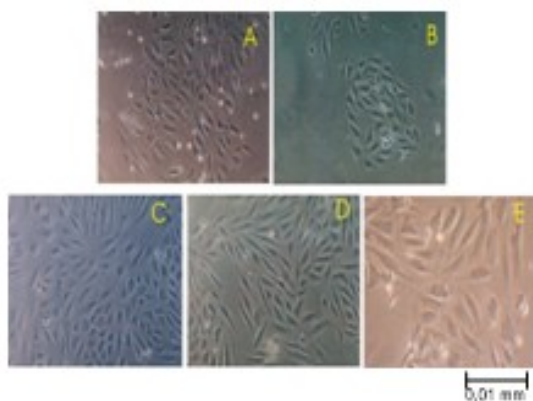
mg ml⁻¹, dan 10 mg ml⁻¹ selama dua jam dan dipapar dengan Ox-LDL 40 μ g ml⁻¹ selama 30 menit untuk melihat aktivasi NF- κ B (Gambar 4), dapat diketahui bahwa kultur sel endotel normal tanpa adanya aktivasi NF- κ B (Gambar 4). Selain itu tampak pula inti sel berwarna biru atau biru keunguan dengan sitoplasma yang jelas dan tampak kecoklatan. Sedangkan pada kultur sel endotel yang menunjukkan adanya aktivasi NF- κ B, diperlihatkan pada perlakuan kontrol positif (Gambar 5) dengan penampakan inti sel berwarna biru atau ungu tetapi lebih pucat (warna biru atau ungu samar dan tidak jelas).



Gambar 4. Kultur HUVECs hasil imunohistokimia untuk melihat aktivasi NF- κ B.

Keterangan:

(A) Kontrol Negatif (tanpa perlakuan) (B) Kontrol Positif (dipapar LDL teroksidasi 40 μ gml⁻¹) (C),(D) dan (E) adalah HUVECs diberi ekstrak mengkudu dengan dosis berturut-turut 2,5 mg ml⁻¹, 5 mg ml⁻¹, dan 10 mg ml⁻¹ yang dipapar Ox-LDL 40 μ g ml⁻¹ (diamati dengan mikroskop Olympus cx21, perbesaran 1000 kali).



Gambar 5. Kultur Sel Endotel (HUVECs) untuk melihat Ekspresi TNF- α /ICAM-1.

Keterangan:

(A) Kontrol Negatif (tanpa perlakuan) (B) Kontrol Positif (dipapar Ox-LDL 40 μ g ml⁻¹) (C), (D) dan (E) adalah HUVECs diberi ekstrak mengkudu dengan dosis berturut-turut 2,5 mg ml⁻¹, 5 mg ml⁻¹, dan 10 mg ml⁻¹ yang dipapar Ox-LDL 40 μ g ml⁻¹. (Foto dengan perbesaran 400 \times , mikroskop *inverted* merk nikkon).

Analisis statistik Oneway ANOVA dan uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat pengaruh bermakna pada kultur sel endotel yang dipapar dengan ekstrak mengkudu terhadap banyaknya aktivasi NF- κ B dalam sel endotel ($p < 0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak mengkudu berbagai dosis, yaitu 2,5 mg ml⁻¹, 5 mg ml⁻¹, dan 10 mg ml⁻¹ menyebabkan penurunan aktivasi NF- κ B pada kultur sel endotel dipapar Ox-LDL. Berdasarkan analisis di atas menunjukkan bahwa semakin besar dosis ekstrak mengkudu yang diberikan pada kultur sel endotel dipapar Ox-LDL, maka akan semakin menurunkan aktivasi faktor transkripsi NF- κ B pula. Hasil pengecatan secara imunohistokimia untuk aktivasi NF- κ B kemudian dilakukan penghitungan sel dan dianalisis dengan analisis statistik Duncan ($p < 0,01$) yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pemberian Ekstrak Mengkudu pada kultur Sel Endotel dipapar Ox-LDL 40 μ g ml⁻¹ terhadap Aktivasi NF- κ B

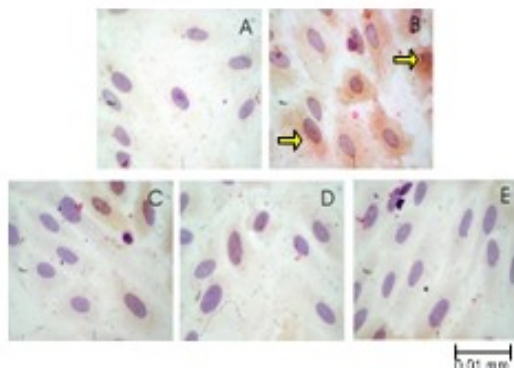
No	Perlakuan	Jumlah Sel	Aktivasi NF- κ B ([X \pm SD]%)
1	Kontrol Negatif	251	2,21 \pm 7,41 ^a
2	Kontrol Positif	175	48,41 \pm 17,84 ^b
3	M ₁ (2,5 ng ml ⁻¹)	223	0,9 \pm 2,74 ^a
4	M ₂ (5 ng ml ⁻¹)	230	0,25 \pm 1,12 ^a
5	M ₃ (10 ng ml ⁻¹)	193	0,00 \pm 0,00 ^a

Keterangan:

Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata berdasarkan analisis statistik Duncan ($p < 0,01$)

Imunohistokimia Ekspresi Protein TNF- α Pada Kultur Sel Endotel (HUVECs)

Kultur sel endotel yang menunjukkan adanya ekspresi protein TNF- α , diperlihatkan pada perlakuan kontrol positif (Gambar 6), dengan penampakan inti sel dan sitoplasma berwarna kecoklatan atau merah kecoklatan. Ekspresi protein sitokin TNF- α yang timbul pada kontrol positif kultur sel akibat dari teraktivasinya faktor transkripsi NF- κ B, hasil induksi atau pemaparan Ox-LDL. Gambar hasil pengecatan imunohistokimia menunjukkan bahwa dengan bertambahnya dosis ekstrak mengkudu yang diberikan pada kultur sel endotel (HUVECs) maka ekspresi protein sitokin TNF- α semakin berkurang. Hal ini ditandai dengan semakin berkurangnya warna inti sel yang tampak coklat kemerahan dan semakin banyak inti sel tampak biru keunguan.



Gambar 6. Kultur HUVECs hasil imunohistokimia untuk melihat ekspresi $TNF-\alpha$.

Keterangan:

(A) Kontrol Negatif (tanpa perlakuan) (B) Kontrol Positif (dipapar Ox-LDL $40 \mu\text{g ml}^{-1}$) (C), (D) dan (E) adalah HUVECs diberi ekstrak mengkudu dengan dosis berturut-turut $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$, 5 mg ml^{-1} , dan 10 mg ml^{-1} yang dipapar Ox-LDL $40 \mu\text{g ml}^{-1}$. Preparat diamati dengan mikroskop Olympus cx21 perbesaran 1000 kali.

Berdasarkan penghitungan jumlah kultur sel endotel yang mengekspresikan protein $TNF-\alpha$ paling tinggi terdapat pada perlakuan kontrol positif, di mana kultur sel endotel hanya dipapar Ox-LDL (Tabel 2.). Pemaparan kultur sel endotel menggunakan Ox-LDL meningkatkan produksi $TNF-\alpha$ dalam sel. Sementara perlakuan dengan pemberian ekstrak mengkudu berbagai dosis menunjukkan penurunan ekspresi protein sitokin $TNF-\alpha$, terutama pada dosis mengkudu 10 mg ml^{-1} yang merupakan dosis paling tinggi.

Tabel 2. Ekspresi protein sitokin $TNF-\alpha$ pada Kultur Sel Endotel yang Dipapar Ox-LDL $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ dan Pemberian Ekstrak Mengkudu

No	Perlakuan	Jumlah Sel	Aktivasi $TNF-\alpha$ ($[X \pm SD]\%$)
1	Kontrol Negatif	147	$0,00 \pm 0,00^a$
2	Kontrol Positif	267	$40,28 \pm 16,82^b$
3	M_1 ($2,5 \text{ ng ml}^{-1}$)	223	$1,97 \pm 4,16^a$
4	M_2 (5 ng ml^{-1})	230	$0,74 \pm 2,28^a$
5	M_3 (10 ng ml^{-1})	193	$0,00 \pm 0,00^a$

Keterangan:

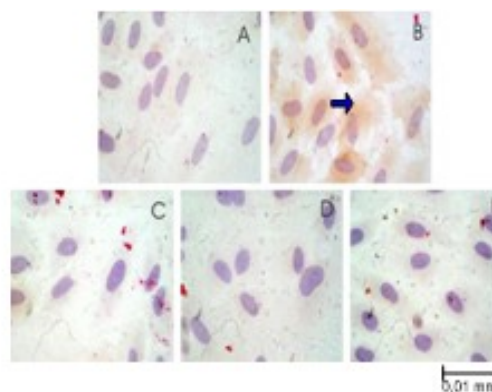
Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata berdasarkan analisis statistik Duncan ($p < 0,01$)

Analisis statistik Oneway ANOVA dan uji Duncan (Tabel 2) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh bermakna pada kultur sel endotel yang dipapar dengan ekstrak mengkudu terhadap banyaknya ekspresi protein sitokin $TNF-\alpha$ dalam sel endotel

($p < 0,01$). Dengan pemberian ekstrak mengkudu berbagai dosis, yaitu $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$, 5 mg ml^{-1} , dan 10 mg ml^{-1} , terjadi penurunan ekspresi protein sitokin $TNF-\alpha$ pada kultur sel endotel dipapar Ox-LDL.

Imunohistokimia Ekspresi Protein ICAM-1 Pada Kultur Sel Endotel (HUVECs)

Hasil Immunohistokimia pada kultur sel endotel tampak terdapat beberapa sel yang menunjukkan adanya ekspresi protein ICAM-1, diperlihatkan pada kontrol positif (Gambar 7) dengan penampakan inti sel berwarna kecoklatan dan membran sel juga berwarna kecoklatan. Pada gambar ditandai dengan panah berwarna biru. Ekspresi protein ICAM-1 yang timbul pada kultur sel kontrol positif akibat dari teraktivasinya faktor transkripsi $NF-\kappa\beta$, hasil induksi atau pemaparan Ox-LDL.



Gambar 7. Kultur HUVECs hasil imunohistokimia untuk melihat ekspresi protein ICAM-1. (A) Kontrol Negatif atau tanpa perlakuan, (B) Kontrol Positif/dipapar LDL teroksidasi $40 \mu\text{g ml}^{-1}$, (C),(D) dan (E) adalah HUVECs diberi ekstrak mengkudu dengan dosis berturut-turut $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$, 5 mg ml^{-1} , dan 10 mg ml^{-1} yang dipapar LDL teroksidasi $40 \mu\text{g ml}^{-1}$. Preparat diamati dengan mikroskop Olympus cx21 perbesaran 1000 kali.

Gambar hasil pengecatan imunohistokimia di atas menunjukkan bahwa dengan bertambahnya dosis ekstrak mengkudu (Gambar 10 C, D dan E) yang diberikan pada kultur sel endotel (HUVECs) maka ekspresi protein ICAM-1 semakin berkurang. Hal ini ditandai dengan intensitas warna inti sel semakin berkurang dan membran sel yang tampak kecoklatan dan semakin banyak inti sel tampak biru keunguan.

Hasil pengecatan secara imunohistokimia untuk aktivasi ICAM-1 kemudian dilakukan penghitungan sel yang ditunjukkan pada Tabel 3. Berdasarkan penghitungan jumlah kultur sel endotel yang mengekspresikan protein ICAM-1 paling tinggi terdapat pada perlakuan kontrol positif, di mana kultur sel endotel hanya dipapar

Ox-LDL. Perlakuan kultur sel endotel dengan pemberian berbagai dosis ekstrak mengkudu menunjukkan penurunan ekspresi protein ICAM-1, terutama pada dosis mengkudu 10 mg ml⁻¹ yang merupakan dosis paling tinggi.

Tabel 3. Pemberian Ekstrak Mengkudu pada kultur Sel Endotel dipapar Ox-LDL 40 μ g ml⁻¹ Terhadap ekspresi ICAM-1

No	Perlakuan	Jumlah Sel	Aktivasi ICAM-1 (X \pm SD) ^a
1	Kontrol Negatif	147	0,00 \pm 0,00 ^a
2	Kontrol Positif	267	96,17 \pm 12,39 ^b
3	M ₁ (2,5 ng ml ⁻¹)	223	3,71 \pm 6,22 ^a
4	M ₂ (5 ng ml ⁻¹)	230	2,15 \pm 3,96 ^a
5	M ₃ (10 ng ml ⁻¹)	193	1,42 \pm 5,09 ^a

Keterangan:

Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata berdasarkan analisis statistik Duncan (p<0,01)

Analisis statistik Oneway ANOVA dan uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat pengaruh bermakna pada kultur sel endotel yang dipapar dengan ekstrak mengkudu terhadap banyaknya ekspresi protein ICAM-1 dalam sel endotel (p<0.01). Dengan pemberian ekstrak mengkudu berbagai dosis, yaitu 2,5 mg ml⁻¹, 5 mg ml⁻¹, dan 10 mg ml⁻¹.

Pengaruh Ox-LDL terhadap aktivasi faktor transkripsi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1

Berdasarkan pada hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa Ox-LDL 40 μ g ml⁻¹ berpengaruh secara nyata pada aktivasi faktor transkripsi NF- κ B (Tabel. 1), ekspresi protein TNF- α (Tabel 2), dan terhadap ekspresi ICAM-1 (Tabel 3) kultur sel endotel. Banyak penelitian yang telah membuktikan bahwa Ox-LDL berperan penting dalam memicu perkembangan patogenesis aterosklerosis. Modifikasi LDL dapat meningkatkan ekspresi beberapa protein inflamasi (sitokin), molekul adesi, *chemokine*, dan mediator inflamasi lainnya pada sel endotel. Hal ini dijadikan sebagai pertanda bahwa ekspresi protein serta molekul adesi muncul melalui aktivasi NF- κ B yang selanjutnya dapat memicu timbulnya aterosklerosis.

Stress oksidatif yang berasal dari Ox-LDL dapat mengaktifasi NF- κ B dan meningkatkan produksi radikal superoksida (salah satu ROS) dalam sel endotel. Proses Ox-LDL yang akhirnya

dapat mengaktifasi NF- κ B juga dipengaruhi oleh reseptor untuk Ox-LDL yaitu LOX-1 (*leptin-like Ox-LDL receptor-1*) sehingga kemudian terbentuk ROS [6, 7, 8].

Brand *et al.*, dan Collins menjelaskan bahwa NF- κ B yang teraktivasi dalam sel endotel berperan penting dalam patogenesis aterosklerosis. NF- κ B sebagai faktor trans-kripsi, ketika dalam keadaan non aktif, NF- κ B berada di sitoplasma dan berikatan dengan I κ B (inhibitor kappa beta). NF- κ B terdiri dari dua protein heterodimer yaitu p50 dan p65 [9, 10]. Jika mengalami stimulasi dari luar, seperti timbulnya ROS akibat Ox-LDL, I κ B yang semula berikatan dengan p50-p65 terfosforilasi dan mengalami ubiquitinasi yang akan terjadi degradasi proteasom 26S. Hal ini menyebabkan terbebasnya dimer NF- κ B (p50-p65) dari kompleks sitoplasmik NF- κ B-I κ B menuju nukleus. NF- κ B kemudian terikat pada gen target dan menginduksi transkripsi dan gen proinflamasi. Aktivasi NF- κ B meningkatkan ekspresi dari molekul adesi E-selectin, VCAM-1 dan ICAM-1, dan sintesis sitokin seperti TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 dan juga COX-2 [11, 12].

Pengaruh Pemberian Ekstrak Mengkudu Pada Kultur Sel Endotel dipapar Ox-LDL Dalam Menghambat Aktivasi NF- κ B

Beberapa data hasil pengecatan secara imunohistokimia (Gambar 4) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak mengkudu berbagai dosis pada kultur sel endotel yang dipapar Ox-LDL mampu menurunkan aktivasi NF- κ B secara signifikan dibandingkan dengan kultur sel endotel kontrol positif (p<0,01). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif antioksidan dan polifenol yang terkandung dalam mengkudu dapat menghambat oksidasi LDL sehingga tidak terjadi aktivasi NF- κ B. Beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap buah mengkudu menunjukkan bahwa di dalam mengkudu terkandung banyak antioksidan (vitamin C dan E) serta senyawa polifenol yaitu 3,3'-bisdemethylpinoresinol, americanoic acid A, americanol A, americanin A, morindolin, dan isoprincepin [13]. Oleh karena itu, diperkirakan bahwa antioksidan dan senyawa polifenol dalam mengkudu yang berperan dalam menghambat modifikasi oksidatif LDL yang berperan penting pada patogenesis atero-sklerosis.

Mekanisme penghambatan yang dilakukan oleh mengkudu terhadap aktivasi NF- κ B adalah dengan mencegah terlepasnya ikatan I κ B dengan p50-p65 dan translokasi p50-p65 dari sitoplasma ke dalam nukleus [11, 12]. Sedangkan

uji antar perlakuan dosis ekstrak mengkudu menunjukkan tidak terdapat beda secara bermakna. Hal ini mungkin disebabkan dosis perlakuan tidak berbeda signifikan.

Hasil perhitungan menggunakan korelasi Spearman's menunjukkan korelasi negatif secara bermakna antara aktivasi NF- κ B dan pemberian ekstrak mengkudu. Sehingga dapat dikatakan bahwa semakin besar dosis ekstrak mengkudu maka aktivasi NF- κ B semakin menurun.

Pengaruh Pemberian Ekstrak Mengkudu Pada Kultur Sel Endotel dipapar Ox-LDL Dalam Menghambat Ekspresi Protein TNF- α

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak mengkudu pada kultur sel endotel yang dipapar Ox-LDL dapat menghambat ekspresi protein TNF- α secara signifikan ($p < 0,01$) dibandingkan dengan kultur sel endotel perlakuan kontrol positif (dipapar Ox-LDL tanpa mengkudu). Penurunan ekspresi protein TNF- α pada kultur endotel yang dipapar Ox-LDL dan ditambah dengan mengkudu sangat signifikan bila dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif ($p < 0,01$). Hal ini dapat ditunjukkan pada hasil immuno-histokimia (Gambar 6) dan penghitungan kultur sel endotel yang mengekspresikan protein TNF- α (Tabel 2).

Ekspresi protein TNF- α pada kultur sel endotel yang dipapar Ox-LDL dihambat dengan adanya ekstrak mengkudu mengandung senyawa bioaktif antioksidan dan polifenol. Adanya antioksidan dan polifenol dalam ekstrak mengkudu yang menyebabkan proses ekspresi protein TNF- α melalui jalur faktor transkripsi NF- κ B dapat dihambat melalui penghambatan ROS yang dipicu oleh Ox-LDL. Mian-Ying menjelaskan bahwa Ekstrak etanol dari mengkudu pada berbagai konsentrasi juga dapat menghambat produksi *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α) yang merupakan promotor tumor endogen [14].

Pengaruh Pemberian Ekstrak Mengkudu Pada Kultur Sel Endotel dipapar Ox-LDL Dalam Menghambat Ekspresi Protein ICAM-1

Berdasarkan analisis statistik ANOVA, pemberian ekstrak mengkudu berbagai dosis menurunkan ekspresi protein ICAM-1 secara bermakna dibandingkan dengan kontrol positif ($p < 0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif antioksidan dan polifenol yang terkandung dalam mengkudu dapat menghambat oksidasi LDL sehingga tidak terjadi ekspresi protein ICAM-1. Sedangkan uji Duncan antar perlakuan dosis ekstrak mengkudu menunjukkan tidak terdapat beda secara bermakna.

Penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yaitu kultur sel endotel yang dipapar dengan Ox-LDL dapat meningkatkan ekspresi molekul adesi sel, seperti ICAM-1 (*intracellular cell adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), dan E-selektin. Molekul adesi ini berinteraksi dengan ligan spesifik yang terekspresi pada permukaan leukosit, seperti integrin β_1 dan β_2 , dan memediasi perputaran leukosit, tetap melekat pada endotel dan bermigrasi ke dalam ruang subendotel [9, 10, 15].

Penghambatan ekspresi molekul adesi ICAM-1 dengan pemberian ekstrak mengkudu mengandung senyawa bioaktif antioksidan dan polifenol sejalan dengan Cominacini yang membuktikan bahwa antioksidan menghambat ekspresi ICAM-1 dan VCAM-1 pada kultur sel endotel dipapar Ox-LDL. Antioksidan juga menurunkan ekspresi stimulus yang diinduksi ekspresi dari integrin β_1 dan β_2 pada leukosit dan adesi sel ini pada kultur sel endotel. Ekspresi adesi molekul ICAM-1 juga diregulasi oleh NF- κ B pada kultur sel. Adanya antioksidan dan senyawa polifenol dalam ekstrak mengkudu merupakan inhibitor poten yang dapat menghambat aktivasi NF- κ B sehingga ekspresi molekul adesi ICAM-1 menurun [9].

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pemberian dosis ekstrak mengkudu 2,5 mg ml⁻¹, 5 mg ml⁻¹, dan 10 mg ml⁻¹ pada kultur sel endotel yang dipapar oleh Ox-LDL dapat menghambat aktivasi faktor transkripsi NF- κ B, ekspresi protein sitokin TNF- α , dan ekspresi protein ICAM-1 pada kultur sel endotel manusia (HUVECs) dipapar Ox-LDL 40 μ g ml⁻¹ sebagai agen inflamasi yang dapat menimbulkan terjadinya aterosklerosis secara signifikan ($p < 0,01$). Senyawa bioaktif antioksidan dan polifenol yang terkandung dalam mengkudu diduga dapat menghambat oksidasi LDL sehingga tidak terjadi ekspresi aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α , dan protein ICAM-1.

Saran

Metode pengukuran secara imunohistokimia masih bersifat semi kuantitatif dalam menganalisis aktivasi NF- κ B, ekspresi protein inflamasi TNF- α serta ICAM-1, sehingga perlu analisis lebih akurat menggunakan EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) untuk mengetahui pengikatan protein-DNA atau RT PCR/RNA untuk mendeteksi gen target. Perlu penelitian lebih lanjut menggunakan ekstrak murni zat bioaktif antioksidan dan polifenol dari mengkudu untuk

membuktikan zat bioaktif tersebut dapat menghambat kerja Ox-LDL dalam menimbulkan ROS, menghambat aktivasi NF- κ B, ekspresi protein inflamasi TNF- α serta ICAM-1 yang menyebabkan penyakit aterosklerosis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ross, R. 1999. Atherosclerosis– An Inflammatory Disease. *The New England Journal Of Medicine*. No. 2 Vol. 340:115-126.
2. Middleton, E., K. Chithan, C.T. Theoharis. 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Tufts University School of Medicine. Boston. Massachusetts (T.C.T.) Vol. 52 Issue 4:673-751.
3. Wijayakusuma, H. 2001. Penyembuhan Dengan Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Penerbit Milenia Populer. Jakarta.
4. Kamiya, K., Y. Tanaka, H. Endang, M. Umar, T. Satake. 2004. Chemical Constituent of *Morinda* Fruits Inhibit Cooper-induced Low Density Lipoprotein Oxidation. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 22.52.19:5843-5848.
5. Arjita, I P. D., M.A. Widodo, E. Widjajanto. 2002. Pengaruh Kadar Glukosa Tinggi Terhadap Sintesa *Nitric Oxide* dari Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Culture Dengan Teknik Bioassay. BIOSAIN. Vol.2. No.1.
6. Cominacini, L., F.P. Anna, G. Ullise, 2000. Oxidized Low Density Lipoprotein (Ox-LDL) Binding to Ox-LDL Receptor-1 in Endothelial Cells Induces The Activation Of NF- κ B through an Increased Production of Intracellular ROS. *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. 275 No. 17:12633-12638.
7. Foncea, R., C. Carvajal, C. Almarza, F. Leighton. 1999. Endothelial Cell Oxidative Stress and Signal Transduction. Laboratorio de Citologia Bioquimica y Lipidos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile, Santiago.
8. Tardif, J. C. 2003. Oxidative Stress and Coronary Heart Disease. *Cardiology Rounds*. Vol 7. issue 9.
9. Brand, K., P. Sharon, R. Gerhard, B. Armin. 1996. Activated Transcription Factor Nuclear-Kappa B is Present in The Atherosclerotic Lesion. *J. Clin. Invest*. Vol. 97. 7:1715-1722.
10. Collins, T., I.C. Myron. 2001. NF- κ B: Pivotal Mediator or Innocent bystander in Atherogenesis? *J Clin Invest*. Vol. 107. No. 3:255-264.
11. Tak, P. P., S. F. Gary. 2001. NF- κ B: a Key Role in Inflammatory Diseases. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 107 No.1.
12. Ho, E. 2002. NF- κ B–What Is It and What’s The Deal With Radicals? Linus Pauling Institute Scientist. Department Of Nutrition And Food Management. Oregon State University.
13. Aviram, M. 2003. Polyphenolic Flavonoids Content and Antioxidant Activities Of PJ and various Fruit Juices [Pomegranate Juice(PJ), PJ/Blueberry, MOBETA, Orange-Carrot-Banana, Orange-Carrot, Mango, Apple-kiwi, and Tahitian NONI]: a comparative Study. The Lipid Research Laboratory. Technion Faculty. The Rappaport Family Institute for research in the medical science and Rambam medical Center. Haifa. Israel.
14. Miang-Ying, W., J.W. Brett, C.J. Jensen. 2002. *Morinda citrifolia* (Noni): A Literature Review and Recent Advances In Noni Research. *Acta Pharmacol Sinica Shanghai Institute of Materia Medica Chinese Academy Of Science*. Dec. 23. 12:1127-1141.
15. Carr, A., B. Zhu, B. Frei. 2000. Potential Antiatherogenic Mechanisms of Ascorbate (Vitamin C) and α -Tocopherol (Vitamin E). *Circulation Research*. 87:349-354.

PETUNJUK BAGI PENULIS

1. Jenis Naskah

Naskah yang diterima adalah artikel yang belum pernah dipublikasikan sebelumnya. Naskah dapat berupa jurnal laporan hasil penelitian atau artikel review. Naskah ditulis mempergunakan Bahasa Indonesia atau Bahasa Inggris. Tata cara penulisan dapat dilihat di web JELS dengan alamat <http://www.jels.org>.

2. Kode Etik Penelitian

Penelitian yang mempergunakan probandus hewan, manusia, dan uji coba klinik harus telah memperoleh sertifikat laik etik dari lembaga yang berwenang

3. Format

Naskah diketik dengan program *Microsoft Word* (doc.) pada kertas A4 (21 cm x 29,5 cm) dengan jarak antar baris satu spasi. Batas pengetikan dari tepi kertas diatur sebagai berikut:

- tepi atas : 3 cm
- tepi bawah : 3 cm
- tepi kiri : 4 cm
- tepi kanan : 3 cm

Naskah diketik dengan jenis huruf Calibri dengan spesifikasi ukuran huruf sebagai berikut:

- Judul naskah : ukuran huruf 14 point
- Nama, keterangan penulis, abstrak dan kata kunci : ukuran huruf 10 point
- Isi naskah : ukuran huruf 10 point
- Keterangan gambar dan tabel : ukuran huruf 10 point
- Daftar pustaka : ukuran huruf 10 point

Format penulisan JELS mempergunakan dua kolom (67 karakter), kecuali bagian judul dan abstrak ditulis dalam format satu kolom. Naskah setiap halaman diberi nomor secara berurutan, maksimum 10 halaman termasuk tabel dan gambar. Naskah dikirim melalui e-mail atau file dalam CD ke:

Redaksi The Journal of experimental Life Science (JELS)

**Gedung A, Lt. E, Program Pascasarjana
Universitas Brawijaya
Jl. MT. Haryono 169, Malang, 65145
e-mail: jels@ub.ac.id**

4. Susunan naskah

Naskah disusun secara berurutan terdiri atas:

- Judul makalah
- Nama lengkap penulis (tidak disingkat, tanpa gelar)
- Afiliasi penulis (instansi tempat penulis bekerja dan alamat korespondensi)
- Abstrak dan Kata kunci (Bahasa Indonesia dan Bahasa Inggris)
- Pendahuluan
- Metode Penelitian
- Hasil dan Pembahasan
- Kesimpulan
- Ucapan terimakasih (bila ada)
- Daftar Pustaka
- Tabel
- Gambar dan legenda gambar
- Lampiran

5. Deskripsi Bagian Naskah

JUDUL

Judul dicetak tebal (*bold*) dengan huruf kapital pada setiap awal kata, kecuali kata sambung. Judul maksimum terdiri dari 12 kata (tanpa kata sambung). Naskah dalam Bahasa Indonesia harus disertai judul dalam Bahasa Inggris yang ditulis miring (*Italic*). Judul Bahasa Inggris ditulis setelah judul Bahasa Indonesia sebelum nama penulis. Nama penulis ditulis lengkap, tanpa gelar, alamat lembaga afiliasi penulis. Beri tanda * untuk alamat korespondensi. Alamat untuk korespondensi dilengkapi dengan kode pos, *faksimile* atau nomor telepon, dan e-mail, ditulis pada bagian bawah halaman pertama (*footnote*).

Contoh penulisan judul dan Nama penulis:

Pengaruh Terapi Lidah Buaya terhadap Kadar

IL-1 β Mencit (*Mus musculus* BALB-C) Betina

Ghaisan Ramadhan^{1*}, Irfan Hakim², Setyawati³

¹Program Pascasarjana, Universitas Brawijaya

^{2,3}Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya

ABSTRAK DAN KATA KUNCI

Abstrak memuat tujuan penelitian, metode penelitian dan hasil penelitian yang disusun

dalam satu paragraf dengan format *esei* bukan *enumeratif*. Tidak ada kutipan pustaka di dalam abstrak. Abstrak ditulis dalam Bahasa Indonesia dan Bahasa Inggris, satu paragraf, maksimum 200 kata. Kata kunci ditulis setelah abstrak.

TEKS

Awal paragraf dimulai 5 indent dari sisi kiri naskah. Penulisan sub judul (**PENDAHULUAN, METODE PENELITIAN, HASIL DAN PEMBAHASAN, KESIMPULAN, UCAPAN TERIMA KASIH dan DAFTAR PUSTAKA**) ditulis di bagian kiri naskah dengan huruf kapital dan tidak menggunakan nomor. Sub-sub judul ditulis di kiri halaman dengan cetak miring (*italic*) dan huruf kapital di setiap awal kata.

Penggunaan kalimat dan bahasa yang dipergunakan dalam jurnal harus menggunakan bahasa Indonesia yang baik dan benar sesuai dengan kaidah yang berlaku dalam tata bahasa (EYD). Nama organisme harus diikuti dengan nama ilmiahnya secara lengkap pada pengungkapan pertama. Nama ilmiah ditulis miring, sedangkan nama penulis dari nama ilmiah dan kata seperti "var." ditulis tegak. **Contoh:** *Stellaria saxatillis* Buch. Ham.

Singkatan pertama kali ditulis dalam kurung setelah kata-kata yang disingkatnya. Penulisan satuan menggunakan Standar Internasional (SI). Eksponen negatif digunakan untuk menyatakan satuan penyebut. Contoh: $g\ l^{-1}$, bukan g/l. Satuan ditulis menggunakan spasi setelah angka, kecuali untuk menyatakan persen. Contoh: $25\ g\ l^{-1}$, bukan $25g\ l^{-1}$; 35% bukan 35 %. Penulisan desimal menggunakan koma (bukan titik). Seluruh tabel dan gambar harus dirujuk dalam teks.

DAFTAR PUSTAKA

Ketentuan pustaka yang dipergunakan adalah:

- Sumber pustaka primer terdiri atas jurnal, paten, disertasi, tesis, makalah dalam prosiding dan buku teks.
- Membatasi pustaka yang mengacu pada diri sendiri (*self citation*)
- Sebaiknya dihindari penggunaan pustaka di dalam pustaka, buku populer, dan pustaka dari internet kecuali jurnal dan dari instansi pemerintah atau swasta
- Abstrak tidak diperbolehkan sebagai rujukan

- Referensi yang bisa dipergunakan hanya referensi yang telah dipublikasikan (buku, jurnal penelitian atau prosiding penelitian). Referensi yang tidak dipublikasikan atau data tidak ditampilkan tidak bisa dipergunakan sebagai referensi dalam penulisan jurnal
- Daftar Pustaka ditulis berupa daftar (format nomor 1,2,3,...), disusun berdasar urutan pemuatan referensi pada naskah (sistem *Vancouver* atau *author-number style*)
- Keterangan daftar pustaka pada naskah hanya ditulis nomor referensi (bukan nama pengarang dan tahun), contoh:
Obesitas merupakan penimbunan lemak dalam jumlah besar yang akan menimbulkan berat tubuh yang berlebihan (*overweight*) [1]. Obesitas merupakan faktor resiko terjadinya diabetes, hipertensi dan aterosklerosis [2].

Beberapa contoh penulisan daftar pustaka adalah:

Referensi berupa jurnal

- Shi, Z., M. Rifa'i, Y. Lee, K. Isobe, H. Suzuki. 2007. Importance of CD80/CD86-CD28 interaction in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Journal Immunology*. 124. 1:121-128.

Referensi berupa buku

- Vander, A., J. Sherman., D. Luciano. 2001. Human Physiology: The Mecanisms of Body Function. McGraw-Hill Higher Education. New York.

Referensi berupa bab dalam buku

- Dean, R.G. 1990. Freak waves: A possible explanation. p. 1-65. *In* Torum, A., O.T. Gudmestad (eds). Water wave kinetics. CRC Press. New York.

Referensi berupa artikel di prosiding

- Syafi'i, M., Hakim, L., dan Yanuwiyadi, B. 2010. Analisis Potensi *Indigenous Knowledge* (IK) Desa Ngadas Sebagai Atraksi Wisata. hal.217-234. Dalam Widodo, Y. Noviantari (eds) Prosiding *Basic Science National Seminar 7* Vol.4. Universitas Brawijaya, Malang.

Referensi berupa disertasi atau tesis

- Astuti, A.M. 2008. Pengaruh Fraksi Air Tanaman Tepung Otot (*Stellaria* sp.)

terhadap Kadar TNF- α Mencit (*Mus musculus* BALB-C). Tesis. Jurusan Biologi. Universitas Brawijaya. Malang

TABEL

Tabel selain ditulis di dalam naskah, hendaknya juga ditulis dalam format tabel dari *Microsoft Excel* (xls.) dan dimasukkan dalam file terpisah dari teks. Tabel berukuran maksimal 8 cm (satu kolom) dan 17 cm (dua kolom). Tabel dilampirkan pada lembar terpisah setelah daftar pustaka

Penomoran tabel adalah berurutan. Judul tabel ditulis singkat namun jelas pada bagian atas tabel. Judul dan kepala tabel menggunakan huruf kapital pada awal kalimat. Garis vertikal tidak boleh digunakan. Catatan kaki menggunakan angka dengan kurung tutup dan diketik *superscript*. Tanda (*) atau (**) digunakan untuk menunjukkan tingkat nyata berturut-turut pada taraf 95 dan 99%.

Gambar

Gambar, gambar yang ditampilkan dalam naskah harus jelas, memiliki resolusi tinggi dan kontras yang baik dalam format JPEG atau PDF dengan ketentuan sebagai berikut:

- a. *Monochrome image (line art)*, yaitu gambar berupa diagram dengan warna hitam putih (solid/tanpa ada warna abu-abu), harus memiliki resolusi 1000-1200 dpi (*dot per inch*).
- b. *Combination Halftone*, contohnya adalah gabungan antara gambar dan teks (gambar yang mengandung teks) dan grafik yang berwarna atau dalam format *grayscale*. Gambar jenis ini harus memiliki resolusi 600-900 dpi.
- c. *Halftone*, yang termasuk kelompok ini adalah gambar berwarna atau dalam format *grayscale* tanpa teks. Gambar jenis ini harus memiliki resolusi 300 dpi.
- d. Gambar hitam putih harus dibuat dalam mode *grayscale*, sedangkan gambar berwarna dalam mode RGB.
- e. Gambar dibuat berukuran lebar maksimal 8 cm (satu kolom), 12.5 cm (satu setengah kolom) atau 17 cm (dua kolom).
- f. Judul gambar ditulis dengan jelas pada bagian bawah gambar.

- g. Gambar dengan garis penunjuk (jika ada) hendaknya disatukan (*grouping*).
- h. Gambar dianjurkan hitam putih, apabila ingin mencantumkan gambar berwarna, biaya cetak dibebankan kepada penulis.
- i. Legenda atau keterangan gambar harus jelas dan lengkap. Jika gambar diperkecil maka semua tulisan harus tetap dapat terbaca.
- j. Grafik statistik disertai dengan file data sumbernya untuk memudahkan proses edit.
- k. Gambar yang akan dipublikasikan pada jurnal harus diberi keterangan jelas dan apabila gambar diperoleh dari pihak ketiga harus mendapat ijin dari pemilik gambar (*copyright holder*) baik gambar yang diperoleh secara *online* atau secara langsung

6. Prosedur Publikasi

Penulis wajib mengisi form pernyataan bahwa naskah belum pernah atau tidak sedang diajukan untuk dipublikasikan di jurnal lain. Seluruh naskah yang diterima akan dikirimkan ke Dewan Editor untuk dinilai. Dewan Editor berhak meminta penulis untuk melakukan perbaikan sebelum naskah dikirim ke penelaah. Editor juga berhak menolak naskah jika naskah tidak sesuai dengan format yang telah ditentukan. Naskah selanjutnya ditelaah oleh penelaah (reviewer) yang ahli pada bidang yang bersangkutan. Dewan editor akan menentukan naskah yang dapat diterbitkan berdasarkan hasil penelaahan.

7. Administrasi

Setiap penulis yang naskahnya siap diterbitkan dikenakan biaya minimal Rp.150.000,- untuk setiap naskah yang dimuat. Biaya dikirim ke redaksi pelaksana a.n. Afidatul Muji Astuti.

Gambar sampul:
Struktur Tiga Dimensi Senyawa EGCG (*Epigallocatechin-3-Gallate*)
Komponen Teh Hijau
Dibuat oleh:
Widodo, S.Si.,M.Si.,Ph.D MED Sc.

Alamat Redaksi

Redaksi JELS

Gedung E, Lt.2, Program Pascasarjana Universitas Brawijaya

Jl. Mayor Jenderal Haryono 169, Malang, 65145

Telp: (0341) 571260 ; Fax: (0341) 580801

Email: jels@ub.ac.id

Web: <http://www.jels.org>

