

**STUDI AKTIVITAS PUERARIN SEBAGAI PENGHAMBAT EKSPRESI
VCAM-1 PADA KULTUR *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
(HUVECs) YANG DIINDUKSI LEPTIN**

SKRIPSI

Oleh:
ERLY NOER AISYAH
0310910019-91



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

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Kupersembahkan tulisan sederhana ini
untuk Bapak-Ibuku Tercinta

**STUDI AKTIVITAS PUERARIN SEBAGAI PENGHAMBAT
EKSPRESI VCAM-1 PADA KULTUR *Human Umbilical Vein
Endothelial Cells* (HUVECs) YANG DIINDUKSI LEPTIN**

SKRIPSI

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

Oleh:

ERLY NOER AISYAH

0310910019-91



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

STUDI AKTIVITAS PUERARIN SEBAGAI PENGHAMBAT EKSPRESI VCAM-1 PADA KULTUR *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) YANG DIINDUKSI LEPTIN

Oleh:

ERLY NOER AISYAH

0310910019-91

Akan dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 28 Juli 2008 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

DR.Ir.Moch. Sasmito Djati, MS
NIP. 132 090 387

Dr.dr. Retty Ratnawati, MSc
NIP. 131 475 830

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama

: Erly Noer Aisyah

Nim

: 0310910019-91

Penulis Tugas Akhir Berjudul : Studi Aktivitas Puerarin Sebagai Penghambat Ekspresi VCAM-1 Pada Kultur *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) Yang Diinduksi Leptin

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 28 Juli 2008
Yang Menyatakan,

Erly Noer Aisyah
NIM. 0310910019

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

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



**STUDI AKTIVITAS PUERARIN SEBAGAI PENGHAMBAT
EKSPRESI VCAM-1 PADA KULTUR *Human Umbilical Vein
Endothelial Cells* (HUVECs) YANG DIINDUKSI LEPTIN**

Erly Noer Aisyah¹, M. Sasmito Djati¹, Retty Ratnawati²

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

²Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian puerarin terhadap penurunan ekspresi VCAM-1 pada kultur sel endotel (HUVECs) yang diinduksi leptin. Kultur sel endotel dikelompokkan menjadi dua, yaitu (1) perlakuan puerarin (0, 5, 25, 200 dan 525 μM) selama 6 jam dan (2) leptin (25 ng/mL) selama 6 jam yang diikuti dengan pemberian puerarin (0, 5, 25, 200 dan 525 μM) selama 6 jam berikutnya. Selanjutnya dilakukan pewarnaan imunositokimia menggunakan *mouse monoclonal VCAM-1* sebagai antibodi primer dan anti *mouse VCAM-1* sebagai antibodi sekunder. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *one way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa leptin 25 ng/mL mampu meningkatkan ekspresi VCAM-1 ($2,68 \pm 0,15$) % dibandingkan dengan leptin 0 ng/mL ($0,54 \pm 0,15$) %. Namun pemberian puerarin (5, 25, 200 dan 525 μM) tidak signifikan dalam menurunkan ekspresi VCAM-1.

Kata kunci: HUVECs, leptin, puerarin, VCAM-1.

**THE STUDY OF PUERARIN ACTIVITY AS AN INHIBITOR
OF VCAM-1 EXPRESSION IN *Human Umbilical Vein*
*Endothelial Cells (HUVECs) CULTURE THAT WAS INDUCED
BY LEPTIN***

Erly Noer Aisyah¹, M. Sasmito Djati¹, Retty Ratnawati²

¹Biology Department, Faculty of Mathematics and Science

²Faculty of Medical

Brawijaya University, Malang

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the influence of puerarin to decrease the VCAM-1 expression in HUVECs culture that was exposed by leptin. The endothelial cell cultures were divided into two groups that were (1) induced by puerarin (0, 5, 25, 200, 525 μ M) for 6 hours and (2) induced by leptin (25 ng/mL) for 6 hours, then incubated with puerarin (0, 5, 25, 200, 525 μ M) for another 6 hours. The imunocytochemistry was employed by mouse monoclonal antigen antibody VCAM-1 as primer antibody and anti mouse VCAM-1 as secondary antibody. Data were analyzed by using one way Anova and followed by Tukey test. The result showed that leptin 25 ng/mL could increase the VCAM-1 expression ($2,68 \pm 0,15$) % compared to leptin 0 ng/mL ($0,54 \pm 0,15$) %. However the treatment of several doses of puerarin (5, 25, 200, 525 μ M) were did not affect the VCAM-1 expression significantly.

Key words: HUVECs, leptin, puerarin, VCAM-1.

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum wr.wb

Puji syukur kepada Allah SWT Sang Pemilik Kehidupan atas segala kemurahan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat serta salam senantiasa tercurah pada Rosulullah Muhammad SAW, keluarga, sahabat dan orang yang senantiasa istiqomah di jalan Islam. Skripsi ini berjudul "**Studi Aktivitas Puerarin Sebagai Penghambat Ekspresi VCAM-1 Pada Kultur Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUEVCs) Yang Diinduksi Leptin**". Proses penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan semua pihak. Untuk itu, dalam kesempatan ini penulis dengan segala hormat dan kerendahan hati ingin mengucapkan terima kasih kepada:

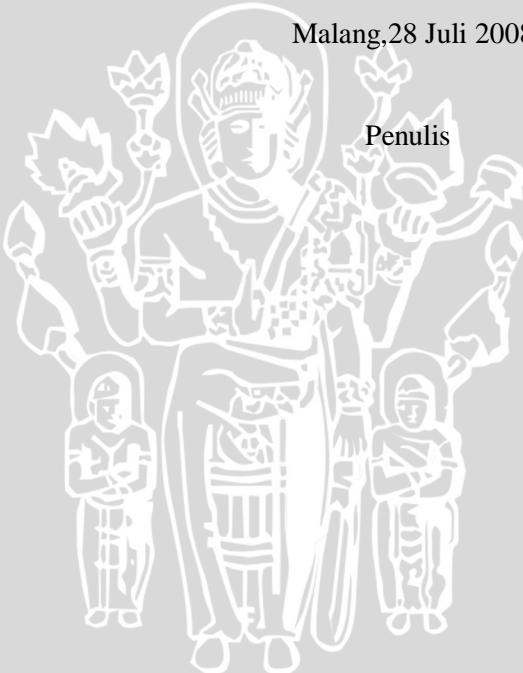
1. **Ketua Jurusan Biologi Fakultas MIPA** dan **Seluruh dosen Biologi** yang telah mendidik dan memberikan kontribusi ilmu yang sangat berarti bagi penulis selama studi.
2. **dr. Ahmad Dian Wahyudiono** yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk turut serta dalam penelitian ini.
3. **Dr. Ir. Moch. Sasmito Djati, Ms** selaku pembimbing I yang telah dengan sabar memberikan bimbingan, motivasi, arahan dan nasehat kepada penulis.
4. **Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Si** selaku pembimbing II atas segala bimbingan, arahan, nasehat serta motivasi yang selalu diberikan kepada penulis.
5. **Drs. Sofy Permana MSc., Dsc** selaku penguji I yang telah memberikan nasehat dan masukan untuk penulis.
6. **Satuman S.Si, M.kes** selaku penguji II yang telah banyak memberikan nasehat dan masukan yang berarti dalam penulisan ini.
7. **Muhamimin Rifai S.Si., PhD** selaku penguji III yang banyak memberikan bantuan kepada penulis.
8. **Dr. dr. Rasjad Indra** selaku Ka. Lab Faal, **mbak Fitri, mas Yuda** beserta **staff Biomedik, mbak Titik, mas Budi** beserta **staff Faal** yang telah memberikan kemudahan dan selalu sabar selama pengerjaan skripsi ini.

9. **Ayah-Ibu, Kakek-Nenek** yang selalu memberikan dukungan dan doa kepada penulis selama skripsi.
10. **Rekan penelitian (Ririn, Ratna, Puji, Noer), Bio'03, Afan, Ayah, Mas Denz, MT2D Girl, Bu Beny sekeluarga** dan semua pihak yang terlibat dalam penggerjaan skripsi ini.

Bagaimanapun juga, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Karenanya kritik dan saran akan selalu penulis harapkan demi perbaikan skripsi ini. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak. Amin.

Malang, 28 Juli 2008

Penulis



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI.....	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Obesitas Sebagai Faktor Resiko Atherosklerosis	3
2.1.1 Obesitas dan Leptin.....	3
2.1.2 Mekanisme Atherosklerosis.....	3
2.2 Aktivasi VCAM-1 pada Sel Endotel	6
2.3 Puerarin	9
2.4 Kerangka Konseptual	12
2.5 Hipotesis	13
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	14
3.2 Alat dan Bahan	14
3.2.1 Alat Penelitian	14
3.2.2 Bahan Penelitian.....	14
3.3 Isolasi dan Kultur Sel Endotel	14
3.4 Perlakuan Induksi Leptin Pada HUVECs.....	15
3.5 Perlakuan Puerarin	15

3.6 Identifikasi Protein VCAM-1 menggunakan Immunositokimia	15
3.7 Analisis Data.....	16
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Kultur Sel Endotel	17
4.2 Analisis Ekspresi VCAM-1.....	18
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	25
5.2 Saran	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	33



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Gambaran skematis proses pembentukan plak atherosklerosis	5
Gambar 2.2 Struktur kimia puerarin	11
Gambar 2.3 Kerangka konseptual.....	12
Gambar 4.1 Kultur sel endotel.....	17
Gambar 4.2 Hasil imunositokimia ekspresi VCAM-1 pada kultur sel endotel berbagai perlakuan	20
Gambar 4.3 Grafik hubungan konsentrasi puerarin dengan jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1	21
Gambar 4.4 Jalur sinyal NF-κB	23

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Persentase jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1.....	18
Tabel 1. Komposisi Bahan Pembuatan <i>cord solution</i>	44
Tabel 2. Komposisi Bahan Pembuatan Serum <i>free</i>	44
Tabel 3. Komposisi Bahan Pembuatan Medium Kultur	45
Tabel 4. Komposisi Bahan Larutan <i>Collagenase</i>	45

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Uji Statistik Ekspresi VCAM-1	33
Pembuatan Kultur Sel Endotel (HUVECs)	39
Skema Kerja Perlakuan leptin dan puerarin	41
Skema Kerja Imunositokimia	42
Skema Kerja Penelitian	43
Komposisi larutan.....	44



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

α	: <i>alfa</i>
β	: <i>beta</i>
γ	: <i>gamma</i>
μ	: <i>mikro</i>
COX	: <i>Cyclooxygenase</i>
CRP	: <i>C-reactive protein</i>
DAB	: <i>3,3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleid Acid</i>
EDCF	: <i>Endothelium Derived Contracting Factors</i>
EDRF	: <i>Endothelium Derived Relaxing Factors</i>
ELAM	: <i>Endothelial Cell Adhesion Molecules</i>
eNOS	: <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ERK	: <i>Extra cellular-Regulated Kinase</i>
ET	: <i>Endothelial</i>
HUVECs	: <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
ICAM	: <i>Intracellular Cell Adhesion Molecule</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
I κ B	: <i>Inhibitor Kappa B</i>
kD	: <i>kilo Dalton</i>
LFA	: <i>Leucocyte Functioning Antigen</i>
LDL	: <i>Low-Density Lipoprotein</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCFS	: <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MCP	: <i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
PGL	: <i>Prostacyclin</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SA-HRP	: <i>Strep Avidin Horseradish Peroxidase</i>
SPSS	: <i>Statistical Product and Service Solution</i>
VCAM	: <i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	: <i>Vasculogenic Endothelial Growth Factor</i>
VLA	: <i>Very Late Integrin Antigen</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obesitas merupakan penimbunan lemak dalam jumlah besar yang akan menimbulkan berat tubuh (*overweight*) yang berlebihan (Vander dkk., 2001). Saat ini diperkirakan lebih dari 100 juta penduduk dunia menderita obesitas. Berdasarkan data yang diterima WHO (*World Health Organization*) semakin hari jumlah penderita obesitas semakin meningkat. Pada tahun 2000, diperkirakan sekitar 210 juta penduduk Indonesia menderita penyakit ini (Rahmawati, 2006).

Obesitas merupakan faktor resiko terjadinya diabetes, hipertensi dan atherosklerosis (Lau dkk., 2004). Atherosklerosis 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 ekstraselular dan penebalan lapisan matriks jaringan konektif (Vander dkk., 2001). Atherosklerosis terjadi karena adanya kerusakan pada sel endotel (difungsi endotel) vaskular dimana kerusakan ini disebabkan oleh adanya gangguan mekanik, biokimia dan inflamasi (Libby dkk., 2002 dan Ross, 1999).

Penderita obesitas memiliki kadar plasma leptin yang tinggi dalam darah. Ini disebabkan karena penumpukan sel adiposit yang menghasilkan leptin. Sebagaimana yang diketahui, 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 atherosklerosis (Lau dkk., 2004). Menurut Singh dkk (2007) tingkat leptin yang tinggi juga dapat meningkatkan kadar *C-reactive protein* (CRP). Selanjutnya CRP dapat menginduksi ekspresi *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1) melalui jalur sinyal NF- κ B dalam HUVECs (Kawanami dkk., 2007 dan Liang dkk., 2007).

Puerarin merupakan senyawa isoflavon yang bersifat antiinflamasi. Baru-baru ini juga dilaporkan bahwa puerarin dapat mencegah disfungsi endotel yang diinduksi oleh banyak faktor (Hill dkk., 2003). Di dalam pembuluh darah sel endotel membentuk barier yang selektif dalam usaha mencegah transfer berbagai substansi yang

ada dalam sistem pembuluh darah (Born dan Schwartz, 1997). Sel endotel menyokong regulasi tekanan darah dan aliran darah dengan melepaskan vasodilatator *nitric oxide* (NO) dan *prostacyclin* (PGI2) dan vasokonstriktor *endothelin* (ET) dan *platelet activatory factor* (Marks dkk., 1995). Menurut Sanyin dkk (2007) puerarin dapat menginduksi ekspresi eNOS. *Endothelial nitric oxide synthase* dapat menghasilkan endogenous vasodilator *nitric oxide* (NO). 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) (Libby, 2005).

Namun belum diketahui apakah pemberian puerarin dalam jangka pendek berpengaruh terhadap disfungsi endotel. Oleh karena itu, kajian pada studi ini adalah membuktikan pengaruh puerarin terhadap ekspresi VCAM-1 pada kultur HUVECs yang diinduksi leptin.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dapat diangkat suatu permasalahan yaitu apakah puerarin dapat menurunkan ekspresi dari VCAM-1 pada sel endotel yang diinduksi leptin?

1. 3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek puerarin terhadap kultur sel endotel (HUVECs) yang diinduksi leptin dengan melihat adanya penurunan ekspresi VCAM-1.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan khasanah keilmuan kemungkinan puerarin yang secara teoritis sebagai agen alternatif terapi terhadap disfungsi endotel.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Obesitas Sebagai Faktor Resiko Atherosklerosis

2.1.1 Obesitas dan Leptin

Pada obesitas terjadi peningkatan masa jaringan lemak akibat ketidakseimbangan sistematik antara asupan kalori dengan pemakaian energi. Obesitas dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu, faktor genetik, asupan makan, metabolisme neuroendokrin, faktor sosial dan gaya hidup. Obesitas akan meningkatkan resiko penyakit kardiovaskuler (Ma'ruf dkk., 2003). Sel lemak dikenal sebagai gudang energi yang menghasilkan sejumlah sitokin yang diketahui sebagai adipokin. Salah satu adipokin adalah leptin (Lau dkk., 2004).

Adanya peningkatan sekresi leptin oleh sel adiposit dapat berperan dalam akumulasi makrofag melalui stimulasi makrofag (*macrophage recruitment*) ke dalam jaringan adiposa dan mempromosi adhesi makrofag pada sel endotel. Leptin adalah suatu polipeptida dengan 16 kD yang diproduksi oleh sel-sel adiposit (Wijaya, 1997). Leptin berasal dari bahasa Yunani yang artinya kurus. Leptin adalah produk dari gen *ob* yang berupa protein plasma (Camfield dkk., 1995). Leptin dapat menekan efek parakrin dalam sel lemak dan ekspresi serta sekresinya dapat disebabkan oleh IL-6 dan dihambat oleh TNF- α (Lau dkk., 2002). Leptin memiliki 145 sekuen asam amino dan masing-masing mengandung satu ikatan disulphida. Leptin berbentuk pilinan empat helix dengan satu segmen strand yang sangat pendek dan dua *interconnected loop* yang relatif panjang (Horrison, 2002).

Leptin mempunyai sifat proagulan dan antifibrinolitik serta pembentukan trombus dan atheroma melalui reseptor leptin yang menyebabkan inflamasi vaskular, proliferasi dan meningkatkan stress oksidatif (Kougias dkk., 2004). Stress oksidatif merupakan suatu kondisi sebagai akibat ketidakseimbangan antara oksidan dengan antioksidan (Kurniasih dan Wijaya, 2002).

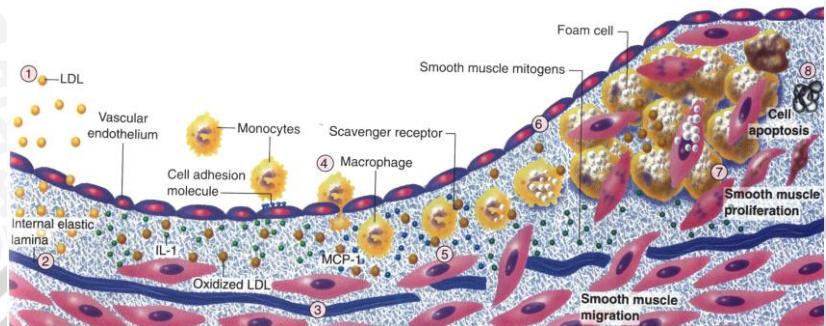
2.1.2 Mekanisme Atherosklerosis

Kerusakan fisik sel endotel yang disebabkan oleh perubahan ukuran sebagai konsekuensi dari lingkungan yang lipopolitik dapat juga

memberikan kontribusi pada peningkatan makrofag jaringan adiposa, sebagaimana tahapan kejadian pada proses atherosklerosis (Yudkin dkk., 1999). Pada tahap awal atherosklerosis, seperti yang terlihat pada gambar 2.1, terjadi adhesi lekosit pada permukaan endotel yang mengekspresikan molekul-molekul adhesi seperti VCAM-1, ICAM-1 dan E-selektin dan oleh protein kemotaktik (MCP-1) sel leukosit tersebut akan masuk ke dalam intima. Mediator inflamasi seperti M-CFS dapat meningkatkan ekspresi reseptor *scavenger* makrofag yang menyebabkan pengambilan partikel lipoprotein termodifikasi dan pembentukan sel busa. M-CFS dan mediator lain yang dihasilkan dalam plak dapat mengawali replikasi makrofag dalam intima (Libby dkk., 2002., Ross, 1999).

Limfosit T bersama dengan makrofag terdapat dalam intima (*fatty streak*) selama perkembangan atherosklerosis. Leukosit dan makrofag dapat mensekresi sitokin, kemokin dan faktor pertumbuhan yang akan mengawali terjadinya migrasi dan proliferasi sel otot polos. Sel otot polos dapat mengekspresikan enzim yang akan mendegradasi elastin dan kolagen sebagai respon terhadap stimulasi inflamasi. Degradasi matrik ekstraselular menyebabkan penetrasi sel otot polos melalui lamina elastik dan terjadi pembentukan matrik kolagen yang akan menutupi ateroma yang mengandung leukosit, lipid dan debris yang akan membentuk inti nekrotik, selain itu juga terjadi akumulasi makrofag yang dimediasi oleh M-CFS, MCP-1, ox-LDL dan terbentuk *advanced, complicated* luka atherosklerosis (Libby dkk., 2002., Ross, 1999).

Pada akhirnya, mediator inflamasi dapat menghambat sintesis kolagen dan menyebabkan ekspresi kolagenase oleh sel busa dalam intima. Perubahan metabolisme matrik ekstraselular menyebabkan fibrous cap menjadi tipis sehingga mudah koyak. Koyaknya plak, ulserasi dan hemoragik intraplak dimediasi terutama oleh MMP-9. *Cross talk* antara limfosit T dan makrofag dapat meningkatkan ekspresi *tissue factor/ faktor pertumbuhan* yang merupakan prokoagulasi yang kuat (Libby dkk., 2002; Ross, 1999 dan Loftul dkk., 2003).



Gambar 2.1 Gambaran skematis proses terbentuknya plak atherosklerotik. 1. Akumulasi partikel lipoprotein ke dalam intima. Lipoprotein yang termodifikasi diperlihatkan dengan warna yang lebih gelap. Proses modifikasi termasuk *glycation* dan oksidasi. 2. Stres oksidatif, termasuk hasil yang didapatkan dari lipoprotein termodifikasi, dapat menginduksi sitokin lokal. 3. Selanjutnya sitokin menginduksi peningkatan ekspresi molekul adhesi untuk leukosit yang menyebabkan penempelannya dan molekul *chemoattractant* yang mengarahkan migrasi leukosit ke dalam intima. 4. Monosit darah, saat memasuki dinding arteri sebagai respon dari adanya sitokin *chemoattractant* seperti MCP-1, bertemu dengan rangsangan lain seperti M-CSF yang dapat memperkuat ekspresi reseptor *scavanger*. 5. Reseptor *scavanger* memediasi pengambilan partikel lipoprotein termodifikasi dan meningkatkan perkembangan sel busa. Sel busa makrofag adalah sumber dari mediator seperti sitokin lanjut dan *effector molecule* seperti asam *hypochlorus*, superokida anion (O_2^-), dan matriks *metalloproteinases*. 6. Sel otot polos dalam intima memisahkan sel otot polos lainnya yang bermigrasi ke dalam intima dari media. 7. Sel otot polos kemudian dapat memisahkan dan menambah kompleksan matriks ekstraselular, memperbanyak akumulasi matriks ekstraselular di dalam pertumbuhan plak atherosklerosis. Dengan cara ini, asam lemak dapat berkembang menjadi *fibrofatty lesion*. 8. Dalam tahapan akhir, proses *calcification* dapat terjadi dan berlanjut dengan *fibrosis*, kadang-kadang diikuti dengan kematian sel otot polos termasuk apoptosis, menghasilkan *acellular fibrous capsule* meliputi daerah inti yang kaya dengan lemak, sel mati dan sisa buangannya (Libby, 2005).

2.2 Aktivasi VCAM-1 Pada Sel Endotel

Endotel merupakan sel-sel pipih yang membentuk dinding kapiler. Sel endotel membatasi permukaan bagian dalam dari pembuluh darah (Bevalender dan Ramaley, 1988). Semua sel endotel selalu bersentuhan langsung dengan cairan darah (Widodo, 1995). Fungsi dari sel endotel yaitu membentuk barier yang selektif untuk mencegah terjadinya transfer berbagai substansi (Isnaeni dkk., 1999). Selain itu, sel endotel juga berperan sebagai tempat metabolisme bahan tertentu yang ada dalam sel endotel, misalnya angiotensin 1 yang ada didalam sirkulasi dapat diubah menjadi peptida yang tidak aktif, *norepineprine* dan *5 hydroxy tryptamin* yang di *uptake* oleh sel endotel diubah menjadi metabolit inaktif oleh enzim oksidase dan *cthe col-o-methyl transferase* (Sargowo, 2003). Fungsi ketiga dari sel endotel adalah sebagai tempat sintesis yang bisa menghasilkan dan melepaskan EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factors*) maupun EDCF (*Endothelium Derived Contracting Factors*) yang bekerja dalam mengatur perubahan tonus pembuluh darah. Sel endotel juga menghasilkan *nitric oxide* yang berperan penting dalam proses relaksasi otot polos arteri karena merupakan vasodilatasi endogen yang kuat (Isnaeni dkk., 1999).

Interaksi adesi diatur oleh ekspresi permukaan sel yaitu molekul adhesi serta ligan atau reseptor-reseptornya. Ikatan leukosit dan sel endotel diawali oleh ekspresi L-selektin pada permukaan leukosit, P-selektin dan E-selektin pada permukaan sel endotel, dengan reseptornya berupa hidrat arang. Interaksi ini memungkinkan terjadi marginasi leukosit sepanjang dinding vaskular ditempat inflamasi. Pelepasan mediator inflamasi meningkatkan molekul adhesi baik pada sel inflamasi (neutrofil, monosit) maupun pada sel endotel. Hal tersebut meningkatkan adhesi, perubahan arus darah, marginasi dan migrasi sel-sel seperti neutrofil, monosit dan eosinofil ke pusat inflamasi. Migrasi sel-sel inflamasi tersebut juga diarahkan oleh faktor-faktor kemotaktik yang diproduksi berbagai sel, mikroba, komplemen dan sel mast. Sel-sel yang masuk ke tempat lesi akan melepas produknya yang meneruskan perjalanan proses inflamasi dan kadang menimbulkan kerusakan jaringan akibat pelepasan oksigen reaktif. IL-1 dan TNF- α juga endotoksin meningkatkan ekspresi molekul adhesi ICAM-1 dan VCAM-1 pada permukaan sel endotel yang berinteraksi dengan ligannya pada permukaan leukosit

(ICAM-1 mengikat LFA-1, VCAM-1 mengikat VLA-4) (Baratawidjaja, 2006).

Reseptor leptin tersebar diseluruh tubuh dan reseptor tersebut diekspresikan oleh berbagai sel perifer seperti sel endotel (HUVECs). Karena itu sel-sel endotel merupakan salah satu target leptin (Bouloumié dkk., 1999). Leptin diketahui menginduksi ROS berupa anion superokksida mitokondrial yang diproduksi di dalam sel endotel melalui peningkatan oksidasi asam lemak. Peningkatan produksi anion superokksida di dalam sel endotel mereduksi ketersediaan NO lokal dengan cara membantu pembentukan peroksinitrit (Knudson, 2005). ROS menghambat efek relaksasi *nitric oxide* sehingga dapat menghambat fungsi endotel dengan menyebabkan rusaknya NO (Selvinna dan Setiabudy, 2005).

Induksi leptin pada sel endotel dapat menyebabkan akumulasi ROS yang merupakan molekul radikal bebas yang sangat reaktif dan dapat menyebabkan kerusakan pada membran sel dan komponen sel lainnya (Kurniasih dan Wijaya, 2002).

Secara langsung maupun tidak langsung, leptin dapat mempengaruhi level CRP melalui sistem imun (Karaduman dkk., 2006). CRP merupakan plasma protein yang berperan pada proses inflamasi. CRP tersusun dari 5 subunit yang identik dengan ikatan nonkovalen yang mempunyai berat molekul 23 kDa dan tersusun melingkar secara asimetris (Ouchi dkk., 2003 dan Verma dkk., 2003). CRP diproduksi di dinding vaskular yang secara langsung dapat mengganggu bioavaibilitas *nitric oxide* (NO) (Fichtlscherer dkk., 2004). CRP memiliki kemampuan untuk mengaktivasi NF- κ B sebagai kunci utama faktor transkripsi (Brian dkk., 2005). Peningkatan level CRP berkaitan dengan disfungsi endotel. CRP meningkatkan aktivitas promotor VCAM-1 melalui induksi ekspresi mRNA pada level transkripsi, misalnya melalui protein kinase C (PKC), p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *tyrosine* kinase dan jalur sinyal NF- κ B-dependent di dalam sel endotel vaskular (Kawanami dkk., 2007). VCAM-1 merupakan molekul adhesi endothelial dari Ig gene superfamily yang telah diketahui sebagai *biomarker* terjadinya atherosklerosis. VCAM-1 berperan penting dalam adhesi mononuklear leukosit ke endothelium dan dapat diinduksi dengan cepat oleh sitokin proinflammatory (Karaduman dkk., 2006). Gen ini mengkodekan permukaan sialoglycoprotein dan diekspresikan oleh aktivasi sitokin sel endotel

VCAM-1 dilibatkan dalam ikatan sel B dan T ke sel endotelial. Sel T diaktivasi oleh stimulasi lektin atau oleh antigen spesifik yang berikatan dengan HUVECs secara *in vitro* (Yamasaki, 1988). Sekuen DNA dari VCAM-1 tidak mempunyai kemiripan stuktural dengan ELAM-1 tetapi VCAM-1 dan ELAM-1 merupakan anggota dari supergen famili immunoglobulin. Tiga superfamili Ig melepaskan sel-sel adhesi, yaitu NCAM, CEA dan ICAM-1. NCAM berikatan dengan dirinya sendiri pada permukaan sel lainnya (*homotypic adhesion*) karenanya dapat mempromosi adhesi antara sel dengan tipe yang sama (Benchimol, 1989). ICAM merupakan ligan untuk protein permukaan leukosit, LFA-1 dan memediasi adhesi leukosit-leukosit dan leukosit sel adhesi endotelial. ICAM-1 dan VCAM-1 memberikan beberapa kemiripan fungsional. Misalnya, keduanya diinduksi dalam sel endotelial setelah pemberian sitokin dan keduanya memediasi adhesi limfosit dan *cell line* yang berhubungan. VCAM-1 memainkan peranan dalam regulasi imun dan infeksi virus (White dan Littmann, 1989).

Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) secara kolektif diketahui sebagai molekul sel adhesi yang terdiri atas tiga family yang berbeda yaitu, selektin, integrin dan superfamly immunoglobulin yang masing-masing dengan peran yang spesifik dalam proses inflamasi (Robbin dan Topol, 2001).

Terdapat dua macam jenis VCAM, yaitu VCAM-1 dan VCAM-1b yang termasuk dalam kelompok ELAM-1 (*Endothelial Cell Adhesion Molecules*). ELAM-1 merupakan glikoprotein permukaan sel berukuran 116 kD yang disintesis oleh HUVECs sebagai respon terhadap sitokin inflamasi (IL-1 atau TNF) (Bevilacqua, 1987). ELAM-1 hanya diekspresikan dalam endoteliun dan ekspresinya merupakan kejadian sementara berdasarkan adanya sitokin (Cotran, 1986., Cotran dan Pober, 1988).

Integrin VLA-4 merupakan ligan dari VCAM-1. Integrin adalah matriks sel ekstraselular dan reseptor sel-sel adhesi penghambat struktur *heterodimetric*. Ligan ini menentukan jalur ikatan limfosit B dan T untuk mengaktifkan sel endotel (Marcantonio dan Hynes, 1988).

VCAM-1 diekspresikan oleh HUVECs melalui jalur NF- κ B. NF- κ B adalah faktor transkripsi pada nukleus yang menginisiasi transkripsi sejumlah sitokin meliputi TNF- α , interleukin (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-8, *platelet activating factor* dan interferon- γ (Wilson dan

Sarde, 2001). Aktivasi NF- κ B diregulasi oleh gen yang mengkodekan sitokin proinflamasi, molekul adhesi, kemokin, faktor pertumbuhan dan *inducible enzym* seperti *cyclooxygenase-2* (COX2) dan penginduksi *nitric oxide synthase* (iNOS). NF- κ B dalam bentuk tidak aktif berikatan dengan penghambat κ B (I- κ B α/β) dalam sitoplasma. Sitokin proinflamator dan patogen bekerja melalui jalur sinyal yang berbeda yang akhirnya bertemu pada aktivasi I- κ B kinase (IKK) kompleks, yang mengandung IKK1/IKK α dan IKK2/IKK β serta IKK γ . Aktivasi IKK mengawali phosphorilasi I κ B α/β pada specific NH₂-terminal serine residu. Phosphorilasi I κ B kemudian *ubiquitinated*, membuatnya terdegradasi oleh *proteasome* 26S. Ini melepaskan dimer NF- κ B dari sitoplasmik NF- κ B-I κ B kompleks dan membuatnya bertranslokasi kedalam inti. Di dalam inti, NF- κ B akan berikatan dengan elemen *enhancer* κ B pada gen spesifik yang mengawali transkripsi. Gen target NF- κ B adalah termasuk I κ B α , sintesis yang memastikan bahwa NF- κ B diaktifkan sementara. Regulasi *negatif-feedback* ini membuat translokasi NF- κ B berosilasi. Antioksidan, seperti aspirin, N-acetylcysteine (NAC) dan flavonoids dapat menghambat aktivasi NF- κ B. (Tedgui dan Mallat, 2006).

2.3 Puerarin

Puerarin merupakan unsur ramuan ekstrak dari bahan Ge-gen yang digunakan sebagai obat pada penyakit arteri koroner (CAD). Baru-baru ini diketahui bahwa puerarin memberikan perlindungan terhadap disfungsi endotel yang diinduksi oleh banyak faktor (Zhu dkk., 2004).

Pueraria lobata merupakan tanaman kacang-kacangan yang termasuk dalam famili *Leguminaceae* yang hidup menahun, merambat dan memanjang. Daunnya berwarna hijau tua, akarnya berserat mengandung pati dengan bagian dalam berwarna putih kekuningan dan berbau khas. Kelompok dari *Leguminaceae* ini merupakan sumber utama isoflavon di alam. Kandungan isoflavon tertinggi ditemukan pada umbi *Pueraria lobata*, yaitu 197,600 μ g/100g. Isoflavon mempunyai berat molekul rendah dan bersifat hidrofobik. Kelarutannya dalam air mengikat dalam keadaan terkonjugasi menjadi glukosa, glikoronida atau sulfat (Mazur dkk., 1998).

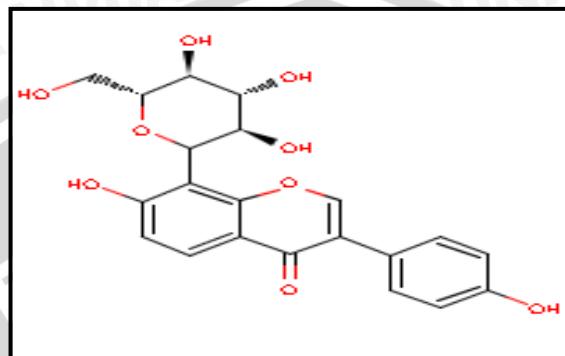
Isoflavonoid yang terkandung di dalam akar Pueraria lobata meliputi puerarin, daidzin, daidzein, formonetin serta glukosida-glukosida C dan O yang lain. Senyawa-senyawa tersebut berhubungan erat dengan antioksidan serta efek-efek farmakologis yang lain (Prasain dkk., 2003).

Pada gambar 2.2 dapat dilihat struktur puerarin yg menentukan polaritas dari isoflavan dimana polaritas isoflavan tergantung pada jumlah gugus hidroksil yang dapat membentuk ikatan hidrogen dengan pelarut yang bersifat polar. Semakin banyak jumlah gugus hidroksil, maka semakin banyak pula ikatan hidrogen yang dapat terbentuk sehingga senyawa tersebut akan mudah larut dalam pelarut yang polar (Harborne, 1997). Isoflavon memiliki 2 gugus hidroksil pada 6 dan 7 posisi A cincin yang menunjukkan potensi yang kuat sebagai antioksidan (Jha, 1985). Antioksidan memiliki dua fungsi, fungsi pertama yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) sering disebut antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. fungsi sekunder atau kedua yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan pengubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil (Trilaksani, 2003).

Puerarin dapat memberikan dampak yang menguntungkan yaitu: pelebaran arteri koroner, penurunan oksigen myocardial, penurunan akumulasi platelet, meningkatkan proliferasi sel otot polos (*vascular smooth muscle*), meningkatkan aktivitas rennin-angiotensia-aldosteron dan lain-lain (Zhu dkk., 2004). Menurut Peng dkk (2007), puerarin memiliki aktivitas antitrombotik dan anti alergi. Selain itu, penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa puerarin juga memiliki aktivitas antioksidan yang kuat.

Puerarin dapat menurunkan level plasma asam lemak bebas, matrik *metalloproteinase-9*, CRP, serum interleukin-6 dan TNF- α , menghambat inflamasi dan menstabilkan plak atherosklerosis. Puerarin juga dapat meningkatkan ekspresi VEGF (*vasculogenic endothelial growth factor*) dan eNOS. VEGF mengaktifasi eNOS melalui induksi kalsium fluk, perekutan Hsp90 dan phosphorilasi NOS melalui jalur [PtdIns(3)K]-Akt. Selama aktivasi eNOS

mengkatalis L-arginine menjadi L-citrulline dan NO (Zhang dkk., 2006).

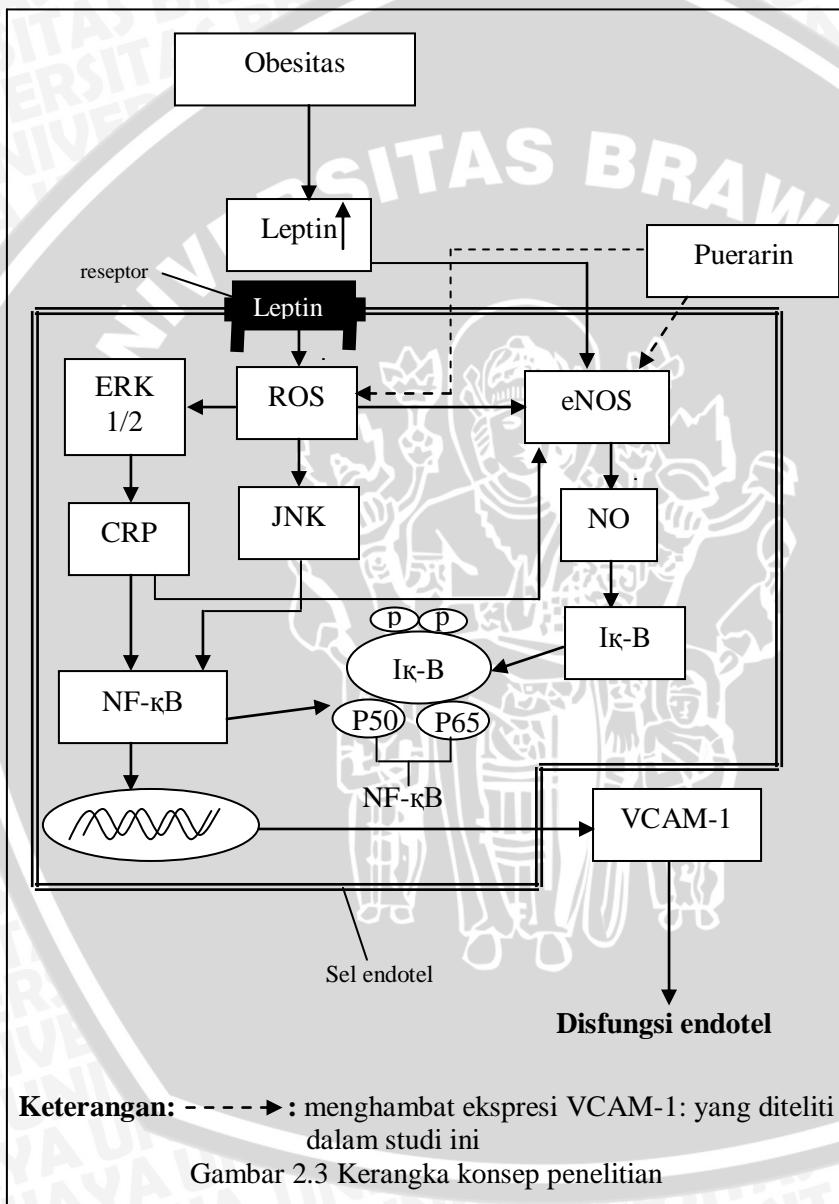


Gambar 2.2. Struktur kimia dari puerarin (Meezan dkk., 2005).

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) menghasilkan endogenous vasodilatator *nitric oxide* (NO) (Sanyin dkk., 2006). Disamping fungsinya sebagai vasodilatasi, NO juga dapat menahan aktivasi inflamasi dari fungsi endotel seperti ekspresi VCAM-1. Sifat antiinflamasi *nitric oxide* bekerja pada tingkat ekspresi gen dengan menginterferensi pengatur transkripsi *nuclear factor kappa B* (NF- κ B). *Nitric oxide* dapat meningkatkan produksi penghambat intraselular NF- κ B yaitu I κ B α (Libby, 2005).

2.4 Konsep Penelitian

Adapun konsep penelitian yang dilakukan seperti yang terlihat pada gambar 2.3 dibawah ini:



2.5 Hipotesis

Puerarin menurunkan ekspresi VCAM-1 pada kultur sel endotel (HUVECs) yang diinduksi leptin.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2007 sampai Januari 2008 di Laboratorium Fisiologi (Faal) dan Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Laminar Air Flow, kanul, benang, botol falkon, centrifuse, pipet, flask, inkubator CO₂, mikroskop inverted, mikropipet, vorteks, blue tip, 24 well-plate culture, cover glass, object glass, disposable syringe, timbangan analitik.

3.2.2 Bahan Penelitian

Umbilikus hasil persalinan *caesar*, Puerarin (ChemExper), Leptin (Sigma), *Hank's Balance Salt Solution* (Sigma), alkohol 70% (oneMed), PBSA (*Dulbecco's Phosphate Buffered Salin*), Medium199, *collagenase* tipe II (Gibco), serum free, gelatin 0,2% (Sigma), DAB (Dako), SA-HRP (Dako), aquades (otsuka), *Mouse Monoclonal VCAM-1* (abcam) ,buffer bloting, mayer hematoxilen (Mp biomedical),

3.3 Isolasi dan Kultur Sel Endotel

Metode yang digunakan ini menurut Khotimah (2003). Umbilikus dalam *cord solution* (Tabel 1.L6) 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 (± 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 kanul yang dipasang. Selanjutnya umbilikus dihangatkan dengan cara digenggam dengan kedua tangan selama 7 menit. Larutan *collagenase* yang telah mengandung endotel

dikeluarkan dari umbilikus kemudian sisanya umbilikus dibilas dengan 8 ml larutan PBSA. Kemudian *collagenase* dan PBSA yang mengandung sel endotel disentrifus dalam tabung sentrifus steril 15 ml dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit. Selanjutnya pelet yang diperoleh diresuspensi dengan medium kultur (Tabel 3. L6) 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 inverted, jika sel sudah menempel pada dasar plate, medium kultur diambil dan sel dibilas dengan 3 ml larutan *serum free media* (Tabel 2. L6) dan ditambahkan medium baru. Selanjutnya plate dimasukkan dalam inkubator sampai terbentuk monolayer kurang lebih 3-4 hari dan setiap 2 hari sekali dicuci dengan *serum free media* serta ditambahkan medium yang baru.

3.4 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 dan 25 ng/mL. Leptin yang telah tersedia dicampur dengan media komplit (Tabel 3. L6). Masing-masing well diisi dengan 500 µl kemudian sel endotel diinkubasi 37°C selama 6 jam.

3.5 Perlakuan Puerarin

Setelah kultur HUVECs diinkubasi leptin selama 6 jam, sel dicuci dan diperlakukan puerarin hasil ekstraksi (ChemExper). Kadar puerarin terdiri dari 5 konsentrasi yaitu 0 (kontrol), 5 µM, 25 µM, 200 µM dan 525 µM. Setelah ditambahkan puerarin, kultur sel diinkubasi pada 37°C, 5 % CO₂ dan 95 % kelembaban udara selama 6 jam.

3.6 Identifikasi protein VCAM-1 Menggunakan Imunositokimia

Kultur endotel dicuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali, kemudian difiksasi dengan metanol absolut 10 % (v/v) dalam PBS pH 7,4 selama 20 menit. Sel dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali masing-masing 5 menit. Sel ditetesi dengan 0,02 % (w/v) *sodium azide*. Sel dicuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali selama 5 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 1 jam. Sel dicuci dengan PBS. Inkubasi antibodi primer dalam serum 1 : 200 (*Mouse Monoclonal VCAM-1*) selama 24 jam. Sel disimpan pada suhu 4 °C. Sel dikeluarkan pada suhu ruang selama 15 menit. Sel dicuci dengan PBS 3 kali selama masing-masing 5 menit. Sel diinkubasi dengan antibodi sekunder 1 : 400 (*Anti Mouse VCAM-1*) selama 1 jam pada suhu ruang. Sel dicuci dengan PBS 3 kali selama masing-masing 5 menit. Sel ditetesi dengan SA-HRP selama 40 menit kemudian dicuci dengan PBS 3 kali selama masing-masing 5 menit. Sel ditetesi dengan kromogen DAB (3,3 *Diaminobenzidine tetrahydrochloride*). Sel ditetesi dengan *counterstains* dengan *mayer hematoxilen* selama 10 menit. Sel dicuci dengan air kran kemudian dicuci dengan aquades selama 10 menit. Sel dibiarkan pada suhu kamar. Jaringan diletakkan pada *object glass* dan ditetesi dengan entellan dan diamati dibawah mikroskop *inverted*.

3.7 Analisis Data

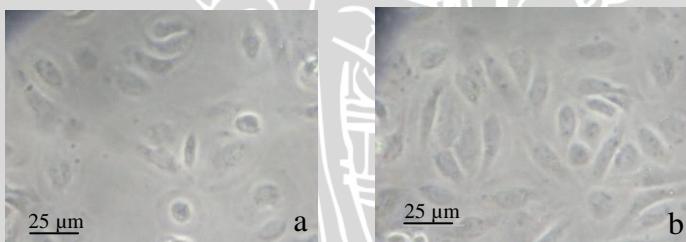
Jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 dihitung per 100 sel dengan tiga kali ulangan. Data yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan *one way anova* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultur Sel Endotel

Sumber kultur sel endotel diperoleh dari sel umbilikus manusia. Sel endotel pada umbilikus digunakan karena strukturnya lebih sederhana jika dibandingkan dengan sel endotel orang dewasa (Libby, 2003). Selain itu mudah didapatkan dan secara fisiologis mudah ditumbuhkan menjadi *cell lines*. Menurut Couillard dkk (2005) sel endotel vaskular sebelumnya dianggap sel yang tidak aktif dan berfungsi sebagai lapisan antara darah dan jaringan, tetapi saat ini telah banyak bukti yang mendukung bahwa sel endotel vaskular menjaga homeostatis tubuh. Misalnya menjaga keseimbangan dinamis NO dimana bila jumlah NO tidak seimbang maka akan terjadi gangguan terhadap sel sel endotel (disfungsi endotel). Ketidakseimbangan antara jumlah NO dapat disebabkan oleh adanya leptin yang menurunkan jumlah NO. Fungsi endotel normal akan berjalan dengan baik jika terjadi keseimbangan dinamis NO dengan oksidan lainnya. Secara morfologi sel endotel normal dapat dilihat pada gambar dibawah ini, dimana sel endotel ditumbuhkan dalam medium M199 dan FBS 10% diperoleh sel sebagai berikut.



Gambar 4.1 Kultur sel endotel (HUVECs) (perbesaran 400x)

Keterangan: a. kultur sel endotel hari kedua
b. kultur sel endotel hari keempat

Pada gambar 4.1 (a) terlihat kultur sel endotel hari kedua dimana jumlah sel masih sedikit dan belum banyak berkembang. Pada hari keempat (b) sel mulai membelah dan memperbanyak diri sehingga jumlah sel bertambah dan membentuk *cobblestone* dengan spesifitas

sel 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* (Arjita dkk., 2002). Pada gambar tersebut juga terlihat sel mulai saling mendekat dan ruang tumbuh sel semakin sedikit (sel mengalami *confluent*) yang ditandai dengan melekatnya sel pada *attachment site* dalam *plate culture*. Menurut Sargowo (2003) sel endotel mempunyai ukuran 25-50 μm kali 10-15 μm . Ketebalan pada bagian tepi sel 1 μm dan didaerah tengah 3 μm . Dengan demikian sel endotel dapat ditumbuhkan dalam media komplit. Bentuk, ukuran dan pertumbuhan sel endotel dapat diamati melalui mikroskop *inverted*.

4.2 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 VCAM-1*)-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. Dengan demikian sel endotel yang mengekspresikan VCAM-1 akan terlihat berwarna coklat seperti pada gambar 4.2.

Tabel 4.1 Persentase jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin dan puerarin.

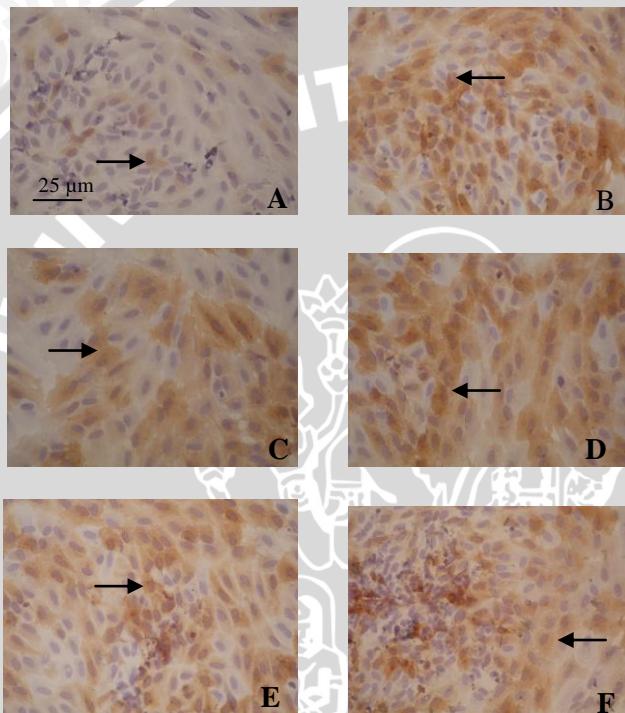
Dosis Puerarin (μM)	Jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 (%)	
	Leptin 0 ng/mL	Leptin 25 ng/mL
0	$0,54 \pm 0,15^{\text{a}}$	$2,86 \pm 0,15^{\text{d}}$
5	$0,92 \pm 0,40^{\text{ab}}$	$1,92 \pm 0,05^{\text{bcd}}$
25	$1,23 \pm 0,38^{\text{abc}}$	$2,12 \pm 0,26^{\text{cd}}$
200	$0,77 \pm 0,36^{\text{a}}$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

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($\alpha 0,05$).

Berdasarkan hasil penelitian, rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 dihitung dalam persentase (Tabel 4.1). Data pada tabel 4.1 menunjukkan bahwa pada kultur sel endotel yang tidak diinduksi leptin (leptin 0 ng/mL) dengan penambahan puerarin 0 μ M, jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 sebesar 0,54%, sedangkan dengan penambahan puerarin 5, 25, 200 dan 525 μ M jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 berturut-turut sebesar 0,92%, 1,23%, 0,77% dan 0,85%. Uji Tukey menunjukkan bahwa penambahan puerarin tersebut tidak berpengaruh signifikan dalam meningkatkan ekspresi VCAM-1 tetapi ada kecenderungan kenaikan jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 pada dosis puerarin 5 dan 25 μ M seperti pada gambar 4.3. Hal ini mungkin disebabkan karena perubahan ekspresi eNOS dapat mengakibatkan gangguan sintesis NO sehingga ekspresi NF- κ B meningkat dan diikuti dengan ekspresi VCAM-1. Menurut Kurniasih dan Wijaya (2002) radikal bebas NO dihasilkan oleh tiga isoform *nitric oxide synthase* (NOS) yaitu *neuronal NOS* (nNOS), *inducible NOS* (iNOS) dan *endothelial NOS* (eNOS). Menurut Lawrence (2007) 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 *di-coupled* oleh tetrahydrobiopteerin (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. Sedangkan pada konsentrasi puerarin 200 dan 525 μ M, jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 cenderung mengalami penurunan.

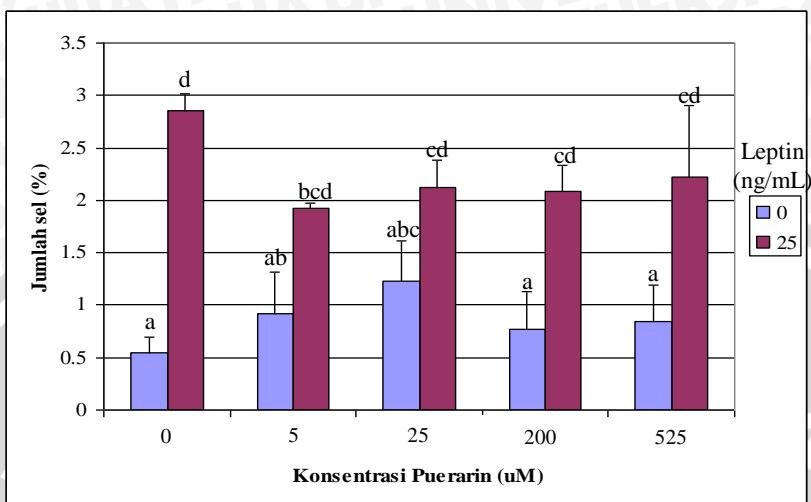
Pada perlakuan leptin 0 ng/mL dan puerarin 0 μ M rata-rata jumlah sel sebesar 0,54 % lebih sedikit jika dibandingkan dengan kultur sel endotel yang diinduksi leptin 25 ng/mL saja dengan rata-rata jumlah sel sebesar 2,86 %. Dari hasil uji statistika menunjukkan bahwa induksi leptin pada kultur sel endotel berpengaruh signifikan ($p<0,05$) terhadap jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 dibandingkan dengan leptin 0 ng/mL. Keadaan ini menunjukkan bahwa sel endotel yang diinduksi dengan leptin dapat meningkatkan ekspresi VCAM-1. Menurut Quehenberger dkk (2002), leptin dengan konsentrasi 25 ng/mL dapat mengakibatkan terjadinya disfungsi pada kultur sel endotel, pernyataan ini selaras dengan penelitian Bouloumié (1999) yang menyatakan bahwa kultur sel endotel yang

distimulasi leptin dapat meningkatkan produksi ROS. Selanjutnya ROS dapat menyebabkan disfungsi sel endotel dengan cara menstimulasi aktivitas selular seperti sitokin dan mengaktifkan faktor transkripsi NF- κ B (Brian dkk., 2005).



Gambar 4.2 Hasil imunositokimia ekspresi VCAM-1 pada kultur sel endotel berbagai perlakuan (perbesaran 400x)

Keterangan: A. Leptin 0 ng/mL + puerarin 0 μ M; B. Leptin 25 ng/mL; C. Leptin 25 ng/mL + puerarin 5 μ M; D. Leptin 25 ng/mL + puerarin 25 μ M; E. Leptin 25 ng/mL + puerarin 200 μ M; F. Leptin 25 ng/mL + puerarin 525 μ M. Tanda panah menunjukkan ekspresi VCAM-1.



Gambar 4.3 Hubungan konsentrasi puerarin dengan jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1.

Keterangan: Notasi a, b, c, dan d menunjukkan beda nyata.

Dari grafik gambar 4.3 dapat dilihat bahwa pada perlakuan puerarin $5 \mu\text{M}$ jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 lebih sedikit ($0,92\%$) jika dibandingkan dengan induksi leptin 25 ng/mL yaitu $1,92\%$. Dari hasil uji statistika menunjukkan bahwa pada perlakuan puerarin $5 \mu\text{M}$ dengan penambahan leptin 25 ng/mL tidak berpengaruh signifikan dalam meningkatkan ekspresi VCAM-1 (dapat dilihat adanya notasi yang sama yaitu b). Pada perlakuan puerarin $25 \mu\text{M}$ jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 lebih sedikit ($1,23\%$) jika dibandingkan dengan induksi leptin 25 ng/mL yaitu $2,12\%$. Secara statistika pada perlakuan puerarin $25 \mu\text{M}$, penambahan leptin 25 ng/mL tidak menunjukkan hasil yang signifikan dalam meningkatkan ekspresi VCAM-1 (dapat dilihat pada notasi yang sama, yaitu c). Pada perlakuan puerarin $200 \mu\text{M}$ jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 lebih sedikit yaitu $0,77\%$ jika dibandingkan dengan induksi leptin 25 ng/mL ($2,08\%$), dari hasil uji statistika menunjukkan bahwa perlakuan puerarin $200 \mu\text{M}$ berpengaruh signifikan dalam meningkatkan ekspresi VCAM-1. Sedangkan pada perlakuan puerarin $525 \mu\text{M}$ juga lebih sedikit jika dibandingkan dengan induksi leptin 25 ng/mL ($2,22\%$). Dari hasil uji

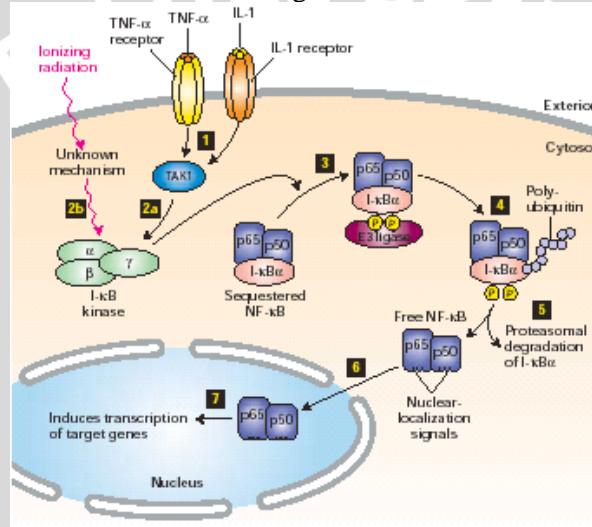
statistika menyatakan bahwa pada perlakuan puerarin 525 μM penambahan leptin 25 ng/mL berpengaruh signifikan dalam meningkatkan ekspresi VCAM-1. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian puerarin 5 dan 25 μM mampu menekan efek leptin yang ditandai dengan penurunan ekspresi VCAM-1, sedangkan pemberian puerarin 200 dan 525 μM belum mampu memberikan efek pada sel endotel yang telah diinduksi leptin.

Pada grafik yang ditunjukkan oleh gambar 4.3 dapat dilihat bahwa jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 cenderung mengalami penurunan pada konsentrasi puerarin 5 μM dengan penambahan leptin 25 ng/mL jika dibandingkan dengan leptin 25 ng/mL saja. Hal ini dapat dimungkinkan karena waktu paruh CRP yang panjang dalam plasma yaitu 20 jam (Arief, 2007 dan Indriyanti, 2005) sehingga terdapat CRP yang belum mengaktivasi pembentukan NF- κ B, pada saat penambahan puerarin, NF- κ B yang tersisa dari hasil CRP akan berikatan dengan I κ -B. Pemberian leptin pada sel endotel dilakukan selama 6 jam, sel endotel yang telah diinduksi leptin akan mengekspresikan VCAM-1. Menurut Bouloumié dkk., (1999) ekspresi VCAM-1 sudah dapat terjadi dalam waktu 30 menit dengan konsentrasi leptin 10 ng/mL. Enam jam berikutnya sel endotel diinkubasi dengan puerarin untuk selanjutnya difiksasi. Dari hasil uji Tukey, penambahan puerarin dengan konsentrasi 0, 5, 25, 200 dan 525 μM tersebut, tidak menunjukkan hasil yang signifikan ($p>0,05$) dalam menurunkan ekspresi VCAM-1. Hal ini diduga karena puerarin baru dapat menurunkan NF- κ B setelah 24 jam (Ding dkk., 2007).

Penelitian ini mengkaji tentang pengaruh puerarin terhadap sel endotel yang diinduksi leptin 25 ng/mL dengan melihat adanya penurunan ekspresi pada VCAM-1 yang merupakan *biomarker* terjadinya disfungsi endotel. Seperti yang telah diketahui bahwa leptin merupakan sitokin yang dihasilkan oleh sel adiposit. Dalam jumlah tinggi, leptin dapat menyebabkan terbentuknya ROS dalam sel endotel. ROS melalui aktivasi ERK ½ akan menginduksi CRP. Selanjutnya CRP menginduksi ekspresi VCAM-1 melalui protein kinase C (PKC), *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK), tyrosin kinase dan NF- κ B (Kawanami dkk., 2007). Salah satu kelemahan dari studi ini yaitu dosis puerarin kurang bervariasi, oleh

karena itu diharapkan adanya penelitian lebih lanjut dengan variasi puerarin yang lebih lebar.

Pada gambar 4.4, 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



Gambar 4.4 Jalur sinyal NF- κ B (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 (Lodish dkk., 2004).

menjadi teraktifasi dan terjadi pada fosforilasi N-terminal dua *serine residues* pada I κ -B. Suatu *E3 ubiquitin ligase* kemudian berikatan terhadap *phosphoserines* dan membentuk *polyubiquitin* I κ -B serta

memicu dengan segera terjadinya degradasi Iκ-B oleh *proteosome*. Akibat Iκ-B terdegradasi, *nuclear-localization* signal pada NF-κB menjadi terekspos sehingga dapat bertranslokasi kedalam inti sel dan mengaktifasi transkripsi dari berbagai macam gen target. Terbentuknya sinyal NF-κB dihentikan oleh *negatif feedback loop*, dimana setiap satu gen yang ditranskripsinya diinduksi langsung oleh NF-κB juga mengkodekan Iκ-B. Akhirnya level protein Iκ-B yang tinggi menonaktifkan NF-κB aktif di dalam sel dan mengembalikannya ke sitosol. Dengan pemberian puerarin dapat mencegah terjadinya disfungsi endotel. 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 (Libby, 2005). Namun dosis puerarin yang digunakan pada penelitian ini kurang bervariasi sehingga sulit untuk menentukan dosis optimumnya dalam mengurangi resiko inflamasi dan disfungsi endotel.



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Pemberian leptin 25 ng/mL terhadap kultur sel endotel dapat meningkatkan ekspresi VCAM-1 jika dibandingkan dengan leptin 0 ng/mL. Pada pemberian puerarin berbagai dosis (5, 25, 200 dan 525 μ M) menurunkan ekspresi VCAM-1 namun tidak signifikan.

5.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan ragam dosis puerarin dengan interval yang lebih lebar. Selain itu perlu dilakukan penelitian di level transkripsi dengan melihat aktivitas NF- κ B, eNOS, NO dan I- κ B serta diperlukan juga penelitian tentang pengaruh puerarin sebagai terapi disfungsi endotel dengan paparan puerarin yang lebih lama dan atau bersamaan dengan pemberian leptin.

DAFTAR PUSTAKA

- Arief, I. 2007. Risiko Baru Penyakit Kardiovaskular.<http://www.pjnhk.go.id>. diakses tanggal 19 Juli 2008 pukul 06.30 WIB.
- Arjita, I.P.D., M.A Widodo., E. Widjajanto. 2002. Pengaruh Kadar Glukosa Tinggi Terhadap Sintesa Nitric Oxide dari *Human Umbilicus Vein Endothelial Cells* Dengan Teknik Bioassay. Biosain Vol 2 No.1.
- Baratawidjaja, K.G. 2006. Imunologi Dasar edisi ketujuh. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Benchimol, S. 1989. Carcinoembryonic Antigen, A Human Tumor Marker, Functions as an Intercellular Adhesion Molecule. Cell, 57 pp. 327-34.
- Bevalender, G dan J. A. Ramaley. 1988. Dasar-Dasar Histologi. Alih bahasa: Wisnu Gunarso. Erlangga. Jakarta.
- Bevilacqua, M.P. 1987. Identification of an Inducible Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule. National Academic Science. USA. 84 pp. 9238-9242.
- Born V. dan J. Schwartz. 1997. Vascular Endothel Physiology, Pathology and Therapeutic Oppurtunities. Schattauer. Stuttgart.
- Bouloumié, A., T. Marumo., M. Lafonta., R. Busse. 1999. Leptin Induces Oxidative Stress in Human Endothelial Cells. Institut Louis Bugnard. German.
- Brian R., BR. Clapp., GM.Hirschfield. 2005. Inflammation and Endothelial Function Direct Vascular Effects of Human C-Reactive Protein on Nitric Oxide Bioavailability. Circulation 111:1530-1536.

- Campfield, L., F. Smith., Y. Gusez., R. Devos., P. Burn. 1995. Recombinant mouse ob Protein: Evidence for a peripheral Signal Linking Adiposity and Central Network. *Science* (269): 546-549.
- Cooke, JP dan R. K. Oka. 2002. Does Leptin Cause Vascular Disease? *Circulation* 106: 1904-1905.
- Cotran, R.S dan J.S. Pober. 1988. Endothelial Activation: Its Role in Inflammatory and Immune Reactions, in *Endothelial Cell Biology*, Simionescu and Simionescu, Eds. Plenum Press. New York. pp. 335-347.
- Cotran, R.S. 1986. Induction and Detection of a Human Endothelial Activation Antigen In Vivo. *J. Exp. Med.*, 164, pp. 661-666.
- Couillard C., G. Ruel., WR. Archer. 2005. Circulating Levels of Oxidative Stress Markers and Endothelial Adhesion Molecules in Men with Abdominal Obesity. *J Clin Endocrin Met* 10:1210.
- Ding, M. P., F. Feng., H. T. Hut. 2007. Effect of Puerarin on Expression of Nuclear Factor Kappa B After Cerebral Ischemia/Reperfusi in Rats. Departement of Medicine, Zhejiang University. China
- Harborne, JB. 1997. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerjemah: Kossasih Patmawinata dan Twang Soediro. ITB. Bandung.
- Harrison, K. 2002. Leptin. <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=154#>. Diakses tanggal 22 September 2007 pukul 05.55 WIB.
- 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.
- Isnaeni. 1999. Circulating Endotel dan Kadar MPA Serum Tikus Diabetes (Streptozotozin Induced Diabetic Rat). Majalah Kedokteran Unibraw. Volume XV. No. 1 (April). Malang.

Jha, H. C., V. Recklinghausen., F. Zilliken. 1995. Kudzu. Biochem. Pharmacol., 4, 1367.

Karaduman, M., C. Oktenli., U. Musabak., A. Sengul., Z. Yesilova., F. Cingoz., A. Olgun., S. Y. Sanisoglu., O. Baysan., O. Yildiz., A. Taslipinar., H. Tatar., M. Kutlu., M. Ozata. 2006. Leptin, Soluble Interleukin-6 Receptor, C-Reactive Protein and Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Level in Human Coronary Atherosclerotic Plaque. Clinical and Experimental Immunology. Turkey.

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.

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 Brawijaya. Malang.

Knudson, J. D., U. D. Dincer., C. Zhang., N. S. Albert., R. Hoshida., A. Picchi., M. Focardi., G. M. Dick., J. D. Tune. 2005. Leptin Receptor are Expressed in Coronary Arteries and Hyperleptinemia causes Significant Coronary Endothelial Dysfunction. Am. J. Physiol (289):H48-H56.

Kougias M. D., Hong Chai, M. D., Peter H., Lin M. D., Qizhi Y., Alan, B. L., Changyi, C. 2004. Effects of Adipocyte-Derived Cytokines on Endothelial Functions: Implication of Vascular Disease. Molecular Surgeon Research Center, Division of Vascular Surgery and Endovascular Therapy, Michael E. DeBakey Department of Surgery, Baylor College of Medicine, Houston. Texas.

Kurniasih, R dan A. Wijaya. 2002. Peran Radikal Bebas Pada Iskemia-Reperfusi Serebral atau Miokardium. Universitas

Padjadjaran. Bandung.

- Lau, D., H. Yan., M. Abdel-Hafez., A. Kermouni. 2002. Adipokines and The Paracrine Control of Their Production in Obesity and Diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: S111 (Abstract).
- Lau, D. C W., B. Dhillon., H. Yang., P. E. Szmitko., S. Verma. 2004. Adipokines: Molecular Links Between Obesity and Atherosclerosis. University of Toronto. Canada.
- Lawrence, G. S. 2007. Implikasi Klinis Disfungsi Endotel dan Radikal Bebas. Universitas Hasanudin. Makasar.
- 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.
- Libby, P., P. M. Ridker., A. Maseri. 2002. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105:1135-1143.
- Libby, P. 2005. Braunwald's Heart Disease A Textbook of Cardiovascular Medicine: The Vascular Biology of Atherosclerosis. Sevnt edition. Elsevier saunders. New York.
- Lodish, H., A. Berk., S.L Zipursky., P. Matsudaira., J. Darnell. 2004. Molecular Cell Biology. WH Freeman and Comp. New York.
- Loftul, IM., A. R. Naylor., S. Goodal., M. Crowther., L. Jones., PRF. Bell., MIM. Thompson. 2003. Increased Matrix Metalloproteinase-9 Acrivity in Unstable Carotid Plaques. *Stroke*.2003;31:40-47.
- Marcantonio, E. E dan R. O. Hynes. 1988. Antibodies to the Conserved Cytoplasmic Domain of the Integrin .beta.-1 Subunit React with Proteins in Vertebrates, Invertebrates and Fungi. *Journal Cell Biology* 106 pp. 1765-72.

Ma'ruf, A., Sarmanu., N. Hidajati. 2003. Studi Sekresi Leptin Sebagai Dasar Diet Penurunan Berat Badan Secara Fisiologis. Jurnal Penelitian Medika Eksakta Vol. 4 No. 3 Desember.

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.

Mazur, W. 1998. Phytoestrogens in Food-In Baillier's Clinical Endocrinology and Metabolism: Phytoestrogens. *Bailliere Tindall* (12):98-112.

Meezan, E., E. M. Meezan., K. Jones., R Moore., S. Barnes., dan J. K. Prasain. 2005. Contrasting Effects of Puerarin and Daidzin on Glucose Homeostasis in Mice. Department of Pharmacology & Toxicology. Alabama.

Ouchi N., S. Kihara., T. Funahashi. 2003. Reciprocal Association of C-Reactive Protein With Adiponectin in Blood Stream and Adipose Tissue. *Circulation* 107:671-674.

Peng, Y., J. Yuan., J. Ye. 2007. Determination of Puerarin, Deidzein and Genistein in *Puerariae Radix* and its Medicinal Preparations by CE-ED. American Laboratory. USA.

Prasain, J. K., K. Jones., N. Brissi., R. Moore., J. M Wyss., S. Barnes. 2004. Identification of Puerarin and Metabolites in Rats by Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrofotometry. *J. Agric. Food. Chem.* 2004, 52:3708-3712.

Quehenberger, P., M. Exner., Raute Sunder-Plassmann., K. Ruzicka., C. Bieglmayer., G. Endler., C. Muellner., W. Speiser., O. Wagner. 2002. Leptin Induced Endothelin-1 in Endothelial Cell In Vitro. *Circ. Res* 90: 711-718.

Rahmawati, A. 2006. Harga Diri Pada Remaja Obesitas. Psikologi Fakultas Kedokteran. Universitas Sumatra Utara.

- Robbin, M. dan E. J. Topol. 2001. Acute Coronary Syndromes. Second edition. Marcel Dekker, inc. New York.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis-An Inflammatory Disease. N Engl J Medd. 1999; 340:115-126.
- 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.
- Sargowo, D. 2003. Disfungsi Endotel Pada Penyakit Kardiovaskular. Bayumedia Publishing. Malang.
- Selvinna dan R. Setiabudy. 2005. Disfungsi Endotel dan Obat Anti Hipertensi. Cermin Dunia Kedokteran (147):20-25.
- 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. USA.
- Tedgui, A. dan Z. Mallat. 2006. Cytokines and Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U. 689, Cardiovascular Research Center Lariboisiere and University Paris 7. Paris.
- Trilaksani, W. 2003. Antioksidan: Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan. Term Paper Introductory Science Philosophy (PPS 702). IPB. Bogor.
- Vander, A., J. Sherman., D. Luciano. 2001. Human Physiology: The Mechanisms of Body Function. McGraw-Hill Higher Education. New York.
- Verma S., MR. Buchanan., T. Anderson. 2003. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. Circulation 108:2054-2059.

- White, J. dan D. Littmann. 1989. Viral Receptors of the Immunoglobulin Superfamily. *Cell*, 56 pp. 725-28.
- Widodo, M. A. 1995. Seminar Sehari Free Radical Update: Peranannya dalam Patogenesis dan Penuaan. FKUB. Malang.
- Wijaya, A. 1997. Leptin, TNF- α dan Reseptor Adrenergik- β 3. Prodia Diagnostict Educational Services 2:4-5.
- Wilson, W. R. dan M. A. Sarde. 2001. Current: Diagnosis and Treatment In Infectious Disease. Mc Graw Hill. New York.
- Yamasaki, K. 1988. Cloning and Expression of the Human Interleukin-6 (BSF-2/IFNB2) Receptor. *Science*, 241 pp. 825-28.
- Yudkin, JS., C. Stehouwer., ES. Coppack. 1999. C-Reactive Protein in Healthy Subjects: Associations With Obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction. A Potential Role for Cytokines Originating From Adipose Tissue? *Arteioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972-978.
- Zhang, S., S. Chen., Y. Shen., D. Yang., X. Liu., A. C. Sin-chi., H. Xu. 2006. Puerarin Induces Angiogenesis in Myocardium of Rat with Myocardial Infraction. *Laboratory in Chinese Medicine and Molecular Pharmacology*. China.
- Zhu, J., X. Wang., J. Z. Chen., Y. P. Shang., X. G. Guo., J. Sun. 2004. Effects of Puerarin on Number and Activity of Endothelial Progenitor Cells from Peripheral Blood. *Chinese Academy of Sciences*. China.

Lampiran 1. Analisis statistika

Descriptives

Ekspresi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minim um	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
L1P1	3	54.00	15.000	8.660	16.74	91.26	39	69
L1P2	3	92.00	40.731	23.516	-9.18	193.18	67	139
L1P3	3	123.67	38.501	22.229	28.02	219.31	85	162
L1P4	3	77.33	35.921	20.739	-11.90	166.57	47	117
L1P5	3	84.67	34.530	19.936	-1.11	170.44	45	108
L2P1	3	286.33	15.503	8.950	247.82	324.84	275	304
L2P2	3	192.33	4.619	2.667	180.86	203.81	187	195
L2P3	3	211.67	26.312	15.191	146.30	277.03	195	242
L2P4	3	207.67	25.106	14.495	145.30	270.03	184	234
L2P5	3	222.33	69.082	39.885	50.72	393.94	159	296
Total	30	155.20	81.003	14.789	124.95	185.45	39	304

ANOVA Ekspresi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	165873.467	9	18430.385	15.100	.000
Within Groups	24411.333	20	1220.567		
Total	190284.800	29			

Lampiran 1. (Lanjutan)

Post Hoc Test

Dependent Variable: Ekspresi

	(I) Interaksi	(J) Interaksi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	L1P1	L1P2	-38.000	28.5 26	.934	-139.01	63.01
		L1P3	-69.667	28.5 26	.353	-170.68	31.35
		L1P4	-23.333	28.5 26	.997	-124.35	77.68
		L1P5	-30.667	28.5 26	.982	-131.68	70.35
		L2P1	-232.333(*)	28.5 26	.000	-333.35	-131.32
	L1P2	L2P2	-138.333(*)	28.5 26	.003	-239.35	-37.32
		L2P3	-157.667(*)	28.5 26	.001	-258.68	-56.65
		L2P4	-153.667(*)	28.5 26	.001	-254.68	-52.65
		L2P5	-168.333(*)	28.5 26	.000	-269.35	-67.32
		L1P1	38.000	28.5 26	.934	-63.01	139.01
L1P3	L1P2	L1P3	-31.667	28.5 26	.978	-132.68	69.35
		L1P4	14.667	28.5 26	1.000	-86.35	115.68
		L1P5	7.333	28.5 26	1.000	-93.68	108.35
		L2P1	-194.333(*)	28.5 26	.000	-295.35	-93.32
		L2P2	-100.333	28.5 26	.052	-201.35	.68
	L1P3	L2P3	-119.667(*)	28.5 26	.013	-220.68	-18.65
		L2P4	-115.667(*)	28.5 26	.017	-216.68	-14.65
		L2P5	-130.333(*)	28.5 26	.006	-231.35	-29.32
		L1P1	69.667	28.5 26	.353	-31.35	170.68
		L1P2	31.667	28.5 26	.978	-69.35	132.68
	L1P4	L1P4	46.333	28.5 26	.822	-54.68	147.35
		L1P5	39.000	28.5 26	.924	-62.01	140.01

Lampiran 1. (Lanjutan)

	L2P1	-162.667(*)	28.5 26	.000	-263.68	-61.65
	L2P2	-68.667	28.5 26	.371	-169.68	32.35
	L2P3	-88.000	28.5 26	.122	-189.01	13.01
	L2P4	-84.000	28.5 26	.157	-185.01	17.01
	L2P5	-98.667	28.5 26	.059	-199.68	2.35
L1P4	L1P1	23.333	28.5 26	.997	-77.68	124.35
	L1P2	-14.667	28.5 26	1.000	-115.68	86.35
	L1P3	-46.333	28.5 26	.822	-147.35	54.68
	L1P5	-7.333	28.5 26	1.000	-108.35	93.68
	L2P1	-209.000(*)	28.5 26	.000	-310.01	-107.99
	L2P2	-115.000(*)	28.5 26	.018	-216.01	-13.99
	L2P3	-134.333(*)	28.5 26	.004	-235.35	-33.32
	L2P4	-130.333(*)	28.5 26	.006	-231.35	-29.32
	L2P5	-145.000(*)	28.5 26	.002	-246.01	-43.99
L1P5	L1P1	30.667	28.5 26	.982	-70.35	131.68
	L1P2	-7.333	28.5 26	1.000	-108.35	93.68
	L1P3	-39.000	28.5 26	.924	-140.01	62.01
	L1P4	7.333	28.5 26	1.000	-93.68	108.35
	L2P1	-201.667(*)	28.5 26	.000	-302.68	-100.65
	L2P2	-107.667(*)	28.5 26	.031	-208.68	-6.65
	L2P3	-127.000(*)	28.5 26	.007	-228.01	-25.99
	L2P4	-123.000(*)	28.5 26	.010	-224.01	-21.99
	L2P5	-137.667(*)	28.5 26	.003	-238.68	-36.65
L2P1	L1P1	232.333(*)	28.5 26	.000	131.32	333.35
	L1P2	194.333(*)	28.5 26	.000	93.32	295.35

Lampiran 1. (Lanjutan)

	L1P3	162.667(*)	28.5 26	.000	61.65	263.68	
	L1P4	209.000(*)	28.5 26	.000	107.99	310.01	
	L1P5	201.667(*)	28.5 26	.000	100.65	302.68	
	L2P2	94.000	28.5 26	.081	-7.01	195.01	
	L2P3	74.667	28.5 26	.272	-26.35	175.68	
	L2P4	78.667	28.5 26	.216	-22.35	179.68	
	L2P5	64.000	28.5 26	.462	-37.01	165.01	
L2P2	L1P1	138.333(*)	28.5 26	.003	37.32	239.35	
	L1P2	100.333	28.5 26	.052	-.68	201.35	
	L1P3	68.667	28.5 26	.371	-32.35	169.68	
	L1P4	115.000(*)	28.5 26	.018	13.99	216.01	
	L1P5	107.667(*)	28.5 26	.031	6.65	208.68	
	L2P1	-94.000	28.5 26	.081	-195.01	7.01	
	L2P3	-19.333	28.5 26	.999	-120.35	81.68	
	L2P4	-15.333	28.5 26	1.000	-116.35	85.68	
	L2P5	-30.000	28.5 26	.984	-131.01	71.01	
L2P3	L1P1	157.667(*)	28.5 26	.001	56.65	258.68	
	L1P2	119.667(*)	28.5 26	.013	18.65	220.68	
	L1P3	88.000	28.5 26	.122	-13.01	189.01	
	L1P4	134.333(*)	28.5 26	.004	33.32	235.35	
	L1P5	127.000(*)	28.5 26	.007	25.99	228.01	
	L2P1	-74.667	28.5 26	.272	-175.68	26.35	
	L2P2	19.333	28.5 26	.999	-81.68	120.35	
	L2P4	4.000	28.5 26	1.000	-97.01	105.01	
	L2P5	-10.667	28.5 26	1.000	-111.68	90.35	

Lampiran 1. (Lanjutan)

L2P4	L1P1	153.667(*)	28.5 26	.001	52.65	254.68
	L1P2	115.667(*)	28.5 26	.017	14.65	216.68
	L1P3	84.000	28.5 26	.157	-17.01	185.01
	L1P4	130.333(*)	28.5 26	.006	29.32	231.35
	L1P5	123.000(*)	28.5 26	.010	21.99	224.01
	L2P1	-78.667	28.5 26	.216	-179.68	22.35
	L2P2	15.333	28.5 26	1.000	-85.68	116.35
	L2P3	-4.000	28.5 26	1.000	-105.01	97.01
	L2P5	-14.667	28.5 26	1.000	-115.68	86.35
L2P5	L1P1	168.333(*)	28.5 26	.000	67.32	269.35
	L1P2	130.333(*)	28.5 26	.006	29.32	231.35
	L1P3	98.667	28.5 26	.059	-2.35	199.68
	L1P4	145.000(*)	28.5 26	.002	43.99	246.01
	L1P5	137.667(*)	28.5 26	.003	36.65	238.68
	L2P1	-64.000	28.5 26	.462	-165.01	37.01
	L2P2	30.000	28.5 26	.984	-71.01	131.01
	L2P3	10.667	28.5 26	1.000	-90.35	111.68
	L2P4	14.667	28.5 26	1.000	-86.35	115.68

Lampiran 1 . (Lanjutan)

Homogenous Subsets

Ekspresi

	Interaksi	N	Subset for alpha = .05			
			1	2	3	4
Tukey HSD(a)	L1P1	3	54.00			
	L1P4	3	77.33			
	L1P5	3	84.67			
	L1P2	3	92.00	92.00		
	L1P3	3	123.67	123.67	123.67	
	L2P2	3		192.33	192.33	192.33
	L2P4	3			207.67	207.67
	L2P3	3			211.67	211.67
	L2P5	3			222.33	222.33
	L2P1	3				286.33
Sig.			.353	.052	.059	.081

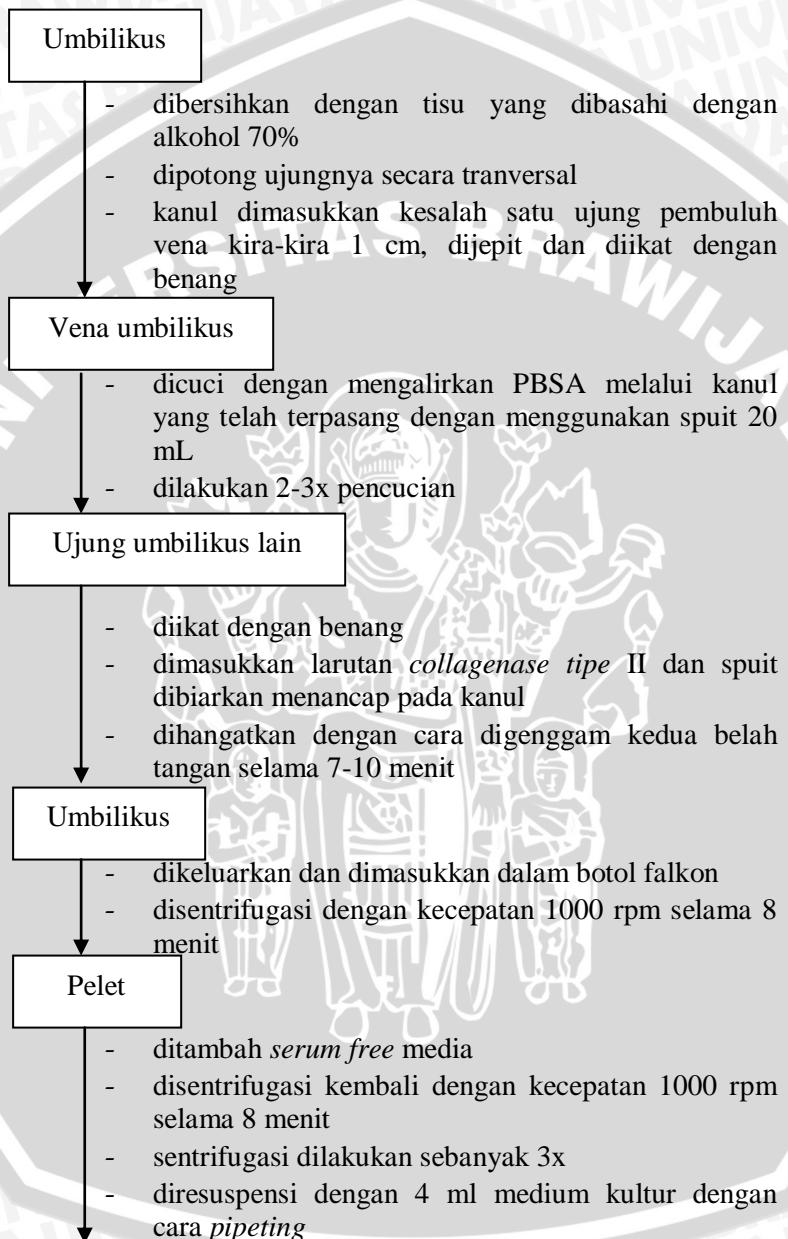
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

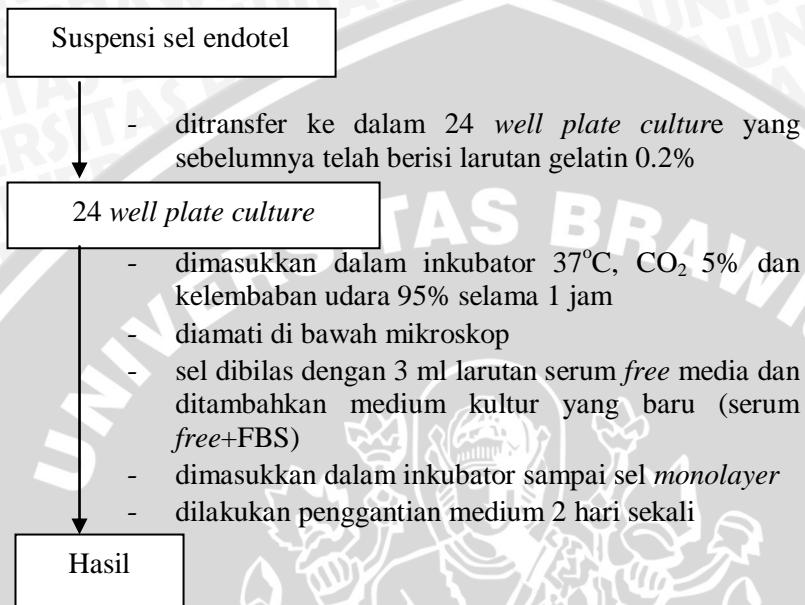
Keterangan :

	angka				
	1	2	3	4	5
L: leptin (ng/mL)	0	25	-	-	-
P: puerarin (uM)	0	5	25	200	525

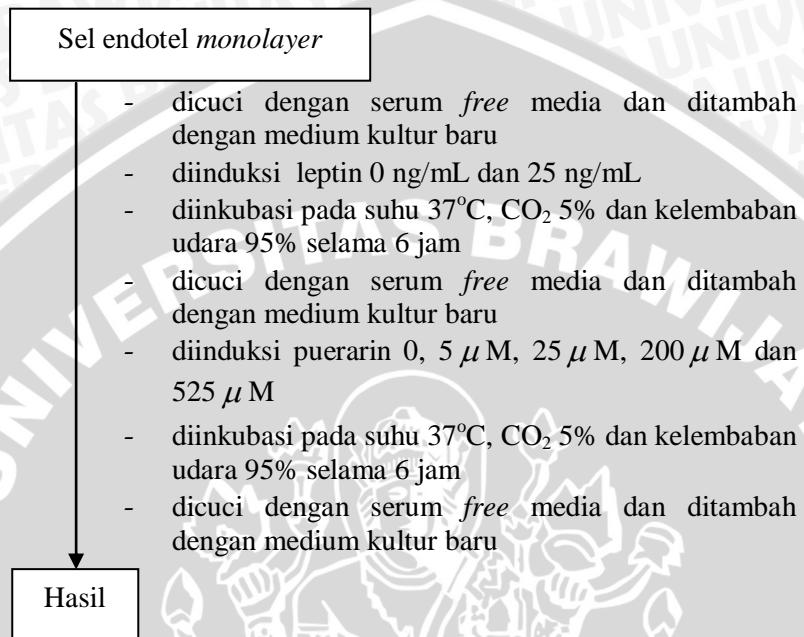
Lampiran 2. Pembuatan Kultur Sel Endotel (HUVECs)



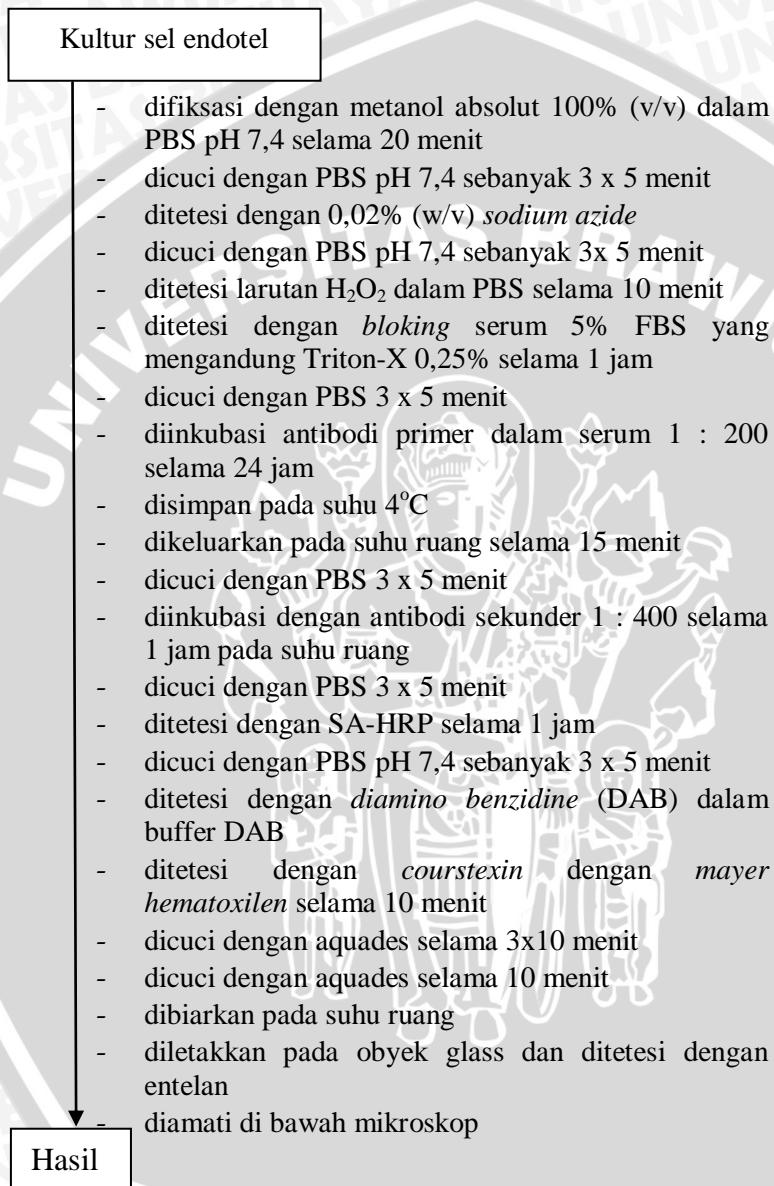
Lampiran 2. (lanjutan)



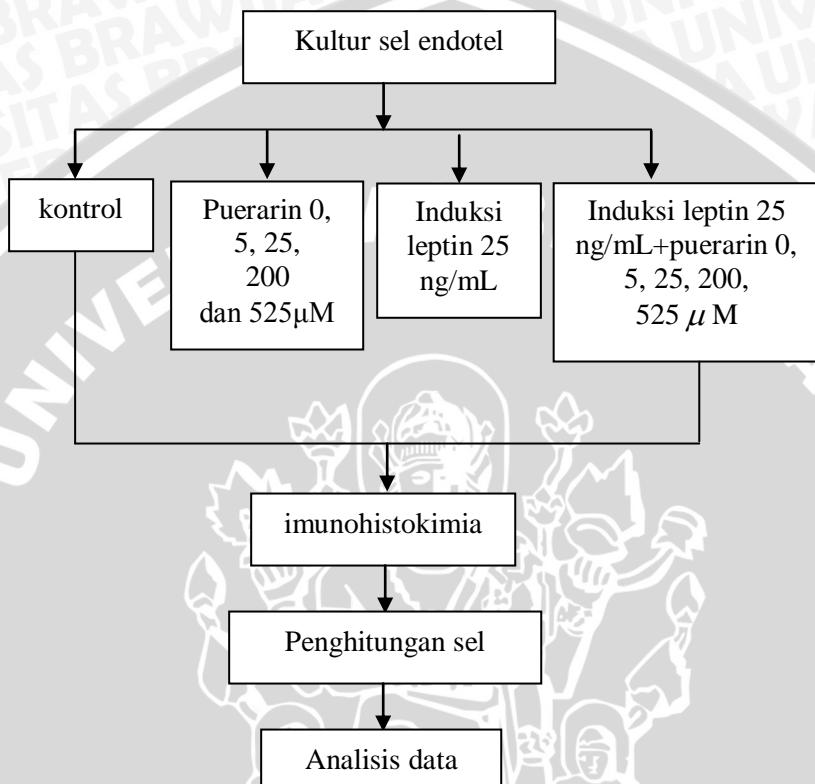
Lampiran 3. Skema Kerja Perlakuan leptin dan puerarin



Lampiran 4. Skema Kerja Imunositokimia



Lampiran 5. Skema Kerja Penelitian



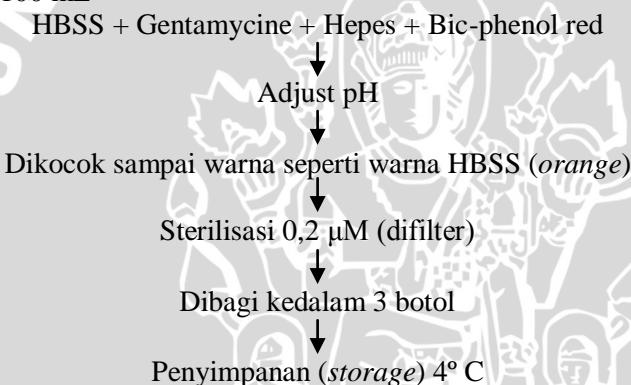
Lampiran 6. Komposisi larutan

Tabel 1. Komposisi Bahan Pembuatan *cord solution*

Nama larutan	Komposisi bahan	Volume pembuatan (100 mL)
<i>Cord solution</i>	HBSS	100
	Bicarbonat-phenol red	3,75
	Hepes	2,5
	Gentamycine	1,25

- Cara pembuatan *cord solution*:

HBSS diencerkan 10x dengan cara: 10 mL diambil dan ditambahkan sampai 100 mL



Tabel 2. Komposisi Bahan Pembuatan Serum *free*

Nama larutan	Komposisi bahan	Volume pembuatan (100 ml)
Serum <i>free</i>	M199	100
	Pen-strep	1,25
	Natrium-bicarbonat	5
	L-Glutamin	1,25

Keterangan : M199 diambil 20 ml dan diencerkan sampai 100 mL

Lampiran 6. (lanjutan)

Tabel 3. Komposisi Bahan Pembuatan Medium Kultur

Nama larutan	Komposisi bahan	Volume pembuatan (10 ml)
Medium kultur/komplit	Serum free	9
	FBS 10%	1

Tabel 4. Komposisi Bahan Larutan *Collagenase*

Nama larutan	Komposisi bahan
<i>Collagenase</i>	Stok collagenase
	Dionized water

