

**Pengaruh Likopen terhadap Penurunan Aktivitas Nuclear Factor kappa Beta (NF- $\kappa$ B) dan Ekspresi Intracelular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) pada Kultur HUVECs yang Dipapar Leptin**

***The Role Of Lycopene to Nuclear Factor Kappa Beta (Nf- $\kappa$ B) Activities and Intracellular Cell Adhesion Molecule-1 (Icam-1) Expressions on Leptin-Induced Endothelial Cell***

Heni Fatmawati<sup>1)</sup>, Satuman<sup>2)</sup>, Endang SW<sup>2)</sup>, A. Rudijanto<sup>3)</sup>, M. Rasjad Indra<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>*Biomedical/Histology Laboratory, Faculty of Medicine, University of Jember, Indonesia*

<sup>2)</sup>*Physiology Laboratory, Faculty of Medicine, University of Brawijaya, Indonesia*

<sup>3)</sup>*Departement of Internal Medicine of RSU Saiful Anwar / University of Brawijaya*

**ABSTRACT**

There is adipocytokine dysregulation on obesity such as amplified leptin, and reduced adiponectin at serum levels. Leptin has been proved to increase oxidative stress in endothelial cell. The adipocyte functions as an important secretory organ via *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) releasing a number of bioactive molecules such as leptin. Lycopene, an antioxidant, is presumed having the ability to block the atherogenesis mechanism, which is stimulated a proinflammatory cytokine and adhesion molecules ICAM-1 by NF- $\kappa$ B. Therefore, the aim of this research was to prove and to determine whether lycopene could decrease the NF- $\kappa$ B and ICAM-1 expression in *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) culture induced by 500 ng/mL leptin. In vitro study used primary culture of the HUVECs were divided in to 7 groups, there were (1) 0 ng/mL leptin and 0  $\mu$ M lycopene, (2) induced by 500 ng/mL leptin for 12 hours, (3) induced by leptin and lycopene with concentration 10; 25; 40; 55 and 75  $\mu$ M for 12 hours. Then the identification of NF- $\kappa$ B was applied by using imunocytochemistry compared with ELISA procedure on cell endothel culture lysate and ICAM-1 expression was measured by using RT PCR. It was showed that lycopene 25  $\mu$ M decreased NF- $\kappa$ B level and ICAM-1 expression significantly in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) culture induced by leptin 500 ng/mL. Leptin was increased NF- $\kappa$ B and ICAM-1 expression in HUVECs culture and was decreased by lycopene. Optimum dose of lycopene is 25  $\mu$ M.

Keywords: Lycopene, obesity, leptin, NF- $\kappa$ B, ICAM-1

**PENDAHULUAN**

Penyakit kardiovaskuler merupakan masalah kesehatan yang masih menjadi pembunuh utama di negara-negara maju dan negara berkembang termasuk Indonesia (Azwar 2004). Salah satu faktor resiko yang diketahui dapat meningkatkan penyakit kardiovaskuler yaitu obesitas atau kegemukan. Data tentang obesitas di Indonesia berdasarkan survei nasional yang dilakukan pada tahun 1996/1997 di ibukota seluruh propinsi Indonesia menunjukkan bahwa 8,1% penduduk laki-laki dewasa ( $\geq$ 18 tahun) mengalami overweight (BMI 25-27) dan 6,8% mengalami obesitas, 10,5% penduduk wanita dewasa mengalami overweight dan 13,5% mengalami obesitas.

Pada kelompok umur 40-49 tahun overweight maupun obesitas mencapai puncaknya yaitu masing-masing 24,4% dan 23% pada laki-laki dan 30,4% dan 43% pada

wanita (Depkes RI 2004). Obesitas khususnya obesitas visceral selama ini diketahui sebagai penyebab utama meningkatnya angka kesakitan dan kematian.

Penelitian terdahulu membuktikan bahwa terdapat hubungan antara obesitas dan aterosklerosis. Zat yang merangsang inflamasi maupun protein dihasilkan sel radang terlibat secara langsung sejak awal hingga proses terjadinya komplikasi dari aterosklerosis. Fase awal kunci pembentukan aterosklerosis (atherogenesis) dimulai dari penumpukan lekosit terutama monosit dan T lymphosit pada dinding pembuluh darah yang dipicu oleh adipokine (sitokin adiposit) yaitu leptin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi peningkatan leptin pada kondisi obesitas (David *et al.* 2005).

Leptin merupakan protein yang dikode oleh gen Ob, yang diproduksi terutama oleh adiposit dan berperan pada pengaturan *intake* makanan

dan penggunaan energi terutama melalui efek hipotalamus (Barrata 2002).

Pada kondisi obesitas, sekresi leptin di tubuh sangat berlebih. Gen yang memproduksi leptin disebut gen *obese (ob)* yang memainkan peran penting dalam regulasi berat badan dan faktor inflamasi (keradangan) (Indra 2006). Keradangan terjadi karena leptin mengaktifkan faktor transkripsi *Nuclear Factor Kappa Beta (NF-κB)* melalui jalur *mitogen-activated protein kinase (MAPK)* dan NF-κB yang teraktifasi akan menginduksi terbentuknya protein-protein sistem imun dan molekul/ zat perantara yang pada akhirnya meningkatkan progresifitas aterosklerosis atau memicu ruptur dari plak aterosklerosis dan mengakibatkan pembuntuan arteri koroner (infark miokard), pembuluh darah otak (stroke) dan lain-lain. Mengingat peradangan menjadi faktor utama dari patogenesis aterosklerosis maka NF-κB merupakan faktor molekuler yang tepat untuk pencegahan dan pengobatan aterosklerosis (David et al. 2005).

Likopen merupakan mikronutrien dari bahan makanan yang biasa dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia yaitu tomat. Tomat sebagai salah satu bahan makanan yang mudah dan murah serta sudah dikenal luas masyarakat sangat potensial untuk dimanfaatkan sebagai preventif aterosklerosis. Likopen adalah antioksidan kuat dari golongan karotenoid dengan kandungan terbanyak terdapat pada buah tomat dan produk olahannya.

Potensi likopen sebagai antioksidan akan meredam spesies oksigen reaktif yang akan mengurangi kerusakan oksidatif pada lipid (termasuk lipoprotein dan lipid membran), protein dan DNA serta mencegah oksidasi dari kolesterol low-density lipoprotein (LDL) sehingga akan menghambat perkembangan aterosklerosis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa likopen dapat digunakan sebagai antioksidan, menghambat oksidasi LDL, menghambat adesi, invasi dan migrasi sel hepatoma secara *in vitro* dan menghambat IGF-1 pada sel epitel prostat (Hwang & Lee 2006; Ute et al. 2003; Balz 2003). Tetapi sampai saat ini belum diketahui peranan likopen terhadap dampak yang disebabkan oleh obesitas dan belum diketahui peranan likopen terhadap nutrigenomik.

Hasil penelitian pendahuluan membuktikan bahwa pemberian pasta tomat pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar mampu

menurunkan pembentukan sel busa (*foam cell*) pada pembuluh darah dan menurunkan kadar F2-Isoprostane (Handayani 2006). Karena itu diperlukan kajian lebih lanjut untuk mengetahui apakah likopen juga berpengaruh pada aktivasi NF-κB dan gen transkripsi yang dihasilkannya. Gen transkripsi yang akan diamati adalah mRNA sICAM-1.

## METODE

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental*) yang dikerjakan di laboratorium secara *invitro* dengan menggunakan rancangan percobaan *Randomized Group Only Design*. Penelitian ini dilakukan melalui dua tahap. Tahap I mengamati pengaruh likopen terhadap aktivasi NF-κB yang berperan di dalam aterosklerosis pada sel endotel yang dipapar oleh leptin. Tahap II mengamati pengaruh likopen dosis optimal terhadap faktor transkripsi mRNA sICAM-1 yang berperan di dalam aterosklerosis.

### Kultur sel endotel manusia (HUVECs)

Metode kultur ini merujuk Bouloumie et al. (1999). Umbilicus dibersihkan dari jaringan dan sisa darah dengan kasa steril yang dibasahi dengan alkohol 70%. Masing-masing ujung umbilicus dipotong secara transversal sehingga terlihat adanya dua pembuluh arteri dan vena dimana pembuluh vena memiliki dinding yang lebih tebal, besar dan elastis. Kanul dimasukkan salah satu ujung pembuluh vena kira-kira 1 cm lalu diikat erat dengan benang. Pembuluh vena dicuci dengan PBS A melalui kanul yang telah terpasang menggunakan spuit 20 cc. Hal ini dilakukan 2-3 kali. Setelah bersih, ikat ujung umbilicus yang lain dengan ikatan kuat atau diklem. Larutan Collagenase tipe II dimasukkan dan spuit dibiarkan menancap pada kanul. Selanjutnya umbilicus dihangatkan dengan cara didekap kedua belah tangan selama 10 menit atau diinkubasi.

Larutan Collagenase yang mengandung endotel dikeluarkan dari umbilicus dengan cara menyedot melalui spuit yang terpasang pada ujung kanul. Kemudian Collagenase tersebut dimasukkan tabung sentrifuse steril 15 cc. Umbilicus dibilas dengan 8 cc larutan PBS-A untuk membilas sel endotel yang tersisa. Kemudian larutan dibilas kembali yang ditambahkan ke tabung sentrifuse yang berisi larutan Collagenase. Larutan yang mengandung endotel disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit sehingga diperoleh pellet yang berisi sel endotel. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan 4 mL medium kultur pada pellet dan diresuspendi dengan cara pipeting sehingga sel endotel terpisah. Larutan dipindahkan ke dalam flask 25 cm<sup>2</sup> yang telah dilapisi larutan Gelatin 0,2 % kemudian dimasukkan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5 % pada suhu 37°C selama 30 menit.

**Perlakuan induksi leptin pada HUVECs**

Metode ini bertujuan untuk membuat model sindroma metabolik pada sel kultur endotel secara *in vitro*. Metode induksi leptin pada sel kultur endotel manusia merujuk pada Spritzer *et al.* (2001). Sel endotel diinkubasi dengan 500 µg/ml *human recombinant leptin* (hiperleptin) selama enam jam pada suhu 37°C.

**Perlakuan likopen pada sel endotel**

Metode perlakuan likopen ini merujuk pada Hwang & Lee (2006). Likopen diperoleh dari HyperChem Singapura. Sel endotel yang sudah monolayer diinkubasi dengan likopen dengan beberapa dosis. Dosis yang diberikan adalah sebagai berikut kontrol, 10 µM, 25, 40, 55 dan 70 µM. Metode pemberian likopen yaitu likopen diperlakukan setelah sel diinkubasi dengan leptin selama 6 jam.

**Pengukuran kadar protein Intrasel NFκB dengan ELISA**

Pengukuran kadar NFκB dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan prosedur dalam *Human NFκB Assay Kit* (Assay Design, USA). Selanjutnya ditentukan nilai absorbansi standar serta nilai absorbansi sampel menggunakan *ELISA readers* pada OD 492 nm.

**Identifikasi protein NFκB dan MAPK dengan imunositokimia**

Metode ini merujuk Melotti *et al.* (2001). Kultur sel endotel masing-masing perlakuan difiksasi dengan formalin 10 % (v/v) dalam PBS pH 7,4 selama 20 menit. Sel dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali selama masing-masing 5 menit. Sel ditetesi dengan 0,02 % (w/v) sodium azide. Sel ditetesi dengan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam PBS selama 10 menit kemudian dilakukan *blocking serum* 5 % FBS yang mengandung Triton-X 0,25 % selama 1 jam. Setelah diinkubasi dengan antibodi primer dalam serum 1 : 500 selama 24 jam, sel disimpan pada suhu 4°C. Kemudian sel diinkubasi dengan antibodi sekunder anti rabbit 1 : 500 selama 1 jam pada suhu ruang dan dicuci dengan. Sel ditetesi dengan SA-HRP selama 40 menit kemudian dicuci dengan PBS 3 kali selama masing-masing 5 menit. Sel ditetesi dengan Diamino Benzidine (DAB) dalam buffer DAB menggunakan counterstain Mayer hematoxilen selama 10 menit. Sel dicuci dengan air kran kemudian dicuci dengan aquades selama 10 menit. Sel diletakkan pada *object glass*, ditetesi dengan entellan kemudian diamati menggunakan mikroskop. Ekspresi NF-κB diamati sebagai warna coklat, dan kerapatan warna merupakan indikator peningkatan ekspresi yang diamati oleh peneliti dan 2 peneliti lain yang independen.

**Isolasi mRNA pada sel kultur dan RTPCR**

Pada masing-masing perlakuan dilakukan isolasi mRNA. Media dibuang dan sel dicuci dengan 5-10 ml PBS dingin. Buffer PBS dibuang dan sel

dilisiskan dengan reagen *monophasic lysis* (ML). Suspensi sel dipindah ke tabung Falcon dan dihomogenisasi selama 15-30 menit pada suhu ruang. Suspensi diinkubasi 5 menit pada suhu ruang ditambahkan 0,2 ml kloroform / ml reagen ML. Suspensi diputar 12.000 rpm, 15 menit, 4°C. Supernatan dipindah pada tabung baru. Presipitan RNA ditambahkan dengan 0,25 volume isopropanol dan 0,25 volume presipitan RNA dalam 1 ml reagen ML dan dihomogenasi suhu ruang selama 10 menit. Suspensi diputar 12.000 rpm, 10 menit, 4°C. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 75 % etanol. Pelet dikeringkan dan ditambahkan dengan diethylpyrocarbonate (DEPC). Simpan RNA pada -30°C. Sampel mRNA selanjutnya dilakukan *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR). RT-PCR digunakan untuk merubah mRNA menjadi cDNA.

**RT PCR**

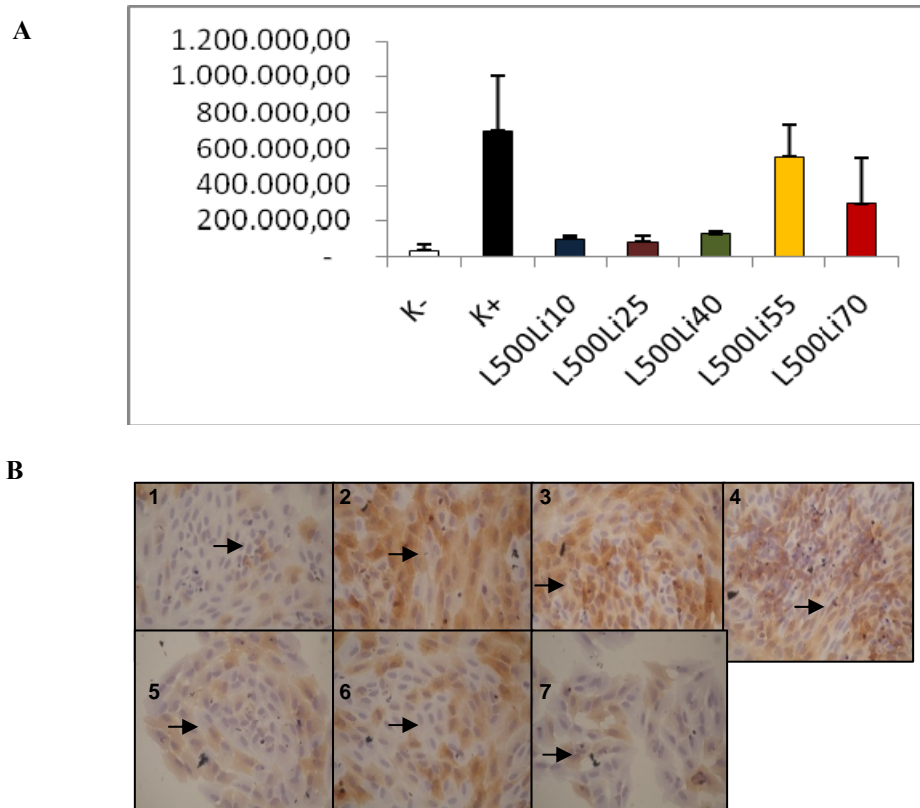
Metode RTPCR dan primer ini merujuk pada Melotti *et al.* 2001. Primer yang digunakan adalah hICAM-1 R (5'-CTTCTGAGACCTCTGGCTTC-3') dan F (5'-TACCAGCTCCAGACCTTTGT-3'). Sampel diamplifikasi melalui PCR dengan 94°C, 58°C, 72°C selama 30 menit setiap siklus dan diulang sebanyak 30 siklus). Produk PCR disepari dengan elektroforesis 2 % agarosa. Evaluasi sel yang mengekspresikan ICAM-1 dikuantifikasi dari densitas warna band pada gel agarosa menggunakan *process imaging analysis* dengan *corel draw paint 12*.

**Analisis data**

Data hasil penelitian akan disajikan dalam mean±SD. Data penelitian merupakan data kuantitatif dan kualitatif. Semua data penelitian akan dianalisis dengan menggunakan *software* SPSS versi 14. Untuk data kuantitatif, analisis menggunakan *one-way* ANOVA dilanjutkan dengan uji DMRT untuk mengetahui perbedaan antar variabel pada masing-masing perlakuan.

**HASIL DAN PEMBAHASAN****Hasil evaluasi ekspresi protein intrasel NF-κB dengan ELISA dan imunohistokimia**

Ekspresi NFκB pada kultur sel endotel (HUVECs) dilakukan dengan teknik imunositokimia. Ekspresi NFκB dideteksi dari warna coklat pada sitoplasma sel endotel seperti yang terlihat pada Gambar 1. Pengukuran kadar NFκB intrasel juga dikomparasi dengan metode ELISA menggunakan *Human NFκB ELISA Kit*. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa leptin mampu meningkatkan kadar protein intrasel NFκB secara nyata (p<0.0) seperti yang terlihat pada kelompok kontrol positif.

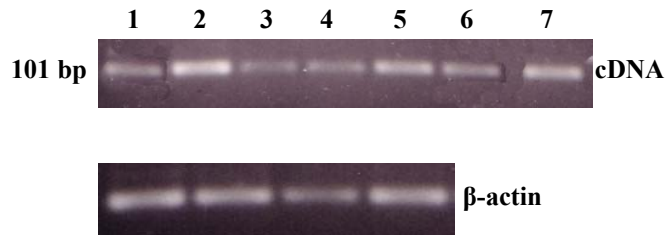


Gambar 1. Identifikasi protein intrasel NFκB aktif pada HUVEC yang telah diinduksi leptin dan dipapar beberapa dosis likopen secara ELISA (A) dan imunositokimia (B).Keterangan: 1.leptin 0 ng/ml (K-), 2. leptin 500 ng/ml (K+), 3. leptin 500 ng/ml + likopen 10 μM, 4. leptin 500 ng/ml + likopen 25 μM, 5. leptin 500 ng/ml + likopen 40 μM, 6. leptin 500 ng/ml + likopen 55 μM, 7. leptin 500 ng/mL + likopen 70 μM.

Tabel 1. Hasil analisis statistik kuantifikasi protein intrasel NFκB pada HUVEC yang telah diinduksi leptin dan dipapar beberapa dosis likopen dengan metode *Human NFκB ELISA Kit*.

	Protein intrasel NFκB (ng/mL) (Mean±SD)*
Kontrol negatif	36 ± 31,61 <sup>a</sup>
Kontrol positif	695 ± 303,67 <sup>c</sup>
L500Li10	99 ± 16,16 <sup>ab</sup>
L500Li25	83 ± 35,16 <sup>a</sup>
L500Li40	131 ± 13,23 <sup>ab</sup>
L500Li55	554 ± 174,02 <sup>bc</sup>
L500Li70	296 ± 249,54 <sup>abc</sup>

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

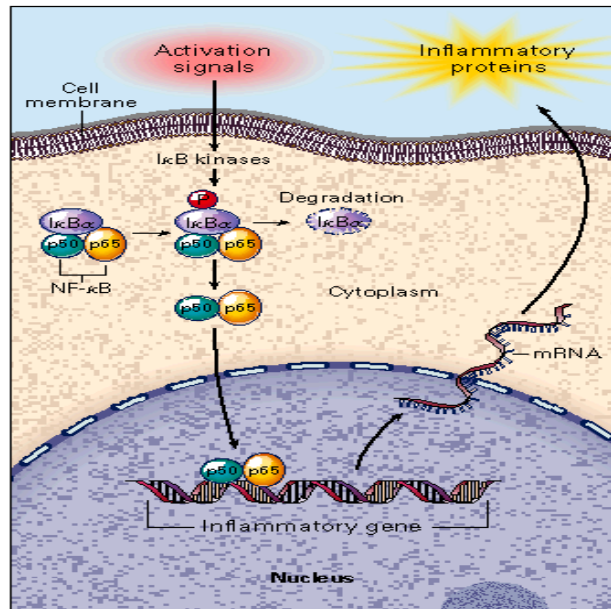


Gambar 2. Hasil RT-PCR hICAM-1 pada HUVEC yang telah diinduksi leptin dan dipapar beberapa dosis likopen. Didapatkan cDNA hICAM-1 dengan ukuran 101 bp. (1. kontrol, 2. kontrol positif, 3. likopen 10  $\mu$ M, 4. likopen 25  $\mu$ M, 5. likopen 40  $\mu$ M, 6. likopen 55  $\mu$ M dan 7. likopen 70  $\mu$ M).

Tabel 2. Persentase jumlah sel yang mengekspresikan gen ICAM-1 berdasarkan densitas warna elektroforesis pada HUVEC yang telah diinduksi leptin dan dipapar beberapa dosis likopen .

Kelompok	Ekspresi gen ICAM-1 Mean $\pm$ SD*
Kontrol negatif	2,86 $\pm$ 0,15 <sup>bc</sup>
Kontrol positif	4,27 $\pm$ 0,38 <sup>d</sup>
Likopen 10 $\mu$ M	1,58 $\pm$ 0,35 <sup>ab</sup>
Likopen 25 $\mu$ M	1,12 $\pm$ 0,26 <sup>ab</sup>
Likopen 40 $\mu$ M	2,92 $\pm$ 0,17 <sup>bc</sup>
Likopen 55 $\mu$ M	3,12 $\pm$ 0,69 <sup>c</sup>
Likopen 70 $\mu$ M	3,42 $\pm$ 0,21 <sup>bc</sup>

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $\alpha$  0,05)



Gambar 3. Diagram skematik aktifasi NF-kB (Barnes & Karin 1997).

Hasil analisis menunjukkan bahwa leptin dapat meningkatkan kadar protein intrasel NF $\kappa$ B secara signifikan dibandingkan dengan kontrol. Pemberian likopen dosis 10, 25 dan 40  $\mu$ M mampu menghambat peningkatan kadar intrasel NF $\kappa$ B secara signifikan pada sel endotel yang dipapar 500 ng/mL leptin dibandingkan dengan pemberian leptin saja (kontrol positif). Namun kadar NF $\kappa$ B meningkat kembali pada pemberian likopen 40  $\mu$ M, 55  $\mu$ M dan turun kembali dengan pemberian likopen dosis 70 $\mu$ M meskipun perubahan ini tidak signifikan dengan kontrol leptin. Hasil analisis menunjukkan bahwa dosis optimum dalam menghambat aktivitas NF $\kappa$ B adalah 10-25  $\mu$ M.

#### Evaluasi Ekspresi ICAM-1 menggunakan RT PCR

Hasil elektroforesis hICAM-1 menggunakan metode RT-PCR didapatkan gen cDNA ICAM-1 dengan ukuran 101 bp. Berdasarkan data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa leptin dapat meningkatkan ekspresi gen ICAM-1 pada kultur sel endotel seperti yang terlihat pada kontrol positif secara signifikan. Pemberian likopen, menurunkan ekspresi gen cDNA ICAM-1 pada sel endotel pada konsentrasi mulai 10  $\mu$ M dan 25  $\mu$ M dibandingkan dengan kontrol positif (leptin) secara nyata. Ekspresi gen cDNA ICAM-1 kembali meningkat pada sel endotel setelah diberi likopen 40  $\mu$ M, 55  $\mu$ M dan 70  $\mu$ M namun tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Dari hasil analisis menunjukkan, dosis optimum likopen menurunkan ekspresi ICAM-1 adalah 10-25  $\mu$ M.

Likopen merupakan antioksidan kuat yang dapat menetralkan radikal bebas, khususnya turunan dari oksigen dan berperan dalam mencegah aterosklerosis dan dikaitkan dengan penyakit arteri koronaria. Likopen dapat melindungi kerusakan oksidatif pada lipid. Balz (2003) juga menyatakan likopen yang dikonsumsi sendiri maupun bersama-sama dengan antioksidan lain dapat menghambat proses oksidasi LDL. Pada penelitian lain juga dilaporkan bahwa suplementasi likopen 60 mg/hari yang diberikan pada pria selama 3 bulan berturut-turut akan menurunkan plasma kolesterol LDL secara nyata. Selain itu secara *in vitro* juga ditunjukkan bahwa likopen dapat menurunkan sintesis kolesterol dan meningkatkan aktivitas reseptor LDL di dalam makrofag (Middleton *et al.* 2000).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa leptin dapat menginduksi aktivitas NF- $\kappa$ B seperti pada Tabel 1. Leptin mampu meningkatkan kadar protein intrasel NF $\kappa$ B pada kelompok kontrol positif secara nyata ( $p < 0.05$ ). Perlakuan likopen dosis 10 dan 25  $\mu$ M mampu menurunkan kadar intrasel NF $\kappa$ B secara signifikan pada sel endotel yang dipapar 500 ng/mL leptin dibandingkan dengan pemberian leptin saja (kontrol positif). Namun kadar NF $\kappa$ B meningkat kembali pada pemberian likopen 40  $\mu$ M, 55  $\mu$ M dan turun kembali dengan pemberian likopen dosis 70 $\mu$ M meskipun perubahan ini tidak signifikan dengan kontrol leptin. Hasil analisis menunjukkan bahwa dosis optimum dalam menghambat aktivitas NF $\kappa$ B adalah 10-25  $\mu$ M.

Dugaan mekanisme induksi leptin pada sel endotel adalah leptin ditangkap oleh reseptor leptin Ob-Rb pada sel. Selanjutnya leptin mengaktifasi AMPK yang merupakan enzim *fuel sensing* yang akan teraktivasi apabila terjadi peningkatan rasio AMP/ATP. Aktivasi fosforilasi AMPK menghambat aktivitas ACC yang selanjutnya menghambat sintesis *Malonyl-CoA*, mengaktifkan CPT 1 (enzim kunci dalam oksidasi asam lemak) (Minokoshi & Khan 2003). Hal ini mengakibatkan peningkatan oksidasi asam lemak di mitokondria sehingga meningkatkan produksi ROS berupa superoksida mitokondrial. Menurut Epstein (2003) ROS selanjutnya mengaktifkan faktor transkripsi NF- $\kappa$ B. ROS menginisiasi *cascade* serin kemudian menyebabkan terjadinya fosforilasi I $\kappa$ B (penambahan fosfat pada I $\kappa$ B). Selanjutnya ikatan NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B terlepas dan heterodimer NF- $\kappa$ B (p50 dan p65) bebas. Terlepasnya ikatan ini menyebabkan NF- $\kappa$ B berpindah atau bertranslokasi ke dalam inti sel (nukleus) secara otomatis. Aktivasi NF- $\kappa$ B menginduksi transkripsi inflamatori gen diantaranya sitokin proinflamatori TNF $\alpha$  dan beberapa molekul adesi seperti ICAM-1 maupun VCAM.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa leptin dapat meningkatkan aktivasi NF $\kappa$ B. Pada penelitian ini, adanya penurunan aktifitas NF- $\kappa$ B setelah pemberian likopen, menunjukkan terdapat peran likopen terhadap hambatan pada aktifitas NF- $\kappa$ B. Dalam hal ini didapatkan dosis optimum adalah 10- 25  $\mu$ M. Hal ini membuktikan bahwa likopen sebagai antioksidan merupakan *scavenger* ROS yang meningkat akibat paparan leptin, disamping

juga menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B dengan penghambatan degradasi I $\kappa$ B dan terjadinya fosforilase. Akibatnya dimer dari NF- $\kappa$ B (p50 dan p65) tidak terlepas dan selanjutnya tidak terjadi translokasi p50 dan p65 ke dalam nukleus. Dengan penurunan aktivitas p65 NF- $\kappa$ B maka transkripsi gen inflamatori serta sintesis beberapa mediator inflamasi VCAM-1 dan ICAM-1 menjadi turun (Gambar 3).

Menurut Quehenberger *et al.* (2002), leptin dengan konsentrasi 25 ng/mL dapat mengakibatkan terjadinya disfungsi pada kultur sel endotel. Disfungsi endotel yang dimulai dengan proses inflamasi, diawali dengan aktivasi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B oleh ROS sebagai akibat induksi leptin. Hal ini sejalan dengan penelitian Bouloumie *et al.* (1999), bahwa leptin meningkatkan produksi ROS intrasel serta mengakibatkan aktivasi NF- $\kappa$ B pada sel endotel manusia. Menurut Tak & Firestein (2001), salah satu jalur yang diaktifkan oleh ROS adalah NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B bertindak sebagai regulator inflamasi. Saat teraktivasi, NF- $\kappa$ B merangsang transkripsi gen inflamatori, dan dapat terjadi pada sel endotel, otot polos dan makrofag. Inflamasi sendiri menjadi faktor utama dari patogenesis terjadinya berbagai penyakit degeneratif (Barnes & Karin 1997, Collins & Myron 2001, Jacobson & Mc. Carthy 2002).

Hasil penelitian terhadap ekspresi ICAM-1 menunjukkan terdapat penurunan ekspresi ICAM-1 pada kultur endotel yang dipapar leptin setelah pemberian likopen 10-25  $\mu$ M. Likopen sebagai *scavenger* ROS, menyebabkan ROS tidak bersifat reaktif lagi. ROS yang tidak reaktif tidak akan mampu lagi mengaktifasi NF- $\kappa$ B sehingga transkripsi gen mediator inflamasi ICAM-1 dan vasokonstriktor ET-1 turun (Lawrence, 2004).. Penurunan ekspresi molekul adesi ICAM-1 pada endotel akan menghambat perkembangan proses aterosclerosis selanjutnya.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa likopen dapat menghambat peningkatan kadar NF- $\kappa$ B dan ekspresi gen ICAM-1 pada sel endotel akibat paparan leptin dengan dosis optimum likopen yaitu 25 dan atau 40  $\mu$ M.

### Ucapan terimakasih

Terima kasih kami sampaikan kepada Departemen Pendidikan Tinggi melalui Lembaga Penelitian dan Pengembangan Program Hibah Bersaing 2008 yang telah memberikan dana penelitian. Terima kasih juga kepada Dr.dr.Budi Siswanto, SpOG dan para partisipan atas kerjasamanya.

### DAFTAR PUSTAKA

- Azwar A. 2004. *Tubuh Sehat Ideal dari Segi Kesehatan*. Makalah disampaikan pada Seminar Kesehatan Obesitas, Senat Mahasiswa Fakultas Kesehatan Masyarakat UI, Sabtu, 15 Februari 2004. h. 1-7.
- Balz F 2003. *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins*. The Linus Pauling Institute.
- Barnes PJ & Karin M. 1997. Nuclear Factor-Kappa B-A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *The New England Journal of Medicine* **336**(15):1066-1071.
- Barrata M. 2002. Leptin-from a signal of adiposity to a hormone mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit* **8** :RA 282-292
- Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M & Busse R. 1999. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* **13**: 1231-1238,
- Collins T & Myron I.C., 2001. NF- $\kappa$ B: Pivotal Mediator or Innocent bystander in Atherogenesis?. *J Clin Invest.* **107**(3): 255-264.
- Departemen Kesehatan RI. 2004. *Kecenderungan Masalah Gizi dan Tantangan di Masa Datang*. Jakarta.
- David CW, Lau, Bikramjit D, Hongyun Y, Paul ES & Subodh V. 2005. Adipokines:molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol.* **288**:H2031-H2041
- Epstein, F. H. 2003. Nuclear Factor Kappa beta a Pivotal transcription factor in chronic inflammatory Disease. *NEJM.* **363**(15): 1066-1071.
- Handayani D. 2006. Pengaruh pasta tomat terhadap sel busa (*foam cell*) pada tikus diet aterogenik. *Jurnal Kedokteran Universitas Brawijaya*. Vol. **III**:7-14.
- Hwang H & Lee H J. 2006. Inhibitory Effects of Likopen on the Adhesion, Invasion, and Migration of SK-Hep1 Human Hepatoma Cells. *The Society for Experimental Biology and Medicine*.
- Indra MR. 2006. *Adiposit, obesitas dan masalah kesehatan global di era millenium*. Edisi Pertama. Penerbit. Lab. Ilmu Faal FK. UNIBRAW. Malang. ISBN : 979-25-9010-2.
- Jacobson, M. D dan Mc Carthy Ni. 2002. *Apoptosis The Molecular Biology of Programmed Cell Death*. Oxford University Press, inc. New York.

- Lawrence GS. 2004. Implikasi Klinis Disfungsi Endotel dan Radikal Bebas. *J. Med Nus.* **25**: 94-102.
- Middleton E, Chithan K & Theoharis CT. 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.
- Minokoshi Y & Khan BB. 2003. Role of AMP-Activated Protein Kinase in Leptin-induced Fatty Acid Oxidation in Muscle. *Biochemical Society Transactions* Vol. 31, part 1.
- Melotti PE, Nicolis A, Tamanini R, Rolfini AP & Cabrini G. 2001. Activation of NF- $\kappa$ B mediates ICAM-1 induction in respiratory cells exposed to an adenovirus-derived vector. *Gene Therapy*. **8**(18) : 1436-1442.
- Quehenberger P, Markus E, Sunder-Plassmann R, Katharina R, Christian B, Georg E Claudia M, Wolfgang S & Oswald W. 2002. Leptin Induces Endothelin-1 in Endothelial Cells In Vitro. *Circ Res*. **90**:711-718.
- Spritzer M, Poy D, Wiltgen, M & Capp E. 2001. Leptin Concentration in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: Influence on LH and relationship with hormonal, metabolic and anthropometric measurement. *Human Repro.* **16**(7): 1340-1346
- Tak PP & Firestein GS. 2001. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammation disease. *The Journal of Clinical Investigation*. **107** (1): 7-10.
- Ute CO, Estibaliz OM, Ana MC, Jason PE, Albert van der V, Giuseppe VCE.C & Lester P. 2003. Lycopene inhibits the growth of normal human prostate epithelial cells in vitro. *Biochemical and Molecular Action of Nutrients*.