

Intervensi Nikotin terhadap Level *Low Density Lipoprotein*, dan Ekspresi UCP-1 (*Uncoupling Protein 1*) pada Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*) Obes dengan Resiko Aterogenesis

[NICOTINE INTERVENTION ON LDL AND UCP-1 EXPRESSION IN OBESE CYNOMOLGUS MONKEY WITH ATHEROGENESIS RISKS]

Anwar Wardy W¹, Irawan Jusuf², Dondin Sajuthi^{3,4}
Erni Sulistiawati³, Sri Supraptini Mansjoer³, Ria Oktarina⁵

¹Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Jakarta

²Fakultas Kedokteran Universitas Hasanudin Makassar

³Pusat Studi Satwa Primata Lembaga Penelitian & Pengabdian Kepada Masyarakat
Institut Pertanian Bogor

⁴Departmen Klinik Reproduksi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

⁵PT. Bimana Indomedical

Korespondensi : anwarwardy@gmail.com

Abstrak: Lima belas monyet ekor panjang obes (*Macaca fascicularis*) dengan resiko aterogenesis digunakan untuk memperoleh informasi tingkat *low density lipoprotein* (LDL) dan ekspresi protein *uncoupling-1* (UCP-1) setelah tiga bulan intervensi nikotin dosis rendah per oral. Kelompok hewan dibagi menjadi tiga dengan komponen diet berbeda, yaitu diet A (lemak), diet tipe B (lemak dan kuning telur), dan diet tipe C (komersial diet-monyet chow), dan setiap kelompok terdiri dari lima monyet. Ketiga diet tersebut dicampur nikotin dan diberikan ke dalam makanan sehari dengan dosis 0,50-0,75 mg/kg/12 jam. Pengamatan terhadap lipid darah dilakukan setiap bulan dan pada saat nekropsis diambil jaringan adiposa coklat untuk evaluasi dengan teknik fluoresensi antibodi. Berdasarkan analisis lipid menunjukkan bahwa ada peningkatan yang signifikan konsentrasi LDL ($p < 0,05$), terutama untuk kelompok yang memperoleh pakan lemak dan telur. Berdasarkan hasil analisis teknik fluoresensi antibodi, diperoleh sel-sel imunoreaktif terhadap ekspresi UCP-1 selama intervensi nikotin.

Abstract: Fifteen obese cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) were used to obtain information of LDL level and to study uncoupling protein-1 (UCP-1) expression during three months oral low dose nicotine intervention. Animals were grouped into three groups based on their diets, diet type A (tallow), type B (tallow and egg yolk) and type C (commercial diet-monkey chow), and each groups consisted of five monkeys. Nicotine was mixed into diet with dose 0.50-0.75 mg/kg/12 hours. Blood samples were collected every month for lipid analyses and during necropsy brown adipose tissues were taken for fluorescence antibody technique evaluation. Based on the lipid analysis showed that there was significant increase in LDL concentration ($p < 0.05$), particularly for animals consuming diet type B. Florescens antibody evaluation revealed that there was immunoreactive cells to UCP-1 expression during nicotine intervention.

Keyword: *nicotine, expression UCP-1, Lipoprotein Low Density (LDL), cynomolgus*

Pendahuluan

Nikotin adalah bahan alkaloid toksik (*senyawa amin tersier*) yang terdiri dari cincin piridina dan pirolidina. Nikotin dapat melewati barrier darah otak (*blood brain barrier*) dan diedarkan ke seluruh bagian otak sehingga menyebabkan ketergantungan yang cukup lama bagi seseorang dan berdampak buruk pada perokok pasif. Namun demikian, peran positif nikotin dalam tubuh juga tidak dapat diabaikan, diantaranya otak dalam menjalankan fungsi intelek menggunakan bahan-kimia *neurotransmitters* nikotin yang selalu ada dan diproduksi oleh sel untuk selalu berfungsi. Efek lain nikotin berperan dalam pengaturan energi dalam tubuh dan dapat mengurangi

berat badan dengan mengaktivasi UCP-1 (uncoupling protein 1) pada otot rangka, otot subkutan dan peritoneal, melalui mekanisme transpor ion proton H⁺ mitokondria dan pengaturan serta mereduksi produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Yamasaki & Sasaki 2006).

Nikotin memiliki *margin of safety* atau batas aman pemakaian yang luas sampai dengan 60 mg/kg berat badan baru dianggap toksik atau mematikan pada hewan penelitian. Nikotin setelah melalui metabolisme di hati secara sistemik didistribusikan ke jaringan neuron preganglionik autonomik, *neuromuscular junction somatic* (N1) dan *neural* (N2). Kemudian nikotin menstimulasi *norepinephrine* (NE) melalui signal β_3 adrenergik

dalam sel mitokondria dan melalui mekanisme siklus CREB (*cAMP response element binding*) mengekspresikan UCP-1. Berkurangnya UCP-1 dalam sel-sel darah dan jaringan lainnya dapat mempercepat perkembangan plak aterosklerosis dengan menginduksi peningkatan jumlah makrofag dan mengurangi kolagen dalam jaringan tersebut. Komponen utama dari plak aterosklerosis yang terbentuk di dalam dinding pembuluh darah adalah kolesterol dan lebih kurang 65% total kolesterol berada dalam bentuk LDL. Sedangkan sekresi UCP-1 dalam jaringan endokrin *brown adipose tissue* (BAT) diduga sebagai faktor antiobesitas (Horimoto & Resnick 2002).

Peningkatan pembakaran cadangan makanan dalam tubuh dapat meningkatkan panas tubuh yang kemudian memberikan sinyal simpatis pada reseptor adrenergik nervus sistem jaringan sel adiposa (Cannon & Nedergard. 2006). Signal intrasel ini akan merangsang cAMP dan *protein kinase A* (PKA) yang selanjutnya akan melepaskan *triglyceride fatty acid*. Mekanisme ini diatur oleh aktivitas pelepasan UCP-1 mitokondria sebagai substrat termogenesis tubuh. Berdasarkan hal-hal diatas, diharapkan melalui penelitian ini dapat diperoleh informasi pengaruh nikotin terhadap ekspresi UCP-1 dan profil lipid pada monyet ekor panjang yang obes dengan resiko aterosgenesis.

Metode Penelitian

Hewan laboratorium

Hewan percobaan yang digunakan adalah monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) sebanyak 15 ekor, yang telah diberi pakan obes selama 12 bulan dengan tiga jenis pakan perlakuan. Setiap kelompok terdiri lima ekor dan mendapatkan nutrisi pakan dengan kandungan lemak yang berbeda, dengan dosis nikotin yang sama yakni 0,50–0,75 mg/kg/12 jam selama tiga bulan. Nikotin dalam bentuk cairan ditambahkan dalam ketiga jenis pakan tersebut. Adapun pembagian kelompok berdasarkan kandungan lemak yang berbeda disajikan pada Tabel 1.

Seluruh perlakuan yang melibatkan hewan percobaan dilakukan berdasarkan peraturan yang telah ditetapkan oleh *Animal Care and Use Committee* (ACUC) yang merupakan Komisi Kesejahteraan dan Penggunaan Hewan Percobaan PT IndoAnilab dengan nomor protokol: 04-IA-ACUC-09.

Koleksi sampel

Pengambilan sampel darah dilakukan pada *vena femoralis* sebanyak 5 ml pada hewan yang disedasi

Tabel 1. Komposisi nutrisi formula pakan perlakuan

Kandungan Nutrisi	Pakan A	Pakan A	Pakan A
Protein (%)	12,02	13,47	26,82
Lemak (%)	20,80	19,52	4,15
Gross energi (kal/kg)	4.479,11	4.399,86	4.492,87
Nikotin cair (mg/kg)	0,75	0,75	0,75

Sumber: Hasil analisis Laboratorium Ilmu dan Teknologi Pakan Fakultas Peternakan IPB Bogor 2009.

dengan ketamin HCl 10-15 mg/kg bobot badan. Serum darah yang diperoleh dilakukan pemeriksaan terhadap LDL kolesterol dengan metode enzimatis menggunakan *fotometer* seri 5010.

Pada akhir penelitian hewan dietanasia dengan tiopental dosis 1 mL/2kg bobot badan dan dilanjutkan dengan pengambilan. BAT pada daerah tulang skapula. Jaringan ini difiksasi menggunakan nitrogen cair dan selanjutnya penyimpanan dalam nitrogen cair sampai siap untuk analisis tingkat selular ekspresi UCP-1 melalui teknik imunofluoresensi.

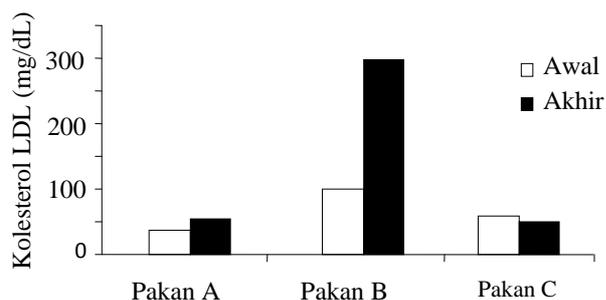
Imunofluoresensi menggunakan *goat electron anti-UCP-1 antibody* yang telah dilabel zat warna agar dapat dilihat dengan mikroskop-fluoresensi. Penggunaan enzim sebagai pengganti zat warna fluorokrom untuk menandai elektron, sehingga dapat digunakan dengan mikroskop biasa. Enzim yang digunakan enzim peroksidase dari *C-20 Santacruz Biotechnology*.

Hasil dan Pembahasan

Pengaruh Nikotin terhadap Profil Lipid LDL

Berdasarkan hasil analisis LDL kolesterol darah dari ketiga kelompok perlakuan dapat dilihat bahwa kelompok yang mendapat pakan B mengalami peningkatan yang signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan kedua kelompok perlakuan lainnya (Gambar 1).

Mekanisme intervensi nikotin secara oral memodifikasi LDL kolesterol tidak sepenuhnya dapat dijelaskan. Namun, diketahui bahwa nikotin dalam bentuk basa menghambat pelepasan asam lemak bebas dari jaringan adiposa yang masuk ke hati. Dengan demikian, asam lemak kurang mengalami esterifikasi untuk trigliserida dan kemudian masuk ke dalam VLDL, yang dapat mengurangi LDL. Dengan meningkatkan aktivitas lipoprotein lipase, asam nikotin dapat meningkatkan laju *removal chylomicron* trigliserida dalam plasma. Demikian



Gambar 1. Rerata lipid kolesterol LDL *Macaca fascicularis* pada awal dan akhir intervensi nikotin.

pula, asam nikotinat menurunkan laju sintesis hati dari VLDL dan LDL. Pada dosis pemeliharaan yang direkomendasikan, menghasilkan pengurangan klinis pada rasio total kolesterol HDL, LDL dan trigliserida sampai 35% dengan peningkatan HDL 16% sampai 26%. Selain pengurangan tersebut di atas dalam tingkat LDL, nikotin menyebabkan pergeseran komposisi LDL dari partikel kecil LDL (lipoprotein aterogenik) ke yang lebih besar, lebih ringan partikel² LDL berarti kurang aterogenik. Peningkatan HDL juga terkait dengan pergeseran dalam distribusi HDL subfraksi termasuk peningkatan HDL₂ dan rasio HDL₃, efek perlindungan dari HDL terutama karena HDL₂. Selain itu komponen protein utama dari lipoprotein densitas sangat rendah (VLDL) dan fraksi LDL dikenal memainkan peran penting dalam atherogenesis; dan yang homolog dengan LDL tetapi dianggap sebagai faktor resiko independen untuk penyakit jantung koroner dan strok (Kamanna *et al.* 2008).

Ekspresi UCP-1

Hasil pengamatan ekspresi UCP-1 disajikan pada Gambar 2 dibawah ini yang dapat menjelaskan sensitivitas *immunoreactive* UCP-1. Jalur aktivasi *thermogenesis* pada jaringan otot coklat, adalah *adrenergik* reseptor (α -AR) agonis yang merangsang generasi cAMP akan mengaktifkan protein kinase A (PKA).

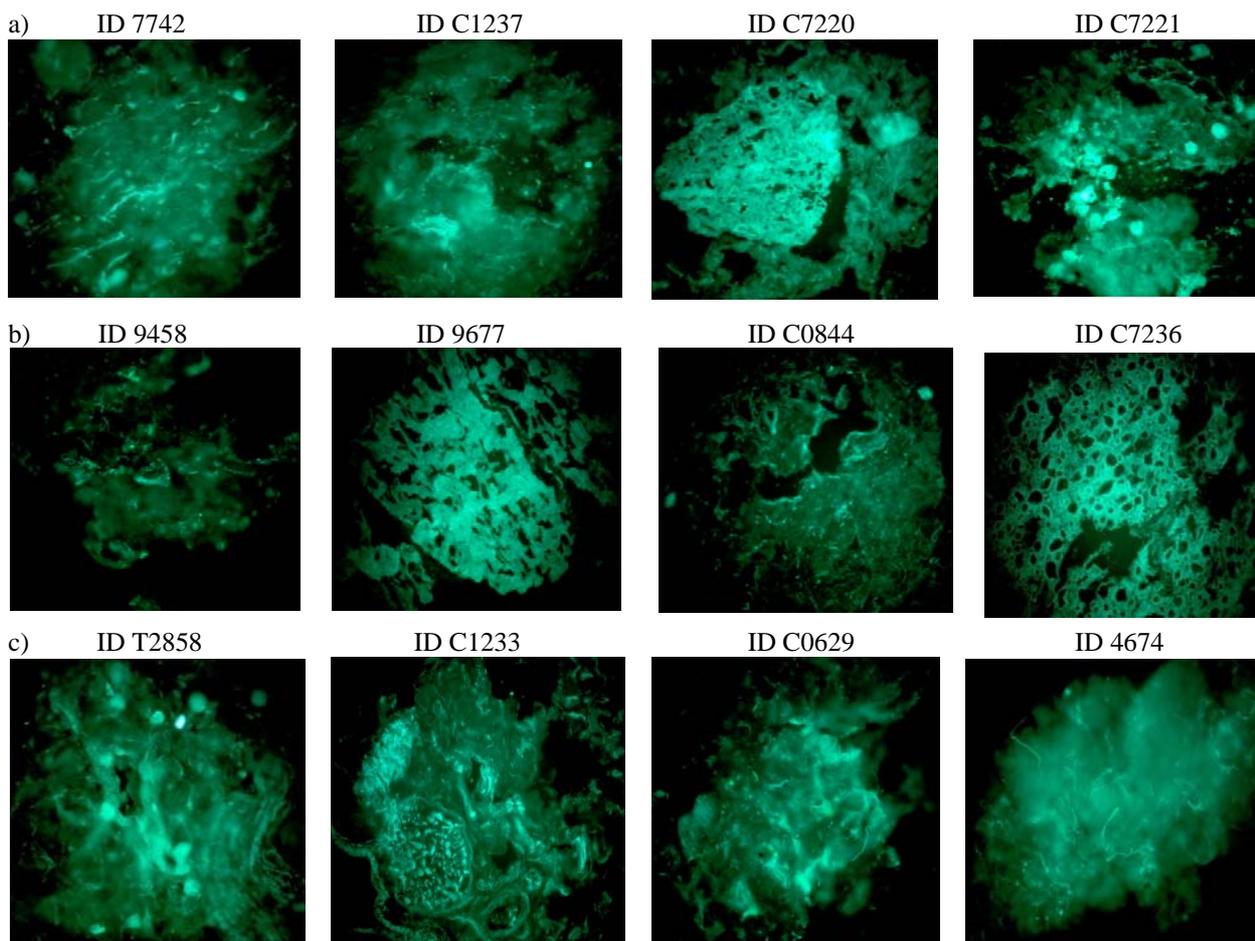
PKA fosforilase dalam CREB yang menyebabkan transkripsi gen meningkat. CREB diaktifkan secara langsung kemudian menginduksi ekspresi PGC-1 dan Tipe II tiroksin diiodinase (DII). PGC-1 koaktivase faktor transkripsi melekat pada *enhancer* UCP1 sehingga meningkatkan ekspresi UCP-1 dalam sel. Selain itu, DII meningkatkan sintesis ekspresi gen triiodothironina (T₃). Sebagai ligan untuk reseptor hormon tiroid, peningkatan ini lebih lanjut mengekspressikan UCP-1. PKA juga mengaktifkan hormon sensitif lipase (HSL),

meningkatkan konsentrasi asam lemak bebas (FFAs) yang pada gilirannya mengaktifkan protein UCP1. Aktivitas PGC-1 juga koaktivase faktor transkripsi, NRF-1 yang menyebabkan peningkatan gen diperlukan untuk biogenesis mitokondria, termasuk NRF-1 dan NRF-2. Hal ini menyebabkan stimulasi yang ditandai biogenesis mitokondria (Jia and Lubetkin 2005). Selama pemberian oral nikotin selama 3 bulan dan ekspresi UCP-1 dapat dilihat pada uji *immunoreactive* UCP-1 setelah dilakukan nekropsis jaringan. Pada MEP obes dengan tingkat pengeluaran energi normal berpatokan pada massa tubuh dan pada umumnya, kurus atau gemuk memiliki tingkat yang sama dalam pengeluaran energi. Dari hasil penelitian tersebut, MEP obes tidak memiliki defisit pengeluaran energi. Gambaran ini dapat dilihat dari sensitivitas *immunoreactive* UCP-1 pada jaringan BAT pada Gambar 2.

Monyet ekor panjang obes pada kelompok B memiliki tingkat pengeluaran energi yang normal adanya hipotesis bahwa individu-individu ini memiliki regulasi cacat pengeluaran energi dan pengeluaran energi menjadi berkurang, sebelum perkembangan obesitas terjadi. Bobot badan mereka diasumsi sebagai patologis. Dukungan pada pandangan ini berasal dari studi prospektif, ditemukan bahwa pengeluaran energi yang rendah, normalisasi untuk massa tubuh, maka prediksi kenaikan bobot badan akan berlebih (Jia and Lubetkin 2005). Penjelasan pengamatan ini menjadi hipotesis bahwa setiap individu memiliki "titik massa homeostatik" lemak. Hal ini adalah titik aktivasi proses yang berfungsi untuk kembali ke massa lemak normal untuk menetapkan titik masing individu. Bila massa lemak meningkat, kontrol homeostatik diaktifkan yang berfungsi untuk menahan bobot badan lebih lanjut.

Kontrol homeostatik ini yang diduga melibatkan peningkatan pengeluaran energi pada mitokondria dengan adanya ekspresi UCP-1. Pada akhirnya, seorang individu yang ditakdirkan untuk menjadi gemuk, tiba pada "titik gemuk" dan menetapkan pada titik homeostatik, dalam pengeluaran energinya normal. Sejumlah studi mendukung pendapat ini, bahwa individu memiliki massa lemak *set-point*, dan *set-point* ini berbeda dari individu ke individu lain, dan hanya mengalami perubahan menjelang dewasa; hal ini yang menjadi landasan kuat penelitian, bahwa diperlukan suatu intervensi substansi yang mendorong adanya kontrol massa homeostatik sepanjang hidup.

Pada penelitian ini ditemukan bahwa variasi penambahan bobot badan *diet induced* dapat dipertanggungjawabkan oleh variasi dalam kemampuan diet untuk meningkatkan pengeluaran



Gambar 2. Floresensi antibodi terhadap UCP-1 dari jaringan adiposa coklat pada individu kelompok a) pakan A, b) pakan B, dan c) pakan C

energi. Namun lebih lanjut bahwa variasi ini disebabkan oleh komponen pengeluaran energi disebut aktivitas *thermogenesis nonexercise* atau *nonshivering thermogenesis*, yang diperkirakan dipicu oleh adanya intervensi nikotin dari energi yang dikeluarkan selama adanya perubahan motilitas. Hal ini dapat dilihat pada evaluasi MEP obes selama 3 bulan mendapat nikotin; menunjukkan pola perbaikan dan penurunan bobot badan dan indek massa tubuh; namun intervensi ini juga bermakna nyata meningkatkan keaktifan MEP dan peningkatan frekuensi makan, minum dan bergerak (Zakariah *et al.* 2010). Penjelasan dan evaluasi sebelum dilakukan nekropsis pada MEP karena adanya norepineprin yang diinduksi oleh proses termogenesis oleh nikotin pada otot akan menghasilkan protein kinase A, hormon sensitif lipase akan melepaskan trigliserida, asetil CoA yang mengaktifasi FFA dan pada akhirnya melalui cAMP terjadi proses CREB dengan protein pada proses aktif lebih lanjut terjadi citric acid cycle (CAC) dan akhirnya terjadi pelepasan UCP-1 sehingga proses metabolisme menjadi meningkat dalam sel. Observasi secara alami menyebutkan suatu mata rantai antara metabolisme lipid dan

perilaku oskilatori glikolitik yang dapat menyarankan suatu kerangka baru untuk melihat imbalan yang dinamis antara ekspresi pelepasan protein dan penggabungan dalam mitokondria (Edwards *et al.* 2003).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Conklin *et al.* (2002) terhadap efek nikotin-kotinin pada kelenjar parakrina otot rangka terbukti menaikkan kadar VEGF mRNA endothelial dan menaikkan kadar protein dalam darah serta merangsang nafsu makan bila di induksi selama lebih dari 10 minggu (70%). Namun induksi nikotin dengan dosis optimal dapat menurunkan lecithin dan terjadi peninggian deposit kolesterol dan platelet CO kemudian mengakibatkan hipoksia (200-250 x lebih afinitas terhadap Hb), kemudian terjadi pelepasan NE menginduksi protein kinase A (PKA) dan CREB-protein serta menginduksi ekspresi UCP-1 melalui influk proton H⁺ Ekspresi protein (UCPs) mitokondria pada jaringan adiposa otot rangka adalah suatu yang unik dari komponen spesifik sel mamalia. Pada DNA komplementer tikus besar dan tikus kecil, pelepasan UCPs diisolasi pada beberapa laboratorium (Rousset *et al.* 2004), cDNA digunakan untuk menentukan sekuens dari UCP tikus

besar dan untuk memonitor perubahan pada UCPmRNA level di berbagai keadaan fisiologik, patologik, dan farmakologik. Suatu kontroversi mengenai makna yang fisiologik dari jaringan adiposa pada manusia dan kontribusi yang mungkin terjadi pada resistensi obesitas tetap ada, akan tetapi sejumlah besar bukti, menunjukkan bahwa jaringan yang ada pada bayi dan anak, juga pada dewasa muda terdapat situasi nonpatologik dan hanya beberapa pada keadaan patologik tertentu. Pada penelitian ini seluruh MEP obes pada ketiga kelompok perlakuan memperlihatkan ekspresi dengan peningkatan proton-proton yang dilepaskan melalui UCP-1 pada jaringan adiposit coklat yang bertanggung jawab untuk *nonshivering thermogenesis*. Mekanisme yang ditemukan pada manusia usia muda dalam memelihara suhu tubuh, akan tetapi, pada orang dewasa kontribusi dari UCP-1 dimediasi *thermogenesis* dan peran pada regulasi bobot badan, sebab yang kontroversial jaringan adiposa coklat secara relatif langka (Fabian-Fine et al. 2004). Pada manusia, otot skeletal adalah jaringan yang paling penting untuk adaptif *thermogenesis*, karena UCP-1 tidak terdapat pada otot skeletal, ekspresi *UCPs* lain diharapkan untuk eksis. Kedepan untuk hal-hal yang demikian akan diperlukan intervensi nikotin dalam jumlah yang kecil untuk mengekspresikan UCP-1 oleh tubuh.

Simpulan dan Saran

Simpulan

1. Penggunaan nikotin dosis rendah memberi pengaruh interaksi transeluler dengan hormon endokrin baik sentral maupun perifer dalam mengatur energi tubuh.
2. Penggunaan nikotin dapat meningkatkan nilai kolesterol LDL melalui peningkatan laju *removal chylomicron* trigliserida dalam plasma, namun hasil penelitian ini secara statistik tidak bermakna.
3. Aktivasi motorik *non-shivering thermogenesis* dapat mengurangi proses aterosgenesis.

Saran

1. Penelitian lanjutan pengaruh nikotin pada reseptor *ACh-nicotine* area *ventromedial nucleus hypothalamus* (VMN) yang memberikan efek penurunan bobot badan, dalam jangka waktu tertentu.
2. Disarankan penggantian *No Tobacco Day* menjadi *No Cigarette Day*, karena yang bermasalah bukan pada tembakau, tetapi pada pemanfaatan nikotin.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dewi Apri Astuti, I Nengah Budiarsa, dan PT. IndoAnilab dalam dukungan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Cannon B, Nedergaard J.** 2006. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Phys. Rev.* 84:277-359
- Conklin BS, Zhao W, Zhong DS, Chen C.** 2002. Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 160(2):413-8.
- Edwards JG, Kaminski PM, Ungvari Z, Csiszar A.** 2003. Increased Superoxide Production in Coronary arteries in Hyperhomocysteinemia Role of Tumor Necrosis Factor- α , NAD(P)H Oxidase and Inducible Nitric Oxidase Synthase. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* 23:418-424
- Fabian-Fine R, Skehel P, Errington ML, Davies HA, Sher E, Stewart MG, Fine A.** 2001. Ultrastructural distribution of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 21:7993-8003
- Horimoto M, Resnick MB.** 2002. Expression Of Uncoupling Protein 2 in Human Colon Cancer. *Clin. Cancer. Res.* 10:6203-6207
- Jia H, Lubetkin EI.** 2005. The impact of obesity on health-related quality-of-life in the general adult US population. *J. Public. Health.(oxf)* 27:156-164
- Kamanna VS, Vo A, Kashyap ML.** 2008. Nicotinic acid: recent developments. *Curr. Opin. Cardiol.* 23(4): 393-8.
- Rousset S, Alves-Guerra M, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulier A, Bouillaud F, Ricquier D.** 2004. The Biology of Mitochondrial Uncoupling Protein. *Diabetes.* 53: S130 - S135.
- Yamasaki H, Sasaki H.** 2006. Uncoupling Protein 2 Promoter Polymorphism – 866G/A Affects Peripheral Nerve Dysfunction In Japanese Type 2 Diabetics Patients. *American Diabetes Association.* 29:
- Zakariah S.** 2010. Analisis Hematologi, Nilai Kecernaan dan Tingkah Laku Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*) Jantan Obes yang Diintervensi Nikotin. [Tesis]. Sekolah Pasca Sarjana IPB. Bogor.