

Pengaruh Likopen terhadap Penurunan Aktivitas *Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)* dan Ekspresi *Endothelin-1 (ET-1)* pada Kultur Huvecs yang Dipapar Leptin

Heni Fatmawati¹⁾, Satuman²⁾, Ahmad Rudijanto³⁾, dan Muhammad Rasjad Indra²⁾

¹⁾Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember, Jalan Kalimantan 23 Jember 68121

²⁾Laboratorium Ilmu Faal, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Jalan Veteran Malang 65145

³⁾Bagian penyakit dalam Rumah Sakit Saiful Anwar/Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Jalan Veteran Malang 65145

Diterima 12-03-2010

Disetujui 06-12-2010

ABSTRACT

The effect of obesity on vascular function is mediated by hormone leptin. Leptin has been proved to increase oxidative stress in endothelial cell. The previous study has proven that leptin caused the endothelial dysfunction as a step of the atherogenesis. Lycopene, an antioxidant, is presumed having the ability to block the atherogenesis mechanism, which is stimulated a proinflammatory cytokine and adhesion molecules by MAPK and transcription factor ET-1. Therefore, the aim of this research was to prove and to determine whether lycopene could decrease the MAPK and ET-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 μ 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 μ M for 12 hours. Then the identification of MAPK was applied by using immunocytochemistry compared with ELISA procedure on cell endothel culture lysate and ET-1 expression was measured by using RT PCR. It was showed that lycopene 10-25 μ M decreased MAPK and ET-1 expression significantly in HUVECs culture induced by leptin 500 ng/ml. Leptin was increased ERK1/2 MAPK and ET-1 expression in HUVECs culture and can decrease by lycopene. Optimum dose of lycopene is 10-25 μ M.

Keywords: endothelin-1 (ET-1), leptin, lycopene, mitogen-activated protein kinase (MAPK), obesity

PENDAHULUAN

Nutrisi (gizi) yang baik merupakan kebutuhan vital untuk kesehatan, pertumbuhan dan perkembangan serta pencegahan penyakit. Zat bioaktif pada makanan bisa mempengaruhi ekspresi gen baik secara langsung maupun tidak langsung. Dalam hal ini termasuk juga interaksi antara komponen bioaktif dari makanan dengan sintesis protein, degradasi protein, dan modifikasi protein yang keseluruhannya bermuara pada metabolisme sel (Kaput, 2004). Interaksi antara nutrisi dengan genomik (nutrigenomik) merupakan kajian yang sangat menarik karena masih sedikit data penelitian yang mengungkap hal tersebut (Suarez, 2005).

Obesitas menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia. 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 (≥ 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 leukosit 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).

*Telp: +628179621176

Email: fatmawatiheni@ymail.com

Pada kondisi obesitas, sekresi leptin di tubuh sangat berlebih. Leptin merupakan protein yang dikode oleh gen Ob, yang diproduksi terutama oleh adiposit (Indra, 2006). Peradangan terjadi karena leptin mengaktifkan faktor transkripsi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B melalui jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan NF- κ B 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- κ B merupakan faktor molekuler yang tepat untuk pencegahan dan pengobatan aterosklerosis (David *et al.*, 2005).

Indonesia sebagai negara tropis mempunyai keragaman nutrisi yang mempunyai potensi besar untuk dikembangkan dalam dunia pengobatan. Likopen adalah antioksidan kuat dari golongan karotenoid dengan kandungan terbanyak terdapat pada buah tomat dan produk olahannya. Potensinya 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 MAPK dan transkripsi gen yang dihasilkannya. Transkripsi gen yang akan diamati adalah mRNA ET-1.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true eksperimental*) 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- κ B yang berperan di dalam aterosklerosis pada sel endotel yang dipapar oleh leptin. Tahap II mengamati pengaruh likopen dosis optimal terhadap faktor transkripsi mRNA ET-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 dengan menggunakan spuit 20 ml Lakukan 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. 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 ml Umbilicus dibilas dengan 8 ml arutan PBS-A untuk membilas sel endotel yang tersisa. Kemudian larutan dibilas kembali yang ditambahkan ke tabung *centrifuge* yang berisi larutan Collagenase. Larutan yang mengandung endotel disentrifugasi dengan kecepatan 95 g selama 8 menit sehingga diperoleh pellet yang berisi sel endotel. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan 4 ml edium kultur pada pellet dan diresuspensi dengan cara pipeting sehingga sel endotel terpisah. Larutan dipindahkan ke dalam flask 25 cm² yang telah dilapisi larutan Gelatin 0,2% kemudian dimasukkan dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 30 menit.

Perlakuan Induksi Leptin pada HUVECs. Tode 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 uman recombinant leptin (hiperleptin). Sel endotel diinkubasi 37°C selama 6 jam.

Perlakuan Likopen (HyperChem) pada Sel Endotel. Tode perlakuan likopen ini merujuk pada Hwang and 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 mM, 25, 40, 55 dan 70 mM. Metode pemberian likopen yaitu likopen diperlakukan setelah sel diinkubasi dengan leptin selama 6 jam.

Pengukuran Kadar Protein Intrasel MAPK dengan ELISA. Pengukuran kadar MAPK dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan prosedur dalam Human ERK1/2 MAPK Assay Kit (Assay Design, USA). Selanjutnya ditentukan nilai absorbansi standar serta nilai absorbansi sampel menggunakan *ELISA readers* pada OD 492 nm.

Identifikasi 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 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 : 500 selama 24 jam. Sel disimpan pada suhu 4°C. Sel dikeluarkan pada suhu ruang selama 15 menit. Jaringan dicuci dengan PBS 3 kali selama masing-masing 5 menit. Sel diinkubasi dengan antibodi sekunder anti rabbit 1 : 500 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 Diamino Benzidine (DAB) dalam buffer DAB. Sel ditetesi dengan 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 MAPK 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 3.000 g, 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 3.000 g, 10 menit, 4°C. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 75% etanol. Pelet dikeringkan dan ditambahkan dengan diethylpyrocarbonate (DEPC). Simpan RNA pada -30°C (Montague *et al.*, 1997). Sampel mRNA selanjutnya dilakukan *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR). RT-PCR digunakan untuk merubah mRNA menjadi cDNA.

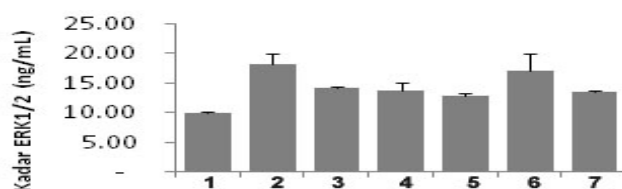
RT PCR. Primer yang digunakan adalah Primer ET-1 merujuk Peter *et al.*, (2002) (human dan murine) sense, 5'-GCTGGTGGAGGGAAGAAAAC-3' dan antisense, 5'-CACCACGGGGCTCTGTAGTC-3'. Primer tersebut diambil dari gen ET-1. Sampel diamplifikasi melalui PCR dengan 94°C, 58°C, 72°C selama 30 menit setiap siklus dan diulang sebanyak 30 siklus). Produk PCR diseparasi dengan elektroforesis 2% agarosa. Evaluasi sel yang mengekspresikan ET-1 dikuantifikasi dari densitas warna band pada gel agarosa menggunakan *process imaging analysis* sesuai instruksi yang terdapat pada *software 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 *Tukey* untuk mengetahui perbedaan antar variabel pada masing-masing perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

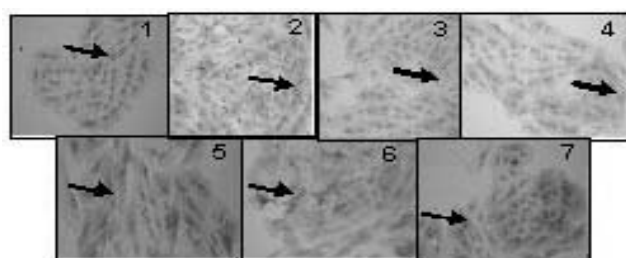
Metode pengukuran kadar protein MAPK menggunakan Human ERK1/2 MAPK ELISA Kit. Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa perlakuan 500 ng/ml leptin (18,115 ± 1,823) dapat meningkatkan aktivitas MAPK intrasel secara signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif (9,965 ± 0,194).

Aktivitas MAPK turun dengan pemberian likopen 10 µM dan secara signifikan pada likopen dosis 25 µM (L500Li25) jika dibandingkan dengan kontrol positif pada sel endotel yang dipapar dengan leptin. Sedangkan pada likopen 40 µM dan 55 µM, aktivitas MAPK meningkat kembali dibandingkan dengan kontrol negatif walaupun aktivitas MAPK dengan pemberian likopen 70 µM kembali turun dan tidak berbeda nyata dengan kelompok normal (kontrol negatif).



Keterangan: Kelp 1 : Leptin 0 ng/ml (K-); Kelp 2 : Leptin 500 ng/ml (K+); Kelp 3 : Leptin 500 ng/ml + Likopen 10 µM (L500Li10); Kelp 4 : Leptin 500 ng/ml +Likopen 25 µM (L500Li25); Kelp 5 : Leptin 500 ng/ml + likopen 40 µM (L500Li40); Kelp 6 : Leptin 500 ng/ml + likopen 55 µM (L500Li55) dan Kelp 7 : leptin 500 ng/ml + likopen 70 µM (L500Li70).

Gambar 1. Diagram batang kadar protein intrasel ERK1/2MAPK pada HUVEC yang telah diinduksi leptin dan dipapar beberapa dosis likopen



Gambar 2. Identifikasi protein intrasel ERK1/2MAPK pada HUVEC yang telah diinduksi leptin dan dipapar beberapa dosis likopen secara imunohistokimia

Tabel 1. Hasil analisis statistik kadar protein intrasel ERK1/2MAPK pada HUVEC yang telah diinduksi leptin dan dipapar beberapa dosis likopen

Kelompok	Kadar MAPK (pg/ml) (Mean±SD)*
Kontrol negatif	9,965 ± 0,194 ^a
Kontrol positif	18,115 ± 1,823 ^d
L500Li10	14,224 ± 0,296 ^{bcd}
L500Li25	12,795 ± 1,452 ^{ab}
L500Li40	13,659 ± 1,452 ^{abc}
L500Li55	16,993 ± 3,054 ^{cd}
L500Li70	13,448 ± 0,235 ^{abc}

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata (á 0,05)

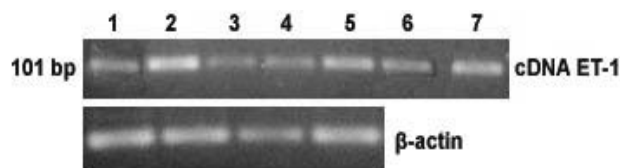
Identifikasi Ekspresi ET-1 menggunakan RT

PCR. Hasil elektroforesis ET-1 menggunakan metode RT-PCR didapatkan gen cDNA ET-1 dengan ukuran 101 bp (Gambar 3).

Berdasarkan data Tabel 2, terdapat peningkatan ekspresi mRNA ET-1 pada kelompok yang diberi leptin (kontrol positif). Pemberian likopen 10-25 mM menurunkan ekspresi mRNA ET-1 secara signifikan dibandingkan dengan kontrol positif maupun negatif. Sedangkan likopen pada konsentrasi mulai 40 mM menunjukkan peningkatan ekspresi mRNA ET-1 meskipun tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif dan negatif. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa likopen 10-25 mM merupakan dosis optimum dalam menurunkan ekspresi gen ET-1.

Enzim MAPK merupakan salah satu anggota superfamili MAP serin/threonin protein kinase, selain ERK1 (*extracellular signal-regulated protein kinase* atau p44MAPK), ERK2 (p42MAPK), dan JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) atau SAPK (*stress-activated protein kinase*) (Evans *et al.*, 2002; Thannickal & Fanburg, 2000). Aktifasi enzim MAPK diketahui diinduksi oleh berbagai stimulus stress endogen maupun eksogen, antara lain hiperglikemia, ROS, stress oksidatif, stress osmotik, sitokin-sitokin proinflamasi, *heat shock* dan radiasi sinar ultra violet (Droge, 2001; Evans *et al.*, 2002).

Pengukuran aktifitas MAPK di sel kultur HUVECs pada penelitian ini dilakukan dengan mengamati ekspresi MAPK yang terfosforilasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa leptin dapat menginduksi aktivitas



Gambar 3. Hasil RT-PCR ET-1 pada HUVEC yang telah diinduksi leptin dan dipapar beberapa dosis likopen. Didapatkan cDNA ET-1 dengan ukuran 101 bp

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

Kelompok	Ekspresi gen ET-1 Mean ± SD*
Kontrol negatif	161,93 ± 14,04 ^b
Kontrol positif	171,83 ± 4,39 ^b
Likopen 10 µM	125,58 ± 10,34 ^a
Likopen 25 µM	119,82 ± 13,04 ^a
Likopen 40 µM	135,72 ± 15,16 ^{ab}
Likopen 55 µM	138,58 ± 17,20 ^{ab}
Likopen 70 µM	136,03 ± 13,24 ^{ab}

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan berbeda nyata (á 0,05)

MAPK seperti pada Tabel 1. Leptin mampu meningkatkan kadar protein intrasel MAPK pada kelompok kontrol positif secara nyata ($p < 0,05$). Aktivitas MAPK turun dengan pemberian likopen $10 \mu\text{M}$ dan secara signifikan pada likopen dosis $25 \mu\text{M}$ (L500Li25) jika dibandingkan dengan kontrol positif pada sel endotel yang dipapar dengan leptin. Sedangkan pada likopen $40 \mu\text{M}$ dan $55 \mu\text{M}$, aktivitas MAPK meningkat kembali dibandingkan dengan kontrol negatif walaupun aktivitas MAPK dengan pemberian likopen $70 \mu\text{M}$ kembali turun. Analisis statistik lebih lanjut menunjukkan dosis optimum dalam menghambat aktivitas MAPK adalah $10-25 \mu\text{M}$. Peningkatan aktifitas enzim p38 MAPK pada paparan leptin diduga akibat peningkatan ROS. Menurut Evans *et al.*, (2002), ROS dapat mengaktifkan ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase*) yang merupakan sensor adanya stress oksidatif. ASK1 mengaktifkan MKK3/6 (MAPK kinase) yang selanjutnya memfosforilasi enzim p38 MAPK pada residu threonin180 dan tirosin182 sehingga enzim p38 MAPK menjadi aktif. Enzim p38 MAPK yang teraktifasi selanjutnya dapat memfosforilasi *activator transcription factors* (ATF-2) yang menstimulasi transkripsi gen. ASK1 juga dapat diaktifasi oleh sitokin-sitokin proinflamasi (Evans *et al.*, 2002; Roux & Blenis, 2004).

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 teraktifasi 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 *et al.*, (2003), ROS selanjutnya mengaktifkan faktor transkripsi NF- κ B. ROS menginisiasi *cascade* serin kemudian menyebabkan terjadinya fosforilasi I κ B (penambahan fosfat pada I κ B). Selanjutnya ikatan NF- κ B-I κ B terlepas dan heterodimer NF- κ B (p50 dan p65) bebas. Terlepasnya ikatan ini menyebabkan NF- κ B berpindah atau bertranslokasi ke dalam inti sel (nukleus) secara otomatis. Aktivasi NF- κ B menginduksi transkripsi inflamatori gen diantaranya sitokin proinflamatori TNF α dan beberapa molekul adesi seperti ICAM-1 maupun VCAM.

Aktifasi p38 MAPK mempengaruhi beberapa proses seluler, antara lain pertumbuhan sel dan apoptosis, inflamasi, serta respon jaringan spesifik akibat stres melalui regulasi ekspresi gen. Enzim p38 MAPK juga meregulasi serin kinase dan mengaktifasi faktor transkripsi yang menyebabkan berbagai efek patologis (Evans *et al.*, 2002). Pada penelitian ini, adanya penurunan aktifitas MAPK setelah pemberian likopen, menunjukkan terdapat peran likopen terhadap hambatan pada aktifitas MAPK. Dalam hal ini didapatkan dosis optimum adalah $10-25 \mu\text{M}$. Hal ini membuktikan bahwa likopen sebagai antioksidan merupakan *scavenger* ROS yang meningkat akibat paparan leptin, disamping juga menghambat terjadinya fosforilasi MAPK. Hambatan fosforilasi ini menyebabkan penurunan aktivitas NF- κ B sehingga transkripsi gen inflamatori serta sintesis beberapa sitokin proinflamasi seperti TNF, IL-1, IL-2, IL-6 dan mediator inflamasi VCAM-1 dan ICAM-1 menjadi turun.

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 MAPK dan faktor transkripsi NF- κ B oleh ROS sebagai akibat induksi leptin. Fosforilasi MAPK selanjutnya akan mengaktifasi NF- κ B dan merangsang transkripsi gen inflamatori serta menyebabkan sintesis beberapa sitokin proinflamasi seperti TNF α , IL-1, IL-2, IL-6 dan mediator inflamasi VCAM-1 dan ET-1. Transkripsi gen inflamatori dapat terjadi pada sel endotel, otot polos dan makrofag. Inflamasi sendiri menjadi faktor utama dari patogenesis terjadinya berbagai penyakit degeneratif (Barnes & Karin, 1997; Collins *et al.*, 2001; Jacobson & Mc. Carthy, 2002).

Endotelin-1 ditemukan pada sel endotel, sel otot polos pembuluh darah, leukosit dan *cardiomyocytes*. ET-1 mempunyai efek vasokonstriktor dan efek mitogenik, menstimulasi produksi *growth factor*. Pada aterosklerosis, infark miokard dan gagal ginjal level ET-1 meningkat baik pada plasma maupun pada jaringan. Diet tinggi lemak, memicu timbulnya disfungsi endotel dan dihubungkan dengan tingginya level ET-1 pada plasma dan pada jaringan. Peningkatan pelepasan ET-1 menstimulasi sintesis beragam molekul adesi seperti VCAM dan ICAM-1 yang mengarah pada terjadinya aterosklerosis (Barrata *et al.*, 2002).

Hasil penelitian terhadap ekspresi ET-1 menunjukkan terdapat penurunan ekspresi ET-1 pada kultur endotel yang dipapar leptin setelah pemberian likopen. Dari hasil analisis statistik, dosis optimum likopen menurunkan ekspresi ET-1 adalah 10-25 μ M. Sekresi ET-1 yang diinduksi oleh leptin pada HUVEC mungkin berkontribusi terhadap resiko penyakit kardiovaskuler pada individu obes. Paparan leptin menyebabkan peningkatan ekspresi ET-1. Peningkatan vasokonstriktor ET-1 akan menyebabkan kondisi ketidakseimbangan terhadap vasodilator yang dihasilkan oleh endotel. Ketidakseimbangan ini merupakan salah satu tanda disfungsi endotel. Penelitian lain sebelumnya juga membuktikan bahwa ET-1 menyebabkan perkembangan dari aterosklerosis, seperti proliferasi fibroblast dan sel otot polos. (Quehenberger *et al.*, 2002). Likopen sebagai *scavenger* ROS, menyebabkan ROS tidak bersifat reaktif lagi. ROS yang tidak reaktif tidak akan mampu lagi mengaktifasi MAPK sehingga transkripsi gen oleh NF- κ B terhadap vasokonstriktor ET-1 turun (Lawrence, 2004). Penurunan ekspresi vasokonstriktor ET-1 pada endotel akan menghambat perkembangan proses aterogenesis selanjutnya.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa likopen dapat menghambat peningkatan kadar MAPK dan ekspresi gen ET-1 pada sel endotel akibat paparan leptin dengan dosis optimum likopen yaitu 10-25 μ M.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Departemen Pendidikan Tinggi melalui Lembaga Penelitian dan Pengembangan Program Hibah Bersaing dengan Nomor Kontrak 320/SP2H/PP/DP2M/V/2009 yang telah memberikan dana penelitian. Terima kasih juga kepada Dr.dr.Budi Siswanto, SpOG dan para partisipan atas kerjasamanya.

DAFTAR PUSTAKA

- 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 Journal* **13**: 1231-1238.
- David, C.W., Lau., Bikramjit, D., Hongyun, Y., Paul, E.S. & Subodh, V.** 2005. Adipokines:molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am. Journal Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H2031-H2041.
- Departemen Kesehatan RI.** 2004. Kecenderungan Masalah Gizi dan Tantangan di Masa Datang. Jakarta.
- Droge, W.** 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* **82**: 47-95.
- Epstein, F.H.** 2003. Nuclear Factor Kappa beta a Pivotal transcription factor in chronic inflammatory Disease. *NEJM* **363(15)**: 1066-1071.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A. & Grodsky, G.M.** 2002. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews* **23(5)**: 599-622.
- Frei, B.** 2003. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins. The Linus Pauling Institute.
- Handayani, D.** 2006. Pengaruh pasta tomat terhadap sel busa (*foam cell*) pada tikus diet atherogenik. *Journal Kedokteran Universitas Brawijaya 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, M.R.** 2006. Adiposit, obesitas dan masalah kesehatan global di era millenium. *Edisi Pertama. Penerbit. Lab. Ilmu Faal FK. UNIBRAW.* Malang. ISBN : 979-25-9010-2.
- Kaput, J.** 2004. Diet-disease gene interaction. *Nutrition*. **20**: 26-31.
- Lawrence, G.S.** 2004. Implikasi Klinis Disfungsi Endotel dan Radikal Bebas. *Journal Med Nus* **25**: 94-102.
- Minokoshi, Y. & Kahn, B.B.** 2003. Role of AMP-Activated Protein Kinase in Leptin-induced Fatty Acid Oxidation in Muscle. *Biochemical Society Transactions* **31**, part 1.
- Melotti, P.E., Nicolis, A., Tamanini, R., Rolfini, A., Pavirani. & Cabrini. G.** 2001. Activation of NF- κ B mediates ICAM-1 induction in respiratory cells exposed to an adenovirus-derived vector. *Gene Therapy* **8(18)**: 1436-1442.
- Montague, C.T., Prins, J.B., Sanders, L., Digby, J.E. & Rahilly, S.** 1997. Depot and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes* **46**: 342-347.
- Quehenberger, P., Exner, M., Sunder-Plassmann, R., Ruzicka, K., Bieglmayer, C., Endler, G., Muellner, C., Speiser, W. & Wagner. O.** 2001. Leptin Induces Endothelin-1 in Endothelial Cells In Vitro. *Circ Res* **90**: 711-718.
- Roux, P.P. & Blenis, J.** 2004. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68(2)**: 320-344.
- Suarez, L.** 2005. Nutritional Genomics:Customizing Diet Plans According to Genetic Makeup. Diabetic microvascular complications today. Issues in Diabetes.
- Thannickal, V.J. & Fanburg, B.L.** 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am Journal Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: L1005-1028.
- Ute, C.O., Estibaliz, O.M., Ana, M.C., Jason, P.E., Albert, van der V., Giuseppe, V.C.E.C & Lester, P.** 2003. Likopen inhibits the growth of normal human prostate epithelial cells in vitro. Biochemical and Molecular Action of Nutrients.