

## **Inhibisi Kurkuminoid Temumangga terhadap Ekspresi Molekul Adhesi Icam-1 yang Diinduksi dengan LDL *Macaca fascicularis* pada Kultur Sel Endotel**

[INHIBITION CURCUMINOID TEMUMANGGA OF EXPRESSION ADHESION MOLECULE ICAM-1 WITH THE INDUCIBLE BY LOW DENSITY LIPOPROTEIN OF *Macaca Fascicularis* ON CULTURE ENDOTHELIAL CELLS]

Trini Susmiati<sup>1</sup>, Sulistiyani<sup>2</sup>, Dondin Sajuthi<sup>1</sup>, Latifah K Darusman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Hewan UGM

<sup>2</sup>Departemen Kimia FMIPA IPB

**Expression of adhesion molecule ICAM-1 in atherosclerosis increases on the surface of endothelial cells. Oxidized LDL induction of endothelial cell culture initiation state of atherosclerosis because of the occurrence of endothelial cell dysfunction. The purpose of this study is to inhibit the expression of ICAM-1 adhesion molecule by curcuminoid of temumangga (Curcuma mango) in culture-induced endothelial cell oxidized LDL from *Macaca fascicularis* plasma. Monolayer culture of endothelial cells incubated with curcuminoid for 48 hours, then induced oxidized LDL for 24 hours. This treatment results compared with endothelial cell culture that is oxidized metals Cu<sup>2+</sup>. Method of measuring adhesion molecular ICAM-1 by immunohistochemistry using antibodies anti ICAM-1.**

**This results indicate that endothelial cell cultures induced by metal ion Cu<sup>2+</sup> + expression adhesion molecule ICAM-1 in cell culture surface of endothelial, brownish-yellow colored with dye after 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). Endothelial cell cultures are incubated with oxidized LDL, foam cell accumulation shown. The accumulation of foam cells occurs as a result of oxidized LDL causes damage to the surface of endothelial cells and exacerbated by metal ion Cu<sup>2+</sup>. curcuminoid extract doses given in the study was not able to inhibit the oxidation rate of LDL particles.**

**Keywords:** *Low density lipoprotein (LDL) plasma Macaca fascicularis, curcuminoid of temumangga, adhesion molecules ICAM-1, immunohistochemistry.*

### **Pendahuluan**

Ekspresi molekul adesi ICAM-1 pada aterosklerosis meningkat pada permukaan sel endotel. Induksi LDL-teroksidasi pada kultur sel endotel me'mimik' keadaan aterosklerosis karena terjadinya disfungsi sel endotel. Disfungsi endotel dan hilangnya sel endotel merupakan awal pembentukan plak ateroma yang ditandai oleh meningkatnya molekul adesi monosit pada endotel arteri. Kondisi ini dipicu oleh *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) yang akan menarik netrofil dan limfosit. Sedangkan *endothelium leukocyte adhesion molecule-1* (ELAM-1) meningkatkan interaksi antara monosit dan T-limfosit, dan *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) meningkatkan ikatan pada permukaan leukosit antara monosit dan sel T-limfosit. Adesi leukosit pada sel dinding endotel merupakan mekanisme utama yang merespon pembentukan

radikal bebas dari oksigen (ROS), yang akhirnya akan menghasilkan oksidan sitotoksik dan mediator peradangan yang mengaktifkan sistem komplemen. Dalam kondisi normal, sel leukosit bergerak bebas di sepanjang endotel. Selama iskemik dan peradangan, berbagai mediator dibebaskan sel endotel yang menyebabkan molekul adesi leukosit muncul pada permukaan sehingga akan memobilisasi dan merangsang granula-granula leukosit. Oksidan yang dihasilkan akan menyebabkan kelukaan pada permukaan jaringan (Caterina *et al.* 2000; Hoorn *et al.* 2003; Joris *et al.* 1983).

Endotel merupakan lapisan pelindung utama dinding pembuluh darah terhadap segala pengaruh buruk terutama berasal dari darah. Oleh karena itu jika sel endotel mengalami kerusakan/luka, maka sel-sel otot polos dan monosit akan masuk ke dalam sel endotel

kemudian berproliferasi dan akhirnya akan menumpuk dan menjadi sel busa sehingga terbentuk plak pada bagian intima dinding pembuluh darah. Dengan demikian, sel endotel memegang peranan penting dalam menentukan laju kejadian aterosklerosis.

Salah satu penyebab utama kejadian aterosklerosis dapat disebabkan oleh kadar kolesterol di dalam darah tinggi (hiperkolesterolemia) meliputi kolesterol dan trigliserida sebagai unsur utama. Hipercolesterolemia terjadi karena adanya gangguan metabolisme lipid yang menyebabkan peningkatan konsentrasi kolesterol darah, yang dapat disebabkan oleh defisiensi enzim lipoprotein. Hipercolesterolemia berkaitan erat dengan LDL dan HDL dalam pembentukan aterosklerosis yang pada patologi awal akan ditandai dengan lempeng-lempeng kolesterol yang tipis dan tajam pada jaringan (Fuller & Jialal, 1994; Stocker & Keaney, 2004). Kadar kolesterol yang tinggi memungkinkan LDL menembus lumen dinding pembuluh darah masuk ke bagian intima. Pada bagian intima LDL akan mengalami oksidasi. Kolesterol yang teroksidasi bersifat sangat toksik terhadap sel otot polos (*in vitro*) dan merupakan agen aterogenik (*in vivo*). Partikel LDL teroksidasi akan menyebabkan peningkatan adhesi monosit ke endotel, yang diikuti dengan kemotaksis ke dalam jaringan subendotel (intima). Di intima, monosit akan berdeferensiasi menjadi makrofag. Partikel LDL yang teroksidasi tidak akan dikenali oleh reseptor LDL akan tetapi dikenali oleh reseptor skavenger dari makrofag. Apabila partikel LDL teroksidasi terjadi secara terus menerus, maka LDL termodifikasi akan ditangkap oleh scavenger makrofag sehingga terbentuknya sel-sel busa. Kondisi ini akan merangsang terekspresinya sejumlah gen sitokin dan faktor pertumbuhan yang mengakibatkan terjadinya proliferasi sel otot polos di bagian intima. Akibatnya permukaan dinding pembuluh darah dibagian lumen akan menggelembung karena terjadinya penimbunan plak pada bagian media (Linder 1985; Stocker & Keaney 2004).

Dalam usaha pencegahan terhadap proses reaksi oksidasi terhadap LDL, saat ini peranan obat tradisional cukup menjanjikan. Usaha untuk mengidentifikasi dan membudidayakan obat-obat tradisional yang kandungan zat aktif telah banyak diketahui masih terus dilakukan penelitian.

Peranan obat tradisional bagi kesehatan sangat penting, oleh karena itu pemerintah telah mengeluarkan kebijakan yang tertuang dalam GBHN 1993 atas perlunya pemeliharaan, penelitian dan pengembangan obat tradisional agar cakupan penggunaan lebih luas dan secara medis dapat dipertanggung-jawabkan.

Kunir /kurkuma merupakan kerabat kunyit yang sudah sejak dulu ditanam sebagai bahan ramuan obat tradisional, tetapi mekanisme kerjanya sebagai obat sampai saat ini masih belum jelas diketahui. Kunir sebagai tanaman jamu tradisional dikenal sebagai temu-temuan semakin memasyarakat sebagai obat tradisional. Beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa, kelompok rimpang temu-temuan dapat digunakan sebagai obat karena dimungkinkan mempunyai daya antiradang, antirematik, antihepatotoksik bahkan antioksidan. Zat aktif yang terkandung dalam kurkuma adalah kurkumin (*diferuloylmethane*). Kurkumin memberikan aroma spesifik dan berwarna kuning dapat digunakan sebagai zat pewarna makanan, kosmetik serta pengobatan yang dapat diisolasi dari berbagai spesies kurkuma. Kurkumin mempunyai aktivitas farmakologi terhadap kondisi patologi seperti peradangan, trombotik, kanker, karsinogenesis, bahkan mutasi yang telah dikenal cukup luas. Kurkumin dapat berperan sebagai senyawa antioksidan akan melindungi LDL dari oksidasi sehingga pengambilan makrofag dapat dikurangi (Quiles *et al.* 2002, Rao 1995, Ruby & Lokesh 1995, Sreejayan *et al.* 1997). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi kemampuan ekstrak kurkuminoid temumangga dalam menghambat reaksi oksidasi LDL sehingga mencegah terekspresinya molekul adhesi ICAM-1.

### Materi dan Metode

Penelitian dilaksanakan mulai dari bulan Mei 2005 sampai dengan Juli 2006, di laboratorium Patologi dan Histologi dan di Laboratorium Mikrobiologi dan Virologi Pusat Studi Satwa Primata, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor (PSSP LPPM-IPB).

Bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini *line* sel CPAE yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi dan virologi PSSP LPPM-IPB. DMEM, Macaca fascicularis (moyet

ekor panjang, MEP) jantan dewasa 5 ekor. 10% fetal bovine serum (FBS), monoclonal mouse anti human ICAM-1 (CD 54) cat. No: C 2969; fosfat buffer salin (PBS), 3,3-diaminobenzidine tetrahydro chloride (D AB, sigma, cat. No. D-5905), Avidin-Biotin- conjugated (Elite Vecta Stain<sup>®</sup>, Vector Lab. Cat. No: PK 6100), PBS, penisilin dan streptomisin. Alat yang digunakan antara lain laminar flow, inkubator CO<sub>2</sub>, mikroskop, kultur flask, pipet mikro, spektrofotometer, sentrifugasi, kultur slide chamber, dan alat gelas lainnya.

### Metode Penelitian

**Pengambilan plasma darah.** Molekul LDL plasma diisolasi dari darah monyet ekor panjang (MEP) yang diberi pakan aterogenik selama 3 bulan, yang sebelumnya telah diadaptasi selama 2 minggu (Adam *et al.* 1985). Sebelum pengambilan darah, MEP dipuaskan selama 24 jam. Pada saat pengambilan darah, MEP dibius menggunakan ketamin 10 mg/10 kg bobot badan dan darah diambil melalui vena femoralis. Darah dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi EDTA 1 mg/ml dan dijaga pada suhu 4°C, lalu darah disentrifus untuk mendapatkan plasma darah.

**Isolasi Lipoprotein Densitas Rendah (LDL) monyet ekor panjang.** Lipoprotein densitas rendah (LDL) yang digunakan dalam percobaan ini diisolasi sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Sulistiyani (1991). Plasma darah *Macaca fascicularis* dipisahkan dengan cara sentrifugasi selama 30 menit menggunakan Beckman GS-6R 'low speed centrifuge' dengan kecepatan 2700 rpm pada suhu 4°C.

Sebanyak 8 ml, plasma darah dimasukkan ke dalam tabung polialimer dan ditambahkan 5 ml larutan 0,9% NaCl- 0,01 % EDTA (w/v) secara hati-hati hingga tabung penuh. Larutan NaCl-EDTA ini berfungsi sebagai gradien densitas. Selanjutnya, plasma darah disentrifus dengan menggunakan ultrasentrifus Beckman XL-90 dengan rotor SW 40 pada suhu 4°C selama 20 jam dengan kecepatan 36000 rpm, dari pemusingan diperoleh β-Very Low Density Lipoprotein (β-VLDL) yang terpisah, dengan cara mengambil lapisan bagian bawah (d>1,006g/ml) adalah plasma dan lapisan atas (d<1,006 g/ml). Lapisan bawah ini

kemudian ditambahkan Kalium Bromida (KBr) sebanyak 0,1109 g/ml, kemudian dicampur hingga larut dan merata. Campuran larutan tersebut diambil 9 ml dan dipindah ke dalam tabung sentrifus polialimer yang baru dan ditambahkan 4 ml KBr (d=1,063 g/ml) yang mengandung larutan 0,9% NaCl-0,01% EDTA, lalu disentrifus dengan menggunakan ultrasentrifugasi dengan rotor SW-40 pada kecepatan 36000 rpm pada suhu 4°C selama 24 jam, dari pemusingan akan diperoleh LDL pada lapisan atas dan dipisahkan dengan menggunakan alat pemotong tabung. Fraksi LDL yang diperoleh, dilakukan dialisis dengan larutan 0,9% NaCl-0,01% EDTA pH 7,4/4°C, dilakukan 3X2 L selama 72 jam. LDL yang diperoleh selanjutnya, disaring dengan millipore 0,45 μm, fraksi yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C. Pengujian terhadap kandungan protein dilakukan dengan uji Lowry dan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai standar (Lowry 1951).

Sediaan LDL yang telah diukur proteinnya dilakukan dialisis kembali menggunakan larutan 0,9% NaCl-0,01% EDTA pH 7,4/4°C, dilakukan 3X 2 l selama 72 jam. Dialisis ini bertujuan untuk menghilangkan EDTA dari sediaan LDL. Adapun derajat oksidasi LDL yang terbentuk diukur dengan uji asam tiobarbiturat (Kleinveld *et al.* 1992; Conti *et al.* 1991).

**Inhibisi kurkuminoid temumangga terhadap ekspresi molekul adesi.** Kultur sel lini CPAE diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dalam DMEM yang mengandung 20% FBS (v/v), dengan atau tanpa penambahan ekstrak kurkuminoid temumangga (2 ppm/ml dan 8 ppm/ml) sehingga diperkirakan 50% sel konfluen. Kontrol dibuat tanpa menambahkan ekstrak temumangga hanya diinkubasi. Kemudian sel dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali, lalu diberi 200 ug fraksi LDL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sehingga sel konfluen. Molekul adesi ditentukan dengan reaksi antigen antibodi (pewarnaan imunohistokimia).

**Pewarnaan imunohistokimia terhadap molekul adesi ICAM-1.** Slide monolayer (kultur sel endotel) dicuci dengan larutan DMEM dan dilakukan fiksasi dengan larutan aseton selama 2-3 menit lalu dikeringkan. Slide dicuci dengan 0,1 M buffer fosfat salin pH 7,4 (3x selama 10 menit), lalu diinkubasi dengan proteinase-K (10 ug/ml) selama 30 menit pada suhu 37°C, kemudian dibilas dengan 0,1M PBS sebanyak 3 kali, masing-masing

10 menit. Aktivitas *endogenous peroksidase* pada sel diblok dengan 0,3% hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) selama 15 menit, kemudian dibilas dengan akuades sebanyak 3 kali, masing-masing 10 menit. *Slide* kemudian diinkubasi dalam 2% *non-immune goat serum* pada suhu kamar selama 60 menit dan dikeringkan (udara) tanpa dibilas. *Slide* diinkubasi kembali selama 24 jam dalam *refrigerated*, dengan antibodi primer *monoclonal mouse anti human ICAM-1*(CD 54) cat. No: C2969 yang diencerkan 100 kali. Pada kontrol tidak ditambahkan antibodi primer, hanya diberi antibodi sekunder dan *slide* dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit lalu dibilas dengan 0,1M PBS masing-masing sebanyak 3 kali selama 15 menit. *Slide* diinkubasi dengan antibodi sekunder *biotinylated goat anti-mouse* (1:200) (Vector Elite, Vector Labs) dalam PBS pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya, *slide* dibilas sebanyak 3 kali masing-masing 10 menit dengan 0,1 M PBS lalu diinkubasi dalam *Avidin-Biotin-conjugated* (Elite Vecta Stain<sup>R</sup>, Vector Lab. Cat. No: PK 6100) (1:200) dalam PBS selama 60 menit. *slide* dibilas kembali dengan *posfat buffer* sebanyak 3 kali masing-masing 15 menit.

Segera setelah selesai dibilas, *slide* kemudian diinkubasi dengan larutan *3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB, sigma, cat. No. D-5905) selama 5 menit dan dilanjutkan dengan 3%  $H_2O_2$  yang dipersiapkan dalam DAB selama 20 menit. *Slide* dicuci beberapa kali sampai bersih dalam bufer fosfat, lalu dikeringkan dalam inkubator selama satu malam.

### Analisis Data

Sel endotel dapat menghasilkan protein molekul adesi yang akan bereaksi membentuk ikatan dengan antibodi terhadap anti ICAM-1. DAB digunakan untuk memvisualisasikan warna coklat kekuningan terhadap sel endotel yang imunoreaktif terhadap antibodi anti ICAM-1. Hasil pewarnaan molekul sel adesi (ICAM-1) dianalisis secara diskriptif.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

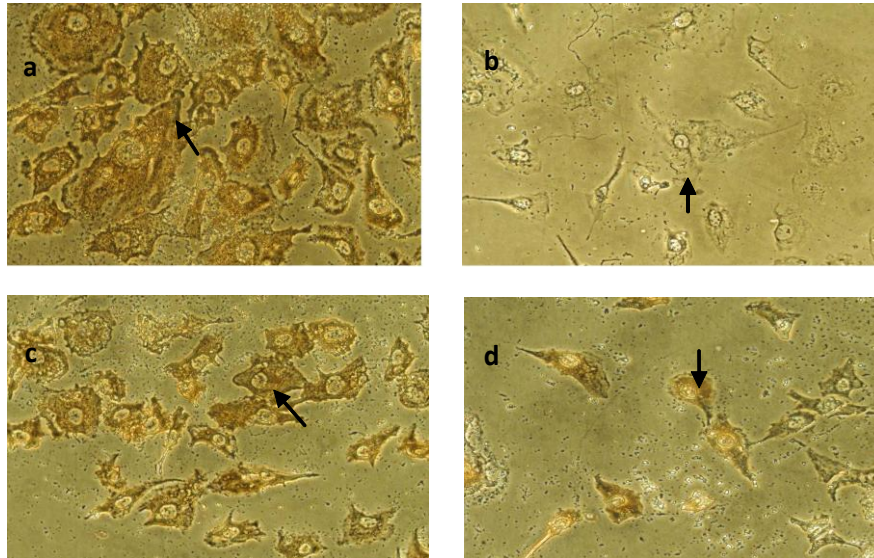
Jumlah protein LDL hasil isolasi dari ke 5 MEP sebelum diberi pakan aterogenik diperoleh 2,30 mg /ml sebanyak 7 ml. Setelah diberi pakan pakan aterogenik selama 3 bulan diperoleh protein

LDL 5,31 mg sebanyak 9 ml. Peningkatan total kolesterol dibandingkan dengan konsentrasi awal disebabkan pengaruh pakan aterogenik yang diberikan pada MEP selama 3 bulan.

Lipoprotein densitas rendah (LDL) hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi protein LDL setelah monyet ekor panjang (MEP) diberi pakan aterogenik selama 3 bulan. Kondisi ini adalah normal sebagai akibat pemberian pakan dengan kolesterol tinggi. Konsentrasi kolesterol darah tergantung dari banyaknya kolesterol yang diperoleh dari makanan maupun dari sintesa *de novo*. Mekanisme reseptor LDL memegang peranan penting dalam mendegradasi kolesterol di hati. Kolesterol ini disekresikan ke dalam kantong empedu untuk diubah menjadi empedu. Pembentukan kolesterol *de novo* di hati diatur oleh aktivitas enzim HMG-SKoA reduktase, dimana diet kolesterol dapat menurunkan aktivitas enzim tersebut (Hortan *et al.* 1996).

Pewarnaan imunohistokimia merupakan suatu metode yang didasarkan atas reaksi antigen antibodi. Sel endotel (lini sel CPAE) ditumbuhkan dalam medium pertumbuhan dan diinkubasi dengan LDL teroksidasi. Molekul adesi dapat terekspresikan apabila lini sel mengalami gangguan akibat diberi LDL oksidasi. Antibodi primer yang digunakan adalah *monoclonal antibody Human ICAM-1* (CD54). *Slide* preparat diwarnai dengan larutan *3,3-diaminobenzidin tetrahydro chloride* (DAB).

Efek ion  $Cu^{2+}$  mengakibatkan kerusakan pada komponen penyusun membran sel, seperti asam lemak tak jenuh yang merupakan bagian dari fosfolipid. Membran merupakan barier penting agar sel dapat berfungsi normal, demikian juga dengan sistem membran sel imun terhadap serangan berbagai benda asing (antigen). Untuk mendeteksi efek ion  $Cu^{2+}$  terhadap sel endotel/ lini sel dalam mengekspresikan molekul adesi ICAM-1 (Gambar 1). Gambar tersebut menunjukkan bahwa sel endotel/lini sel yang dikultur tetap mampu mengekspresikan molekul adesi (ICAM). Molekul adesi merupakan senyawa protein yang terdapat pada bagian intima dari sel endotel. Apabila sel mengalami gangguan dan menyebabkan kelukaan pada sel endotel, maka molekul adesi akan terekspresikan dan meningkat dalam kondisi aterosklerosis.



Gambar 1 Gambaran mikroskopis pewarnaan imunohistokimia untuk ICAM-1 pada endotel lini sel dengan  $\text{Cu}^{2+}$  5  $\mu\text{M}$ : (a) SE + Ab<sub>1</sub> 20  $\mu\text{g}$ , (b) SE tanpa Ab<sub>1</sub>, (c) SE + Ab<sub>1</sub> 20  $\mu\text{g}$  + ET 2 ppm, (d) SE + Ab<sub>1</sub> 20  $\mu\text{g}$  + ET 8 ppm (SE, sel endotel; ET, ekstrak temumangga).

Masing-masing gambar dalam penelitian ini menunjukkan bentuk sel dan mempunyai intensitas warna yang jelas. Intensitas warna molekul adesi yang diekspresikan sel berwarna coklat lebih pekat ditunjukkan Gambar a; c; dan d, dibandingkan Gambar b. Ion  $\text{Cu}^{2+}$  merupakan senyawa kimia yang dapat menginduksi sel sehingga sel akan teroksidasi dan menjadi racun bagi sel. Dalam kondisi patologis, keseimbangan normal antara produksi senyawa oksigen reaktif dengan kemampuan pertahanan antioksidan akan mengalami gangguan. Hal ini akan menggoyahkan rantai reduksi-oksidasi normal sehingga terjadi kerusakan oksidatif jaringan yang disebut sebagai stress oksidatif (Halliwell & Chirico, 1993). Sesuai dengan pendapat yang dikemukakan oleh Halliwell *et al.* (1992), berbagai logam berat dan logam transisi telah diketahui sebagai katalis radikal bebas.

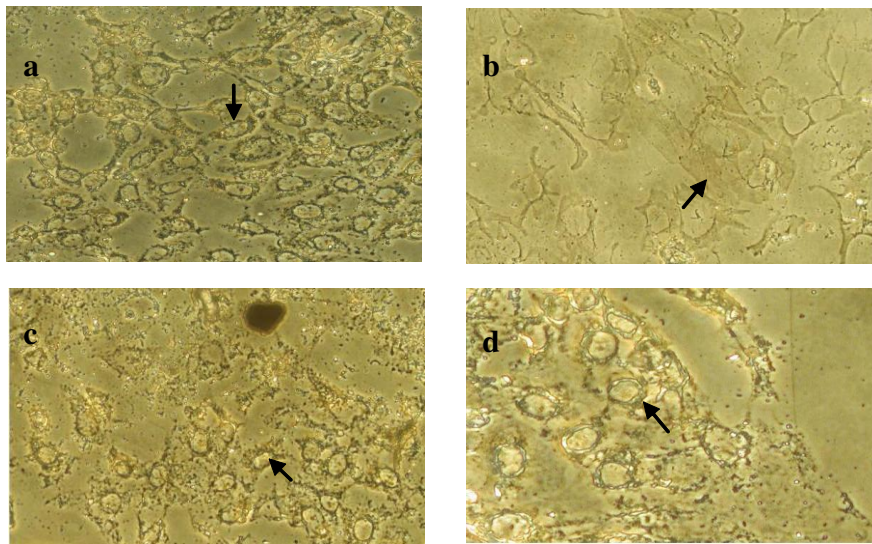
Menurut Sadikin (2001), serangan radikal bebas terhadap molekul sekelilingnya akan menyebabkan terjadinya reaksi berantai, kemudian menghasilkan senyawa radikal baru. Dampak reaktivitas senyawa radikal bebas dapat bermacam-macam dimulai dari kerusakan sel atau jaringan, penyakit autoimun, penyakit degeneratif hingga kanker. Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan di berbagai bagian sel, karena sangat

reaktif dalam gerakan yang tidak beraturan (Halliwell *et al.* 1992; Muhilal 1991). Kerusakan dapat terjadi pada komponen penyusun membran sel seperti asam lemak tak jenuh yang merupakan bagian dari fosfolipid, kerusakaan lebih lanjut terjadi pada organel sel sampai pada kerusakan DNA di dalam inti (Halliwell 2005) Dalam penelitian, antibodi anti ICAM-1 yang diinkubasikan pada slide kultur sel endotel akan bereaksi dengan molekul adesi ICAM-1, karena molekul adesi ICAM-1 dapat diekspresikan ke permukaan sel sebagai akibat pengaruh ion  $\text{Cu}^{2+}$  yang mengoksidasi sel. Ekstrak kurkuminoid temumangga dengan dosis 2 dan 8 ppm tidak dapat menahan laju oksidasi ion  $\text{Cu}^{2+}$  yang mengoksidasi kultur sel endotel.

Partikel LDL teroksidasi merupakan salah satu penyebab terjadinya plak aterosoma. Akibat dari proses oksidasi yang terjadi di dalam tubuh, maka radikal bebas yang ada di dalam tubuh akan mengoksidasi lipid lebih lanjut menghasilkan produk oksidasi lipid seperti malonaldehid. Pengaruh LDL yang diinduksi dengan ion  $\text{Cu}^{2+}$  disajikan dalam Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan adanya kerusakan yang cukup parah pada permukaan sel endotel yang dikultur. Hal ini disebabkan adanya molekul LDL yang merusak permukaan sel dan diperberat





Gambar 2 Gambaran mikroskopis pewarnaan imunohistokimia untuk ICAM -1 pada endotel lini sel, dengan 200µg LDL dan 5µM Cu<sup>2+</sup> dengan perbesaran 160x: ( a) SE + Ab<sub>1</sub>20 µg, (b) SE tanpa Ab<sub>1</sub>, (c) SE + Ab<sub>1</sub> 20 µg + ET 2 ppm, (d) SE + Ab<sub>1</sub> 20 µg + ET 8 ppm (SE, sel endotel; ET, ekstrak temumangga).

dengan diinduksi oleh Cu<sup>2+</sup>. Kerusakan ini berakibat fatal terhadap struktur sel sehingga aktivitas sel tidak dapat dikendalikan. Dalam penelitian ini, baik kontrol positif (a), perlakuan (c dan d) maupun kontrol negatif (b) menunjukkan kumpulan sel busa. Kejadian ini tidak dapat disangkal lagi bahwa LDL teroksidasi merupakan penyebab utama kerusakan sel endotel yang dikultur. Penambahan ekstrak kurkuminoid temumangga (ET) pada kultur sel endotel dengan dosis 2 ppm dan ET 8 ppm tidak dapat menahan laju oksidasi LDL sehingga berakibat fatal pada sel dan molekul adesi (ICAM-1) dapat muncul dalam penelitian ini.

Analisis imunohistokimia terhadap sel endotel berasal dari lini sel yang diperlakukan dengan LDL yang diinduksi dengan ion Cu<sup>2+</sup> menunjukkan terekspresinya molekul adesi (ICAM-1). Molekul adesi dapat diproduksi sebagai akibat sel yang mengalami gangguan. Gangguan tersebut menyebabkan perubahan struktur pada permukaan sel endotel sehingga sel akan menghasilkan berbagai produk. Salah satu produk adalah molekul adesi (ICAM-1) yang dapat diekspresikan ke permukaan sel endotel dan dapat diamati setelah preparat sel diinkubasi dengan antibodi anti ICAM-1 dan diwarnai dengan DAB. Molekul adesi

berperan penting pada proses inflamasi oleh *mediating leucocyte-endothelial cell adhesion*, migrasi leukosit, dan interaksi sel T dengan *antigen presenting* (APC). Sel imun dan sel peradangan ini diyakini memberikan kontribusi besar terhadap mulainya dan menetapnya respon imun dan respon peradangan pada pembuluh darah yang merupakan awal kelukaan dari endotel.

Pewarnaan imunohistokimia terjadi reaksi antara antigen dengan antibodi membentuk suatu ligan, sehingga terjadi ikatan antigen-antibodi. Terekspresinya molekul adesi pada permukaan sel menandakan ada proses peradangan pada sel tersebut. Sesuai dengan pendapat yang dikemukakan oleh Silverman *et al.* (2001) dan Caterina *et al.* (2000), sel endotel pembuluh darah mampu mengekspresikan berbagai kemokin, sitokin dan molekul adesi yang dapat digunakan untuk medeteksi terjadinya proses-proses peradangan. Penelitian yang dilakukan oleh Gerbacki *et al.* (2005), imunohistokimia terhadap jaringan paru-paru memperlihatkan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1 pada permukaan sel, dan pewarnaan imunohistokimia juga dilakukan terhadap sel endotel LT2 yang diinduksi dengan TNF- $\alpha$  secara *in vitro*. Secara *in vitro* molekul adesi (ICAM-1) dapat diekspresikan ke permukaan sel endotel, sedangkan secara *in vivo*,

karakteristik proses aterosklerosis dimulai adanya gangguan fungsi endotel. Hewan yang diberi pakan aterogenik akan memunculkan molekul adesi (VCAM-1) pada permukaan sel endotel dan merupakan tahap awal kejadian aterosklerosis. Sesuai pendapat yang dikemukakan Crowther (2005), peningkatan adesi seluler berhubungan dengan adanya disfungsi endotel dan tahap selanjutnya akan terjadi pengambilan sel-sel radang, pelepasan sitokin dan pengambilan lipid pada akhir menjadi plak aterosklerosis.

Partikel LDL teroksidasi dan ion  $\text{Cu}^{2+}$  merupakan racun bagi sel. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Holvoet dan Collen (1994), Mertens dan Holvoet (2001) bahwa sel endotel yang diinduksi dengan LDL teroksidasi akan mengekspresikan ELAM-1, ICAM-1 dan VCAM-1 sehingga akan meningkatkan perlekatan monosit. Peningkatan perlekatan monosit pada permukaan endotel akan mendorong terjadi peningkatan permeabilitas pada permukaan sel endotel sehingga mengganggu aktivitas normal endotel. Aktivitas abnormal ini menandakan suatu bentuk lesi awal aterosklerosis dan telah diteliti banyak diteliti pada hewan percobaan.

### Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan yang telah dilakukan, dapat dibuat beberapa simpulan sebagai berikut: dosis kurkuminoid yang diberikan pada kultur lini sel endotel tidak mampu menghambat laju reaksi oksidasi LDL sehingga molekul adesi ICAM-1 dapat diekspresikan. Secara *in vitro*, molekul LDL teroksidasi dapat meningkatkan kerusakan permukaan lini sel.

### Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang ada, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dan teliti terhadap molekul adesi ICAM-1 secara *in vitro*. Masih diperlukan orientasi konsentrasi antibodi primer yang digunakan. Untuk memperkuat hasil penelitian ini, dosis kurkuminoid perlu ditingkatkan konsentrasinya agar reaksi oksidasi LDL dapat dihambat.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis ucapkan terima kasih kepada drh. Sulistyani, MSc., Ph.D., Prof. drh. Dondin Sajuthi, MST., Ph.D dan Prof. Dr. Latifah K. Darusman, M.Si., sebagai Anggota Komisi pembimbing serta Dr. dr. Irma Suparto dan Prof. Dr. Ir. Sri Supraptini Mansjoer yang telah membantu menyempurnakan penulisan ini. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Dr. drh. Diah Iskandriati selaku Kepala Laboratorium Virologi dan Mikrobiologi beserta staf yang telah memberikan fasilitas penggunaan laboratorium selama penelitian. Tidak lupa ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada Ketua beserta staf Kesekretariatan Mayor Primatologi (mbak Yanti, Yana dan Keni) yang telah membantu menyelesaikan penulisan ini.

### Daftar Pustaka

- Adam *et al.*** 1985. Ovariectomy, social status, and atherosclerosis in Cynomolgus Monkeys. *Atherosclerosis* 5:192-200.
- Caterina DR, Liao JK, Libby P.** 2000. Fatty acid modulation of endothelial activation. <http://www.ajcn.org/cgi/content/full/71/1/213> [23 maret 2001].
- Conti M, Morand CP, Levillain P, Lemonniera A.** 1991. Improved flouoretic determination of malondialdehyde. *Journal Clinical Chemistry* 37: 1273-1275.
- Crawther MA.** 2005. Pathogenesis of atherosclerosis. *The American Society of hematology*, 1-11.
- Fuller CJ, Jialal I.** 1994. Effetes of antioxidants and fatty acids on low-density-lipoprotein oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 60: 1010S-1035S.
- Garbacki N, Kinet M, Nusgens B, Desmecht D, Darr J.** 2005. Proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves, reduce endothelial adhesion molecule ICAM-1 and VCAM-1. <http://www.Journal-Inflammation.com/content/2/1/9> [9 Juni 2006].
- Halliwell B, Chirco S.** 1993. Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 715S-715S.

- Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE.** 1992. Free radicals, antioxidants and human diseases, where are we now ?. *J. Lab Clin Med.* 119(6): 598-620.
- Holvoet P, Collen D.** 1994. Oxidized lipoprotein in atherosclerosis and thrombosis. *Faseb J.* 8: 1279-1284.
- Hoorn van DE, Norren VK, Boelens PG, Nijveldt RJ, Leeuwen van PAM.** 2003. Biological activities of flavonoids. *Sci & Med* 9(3):152-161.
- Hortan HR, Moran LA, Ochs RS, Scrimgeour.** 1996. *Principles of Biochemistry.* Ed. 2. New York: Prentice-Hall International, Inc. hal 459-491.
- Joris IT, Zand T, Nunnari TJJ, Krolokowski FJ, Majno G.** 1983. Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I. adhesion of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. *Ams J. Pathol.* 113:341-358.
- Kleinveld HA, Hak-Lemmers HM, Stalenhoef AFH, Demacker PNM.** 1992. Improved measurement of low-density lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure of isolation low-density lipoprotein. *Clin. Chem.* 38: 2066-2072.
- Merten A and Holvoet P.** (2001). Oxidized LDL and HDL: antagonists in Atherothrombosis. *Faseb J.* 15:2073-2077.
- Quiles JL, Dolores M, Ramires-Tortosa CL, Aquilera CM, Battina M, Gill A, Ramires-Tortosa MC.** 2002. *Curcuma longa* extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:1225-1231.
- Rao MNA.** 1995. Antioxidant properties of curcumin. Di dalam: *Proceeding of the International Symposium on Curcumin Pharmacology-chemistry (ISCP) August 29-31, 1995, Yogyakarta Indonesia. Curcumin Pharmacology-chemistry.* Yogyakarta.
- Ruby, Lokesh BR.** 1995. Anti-tumor and antioxidant activity of Natural curcuminoid. *Cancer Lett.* 146:35-37.
- Sadikin M.** 2001. Pelacakan dampak radikal bebas terhadap makromolekul. Dalam Kumpulan Pelatihan: Radikal bebas dan antioksidan dalam kesehatan. Jakarta: Fakultas Kedokteran UI.
- Sreejayan N, Rao MNA.** 1997. Curcuminoid as potent inhibitor of lipid peroxidation. *J. Phar. Pharmacol.* 46: 1013 - 1016.
- Sulistiyani, Clair RW.** 1991. The Method of isolation of primary cells and their subculture influence the expression of LDL receptor on pigeon and chicken embryo cells in culture. *Arterioscler.* 91: 123-135.
- Stocker R, Keanedy JF. jr.** 2004. Role of Oxidative modification in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 88: 1381- 1478.
-