Quercetin sebagai Penghambat Aktivasi NF- κ B dan Penurunan Kadar MCP-1 pada Kultur HUVECs yang Dipapar dengan Leptin

Quercetin as NF- κ B activation inhibition & MCP-1 level decreasing on HUVECs culture exposed by Leptin

Muhammad Masyhur¹, Kusworini Handono², L Enggar Fitri³, M Rasjad Indra⁴

¹Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Pemkab Jombang

²Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar

³Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

⁴Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRAK

Hiperleptin mempengaruhi proses oksidasi enzim *N-acetyldiphosphat* (NADPH) yang berfungsi pada proses metabolisme dan reaksi redoks sehingga terjadi stres oksidatif. Peningkatan ROS menyebabkan aktifnya *nuclear factor kappa beta* (NF- κ B) yang mengubah reaksi redoks di dalam sel melalui dimer p50 dan p65 yang bertranslokasi ke inti sel yang akan mempengaruhi gen promotor untuk mengekspresikan faktor kemotaksis yaitu *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1). Tujuan penelitian ini adalah melihat efektifitas *quercetin* pada penurunan ekspresi protein proinflamasi penyebab aterosklerosis. Penelitian ini merupakan eksperimental murni dengan menggunakan sampel kultur sel endotel manusia (HUVECs) yang diberi leptin 500ug/mL dan diinkubasi selama 6 jam yang selanjutnya diberi perlakuan *quercetin* dengan variasi dosis 0 μ M, 50 μ M, 125 μ M dan 625 μ M dan diamati aktivasi NF- κ B menggunakan metode *immunofluorescence* dan kadar MCP-1 menggunakan teknik ELISA. Hasil analisa data dengan menggunakan *Tukey* menunjukkan adanya penurunan aktivasi NF- κ B yang signifikan setelah diinkubasi dengan *quercetin* dosis 125 μ M ($p < 0,001$) dan penurunan kadar MCP-1 sebesar $503,40 \pm 23,93324$ ($p < 0,001$) apabila dibandingkan dengan kontrol positif. Dosis optimal *quercetin* adalah perlakuan dengan dosis 125 μ M karena memberikan pengaruh yang signifikan dalam menurunkan kadar MCP-1 dan penghambatan aktivasi NF- κ B. Dosis 625 μ M hanya menghambat aktivasi NF- κ B tetapi tidak signifikan dalam menurunkan kadar MCP-1 ($p = 0,916$). Peningkatan dosis *quercetin* menunjukkan korelasi yang signifikan dengan penurunan kadar MCP-1 ($r = -0,498$, $p < 0,001$) dan penghambatan aktivasi NF- κ B ($r = -0,803$, $p < 0,001$).

Kata Kunci: Aktivasi NF- κ B, disfungsi endotel, leptin, MCP-1, *quercetin*

ABSTRACT

Hyperleptin affecting oxidation process of *N-acetyldiphosphat* (NADPH) enzyme which functioned in the metabolic process and redox reaction, resulting oxidative stress. ROS increasing trigger the activation of *nuclear factor kappa beta* (NF- κ B) which alters redox reaction in the cell through translocation of p50 and p65 dimer to the cell nuclear affecting promoter gen to express chemo taxis factor, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1). The research aims to observe the *quercetin* effectiveness on pro-inflammation protein expression decreasing caused atherosclerosis. This is an experimental laboratory experiment using human endothelia cell sample (HUVECs) exposed by Leptin 500ug/mL and incubated for 6 hours then treated with *quercetin* with dose variation of 0 μ M, 50 μ M, 125 μ M and 625 μ M. The NF- κ B activation observed with immune-fluorescence method and MCP-1 level measurement used ELISA technique. Data analysis using *Tukey* showed the significant decreasing of NF- κ B activation after incubated with *quercetin* 125 μ M ($p < 0,001$) and decreasing level of MCP-1 as $503,40 \pm 23,93324$ ($p < 0,001$) compared to positive control. The optimal dose of *quercetin* that significantly decreases MCP-1 level and NF- κ B activation inhibition is 125 μ M. Meanwhile, *quercetin* dose of 625 μ M only inhibiting NF- κ B activation but not significantly decreasing the MCP-1 level ($p = 0,916$). The increasing of *Quercetin* dose showed a significant correlation with the MCP-1 level decreasing ($r = -0,498$, $p < 0,001$) and NF- κ B activation inhibition ($r = -0,803$, $p < 0,001$).

Keywords: Endothelial dysfunction, leptin, MCP-1, NF- κ B activation, *quercetin*

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 26, No 4, Agustus 2011; Korespondensi: Muhammad Masyhur. Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Pemkab Jombang, Jl. dr. Soetomo No. 75-77 Jombang Tel. (0321) 870214 Email : kond4ng@gmail.com.

PENDAHULUAN

Prevalensi *overweight* dan obesitas meningkat sangat tajam di seluruh dunia yang mencapai tingkatan yang membahayakan. Kejadian obesitas yang ada di negara-negara maju seperti di negara-negara Eropa, USA dan Australia telah mencapai tingkatan epidemi. Keadaan tersebut tidak hanya terjadi di negara-negara maju. Di beberapa negara berkembang obesitas justru telah menjadi masalah kesehatan yang lebih serius. Sebagai contoh, 70% penduduk dewasa Polynesia di Samua sudah mengalami obes (1,2).

Obesitas merupakan akibat dari adanya ketidakseimbangan antara *energy intake* (asupan energi) yang melebihi energi yang digunakan (*energy expenditure*). Beberapa mekanisme fisiologis berperan penting dalam diri individu untuk menyeimbangkan keseluruhan asupan energi dengan keseluruhan energi yang digunakan dan untuk menjaga berat badan stabil dalam jangka waktu yang cukup panjang. Obesitas hanya akan muncul apabila terjadi ketidakseimbangan energi untuk periode waktu yang cukup panjang (2).

Pada keadaan obesitas terjadi resistensi leptin di hipotalamus sehingga menyebabkan gangguan transport leptin melalui *blood brain barrier* dan adanya gangguan dari *supresor of cytokine signalling* (SOCS). Perubahan keadaan ini menyebabkan peningkatan konsentrasi leptin di plasma darah pada penderita obesitas yang disebut hiperleptinemia (3). Hiperleptinemia merupakan salah satu ciri dari obesitas dan keadaan ini mempengaruhi proses oksidasi enzim *N-acetyldiphosphat* (NADPH) yang berfungsi pada proses metabolisme dan reaksi redoks, peningkatan radikal hidroksida (OH^*), superoksida (O^*), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) baik secara *in-vitro* maupun *in vivo*. Senyawa-senyawa ini menyebabkan terjadinya peningkatan stres oksidatif di endotel yang akhirnya terjadi akumulasi radikal bebas dalam hal ini *Reactive Oxygen Species* (ROS) (4).

Ikatan leptin dengan reseptor leptin (obR) menyebabkan timbulnya akumulasi ROS yang berakibat pembentukan radikal bebas superoksida dan selanjutnya $\text{NF-}\kappa\text{B}$ mengalami aktivasi. Aktifnya $\text{NF-}\kappa\text{B}$ dapat menginduksi terbentuknya protein-protein sistem imun seperti sitokin meliputi *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) dan *Interleukin-1* (IL-1), molekul adesi yang meliputi VCAM dan ICAM-1, zat vasoaktif meliputi eNOS dan NO serta faktor kemotaksis seperti MCP-1. Kejadian tersebut meningkatkan progresifitas aterosklerosis sehingga mengakibatkan pembuntutan arteri koroner.

Karena inflamasi menjadi faktor utama dari patogenesis aterosklerosis, maka pencegahan dan pengobatan dapat dimulai dengan penghambatan aktivasi protein yang menimbulkan inflamasi, yaitu $\text{NF-}\kappa\text{B}$ sebagai target (5,6,7). Pengobatan yang sering dilakukan untuk menghambat proses atherogenesis bermacam-macam, seperti penggunaan statin dan ACE inhibitor. Salah satu bahan yang dapat mencegah terjadinya aterosklerosis adalah antioksidan, alkaloida, *flavonoid* seperti halnya *quercetin* dan mengontrol pola makan dengan banyak mengonsumsi sayur dan buah. (8). *Quercetin* merupakan senyawa aktif yang banyak dihasilkan dari buah-buahan misalnya apel, tomat, anggur merah dan juga dari sayur-sayuran seperti buncis, cabe dan bawang. *Quercetin* dinyatakan paling banyak didapatkan pada bawang (347

mg/Kg), apel (36 mg/Kg) dan anggur merah (11 mg/Kg). *Quercetin* termasuk kedalam famili *flavonoid* yang selama ini diketahui mempunyai efek pada penurunan beberapa ekspresi protein proinflamasi (9).

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh pemberian *quercetin* pada kultur sel endotel (HUVECs) normal dan kultur sel endotel yang telah dipapar dengan leptin terhadap aktivasi $\text{NF-}\kappa\text{B}$ dan kadar *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1). Hipotesis yang ingin diuji adalah apakah pemberian *quercetin* dapat menghambat aktivasi *nuclear factor kappa beta* ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) dan menurunkan kadar *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) akibat paparan hiperleptin pada kultur sel *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs).

METODE

Penelitian dilakukan menggunakan desain eksperimental laboratorium dengan rancangan *posttest only control group design* pada kultur *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) yang diinduksi dengan paparan hiperleptin (500ng/mL). Kultur HUVECs dibagi dalam dua kelompok kontrol, yaitu kelompok tanpa paparan *quercetin* dan leptin sebagai kontrol negatif, kelompok dengan paparan leptin 500 dengan plasebo sebagai kontrol positif, dan 3 perlakuan dan 3 kelompok perlakuan yang diberikan paparan leptin 500 µg/ml dengan tiga dosis leptin yaitu 50µM, 125 µM dan 625 µM berdasarkan hasil penelitian pendahuluan. Semua kelompok kultur sel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C untuk kemudian dilakukan pengukuran aktivasi $\text{NF-}\kappa\text{B}$ dan MCP. Pengukuran ikatan p50-p65 (dimer $\text{NF-}\kappa\text{B}$) dilakukan dengan metode *immunofluorescence*. Kultur sel yang telah siap (*monolayer*) selanjutnya difiksasi dengan menggunakan *methanol* 4% dan selanjutnya dicuci dengan PBS-T 0,1% 3x masing-masing selama 3 menit, ditambahkan Triton-X 0,2% pada *ice-cold* dan diinkubasi selama 5 menit selanjutnya dicuci kembali dengan *Phosphate Buffered Saline with Tween* (PBS-T) 0,1% 3x masing-masing selama 3 menit. *Blocking* dengan BSA dilakukan selama 30 menit dan kemudian dicuci dengan PBS-T 0,1% 3x masing-masing selama 3 menit selanjutnya menambahkan anti p50 (antibodi primer) dalam *blocking* selama semalam (*overnight*). Setelah itu dicuci kembali dengan PBS-T 0,1% 3x masing-masing selama 3 menit, kemudian ditambahkan antibodi sekunder *Fluorescent isothiocyanate* (FITC) dan diinkubasi gelap selama 2 jam dalam kondisi dingin dan dicuci dengan PBS-T 0,1% 3x masing-masing selama 3 menit selanjutnya *coverslip* diambil dan siap dibaca. Pembacaan dilakukan menggunakan *Confocal Scanning Laser Microscope* (CSLM) pada perbesaran 600x dan perhitungannya dilakukan dengan *Immunofluorescence Imaging software*.

Pemeriksaan kadar MCP-1 dilakukan dengan menggunakan metode ELISA. Supernatan dari kultur umbilikus ditempelkan kedalam dinding *plate* Elisa dan diinkubasi semalam (*overnight*), selanjutnya dicuci dengan PBS-T sebanyak 6x selama 3 menit kemudian ditambahkan 50 µl *rabbit polyclonal to MCP-1* dalam *assay buffer* diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar dan dishaker selama 5 menit sediaan dicuci dengan PBST sebanyak 6x selama 3 menit dan ditambahkan 50 µl *goat IgG biotin anti rabbit* dalam *assy buffer* diinkubasi selama 1 jam dan dishaker selama 5 menit kemudian dicuci dengan PBS-T

sebanyak 6x selama 3 menit selanjutnya ditambah 50µl SAHRP dalam *assay buffer* dan dicuci dengan PBS-T sebanyak 6x selama 3 menit kemudian ditambah substrat *Toluen Metiline Blue* (TMB) 100 µl diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar dan dishaker selama 5 menit. Pada sediaan kemudian ditambahkan 100 µl HCL 1N (*stop solution*) kemudian siap dibaca dengan ELISA reader λ 450nm. Untuk mengetahui standar pemeriksaan, data yang telah diperoleh selanjutnya dihitung dengan menggunakan grafik nilai absorbansi sebagai komparasinya

Untuk membuktikan adanya hubungan antara aktivasi NF-κβ dan kadar MCP-1 dilakukan uji regresi korelasi. Perbedaan antara kelompok kontrol dan perlakuan diuji dengan menggunakan uji *Analysis of Varians* (ANOVA), kemudian dilanjutkan dengan uji *Tukey* menggunakan SPSS 14 untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna.

HASIL

Ekspresi Nuclear Factor Kappa Beta (NF-κβ) dengan metode Immunofluorescence

Ekspresi yang mengindikasikan adanya aktivasi NF-κβ pada kultur HUVECs yang dipapar *quercetin* dengan dosis 625µM (7567,80±449,96689) lebih rendah secara signifikan ($p<0,001$) dibandingkan kelompok dengan dosis 125 µM (13996,60±1651,18785) dan 50 µM (24727,40±2755,24859, $p<0,001$) dan kontrol positif ($p<0,001$). Hasil juga menunjukkan bahwa semakin besar dosis *quercetin* semakin rendah aktivasi NF-κβ (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil analisis *Tukey* jumlah NF-κβ yang teraktivasi pada sel endotel

Perlakuan	Aktivasi NF-κβ (%) Mean ± SD*
Kontrol	1490,20 ± 115,15945 ^a
Kontrol Leptin	36096,60 ± 144,99241 ^e
L500 Q50	24727,40 ± 2755,24859 ^d
L500 Q125	13996,60 ± 1651,18785 ^c
L500 Q625	7567,80 ± 449,96689 ^b

Keterangan : *) Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$)

Kadar Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) dengan Metode ELISA

Hasil menunjukkan bahwa kadar MCP-1 pada pemberian leptin (656,00±73,42683) lebih tinggi secara bermakna dibandingkan normal (504,80±16,75410). Pemberian *quercetin* pada dosis 50 memberikan kadar MCP-1 (574,40±43,72414) yang lebih rendah daripada kontrol positif hingga sama dengan normal ($p=0,04$). Peningkatan *quercetin* hingga 125 memberikan kadar MCP-1 (481,40±22,54551) yang lebih rendah dari dosis 50 ($p=0,016$) dan kontrol positif ($p<0,001$) hingga sama dengan normal ($p=0,898$). Peningkatan dosis hingga 625 tidak memberikan perbedaan kadar MCP-1 (503,40±23,93324) dibandingkan dosis 50 ($p=0,09$) dan 125 ($p=0,916$).

Tabel 2. Hasil analisis *Tukey* kadar MCP-1 pada sel endotel

Perlakuan	Kadar MCP-1 (ng/ml) Mean ± SD*
Kontrol	504,80±16,75410 ^{ab}
Kontrol Leptin	656,00±73,42683 ^c
L500 Q50	574,40±43,72414 ^b
L500 Q125	481,40±22,54551 ^a
L500 Q625	503,40±23,93324 ^{ab}

Keterangan: *) Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p<0,05$)

Hubungan Ekspresi NFKB dan MCP-1

Hasil uji korelasi menunjukkan bahwa hubungan perlakuan antara aktivasi *nuclear factor kappa betha* (NF-κβ) dengan kadar *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) menunjukkan korelasi kuat dan signifikan ($r=0,8$; $p=0,00$). Hal itu menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara penurunan aktivasi NF-κβ dengan kadar MCP-1 pada kultur sel endotel yang sebelumnya telah dipapar dengan hiperleptin. Keadaan yang sama juga terjadi pada korelasi aktivasi NF-κβ dengan berbagai dosis *quercetin* yang menunjukkan korelasi yang sangat signifikan pula ($r=-0,803$) dan juga korelasi kadar MCP-1 dengan berbagai perlakuan *Quercetin* (50 µM, 125 µM, dan 625 µM) dengan nilai korelasi $r=-0,498$.

DISKUSI

Pengukuran aktivasi NF-κβ yang dianalisis dengan *One Way ANOVA* dan uji *Tukey* dengan taraf signifikan 5% didapatkan bahwa pemberian *quercetin* dengan dosis 625 µM dapat menurunkan aktivasi NF-κβ secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol leptin dan kelompok perlakuan lainnya. Dosis dari *quercetin* yang memberikan pengaruh maksimal pada aktivasi NF-κβ dalam penelitian ini adalah dosis *quercetin* 625 µM. Kejadian serupa juga terjadi pada penelitian terdahulu yang memberikan perlakuan *quercetin* pada kultur otot polos, dengan potensi *Acetyl-11-Keto-β-Boswellic Acid* (AKβBA) dosis (10-100 µM) yang bereaksi melalui penghambatan *phosphorilasi C-Jun* yang selanjutnya menurunkan aktifitas *signaling* pada AP-1 dan NF-κβ. Keadaan tersebut disebabkan adanya aktifitas antiinflamatori yang ada pada *quercetin* yang merupakan *flavonoid* (antioksidan) (10).

Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) merupakan bagian dari molekul *proatherogenik* yang memicu inflamasi vaskuler kronik melalui perekrutan dan aktivasi monosit yang memainkan peran provital pada perkembangan aterosklerosis. Sel endotel, *vascular smooth muscle cells* (VSMC) dan leukosit ditunjukkan pada kerusakan vaskuler yang disebabkan oleh MCP-1. Dilaporkan bahwa ekspresi dari protein MCP-1 ini dapat disebabkan oleh oxidative stress, *lipid inflammatory teroksidasi* dan Angiotensin II. (11). Pada penelitian ini terlihat produksi MCP-1 diendotel semakin meningkat setelah pemberian leptin. Kadar MCP-1 pada kelompok A (504,80±16,75410) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok B (kontrol leptin) sebesar 656,00±73,42683. Hal tersebut terjadi kemungkinan akibat adanya peningkatan proses stress oksidatif di sel endotel yang ditengarai akibat

adanya induksi hiperleptin yang bertindak sebagai stimulator.

Pemberian perlakuan *quercetin* terhadap penurunan ekspresi kadar MCP-1 pada kultur sel endotel yang dipapar dengan hiperleptin terlihat sangat signifikan. Hal itu terlihat dari data ekspresi kadar MCP-1 dengan berbagai dosis yang selanjutnya dianalisis dengan *One Way ANOVA* dan *Tukey* yang menunjukkan penurunan yang signifikan dengan taraf signifikansi 5% ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan *quercetin*. Dosis optimal dalam menurunkan ekspresi kadar MCP-1 adalah $125 \mu\text{M}$ karena penurunannya terlihat berbeda secara signifikan ($p = 0,00$) dibandingkan dengan kontrol leptin, perlakuan *quercetin* $50 \mu\text{M}$ dan $625 \mu\text{M}$. *Quercetin* mampu menghambat fosforilasi dari berbagai reseptor *growth factor* dan pada jalur *reactive oxygen species* (ROS) serta jalur transkripsi gen. *Quercetin* juga merupakan anti mitogenik dan anti proliferasi (12). *Quercetin* memiliki peranan besar dalam menghambat aktivasi enzim-enzim kinase yang dapat menyebabkan terjadinya reaksi fosforilasi pada NF- κB . *Quercetin* juga mempunyai kemampuan dalam mencegah transkripsi gen/protein (proteomik) yang menginduksi faktor inflamasi (peradangan) seperti TNF- α , IL-1, VCAM dan ICAM pada sel endotel (13).

Proses penghambatan pada aktivasi NF- κB dan MCP-1 dimungkinkan terjadi melalui beberapa proses penghambatan. Proses hambatan yang pertama adalah menghambat aktivitas NADPH oksidase guna mencegah terjadinya akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan enzim yang diperlukan leptin dalam proses reduksi oksidasi (*redox*). Proses reaksi *redox* akan meningkatkan sekresi stress oksidatif dalam hal ini superoksid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) yang merupakan komponen ROS yang juga akan menghambat pengaktifan signal transduksi di intra seluler. *Quercetin* berperan sebagai anti oksidan yang bertindak sebagai *scavenger* (13).

Quercetin yang merupakan *flavonoid* mampu mengikat gugus kinase, dalam hal ini adalah *Mitogen Activated Protein Kinase* pathway (MAPK). Aktivitas MAPK sebagai enzim tidak mampu meningkatkan fosforilase *c-Jun* dan inisiasi jalur *Activator Protein-1* (AP-1) pada sel endotel

(4,9). *Quercetin* dalam hal ini mampu menghambat aktivasi NF- κB dengan penghambatan degradasi ikB dan tidak terjadinya fosforilase. Akibatnya dimer dari NF- κB (p50 dan p65) tidak terpelas dan selanjutnya tidak terjadi translokasi protein p50 dan protein p65 ke dalam nuklues (6). Peranan penting *Quercetin* dalam menghambat gen promotor pada inti sel sehingga tidak melangsungkan transkripsi protein yang bersifat proinflamatori yang disebabkan adanya stimulus dari leptin. Kemampuan *Quercetin* dalam menghambat promotor gen di inti sel melalui interaksi bioaktif dari *Quercetin* dengan gen penyandi transkripsi/translasi (nutrigenomik).

Penelitian ini menunjukkan peningkatan MCP-1 yang dapat memicu sekresi beberapa protein proinflamasi dan menimbulkan terjadinya proliferasi sel sehingga selanjutnya sel endotel mengalami formasi remodelling. *Quercetin* dalam hal ini mampu mencegah terekspresinya *growth factor* ini melalui mekanisme yang telah dibahas di atas. Hal itu dapat terjadi karena ketika protein MCP-1 disekresikan, protein itu diduga belum melakukan interaksi sehingga kemungkinan kerjasama antar protein belum terjadi atau diduga pada tahap ini, protein tersebut masih menjalankan perannya secara sendiri-sendiri. Apabila protein kembali dikeluarkan dari sel endotel, kemungkinan terjadi proses interaksi antara MCP-1 dengan protein lain (*growth factor*) yang akan menstimulus mekanisme inflamatori dengan merangsang sekresi sitokin proinflamatori (TNF- α , IL-1 β , IL-6, E-selektin, ICAM dan VCAM) dan molekul adhesi (14).

Penelitian ini membuktikan terjadi peningkatan aktivasi NF- κB dan MCP-1 pada kultur sel HUVECs setelah diberikan leptin. Pemberian *quercetin* dapat menurunkan aktivasi NF- κB pada kultur HUVECs yang dipapar dengan leptin. *Quercetin* dosis rendah dapat menurunkan kadar MCP-1 pada kultur HUVECs yang diinduksi paparan leptin. Penelitian lebih lanjut perlu dikaji tentang antioksidan dan senyawa *flavonoid* terhadap faktor inflamasi lainnya seperti *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) dan *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) dan beberapa protein sitokin lainnya yang diinduksi oleh paparan MCP-1 secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Weiss T and Shore S. *Obesity and Asthma Direction for Research*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2004; 169(8): 963-968.
- World Health Organization. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic*. WHO Technical Report Series. 2000; 894: 1-253.
- Dötsch Jörg, Rascher W, and Meissner U. *New Insights into Leptin Resistance by Modifying Cytokine Receptor Signal Transduction*. European Journal of Endocrinology. 2005; 152(3): 333-334.
- Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, and Busse R. *Leptin Induces Oxidative Stress in Human Endothelial Cells*. The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1999; 13(10): 1231-1238.
- Davignon J and Ganz P. *Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis*. Circulation. 2004; 109: 27-32.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, and Theoharides TC. *The Effect of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer*. Pharmacological Reviews. 2000; 52(4): 673-751.
- Rosicka M, Kresek M, Moutule M, et al. *Serum Ghrelin Levels in Obese Patient: There relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptor levels*. Physiology Research. 2003; 52(1): 61-66.
- Hansson GK. *Mechanisms of Disease Inflammation, Artherosclerosis, and Coronary Artery Disease*. The New England Journal of Medicine. 2005; 352: 1685-1695.
- Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, et al. *Phase I Clinical Trial of the Flavonoid Quercetin: Pharmacokinetics and Evidence for in Vivo Tyrosine Kinase Inhibition*. Clinical Cancer Research. 1996; 2(4): 659-668.
- Cuaz-Pérolin C, Billiet L, Baugé E, et al. *Antiinflammatory and Antiatherogenic Effects of the NF- κB Inhibitor Acetyl-11-Keto- β -Boswellic Acid in LPS-Challenged ApoE $^{-/-}$ Mice*. Atherosclerosis, (4,9).

- Thrombosis, and Vascular Biology. 2008; 28(2): 272-277.
11. Lawrence GS. *Implikasi Klinis Disfungsi Endotel dan Radikal Bebas*. Jurnal Medika Nusantara. 2004; 25(2): 94-102.
 12. Gunawan D dan Mulyani S. *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi)*. Jilid 1. Jakarta: Penebar Swadaya; 2004.
 13. Milner JA. *Molecular Targets for Bioactive Food Components*. The Journal of Nutrition. 2004; 134(9): 2492S-2498S.
 14. Baratawidjaja KG. *Imunologi Dasar*. Edisi ke-7. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2006.