

**PENGHAMBATAN AKTIFASI NF κ B OLEH CAPE (CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER),
KOMPONEN AKTIF MADU LEBAH (HONEYBEE HIVES), PADA HUVEC'S
(HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS) YANG DIPAPAR LDL TEROKSIDASI**

**INHIBITION OF NF κ B ACTIVATION BY CAPE (CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER),
AN ACTIVE COMPONENT OF HONEYBEE HIVES, IN OXLDL-TREATED HUVEC'S
(HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS)**

Mohammad Saifur Rohman^{*,**}, Endah Kusuma Rastini^{**}, Dwi Sarbini^{**}, Titi A W^{**}, Widodo^{*}, Djangan Sargowo^{***}

^{*} Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

^{**} Program Studi Biomedik Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang

^{***} Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/RSU dr. Saiful Anwar Malang

ABSTRACT

The high prevalence of cardiovascular morbidity and mortality caused by complication of atherosclerosis needs an optimal effort to prevent the atherosclerosis progression and complication. Atherogenesis is a chronic inflammatory process which could be prevented via the inhibition of NF κ B, a known key transcription factor involved in inflammatory process. An active component of honeybee hives, CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester), is believed to inhibit inflammatory process via the inhibition of NF κ B activation. However, it remains uncertain whether CAPE inhibits NF κ B activation in endothelial cells. This study therefore was aimed to examine the molecular mechanism of CAPE mediated NF κ B inactivation in OxLDL-treated HUVEC's. Immunohistochemistry using p50 antibody was applied to detect the migration of NF κ B (p50-p65 complex) from inactive form in cytoplasm to active form in nucleus. The protein expression of p50 in the nucleus significantly increased in 40 ug/ml OxLDL treated HUVEC's as compared to that of negative controls (48.41% vs 2.21%, $p < 0.001$). 40 ug/ml CAPE treatment 2 hours before OxLDL resulted in a significantly decreased p50 protein expression in nucleus (2.69% vs 48.41%, $p < 0.001$), comparable to that of negative controls. These results suggested that CAPE could prevent migration of p50-p65 complex (NF κ B) from the cytoplasm to the nucleus in HUVEC's

Key words: Caffeic Acid Phenethyl Ester, Human Umbilical Vein Endothelial Cells, NF κ B, OxLDL, Atherosclerosis

PENDAHULUAN

Dari data penelitian terdahulu telah banyak dibuktikan bahwa aterosklerosis merupakan proses inflamasi/keradangan kronis. Zat-zat yang merangsang inflamasi/keradangan maupun protein-protein yang dihasilkan oleh sel radang terlibat secara langsung sejak awal aterosklerosis hingga proses terjadinya komplikasi dari aterosklerosis (1). Inflamasi terjadi akibat terakumulasinya LDL teroksidasi (OxLDL). OxLDL berasal dari LDL yang teroksidasi dan bersifat sitotoksik serta berfungsi sebagai faktor kemotaksis bagi monosit sehingga mengakibatkan penumpukan sel sel radang. Di dalam sel endotel pembuluh darah monosit akan menjadi makrofag, dan makrofag ini akan memangsa OxLDL dalam jumlah yang tidak terbatas sehingga terbentuk sel busa. Selain bersifat menarik sel radang, OxLDL juga mengaktifkan faktor transkripsi NF κ B (2). OxLDL merangsang terbentuknya Reactive Oxygen

Species (ROS). Selanjutnya ROS akan mengakibatkan lepasnya inhibisi NF κ B oleh penghambat NF κ B, dan terjadi perpindahan NF κ B dari sitoplasma ke dalam inti. Protein NF κ B terdiri dari subunit p50 dan p65 yang saling berikatan (heterodimer). Pada keadaan basal/ tidak aktif, NF κ B berada dalam sitoplasma sebagai heterodimer yang berikatan dengan I κ B (inhibitor κ B), sehingga NF κ B berada dalam keadaan inaktif (3). Adanya rangsangan dari luar seperti meningkatnya OxLDL merangsang ROS, menyebabkan penambahan fosfat pada I κ B sehingga ikatan NF κ B-I κ B terlepas. Terlepasnya ikatan ini menyebabkan NF κ B berpindah ke dalam inti sel secara otomatis, karena p50 mempunyai *nuclear localization signal* (NLS) yang terhambat saat berikatan dengan I κ B (4). Sebagai sebuah faktor transkripsi, NF κ B kemudian berikatan dengan NF κ B *binding domain*' 5'GGGACTTTCC'3 pada promoter gen-gen yang menjadi sasaran aktivasi NF κ B. NF κ B merangsang banyak sekali gen antara lain; molekul adesi ICAM-1, VCAM-1, P selectin; molekul sitokin / kemokin seperti IL-1, IL-2, IL-6, IL-9,

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXII, No.1, April 2006
Korespondensi: Saifur Rohman; Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran
Unibraw; Jl. Veteran Malang 65145; Telp. (0341) 580993 ext. 122

TNF α , TNF β . NF κ B juga merangsang MCP-1; *C-reactive protein*, *tissue faktor-1*, Urokinase type Plasminogen aktifator, COX-2, iNOS, dan eNOS. NF κ B merangsang molekul yang terlibat apoptosis seperti *Fas-ligand*, *Bcl-xL*; *growth factor* seperti GCSF, PDGF B, trombospondin; dan gen-gen yang menjadi sasaran aktivasi dari NF κ B (5,6). Pada penelitian terdahulu juga terbukti NF κ B meningkat pada tempat dimana terdapat lesi aterosklerotik pada manusia. Dari beberapa temuan yang telah dipaparkan di atas, terbukti NF κ B merupakan protein yang memegang peran sentral pada proses aterosklerosis. Oleh karena itu pencegahan dan pengobatan aterosklerosis dapat dimulai dengan penghambatan aktivasi protein penting yang menimbulkan proses peradangan, yaitu NF κ B, sebagai targetnya.

Penghambat aktivasi NF κ B yang spesifik akan sangat bermanfaat dalam pencegahan dan pengobatan akibat aterosklerosis sehingga dapat menurunkan angka kesakitan dan kematian penyakit kardiovaskuler yang menjadi masalah utama di seluruh dunia. Idealnya penghambat aktivasi NF κ B ini dapat ditemukan sebagai sediaan yang mudah terjangkau baik dari segi harga maupun keberadaannya misalnya obat dari bahan alam yang sudah banyak dikenal masyarakat. Untuk itu diperlukan penelitian mengenai berbagai obat dari bahan alam serta mekanisme kerja dari zat aktif obat tersebut pada proses penghambatan progresifitas aterosklerosis.

Salah satu alternatif yang sangat baik adalah madu lebah, karena ketersediannya yang bisa didapatkan di hampir semua tempat, serta harganya yang murah sehingga terjangkau oleh segenap lapisan masyarakat. Pada penelitian sebelumnya telah terbukti bahwa madu lebah (*honeybee hives*) mengandung senyawa aktif *caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) phenethyl ester (CAPE)*. Akhir-akhir ini madu yang mengandung CAPE lebih dikenal dengan madu propolis. CAPE diketahui mempunyai efek anti radang dan antikanker, namun mekanisme molekular dari efek ini belum banyak diketahui. Mengingat bahwa NF κ B adalah faktor transkripsi yang merangsang proses peradangan dan proliferasi sel kanker, maka kemungkinan efek kerja dari CAPE ini melalui penghambatan aktivasi NF κ B, yang akhirnya dapat menghambat proliferasi sel dan mencegah reaksi inflamasi, seperti penelitian terdahulu yang membuktikan bahwa CAPE menghambat proses keganasan pada *histiocytic cell line* secara in vitro (7). Hingga saat ini belum ada penelitian mengenai efek CAPE terhadap NF κ B pada sel endotel.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji apakah CAPE dapat menghambat aktivasi NF κ B pada sel endotel (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells=HUVEC's*) yang dipapar oleh OxLDL. Sistem pemaparan sel HUVEC's

oleh OxLDL telah banyak diterima dan dipakai sebagai salah satu model ateroskelosis invitro. Sedangkan manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah didapatkannya bukti ilmiah mekanisme kerja CAPE dalam menghambat aktivasi NF κ B sehingga pada gilirannya dapat mencegah progresifitas ateroskleoris.

METODE

Strategi pendekatan yang dipakai dalam penelitian ini adalah eksperimen murni, dengan menggunakan kultur sel endotel (HUVEC's) sebagai model, karena sulitnya mendapatkan sampel secara langsung dari penderita aterosklerosis. Dengan paparan Oxidized LDL dapat dikontrol secara langsung kadar OxLDL yang diharapkan sesuai dengan keadaan yang menyerupai model penderita aterosklerosis dan akibat yang ditimbulkan oleh paparan tersebut. Model ini sudah terbukti banyak digunakan sebagai model awal dalam mengaplikasikan obat-obatan sebelum uji laboratorium dan klinis.

Dengan pemberian OxLDL diamati aktivasi dari NF κ B yang merangsang gen target dengan cara tidak langsung, yaitu mendeteksi perpindahan NF κ B (p50-p65 kompleks) dari sitoplasma (tidak aktif) ke nukleus (aktif) dengan pengecatan imunohistokimia.

Efek dari CAPE dilihat dengan membandingkan aktivasi NF κ B antara HUVEC's yang dipapar hanya dengan OxLDL saja dan HUVEC's dipapar OxLDL dan CAPE serta HUVEC's tanpa pemberian OxLDL maupun CAPE sebagai kontrol negatif. Penelitian dilakukan dengan tahapan tahapan sebagai berikut: isolasi kultur sel endotel (HUVEC's), optimalisasi dosis OxLDL, optimalisasi dosis CAPE dan pengecatan imunohistokimia serta penghitungan dan analisa data.

Isolasi HUVEC's dari umbilicus persalinan dengan operasi caesar pada kehamilan fisiologis tanpa penyulit seperti hipertensi (preeklamsi/eklamsi), infeksi atau DM. Prosedur isolasi HUVEC's sesuai dengan standar yang dilakukan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Setelah HUVEC's mencapai tingkat konfluensi 70-80% (pada hari ketiga-keempat) dilakukan optimalisasi dosis OxLDL dengan dosis 40 ug/ml dan 50 ug/ml, sesuai dengan penelitian sebelumnya, oleh karena kadar tersebut menimbulkan stres oksidatif pada sel endotel dan mengaktifasi NF κ B.

Selanjutnya OxLDL 40ug/ml dipilih untuk penelitian lebih lanjut dan dilakukan pemaparan CAPE. Kultur sel endotel yang telah monolayer diinkubasi dengan CAPE atau tanpa CAPE (PBS saja, sebagai kontrol positif) selama 2 jam dengan dosis 30, 40 dan 50 ug/ml, kemudian ditambahkan 40 ug/ml OxLDL dan diamati pengaruhnya terhadap aktivasi NF κ B setelah 30 menit pemberian OxLDL. Sebagai kontrol negatif sebuah sumur hanya diberikan PBS

saja tanpa CAPE maupun OxLDL. Sebelum dilakukan pengecatan semua sel diperiksa kembali untuk melihat keadaan sel.

Imunohistokimia menggunakan monoclonal anti p50 sebagai antibodi primer untuk mengetahui perpindahan kompleks p50-p65 (dimer NF κ B) dari sitoplasma ke inti sel kemudian diamati dengan mikroskop dengan pembesaran 1000x pada 20 lapangan pandang yang berbeda, diulangi 5 kali.

Analisa data dengan menggunakan uji unpaired t-test memakai *software* SPSS untuk menguji perbedaan bermakna antar perlakuan.

HASIL PENELITIAN

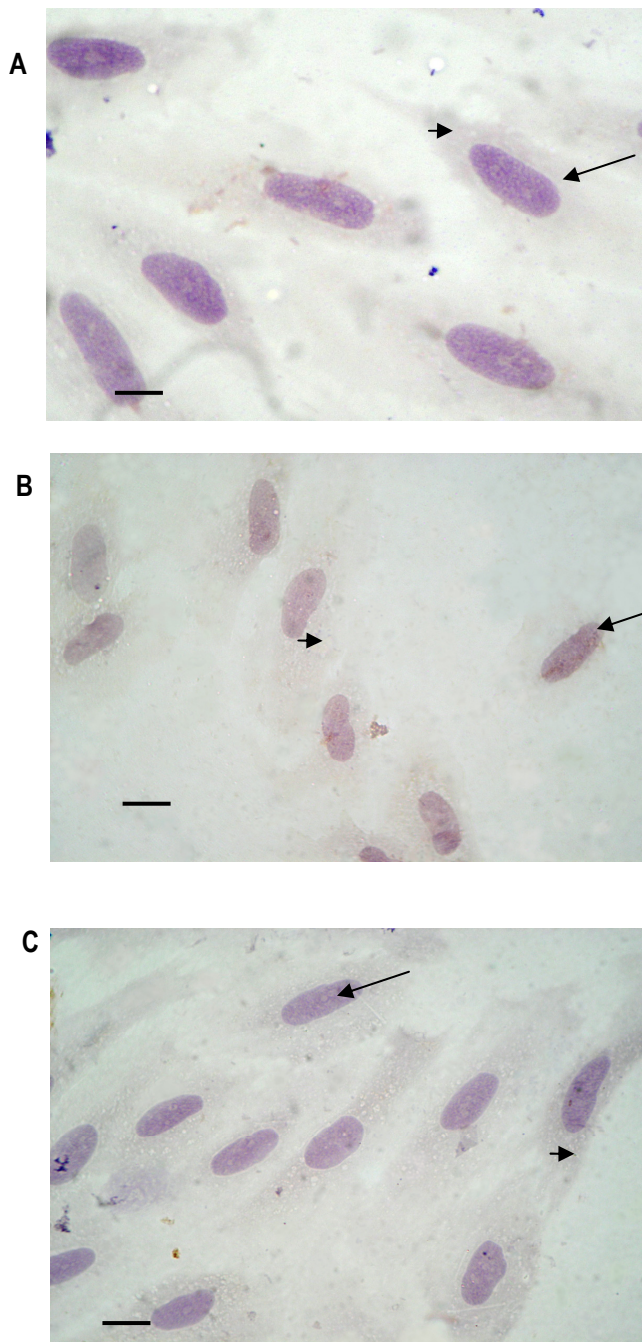
Optimalisasi pemberian kadar OxLDL bertujuan untuk melihat toksisitas OxLDL terhadap sel endotel. Pada beberapa penelitian sebelumnya ditemukan bahwa kadar OxLDL 10-50ug/ml menimbulkan stres oksidatif pada sel endotel dan mengaktifkan NF κ B (8). Pada penelitian ini diuji cobakan dosis OxLDL 40 ug/ml dan 50 ug/ml. Pada pemberian 50 ug/ml OxLDL didapatkan sebagian besar sel endotel mengalami kematian, sedangkan pada dosis 40 ug/ml sel masih terlihat baik dan sel endotel terlihat normal secara morfologis dengan bentuk sel endotel *cobblestone* dengan ciri spesifik sel pada bagian tengahnya tampak bulat dan terang, bentuk sel pipih dengan jarak antara sel yang teratur dan rapat permukaan sel mulus dan tampak inti, membran sel, sitoplasma serta jaringan ekstra seluler serta tidak didapatkan tanda tanda apoptosis.

Optimalisasi dosis CAPE dilakukan dengan dosis 30, 40 dan 50 ug, karena pada beberapa penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa dosis 25-50 ug/ml CAPE dapat menghambat sel kanker untuk berproliferasi melalui hambatan aktivasi NF κ B. Karena antara sel kanker dan sel endotel mempunyai sifat yang berbeda maka diperlukan eksplorasi lebih lanjut untuk mengoptimalkan dosis dari CAPE pada sel endotel. Pada pemberian CAPE dengan dosis 50 ug/ml setelah 2 jam sebagian HUVEC's mengalami kematian, sedangkan pada dosis 30 dan 40 ug/ml sel tampak sehat.

Untuk percobaan selanjutnya diberikan dosis CAPE 40 ug/ml agar didapatkan respon maksimal yang tidak toksis pada sel. HUVEC's diperlakukan dengan 3 perlakuan berbeda yaitu diberikan CAPE 2 jam sebelum OxLDL, pemberian OxLDL saja tanpa CAPE (kontrol positif) dan tanpa CAPE maupun OxLDL (kontrol negatif). Setelah HUVEC's dipapar dengan 40 ug/ml OxLDL 30 selama menit, saat dimana OxLDL sudah memberikan efek optimal terhadap perpindahan NF κ B dari sitoplasma ke inti sel, dilakukan pengecatan imunohistokimia setelah diperiksa semua sel dalam keadaan baik, tidak ada kontaminasi dan tidak ada sel yang mengambang (*detached cells*).

Pada pemeriksaan imunohistokimia terlihat perbedaan bermakna pada ekspresi p-50 di inti sel sebagai komponen kompleks p50-p65 dari NF κ B antara kontrol negatif (HUVEC's tanpa perlakuan CAPE maupun OxLDL) gambar 1A, dengan HUVEC yang dipapar dengan 40 ug/ml OxLDL, Gambar 1B. Pada HUVEC's yang dipapar 30 menit dengan OxLDL, 48,41% terlihat p-50 di inti sel sedangkan pada kontrol negatif lebih banyak pada sitoplasma (sitoplasma lebih gelap), hanya 2,21% terlihat di inti sel ($p < 0,0001$). Penemuan ini menunjukkan bahwa pemberian OxLDL akan mengakibatkan perpindahan kompleks p50-p65 (NF κ B) dari sitoplasma ke inti. Sedangkan dalam keadaan tanpa OxLDL p50-p65 (NF κ B) masih berada di sitoplasma (sitoplasma lebih gelap dibandingkan dengan HUVEC's+OxLDL yang terlihat lebih terang sitoplasmanya).

Pemeriksaan histokimia pada sumur yang diberikan CAPE 2 jam sebelum pemaparan OxLDL, menunjukkan bahwa hanya 2,69 % dari p50 yang terdapat di inti sel, Gambar 1C. Keadaan ini menyerupai hasil pemeriksaan pada kontrol negatif (Gambar 1A) yaitu HUVEC's hanya diberikan PBS tanpa CAPE maupun OxLDL. Uji statistik menunjukkan tidak ada perbedaan antara ekspresi p50 di inti sel antara kontrol negatif dengan HUVEC's yang dipapar dengan CAPE dan OxLDL ($p=0,81$). Sedangkan apabila dibandingkan dengan HUVEC's + OxLDL tanpa CAPE terdapat penurunan bermakna dari p50 yang berada di inti sel ($p < 0,0001$). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian CAPE sebelum pemaparan OxLDL secara bermakna dapat mencegah perpindahan p50-p65 ke dalam inti sel, seperti halnya keadaan HUVEC's tanpa paparan OxLDL.



Gambar 1. Immunohistokimia dengan menggunakan p50 antibodi

- (A). pada sel HUVEC's kontrol negatif,
 (B). kontrol positif HUVEC's+OxLDL dan
 (C). HUVEC's+OxLDL+CAPE.
- Menunjukkan bagian inti yang terdeteksi p50,
 - Bagian sitoplasma. Inti sel yang berwarna lebih coklat apabila terdapat banyak p50 dalam inti, seperti pada pada gambar 1b. Sedangkan pada kontrol negatif (1a) dan pemberian CAPE (1c) sitoplasma tampak lebih coklat daripada di inti karena p50 tersebar di sitoplasma (Pembesaran 1000X, — = 0,004 mm).

DISKUSI

Pemberian OxLDL pada sel endotel mengakibatkan perpindahan sebagian besar dimer p50-p65 (NFκB) dari sitoplasma ke inti sel. OxLDL mengaktifkan NFκB dengan cara perpindahan NFκB dari sitoplasma ke inti melalui pembentukan ROS yang berlebihan. Dalam keadaan fisiologis ROS yang di hasilkan secara efektif dieliminasi oleh berbagai sistem antioksidan intrasel dan ekstrasel. Sel endotel vaskuler yang terpapar ROS berlebihan akut maupun kronis menyebabkan terjadinya disfungsi endotel vaskuler yang mengakibatkan terjadinya peningkatan permeabilitas sel endotel, disfungsi endotel dan terjadinya ekstrasvasi leukosit (7). ROS juga meneruskan sinyal lebih lanjut untuk merangsang aktifitas selular seperti proses peradangan, sekresi sitokin dan prolifesi sel melalui proses aktivasi NFκB terlebih dahulu. NFκB adalah protein yang berfungsi sebagai faktor pemicu transkripsi gen, terutama gen yang terlibat di dalam respon imun dan peradangan serta apoptosis (8). Dengan pemberian OxLDL pada HUVEC's telah dibuktikan pada penelitian terdahulu terjadinya peningkatan TNFα dan ICAM-1 maupun VCAM-1. Hal ini menunjukkan bahwa HUVEC's yang diberikan OxLDL 40ug/ml merangsang terjadinya proses inflamasi dan pengeluaran sitokin dari sel endotel. Sehingga dapat disimpulkan bahwa sistem yang dipakai pada penelitian ini berhasil dengan baik menyerupai keadaan peradangan sel endotel seperti penelitian-penelitian lain sebelumnya.

Pada penelitian ini telah dibuktikan pula bahwa pemberian CAPE sebelum pemaparan OxLDL secara bermakna dapat mencegah perpindahan p50-p65 ke dalam inti sel, seperti halnya keadaan HUVEC's tanpa paparan OxLDL. Penemuan ini juga merupakan hasil penelitian pertama yang menunjukkan bahwa CAPE dapat menghambat perpindahan NFκB dari sitoplasma ke inti sel di kultur HUVEC's. Pada penelitian sebelumnya dibuktikan bahwa CAPE menghambat langsung ikatan p50-p65 pada promotor gen-gen target dari NFκB, sehingga p50-p65 tidak dapat berikatan dengan DNA target dan tidak terjadi peningkatan transkripsi pada sel *histiocytic* (9). Penelitian ini membuktikan bahwa CAPE menghambat aktivasi p50-p65 dengan cara menghambat perpindahan protein tersebut dari sitoplasma ke inti sel. Jadi hambatan juga terjadi sebelum terjadinya ikatan p50-p65 ke promotor gen target. Pada penelitian ini tidak dibuktikan proses hambatan ikatan p50-p65 dengan promotor terhubung keterbatasan bahan dan alat yang tersedia. Sehingga dapat disimpulkan dari hasil ini bahwa CAPE dalam hal ini berfungsi seperti antioksidan yang menghambat proses fosforilasi dari IκB sehingga NFκB(p50-p65) tetap terikat dengan IκB di sitoplasma dan tidak berpindah ke inti sel sehingga NFκB tetap dalam keadaan inaktif.

CAPE yang terkandung dalam madu lebah dapat dipakai untuk mencegah aktivasi dari NF κ B yang merupakan protein pusat pemicu terjadinya peradangan dan pengeluaran sitokin dari sel endotel. Dari segi praktis dapat dikatakan bahwa madu yang mengandung CAPE dapat

mencegah progresifitas aterosklerosis. Pada penelitian ini didapatkan bahwa CAPE dosis 40 ug/ml dapat secara efektif mencegah aktivasi NF κ B pada HUVEC's yang dipapar OxLDL.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Lilly LS. *Pathophysiology of Heart Disease 3rd*. Lippincott Williams & Wilkins; 2003; 111-118.
2. Libby P, Ridker PM, Maseri A. *Inflammation and Atherosclerosis*. *Circulation* 2002; 105:1135-1143.
3. Liou HC, Baltimore D. *Regulation of the NF κ B/rel transcription I Kappa Inhibitory System*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1993; 5: 477-487.
4. Siebenlist U, Franzo G, Brown K. *Structure Regulation and Function of NF Kappa B*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1994; 10: 405-455.
5. Grilli M, Chiu J JS, Lenardo M JNF. *Kappa B and Rel Participate in A Multifunctional Transcriptional Regulatory System*. *Int. Rev. Cytol.* 1993; 143: 1-62.
6. Baeuerle PA, Henkel T. *Function and activation of NF κ B in the immune system*. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12: 141-179.
7. Halliwell B. *Free Radicals, Antioxidants and Human Disease: Curiosity, Cause, and Consequences*. *Lancet* 1994; 344: 721-724.
8. Backwell TS, Jihn WC. *The Role of Nuclear Factor κ B in Cytokine Gene Regulation*. *Am J Respir. Cell Mol Biol* 1997; 17: 3-9.
9. Natarajan K, Singh S, Terrence RB, JR Grunberger D, Aggarwal BB. *Caffeic Acid Phenethyl Ester is A Potent and Specific Inhibitor of Activation of Nuclear Transcription Factor NF- κ B*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 9090-9095.