

Peran Puerarin terhadap Aktivitas Intra dan Ekstraseluler pada Kultur Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Pasca Induksi Leptin

M. Sasmito Djati¹, Satuman², Retty Ratnawati², Sri Widyarti¹, Erly Nur Aisyah¹,
Noer Hasanah¹, Eko Puji Astuti¹, Ririn Rochmawati¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

²Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Beberapa penelitian terkini menyebutkan bahwa leptin merupakan salah satu penyebab disfungsi endotel yang merupakan salah satu penyebab aterosclerosis. Antioksidan puerarin diduga memiliki kemampuan untuk mencegah mekanisme aterosclerosis yang distimulasi oleh beberapa sitokin. Berdasarkan hal tersebut, maka tujuan penelitian ini adalah membuktikan dan mengetahui potensi puerarin untuk menghambat ekspresi dan aktivitas intra dan ekstraseluler VCAM-1, PPAR- γ , SOD dan H₂O₂, apoptosis dan nekrosis pada kultur *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) yang diinduksi 25 ng ml⁻¹ leptin. Penelitian ini mempergunakan sel kultur primer HUVECs yang dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok 0 ng ml⁻¹ dan 0 μ M puerarin, kelompok sel yang diinduksi 25 ng ml⁻¹ leptin selama 12 jam, kelompok induksi puerarin 5, 25, 200 dan 525 μ M puerarin selama enam jam tanpa leptin, kelompok induksi leptin dan puerarin dengan konsentrasi 5, 25, 200 dan 525 μ M selama enam jam. Aktivitas VCAM-1 dan PPAR- γ diketahui dengan analisis imunositokimia, metode ELISA digunakan untuk analisis aktivitas SOD dan H₂O₂. Apoptosis dan nekrosis sel dianalisis setelah HUVECs diberi penanda BrdU selama 20 jam. Data dianalisis dengan analisis satu jalur (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Tukey. Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi 25 ng ml⁻¹ dapat meningkatkan ekspresi VCAM-1 (2,68 \pm 0,15)% dibandingkan dengan perlakuan 0 ng ml⁻¹ (0,54 \pm 0,15)%. Perlakuan induksi puerarin 5, 25, 200, 525 μ M memberikan dampak negatif terhadap ekspresi VCAM-1 meskipun pengaruh ini tidak signifikan. Puerarin dapat menekan apoptosis dan nekrosis sel, 525 μ M puerarin secara efektif dapat menekan ekspresi PPAR- γ . Puerarin tidak memberikan dampak yang signifikan terhadap aktivitas ekstraseluler berdasarkan hasil analisis aktivitas SOD dan H₂O₂.

Kata kunci: apoptosis, H₂O₂, HUVECs, nekrosis, leptin, puerarin, VCAM-1, PPAR- γ , SOD

PENDAHULUAN

Obesitas merupakan penimbunan lemak dalam jumlah besar yang akan menimbulkan berat tubuh yang berlebihan (*overweight*) [1]. Obesitas merupakan faktor resiko terjadinya diabetes, hipertensi dan aterosclerosis [2].

Aterosclerosis adalah keadaan arteri yang dicirikan oleh penebalan bagian dinding pembuluh arteri yang berdekatan dengan lumen dengan sejumlah sel otot polos abnormal, makrofag, limfosit, berkumpulnya kolesterol dan zat lemak lainnya pada sel ini secara ekstraseluler dan penebalan lapisan matrik jaringan konektif [1]. Aterosclerosis terjadi karena kerusakan pada sel endotel (disfungsi endotel) vaskular. Kerusakan ini disebabkan oleh gangguan mekanik, biokimia dan inflamasi [3, 4].

Penderita obesitas memiliki kadar plasma leptin yang tinggi dalam darah yang disebabkan oleh penumpukan sel adiposit penghasil leptin. Jaringan adiposit bertindak sebagai sumber mediator proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, leptin, resisten dan *C-reactive protein* (CRP), yang dapat menginduksi terjadinya disfungsi endotel, resistansi insulin dan akhirnya aterosclerosis [2]. Menurut Singh *et al.*, tingkat leptin yang tinggi juga dapat meningkatkan kadar *C-reactive protein* (CRP) [5]. Selanjutnya CRP dapat menginduksi ekspresi *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1) melalui jalur sinyal NF- κ B dalam HUVECs [6, 7].

Puerarin merupakan senyawa isoflavon yang bersifat antiinflamasi. Puerarin dapat mencegah disfungsi endotel yang diinduksi oleh banyak faktor [8]. Di dalam pembuluh darah sel endotel membentuk barier yang selektif dalam usaha mencegah transfer berbagai substansi yang ada dalam sistem pembuluh darah [9]. Sel endotel menyokong regulasi tekanan darah dan aliran darah dengan melepaskan vasodilatator *nitric oxide* (NO) dan *prostacyclin* (PGI₂) dan vaso-

* Alamat korespondensi:

M. Sasmito Djati

E-mail : msdjati@yahoo.co.id

Alamat : Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang

konstriktor *endothelin* (ET) dan *platelet activatory factor* [10]. Menurut Sanyin et al., puerarin dapat menginduksi ekspresi eNOS. *Endothelial nitric oxide synthase* dapat menghasilkan endogenous vasodilator *nitric oxide* (NO) [11]. NO (*nitric oxide*) bersifat menahan aktivasi inflamasi pada sel endotel, misalnya menurunkan ekspresi VCAM-1 dengan meningkatkan produksi penghambat faktor transkripsi intraseluler NF- κ B (I κ B α) [3].

Namun belum diketahui apakah pemberian puerarin dalam jangka pendek berpengaruh terhadap disfungsi endotel. Oleh karena itu, kajian pada studi ini adalah pengujian pengaruh puerarin terhadap ekspresi intra seluler VCAM-1, PPAR- γ , dan aktifitas ekstraseluler SOD dan H₂O₂, apoptosis serta nekrosis pada kultur sel endotel (HUVECs) yang diinduksi leptin.

METODE PENELITIAN

Isolasi dan Kultur Sel Endotel

Metode yang digunakan ini menurut Khotimah [12]. Umbilikus dalam *cord solution* diperoleh dari Rumah Bersalin di Malang, melalui persalinan *Caesar*. Umbilikus dibersihkan dengan tisu yang telah dibasahi dengan alkohol 70%. *Canul* dimasukkan pada salah ujung vena (\pm 1 cm), kemudian diikat dengan benang. Vena umbilikus dibersihkan dengan mengalirkan 10 ml PBSA untuk menghilangkan sisa darah dari jaringan, kemudian ujung umbilikus yang lain disumbat dengan klem dan 5 ml *collagenase* dimasukkan melalui *canul* yang dipasang. Selanjutnya umbilikus dihangatkan dengan cara didekap dengan kedua tangan selama tujuh menit. *Collagenase* yang telah mengandung endotel dikeluarkan dari umbilikus kemudian dimasukkan dalam tabung sentrifugasi steril 15 ml. Umbilikus dibilas dengan 8 ml larutan PBSA untuk membilas sel endotel yang masih tersisa dan ditambahkan ketabung sentrifugasi yang berisi larutan *collagenase* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit. Selanjutnya pelet yang diperoleh diresuspensi dengan medium kultur (TCM 199-sigma) sebanyak 4 ml, kemudian ditransfer ke 24 *well culture plate* yang sebelumnya telah dilapisi gelatin 0,2% kemudian dimasukkan dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37 °C selama 30 menit. *Culture plate* diamati di bawah mikroskop, jika sel sudah menempel pada dasar *plate*, medium kultur diambil dan sel dibilas dengan 3 ml larutan *serum free media* dan ditambahkan medium baru. Selanjutnya *plate* dimasukkan

dalam inkubator sampai terbentuk monolayer kurang lebih 3-4 hari dan setiap dua hari sekali dicuci dengan *serum free media* serta ditambahkan medium baru.

Perlakuan Induksi Leptin pada HUVECs

Kultur sel yang telah *confluent* dicuci dengan *serum free media* dan ditambahkan medium baru. Kemudian, dipapar leptin dengan konsentrasi leptin yang digunakan 0 ng ml⁻¹ dan 25 ng ml⁻¹. Leptin yang telah tersedia dicampur dengan media lengkap. Masing-masing *well* diisi dengan 500 μ l kemudian sel endotel diinkubasi 37 °C selama enam jam.

Perlakuan Puerarin

Setelah diinkubasi leptin, sel dicuci dan diperlakukan dengan puerarin hasil ekstraksi. Senyawa puerarin didapatkan dari ChemExper. Kadar puerarin terdiri dari lima konsentrasi yaitu 0 (kontrol), 5 μ M, 25 μ M, 200 μ M dan 525 μ M. Sel diinkubasi pada 37 °C, 5% CO₂ dan kelembaban udara 95% selama enam jam.

Identifikasi protein VCAM-1 Menggunakan Imunositokimia

Kultur endotel dicuci dengan PBS (Sigma) pH 7,4 tiga kali, kemudian difiksasi dengan metanol absolut 10% dalam PBS pH 7,4 selama 20 menit. Sel dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali masing-masing lima menit. Sel ditetesi dengan 0,02% *sodium azide*. Sel dicuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali selama lima menit. Sel ditetesi dengan larutan H₂O₂ dalam PBS selama 10 menit. Sel ditetesi dengan *blocking serum* 5% FBS yang mengandung Triton-X 0,25% selama satu jam. Sel dicuci dengan PBS. Inkubasi antibodi primer dalam serum 1:200 selama 24 jam. Sel disimpan pada suhu 4 °C. Sel dikeluarkan pada suhu ruang selama 15 menit. Sel dicuci dengan PBS tiga kali masing-masing selama 5 menit. Sel diinkubasi dengan antibodi sekunder 1:400 selama satu jam pada suhu ruang. Sel dicuci dengan PBS tiga kali selama masing-masing lima menit. Sel ditetesi dengan SA-HRP selama 40 menit, dicuci dengan PBS tiga kali selama masing-masing lima menit. Sel ditetesi dengan kromogen DAB (3,3 *Diaminobenzidine tetrahydrochloride*). Sel ditetesi dengan *counterstains* dengan hematoxilen selama 10 menit. Sel dicuci dengan air mengalir kemudian akuades selama 10 menit. Sel dibiarkan pada suhu kamar. Jaringan diletakkan pada *object glass* dan ditetesi dengan entelan.

Pengukuran ELISA dan Fotometrik Coating Microplates (MP)

Langkah awal dalam pengukuran apoptosis dan nekrosis dengan metode ELISA adalah

menentukan jumlah *well* yang digunakan pada *microplates*. Sebelumnya dilakukan *coating microplates* yaitu dipipet 100 µl *anti-DNA coating solution (solution 3)* ke dalam *well* yang telah ditentukan, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Kemudian *coating solution* dalam masing-masing *well* dibuang dengan cara aspirasi atau *inverting*.

Prosedur Blocking

Microplates yang telah *dicoating*, ditambah 200 µl 1x *incubation solution (solution 5)*, MP ditutup dengan *adhesive cover foil* dan diinkubasi pada suhu 15-25 °C selama 30 menit. Kemudian *incubation solution* dibuang dengan cara aspirasi atau *inverting* dan masing-masing *well* selanjutnya dicuci dengan *washing solution (solution 4)* 250 µl sebanyak tiga kali masing-masing selama tiga menit dan selanjutnya *washing solution* dibuang dengan cara aspirasi atau *inverting*.

Pengukuran ELISA dan Fotometrik

Microplates yang telah di-*coating* dan *diblocking*, diisi masing-masing sampel (masing-masing sampel untuk apoptosis dan nekrosis sebanyak 100 µl), kemudian MP ditutup dengan *adhesive cover foil* dan diinkubasi pada suhu 15-25 °C selama 90 menit, dan selanjutnya *solution* dibuang dengan cara aspirasi atau *inverting*. Masing-masing *well* selanjutnya dicuci dengan *washing solution (solution 4)* 250 µl sebanyak tiga kali masing-masing selama tiga menit, sementara cucian yang terakhir dibiarkan, dan *microplate* tanpa tutup diletakkan diatas *beaker glass* 500 ml yang sudah diisi 300 ml air pada *microwave oven*, di-*irradiate* selama 5 menit pada 500 W, kemudian didinginkan pada suhu -20 °C selama 10 menit. Selanjutnya *fluid* dibuang dengan cara aspirasi atau *inverting*. Masing-masing *well* kemudian ditambah 100 µl *anti-BrdU-POD conjugate solution (solution 6)*, dan ditutup dengan *adhesive cover foil* dan diinkubasi pada suhu 2-8 °C *overnight* (ON), kemudian masing-masing *well* dicuci dengan *washing solution (solution 4)* 250 µl sebanyak tiga kali masing-masing selama tiga menit. *Substrate solution* dipipet sebanyak 100 µl dan dimasukkan pada masing-masing *well*, selanjutnya *microplate* di-*shaker* dalam keadaan gelap sampai terjadi perubahan warna. *Stop solution (solution 8)* sebanyak 25 µl ditambahkan pada masing-masing *well* selama lima menit. Pembacaan nilai absorbansi dilakukan pada λ 450 nm setelah penambahan *stop solution*.

Identifikasi protein PPAR γ dengan imunositokimia

Hasil kultur sel endotel masing-masing perlakuan difiksasi dengan formalin 10% dalam PBS pH 7,4 selama 20 menit. Sel dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali selama masing-masing lima menit. Sel ditetesi dengan 0,02% *sodium azide*. Jaringan dapat disimpan dalam lemari pendingin untuk beberapa hari. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali selama lima menit. Jaringan ditetesi dengan larutan H₂O₂ dalam PBS selama 10 menit. Sel ditetesi dengan *blocking serum* 5% FBS yang mengandung Triton-X 0,25% selama satu jam. Sel dicuci dengan PBS. Inkubasi antibodi primer PPAR γ dalam serum 1:200 selama 24 jam. Jaringan disimpan pada suhu 4 °C. Jaringan dikeluarkan pada suhu ruang selama 15 menit. Jaringan dicuci dengan PBS dua kali masing-masing selama lima menit. Sel diinkubasi dengan antibodi sekunder *biotin-goat-anti rabbit* 1:400 selama satu jam pada suhu ruang. Jaringan dicuci dengan PBS dua kali selama masing-masing lima menit. Sel ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horseradish Peroxidase*) 1:500 selama satu jam kemudian dicuci dengan PBS sebanyak dua kali masing-masing selama lima menit. Sel ditetesi dengan DAB (*Diamino Benzidine*) dalam buffer DAB. Sel ditetesi dengan *courstexin* selama 10 menit. Jaringan dicuci dengan akuades selama 10 menit. Jaringan ditetesi dengan *Mayer Hematoxilen* selama 10 menit. Jaringan dicuci dengan PBS selama tiga kali masing-masing 10 menit. Jaringan dicuci dengan akuades selama 10 menit. Jaringan dibiarkan pada suhu kamar. Jaringan diletakkan pada *object glass* dan ditetesi dengan entelan. Setelah itu dibiarkan semalam. Kemudian diamati.

Pengukuran kadar H₂O₂ dengan Colorimetric Hidrogen Peroxide Kit (Assay Design)

Pengukuran kadar H₂O₂ dari medium kultur menggunakan *Colorimetric Hidrogen Peroxide Kit (Assay Design)*. Larutan standar dibuat dengan melarutkan 34 µl stok *Hydrogen Peroxide Standar* dengan 966 µl *diluent* dan disebut sebagai larutan standar I. Larutan standar II dibuat dengan melarutkan 500 µl larutan standar I dengan 500 µl *diluent*. Dibuat hingga larutan standar 6 dengan cara yang sama. Kemudian dimasukkan 50 µl *diluent* pada *well* pertama sebagai larutan *blanko*, 50 µl larutan standar I-IV ke dalam *well* selanjutnya. Masing-masing larutan sampel di-ambil 50 µl dimasukkan ke dalam *well*. Selanjutnya semua *well*

ditambahkan 100 μ l *Color Reagent* dan dihomogenasi menggunakan pipet selama satu detik. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya dibaca dengan *Elisa Reader* pada panjang gelombang 450 nm.

Pengukuran kadar SOD (Superoksida Dismutase) menggunakan Superoxide Activity Assay Kit (Bio Vision)

Pengukuran kadar SOD dari medium kultur menggunakan *Superoxide Activity Assay Kit*. Sampel sebanyak 20 μ l dimasukkan dalam *well*, dan larutan *blanko* (H_2O) dua *well* masing-masing sebanyak 20 μ l. Kemudian pada masing-masing *well* ditambahkan 200 μ l WST (*Working Solution*). *Blank 2* ditambahkan 20 μ l dilution buffer. Lalu pada masing-masing *well* kecuali *blank 2* ditambahkan 20 μ l *enzyme working solution*. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37 °C. Kemudian dibaca pada panjang gelombang 450 nm. Dilakukan tiga kali ulangan.

Analisis Data

Jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 dan PPAR- γ tiap 100 sel, sedangkan pengukuran apoptosis dan nekrosis pada setiap perlakuan kultur sel endotel dilakukan dengan metode ELISA. Setiap unit percobaan diulang tiga kali. Data yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan metode analisis satu jalur (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji *tukey*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

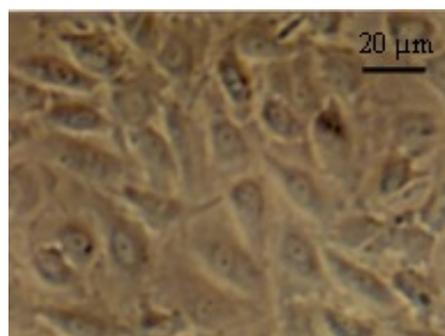
Kultur Human Umbilikus Vein Endothelial Cells (HUVECs)

Kultur sel endotel manusia (HUVECs) diperoleh dari vena umbilikus manusia. Umbilikus yang digunakan harus memenuhi kriteria inklusi, yaitu didapatkan dari hasil persalinan *Sectio Caesaria* (SC) yang meliputi kehamilan fisiologis (normal), kehamilan dengan pinggul sempit dan kehamilan dengan letak melintang. Sedangkan umbilikus hasil persalinan SC yang tidak boleh digunakan adalah kehamilan disertai infeksi, hipertensi atau kondisi ketuban pecah dini.

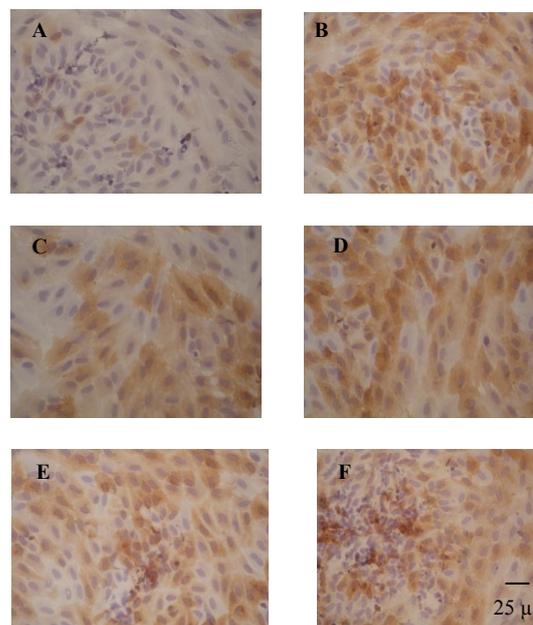
Umbilikus yang didapat dari hasil persalinan disimpan dalam media transport (*cord solution*) dengan komposisi NaBic, M199 dan *gentamycin*. Penyimpanan dalam medium ini bertujuan untuk mempertahankan kondisi fisiologi umbilikus sebelum dilakukan kultur. Umbilikus harus segera ditumbuhkan paling lama 12 jam setelah proses persalinan agar kondisi sel yang didapatkan setelah ditumbuhkan dapat optimal. Sel endotel digunakan dalam penelitian ini karena menurut Boulomie *et al.*, HUVEC mengekspresikan

reseptor fungsional terhadap leptin yang merupakan produk dari *ob gene* [13].

Sel endotel ditumbuhkan dalam medium komplet yang terdiri dari M199 yang mengandung FBS 10 %. Hasil yang diperoleh dari kultur endotel yang *confluent* pada hari ke-4 (Gambar 1). Sel *confluent* dicirikan dengan populasi sel yang memenuhi tempat *attachment* dan saling bersentuhan antar sel menandakan adanya hubungan komunikasi agar sel tumbuh. Dalam keadaan ini, sel siap diperlakukan untuk keperluan penelitian



Gambar 1. Kultur endotel *normal confluent* hari ke-4 pada perbesaran 400 kali



Gambar 2. Hasil imunositokimia ekspresi VCAM-1 pada kultur sel endotel berbagai perlakuan (perbesaran 400 kali)

Keterangan:

- Leptin 0 ng ml⁻¹ + puerarin 0 μ M
- Leptin 25 ng ml⁻¹
- Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 5 μ M
- Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 25 μ M
- Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 200 μ M
- Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 525 μ M

Analisis ekspresi VCAM-1

Pada kultur sel endotel, ekspresi VCAM-1 dapat dilihat dengan menggunakan metode imunositokimia dengan menggunakan kromogen DAB yang akan berikatan dengan SA-HRP-antibodi sekunder (*anti mouse*)-antibodi primer (*mouse monoclonal VCAM-1*) terhadap VCAM-1 pada sel endotel. Kompleks avidin-biotin terbentuk antara SA-HRP dengan antibodi sekunder. Substrat DAB membentuk kompleks dengan peroksidase pada SA-HRP membentuk kromogen yang tervisualisasi sebagai warna coklat. Ekspresi VCAM-1 pada kultur sel endotel dengan berbagai perlakuan dapat dilihat pada gambar 2.

Rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 dituliskan dalam bentuk persentase (Tabel 1). Data pada Tabel 1, menunjukkan bahwa pada kultur sel endotel dengan leptin 0 ng ml⁻¹ dan puerarin 0 μM rata-rata jumlah sel sebesar (0,54 ± 0,15)%, sedangkan pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin 25 ngml⁻¹ rata-rata jumlah sel sebesar (2,86 ± 0,15)%. Hasil uji statistika menunjukkan bahwa induksi leptin pada kultur sel endotel berpengaruh signifikan (p<0.05) terhadap jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 dibandingkan dengan leptin 0 ng ml⁻¹ dan puerarin 0 μM. Keadaan ini menunjukkan bahwa sel endotel yang diinduksi dengan leptin dapat meningkatkan ekspresi VCAM-1. Menurut Bouloumie *et al.*, kultur sel endotel yang distimulasi leptin dapat meningkatkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) [13]. Selanjutnya ROS dapat menyebabkan disfungsi sel endotel dengan cara menstimulasi aktivitas selular seperti sitokin dan mengaktifkan faktor transkripsi NF-κB [14].

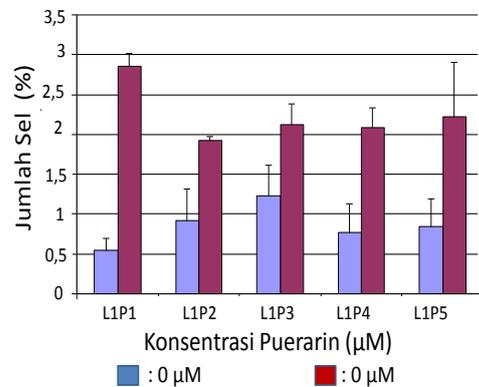
Tabel 1. Persentase jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin dan puerarin.

Dosis Puerarin (μM)	Jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 (%)	
	Leptin 0 ngml ⁻¹	Leptin 25 ngml ⁻¹
0	0,54 ± 0,15 ^a	2,86 ± 0,15 ^d
5	0,92 ± 0,40 ^{ab}	1,92 ± 0,05 ^{bcd}
25	1,23 ± 0,38 ^{abc}	2,12 ± 0,26 ^{cd}
200	0,77 ± 0,36 ^a	2,08 ± 0,25 ^{cd}
525	0,85 ± 0,34 ^a	2,22 ± 0,69 ^{cd}

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata (α 0,05)

Perlakuan leptin 0 ng ml⁻¹ dengan puerarin 5, 25, 200 dan 525 μM tidak berpengaruh signifikan terhadap leptin 0 ng ml⁻¹ dan puerarin 0 μM.

Pada Gambar 3, dapat dilihat dosis puerarin 5 dan 25 μM cenderung mengalami kenaikan jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 (0,92 ± 0,40)% dan (0,85 ± 0,34)%. Hal ini diduga disebabkan oleh perubahan ekspresi eNOS dapat mengakibatkan gangguan sintesis NO sehingga ekspresi NF-κB meningkat dan menyebabkan ekspresi VCAM-1. Menurut Lawrence, radikal bebas NO dihasilkan oleh tiga *isoform nitric oxide synthase* (NOS) yaitu *neuronal NOS* (nNOS), *inducible NOS* (iNOS) dan *endothelial NOS* (eNOS). eNOS merupakan komponen yang paling berperan dalam menjaga homeostasis vaskuler dan terlibat langsung pada patobiologi disfungsi endotel. eNOS akan mengkatalisis produksi NO dari endotel bila dalam keadaan *di-coupled* oleh *tetrahydrobiopterin* (BH₄) dan L-arginin. Dalam keadaan *uncoupled state*, eNOS kekurangan L-arginin atau BH₄ sehingga terjadi produksi O₂^{*} dan H₂O₂ yang terjadi pada disfungsi endotel sehingga menurunkan bioavailabilitas NO [15]. Sedangkan untuk dosis 200 dan 525 μM, jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 cenderung mengalami penurunan, dengan jumlah penurunan yang paling besar ada pada dosis puerarin 200 μM.



Gambar 3. Hubungan konsentrasi puerarin dengan jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1

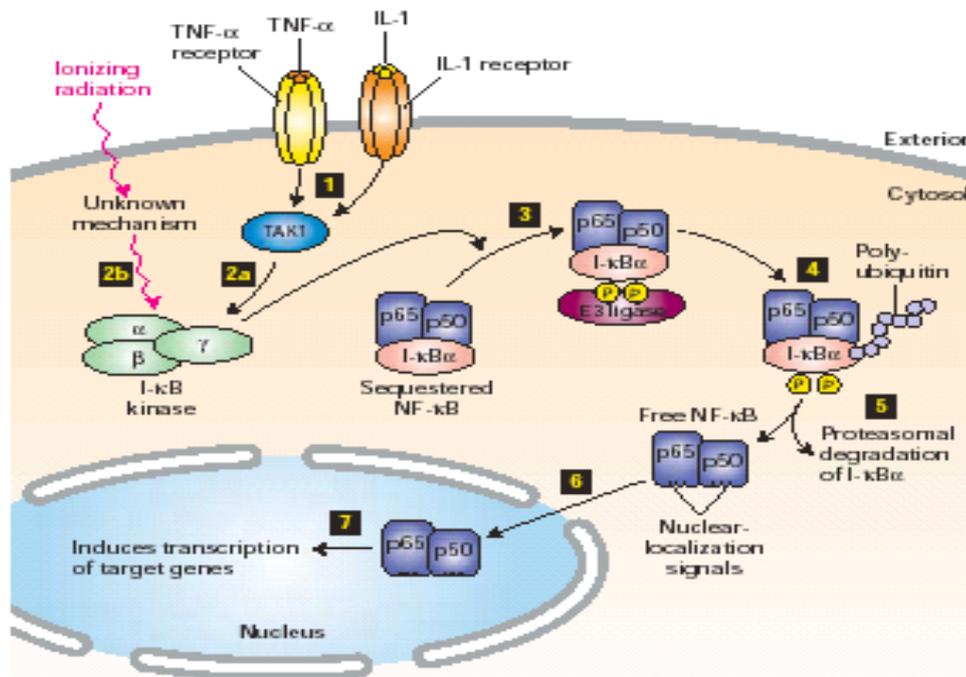
Perlakuan leptin 25 ng ml⁻¹ dengan penambahan puerarin 5, 25, 200 dan 525 μM tidak menunjukkan hasil yang signifikan, tetapi ada kecenderungan penurunan jumlah sel yang mengekspresikan VCAM-1 pada puerarin 5 μM. Hal ini menandakan bahwa puerarin dapat menghambat ekspresi VCAM-1 pada sel endotel yang disebabkan oleh efek antioksidan puerarin sehingga mencegah inflamasi. Tetapi pada penelitian ini, dosis puerarin tidak menurunkan ekspresi VCAM-1 mendekati kondisi leptin 0 ng ml⁻¹ (Gambar 3). Hal ini disebabkan

pemberian puerarin terlambat dalam mencegah aktivasi gen yang mengkode VCAM-1. Menurut Bouloumie *et al.*, dalam jangka waktu 30 menit (10 ng ml^{-1}) leptin sudah mampu meningkatkan level NF- κ B, namun dalam penelitian ini, puerarin diberikan setelah enam jam inkubasi dengan leptin [15]. Sedangkan menurut Ding *et al.*, puerarin mampu menurunkan level NF- κ B setelah 24 jam [16].

Penelitian ini mengkaji tentang pengaruh puerarin terhadap sel endotel yang diinduksi leptin 25 ng ml^{-1} dengan melihat adanya penurunan ekspresi pada VCAM-1 yang merupakan *biomarker* terjadinya disfungsi endotel. Leptin merupakan sitokin yang dihasilkan oleh sel adiposit, dalam jumlah tinggi, leptin dapat menyebabkan terbentuknya ROS dalam sel endotel. ROS melalui aktivasi ERK $\frac{1}{2}$ akan meng-induksi CRP. Selanjutnya CRP menginduksi ekspresi VCAM-1 melalui protein kinase C (PKC), p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), tyrosin kinase dan NF- κ B [6].

Pada Gambar 4, dalam bentuk tidak aktif NF- κ B akan berikatan dengan I κ -B dimana NF- κ B mempunyai dua sub-unit yaitu P65 dan P50.

Molekul tunggal I κ -B menempel pada domain N-terminal dari setiap unit heterodimer p50/p65, karenanya menutupi *nuclear localization* signal. Protein kinase kompleks yang disebut I κ -B kinase merupakan titik berkumpulnya semua sinyal ekstraselular yang mengaktifasi NF- κ B. Dalam hitungan menit, stimulasi I κ -B kinase menjadi teraktifasi dan memfosforilasi dua N-terminal *serine residues* pada I κ -B. E3 ubiquitin ligase kemudian berikatan terhadap *phosphoserines* dan mem-*polyubiquitin* I κ -B kemudian memicu dengan segera degradasi oleh *proteasome*. Akibat I κ -B terdegradasi, *nuclear-localization* signal pada NF- κ B menjadi terekspos sehingga dapat bertranslokasi kedalam inti sel dan mengaktifasi transkripsi dari berbagai macam gen target. Pensinyalan NF- κ B dihentikan oleh *negatif feedback loop*, dimana setiap satu gen yang ditranskripsinya diinduksi langsung oleh NF- κ B juga mengkodekan I κ -B. Akhirnya level protein I κ -B yang tinggi menonaktifkan NF- κ B aktif di dalam sel dan mengembalikannya ke sitosol. Dengan pemberian puerarin dapat mencegah terjadinya disfungsi endotel.



Gambar 4. Jalur sinyal NF- κ B [17]

Keterangan:

(1) stimulasi oleh TNF- α atau IL-1 menginduksi aktivasi TAK-1 *kinase*. (2a) aktivasi trimerik I κ -B *kinase*. (2b) radiasi pengion dan stress lainnya dapat secara langsung mengaktifasi I κ -B *kinase* dengan mekanisme yang belum diketahui. (3) fosforilasi I κ -B oleh I κ -B *kinase* dan pengikatan E3 *ubiquitin ligase*. (4) poliubiquitinase I κ -B (5) target degradasi *proteasome*. (6) hilangnya I κ -B membuka *nuclear localization* dari ke dua sub unit NF- κ B. (7) NF- κ B mengaktifasi transkripsi dari beberapa target gen termasuk sub unit α dari I κ -B yang bertindak untuk menghentikan sinyal.

Puerarin akan menginduksi *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) sehingga menghasilkan NO yang merupakan vasodilatator dan dapat meningkatkan ekspresi Iκ-B dan menurunkan ekspresi VCAM-1 [3]. Namun dosis puerarin yang digunakan pada penelitian ini kurang bervariasi sehingga sulit untuk menentukan dosis optimumnya dalam mengurangi resiko inflamasi dan disfungsi endotel, selain itu ada perbedaan waktu pemberian puerarin dengan leptin sehingga puerarin baru bekerja setelah leptin menginduksi ekspresi VCAM-1 pada sel endotel.

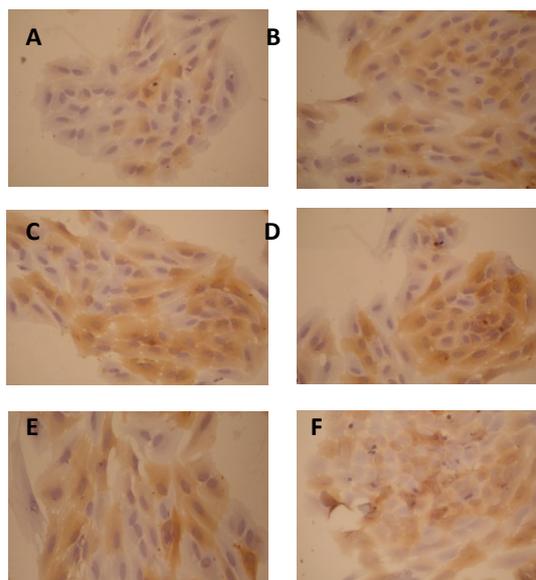
Pendugaan terhadap puerarin sebagai terapi disfungsi endotel yaitu puerarin dapat secara langsung mempengaruhi ekspresi VCAM-1 dimana puerarin merupakan *scavenger* dari VCAM-1. Berdasarkan hasil penelitian Prasain diketahui bahwa puerarin dapat diabsorpsi secara cepat dan sempurna dengan hipotesis bahwa puerarin diduga ditransportasikan menyeberangi dinding intestinal dan diabsorpsi secara sempurna tanpa metabolisme [18]. Selain itu berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sun *et al.*, puerarin diketahui sebagai terapi penyakit kardiovaskular tetapi mekanisme puerarin terhadap disfungsi endotel belum diketahui [19].

Analisis Ekspresi PPARγ

Analisis ekspresi PPAR-γ pada kultur sel endotel (HUVECs) dapat dilakukan *in vivo* dengan teknik imunositokimia yang menggunakan antibodi primer PPAR-γ dalam serum 1:200 dan antibodi sekunder *biotin-goat-anti rabbit* 1: 400. Ekspresi PPAR-γ dideteksi dari warna coklat pada sitoplasma sel endotel. Ekspresi PPAR-γ pada kultur sel endotel dengan berbagai perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.

Berdasarkan hasil perhitungan menunjukkan bahwa pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin 25 ng ml⁻¹, terjadi peningkatan jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ sebanyak (3,37 ± 0,35)%. Sedangkan pada leptin 0 ng ml⁻¹, jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ hanya sebanyak (0,9 ± 0,22)%. Hasil uji statistik menyatakan bahwa induksi leptin 25 ng ml⁻¹ berpengaruh signifikan (p < 0,05) terhadap jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ dibandingkan leptin 0 ng ml⁻¹. Hal ini menunjukkan bahwa leptin 25 ng ml⁻¹ mampu meningkatkan jumlah ekspresi PPAR-γ (Gambar 6). Pada dasarnya PPAR-γ juga telah diekspresikan di sel endotel (normal) tetapi dalam jumlah yang sedikit sehingga dengan induksi leptin 25 ng ml⁻¹ mampu meningkatkan

ekspresi PPAR-γ bila dibandingkan dengan perlakuan tanpa leptin (leptin 0 ng ml⁻¹). Menurut Dadogo *et al.*, menyatakan bahwa konsentrasi leptin dalam darah mencakup 2-10 ng ml⁻¹ dan wanita obesitas 10-100 ng ml⁻¹ dimana pada batas tersebut leptin dapat meningkatkan jumlah sel [20]. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini bahwa induksi leptin 25 ng ml⁻¹ dapat meningkatkan jumlah ekspresi PPAR-γ. Rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ pada tiap perlakuan, ditampilkan pada Gambar 6.



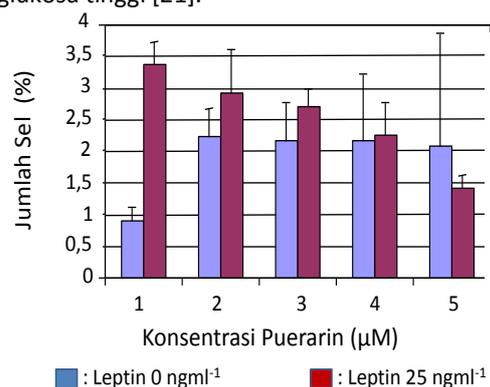
Gambar 5. Hasil imunositokimia PPAR-γ pada kultur sel endotel (HUVEC'S) dengan berbagai perlakuan

Keterangan:

- A. Leptin 0 ng ml⁻¹ + puerarin 0 μM
- B. Leptin 25 ng ml⁻¹
- C. Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 5 μM
- D. Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 25 μM
- E. Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 200 μM
- F. Leptin 25 ng ml⁻¹ + puerarin 525 μM

Pada perlakuan leptin 0 ng ml⁻¹ dengan penambahan puerarin masing-masing 5, 25, 200 dan 525 μM tidak berpengaruh signifikan (p < 0,05), tetapi ada kecenderungan peningkatan ekspresi PPAR-γ dibandingkan leptin 25 ng ml⁻¹, yang ditunjukkan pada Gambar 6. Hal ini diduga disebabkan oleh konsentrasi puerarin yang kurang tinggi dan kurang bervariasi dalam menurunkan ekspresi PPAR-γ. Kenaikan ekspresi PPAR-γ ini dapat berpengaruh pada kenaikan faktor-faktor transduksi yang lain yang dapat memicu terjadinya disfungsi endotel. Menurut Delerive *et al.*, peningkatan PPAR-γ dapat menyebabkan aterosklerosis, resistensi insulin, hipertensi dan diabetes tipe 2. Aktivasi PPAR-γ

dalam sel dapat meningkatkan faktor-faktor seperti proliferasi sel endotel, AT-II (*angiotensin-II*), PAI-1 (*plasminogen-1*), ET-1 (*endothelin-1*), VCAM-1 dan E-selectin, sebagai awal terjadinya aterosklerosis. Kemungkinan kedua disebabkan oleh puerarin sebagai antioksidan, ketika dalam jumlah yang berlebih di dalam sel justru akan menyebabkan prooksidan. Puerarin berpotensi untuk menginduksi diferensiasi preadiposit, mempromote glukosa uptake dari adiposit yang kemudian menginduksi resistensi insulin oleh glukosa tinggi [21].



Gambar 6. Hubungan konsentrasi puerarin dengan jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ

Pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin 25 ng ml⁻¹ dengan penambahan puerarin masing-masing 5, 25, 200 dan 525 μM jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ berurutan masing-masing sebanyak (2,93 ± 0,68)%, (2,72 ± 0,27)%, (2,26 ± 0,51)%, (1,42 ± 0,20)%. Hasil uji statistik menyatakan bahwa antara induksi leptin 25 ng ml⁻¹ dengan masing-masing puerarin 5, 25, 200 μM menunjukkan penurunan terhadap jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ, tetapi tidak signifikan. Namun pada konsentrasi puerarin 525 μM ada kecenderungan penurunan ekspresi PPAR-γ. Konsentrasi puerarin 525 μM adalah konsentrasi yang mampu menurunkan ekspresi PPAR-γ hampir mendekati kondisi sel endotel yang diinduksi leptin 0 ng ml⁻¹ (sel endotel normal) (Gambar 6). Namun pada penelitian ini tidak dilakukan penggunaan dosis atau konsentrasi puerarin yang lebih tinggi dan bervariasi lagi sehingga dapat diketahui konsentrasi puerarin yang optimal dalam menurunkan jumlah ekspresi PPAR-γ serta aman untuk digunakan. Menurut Hill *et al.*, puerarin dilaporkan mempunyai efek mencegah disfungsi endotel yang diinduksi oleh banyak faktor [8]. Penelitian menggunakan isoflavon ini juga dilaporkan telah mempunyai efek antidiabetik melalui jalur PPAR pada tikus obese, diabetes

tipe 2 dan penyakit kardio-vaskuler [22]. Injeksi puerarin dapat menurunkan kerusakan oksidatif pada sel dan menghambat apoptosis [23].

Senyawa aktif puerarin menyebabkan penurunan ekspresi PPAR-γ memiliki kemungkinan jalur penghambatan, yaitu melalui penghambatan ROS. Puerarin juga melakukan penghambatan jalur signal transduksi (*down regulation*) jalur MAPK khususnya Erk 1/2 [8]. Selain itu diduga puerarin bertindak sebagai *Scavenger* terhadap penurunan ekspresi PPAR-γ. Mekanisme kerja senyawa aktif puerarin kemungkinan langsung memblokir aktivasi PPAR-γ pada *binding site* tempat ligan berikatan pada PPAR-γ dan hal ini masih memerlukan penelitian secara *in vitro* lebih lanjut. Pada penelitian ini induksi puerarin digunakan sebagai agen terapi untuk disfungsi endotel. Apabila ekspresi dan aktivasi dari PPAR-γ terhambat atau menurun oleh adanya induksi puerarin, proses akhir dalam hal ini disfungsi endotel juga akan terhambat dan secara tidak langsung dapat menurunkan tahapan disfungsi endotel.

Pada penelitian ini, kultur sel endotel yang diinduksi leptin 25 ng ml⁻¹ mampu meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan PPAR-γ. Hal ini disebabkan karena peran leptin sebagai faktor penginduksi (*inducer*) dan kemampuan leptin dalam meningkatkan ekspresi PPAR-γ. Leptin yang tinggi didalam sel endotel meningkatkan LDL teroksidasi yang menyebabkan kerusakan endotel. Pada kondisi tersebut terjadi peroksidase lipid, inflamasi dan peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) sebagai *second messenger* dan kemungkinan mengaktifkan proses atherogenik, seperti halnya sitokin *proinflammatory* [13]. ROS sebagai *second messenger*, bertindak dalam transduksi stimuli ekstraseluler dan intraseluler, sebagai contoh jalur Erk 1/2 (*extracellular-regulated kinases*). Peningkatan Erk 1/2 ini berasosiasi dengan peningkatan proliferasi sel dan diferensiasi [24]. Leptin dapat meningkatkan PPAR-γ melalui jalur MAP kinases (*Mitogen Activated Protein Kinases*) khususnya Erk 1/2. Jalur MAP Kinase meregulasi dari berbagai proses penting seperti proliferasi, diferensiasi hingga apoptosis. Selanjutnya menginduksi dan mengaktifasi pembentukan protein c-jun dan c-fos yang merupakan komponen (protein) penyusun utama faktor transkripsi AP-1. Faktor transkripsi AP-1 adalah faktor transkripsi yang dapat diaktifkan dan diregulasi pada *level* transkripsional maupun protein [25]. AP-1 berikatan dengan C/EBPα (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*), yang dapat

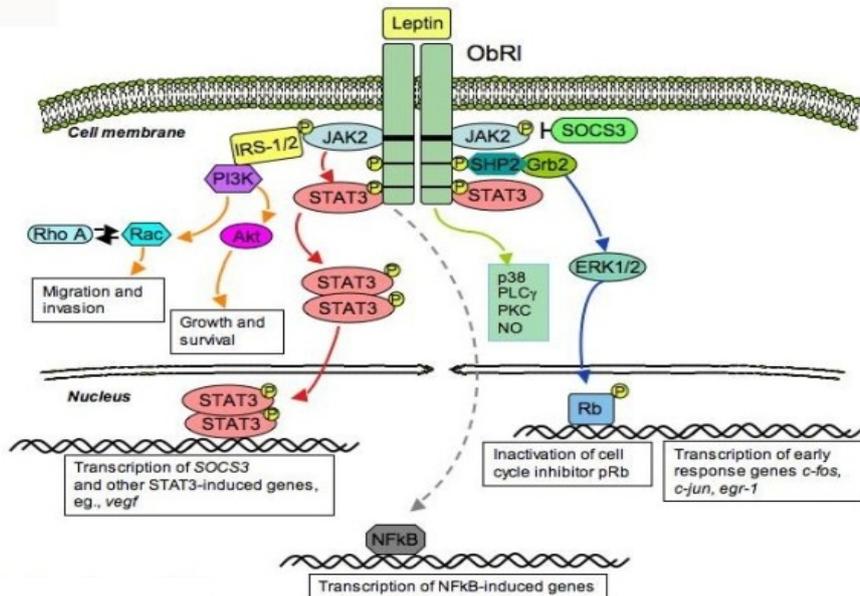
mengaktivasi faktor transkripsi seperti PPAR γ di nukleus [26]. Jalur MAPK ini merupakan jalur responsibel untuk leptin dalam menginduksi aktivasi c-fos. Pada akhirnya mengaktivasi faktor transkripsi [27]. Model leptin *signaling* dapat dilihat pada Gambar 7.

Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)

Pengukuran aktivitas enzim SOD ditandai dengan terjadinya peningkatan kadar SOD pada medium kultur sel endotel (HUVECs). Deteksi kadar SOD menggunakan ELISA Kit karena dianggap lebih sensitif (pengukuran hingga kadar nano gram [10⁻⁹]) sehingga hasil yang didapat dapat lebih akurat. Obyek yang diukur pada penelitian ini adalah *extracellular SOD* (EC-SOD) yang terkandung dalam medium kultur. Menurut Grayck *et al.*, EC-SOD mayoritas diekspresikan di beberapa jaringan termasuk jaringan vaskuler, paru-paru, dan uterus. EC-SOD tersusun dari 70% dari total aktivitas SOD pada manusia [28].

Hasil perhitungan kadar SOD dengan tiga kali ulangan didapatkan rata-rata kadar SOD seperti digambarkan pada Gambar 8. Data dianalisis menggunakan uji statistik. Berdasarkan hasil pengukuran diketahui bahwa aktivitas SOD

terukur pada semua perlakuan. Berdasarkan konsentrasi puerarin yang diperlakukan (pada Gambar 8), pada puerarin 0 μM , paparan leptin 0 ng ml⁻¹ menunjukkan kadar SOD yang sedikit lebih tinggi yaitu 0,027% jika dibandingkan dengan paparan leptin 25 ng ml⁻¹ yaitu 0,025%. Hal ini juga ditunjukkan pada perlakuan puerarin 5 μM dimana paparan leptin 0 ng ml⁻¹ kadar SOD yang terukur lebih tinggi yaitu sebesar 0,031% jika dibandingkan dengan leptin 25 ng ml⁻¹ sebesar 0,026. Demikian juga pada perlakuan leptin 25 μM , kadar SOD pada paparan leptin 0 ng ml⁻¹ lebih tinggi yaitu 0,030%, sedangkan paparan leptin 25 ng ml⁻¹ kadar SOD sebesar 0,028%. Kadar SOD lebih tinggi pada paparan leptin 25 ng ml⁻¹ jika dibandingkan dengan paparan leptin 0 ng ml⁻¹ ditemukan pada perlakuan puerarin 525 μM . Dimana paparan leptin 25 ng ml⁻¹ kadar SOD sebesar 0,033% sedangkan leptin 0 ng ml⁻¹ sebesar 0,031%. Pada perlakuan puerarin 200 μM kadar SOD yang terukur antara paparan leptin 0 ng ml⁻¹ dan leptin 25 ng ml⁻¹ hampir sama, yaitu sebesar 0,0306 dan 0,0309.



Gambar 7. Leptin *signaling* mengaktivasi faktor transkripsi melalui jalur Erk 1/2. Aktivasi dari jalur Erk 1/2 akan mengaktivasi c-jun dan c-fos di nukleus, yang selanjutnya dapat mengaktivasi faktor transkripsi yang lain seperti PPAR γ [29]

Tabel 3. Jumlah fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada sitoplasma (apoptosis) dan supernatan (nekrosis).

Konsentrasi Puerarin (μM)	Jumlah fragmen-fragmen DNA yang dilabel <i>BrdU</i>			
	Apoptosis		Nekrosis	
	Non Leptin	Leptin	Non Leptin	Leptin
0	1,6 \pm 0,3	1,2 \pm 0,1	2,2 \pm 0,5	2,1 \pm 0,2
5	1,2 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	1,7 \pm 0,3
25	1,3 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	1,9 \pm 0,4	1,5 \pm 0,2
200	1,2 \pm 0,2	1,4 \pm 0,6	1,6 \pm 0,3	1,9 \pm 0,6
525	1,3 \pm 0,1	1,8 \pm 0,3	2,3 \pm 0,6	1,9 \pm 0,3

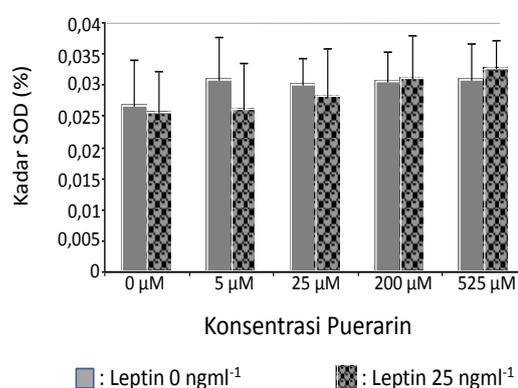
Hasil uji statistik (p value > 0,05) menyatakan bahwa variasi konsentrasi puerarin (0, 5, 25, 200, 525 μ M) tidak menunjukkan beda nyata terhadap terhadap kontrol (tanpa paparan leptin). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi leptin 25 ng ml⁻¹ pada kultur sel endotel selama 12 jam belum dapat mempengaruhi aktivitas SOD ekstraselular. Dimana radikal yang dihasilkan dalam mitokondria ini merupakan ROS primer yaitu superoksida (O₂^{*}) [29]. Sehingga jika jumlah superoksida tinggi, maka superoksida yang ditangkap oleh SOD dan diubah menjadi H₂O₂ meningkat sehingga aktivitas SOD juga diharapkan meningkat. Namun aktivitas SOD dalam penelitian ini menunjukkan perbedaan yang tidak nyata.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi antara puerarin dan leptin tunggal belum dapat mempengaruhi aktivitas SOD secara signifikan. Sedangkan menurut pernyataan Yamagishi *et al.*, yang menyatakan bahwa kadar leptin 10 ng ml⁻¹ dalam plasma darah telah dapat menginduksi over produksi ROS. Sedangkan interaksi antara 25 ng ml⁻¹ leptin dan peningkatan konsentrasi puerarin secara bertahap tidak mempengaruhi aktivitas SOD ekstraselular [30]. Dari hasil tersebut diduga pengukuran kadar SOD ekstraselular belum dapat mempresentasikan jumlah super-oksida karena keberadaan SOD intraselular tidak dapat diabaikan jika dilihat dari kadar pengukuran H₂O₂. Hal ini dijelaskan oleh Hayden and Tyagi, bahwa adanya Parameter Status Antioksidan Total (SAT) diperlukan untuk dapat menggambarkan status keseimbangan redoks, dan untuk mewakili aktivitas menyeluruh suatu oksidan dan anti-oksidan [31]. Dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa puerarin bekerja sinergis dengan SOD dalam menangkap radikal superoksida melalui proses *scavenger* secara langsung. Hal ini dijelaskan oleh Nijveldt, bahwa flavonoid bertindak sebagai antioksidan untuk mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dengan penangkapan oksidan secara langsung (*direct scavenging*) [32]. Mekanismenya menurut Korkina *et al.*, sebagai berikut, yaitu flavonoid dioksidasi oleh radikal menghasilkan bentuk radikal yang lebih stabil dan kurang reaktif. Dengan kata lain, flavonoid menyetabilkan ROS dengan bereaksi bersama komponen reaktif radikal. Reaktivitas flavonoid bergantung pada gugus hidroksil flavonoid tersebut, yang menyebabkan radikal menjadi inaktif. Pernyataan ini dapat menjelaskan bahwa cara kerja antioksidan flavonoid tidak mengaktivasi antioksidan endo-gen, namun

flavonoid (puerarin) bekerja sinergis dengan antioksidan endogen (SOD) dalam menangkap radikal bebas [33]. Selain itu menurut Grayck *et al.*, SOD berperan dalam memodulasi reaksi NO dengan menghambat reaksi antara superoksida dan NO, karena superoksida bereaksi cepat dengan NO menginaktivasi aktivitas vasodilator NO dan membentuk oksidan sekunder kuat yaitu peroksinitrit (OONO⁻) [28].

Kadar Hidrogen Peroksida (H₂O₂)

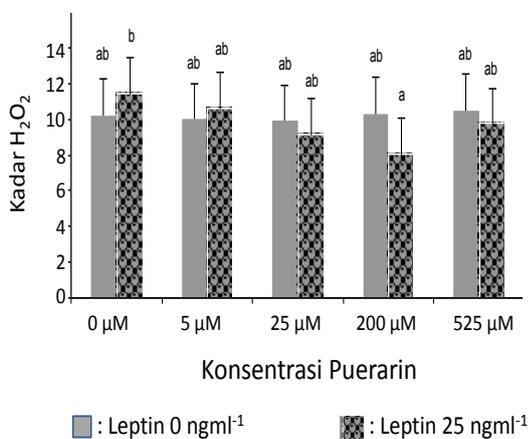
Pengukuran kadar H₂O₂ dapat diukur sebagai produk dari aktivitas enzim SOD. H₂O₂ dibentuk dari dismutasi superoksida secara spontan pada pH rendah yang dikatalisis oleh SOD [34].



Gambar 8. Histogram hubungan konsentrasi puerarin pada kultur sel endotel yang diinduksi 0 ng ml⁻¹ leptin dan 25 ng ml⁻¹ leptin terhadap aktivitas SOD

Hasil pengukuran kadar H₂O₂ menggunakan Elisa, diketahui bahwa H₂O₂ terukur pada semua perlakuan dengan kadar yang digambarkan pada Gambar 9. Berdasarkan variasi konsentrasi puerarin yang diperlakukan (Gambar 9), pada perlakuan puerarin 0 μ M dan 5 μ M menunjukkan kadar H₂O₂ yang lebih tinggi pada paparan leptin 25 ng ml⁻¹ jika dibandingkan dengan leptin 0 ng ml⁻¹. Yaitu berurutan pada puerarin 0, puerarin 25 μ M dan leptin 25 μ M kadar H₂O₂ sebesar 11,42 ng ml⁻¹ sedangkan pada paparan leptin 0 ng ml⁻¹ kadarnya sebesar 10,25 ng ml⁻¹, leptin 25 ng ml⁻¹ kadar H₂O₂ sebesar 10,6 ng ml⁻¹ sedangkan leptin 25 ng ml⁻¹ kadar H₂O₂ sebesar 10,01 ng ml⁻¹. Pada tiga perlakuan puerarin lainnya yaitu 25 μ M, 200 μ M dan 525 μ M menunjukkan kadar H₂O₂ lebih tinggi pada paparan leptin 0 ng ml⁻¹ jika dibandingkan dengan paparan leptin 25 ng ml⁻¹, yang artinya puerarin menurunkan kadar H₂O₂. Yaitu masing-masing berurutan berdasarkan konsentrasi paparan leptin 0 dan 25 ng ml⁻¹

adalah 9,92 ng ml⁻¹ lebih tinggi jika dibandingkan dengan 9,12 ng ml⁻¹, 10,32 ng ml⁻¹ lebih tinggi jika dibandingkan 8,08 ng ml⁻¹ dan 10,5 lebih tinggi jika dibandingkan dengan 9,75 ng ml⁻¹. Hasil uji statistik (berdasarkan perhitungan pada lampiran 6.) menyatakan bahwa penambahan konsentrasi leptin 25 ng ml⁻¹ tidak mempengaruhi secara signifikan kadar H₂O₂ yang diproduksi jika dibandingkan dengan sel normal (tanpa paparan leptin). Sedangkan variasi konsentrasi puerarin (0, 5, 25, 200, 525 μM) menunjukkan beda nyata terhadap kontrol. Berdasarkan uji lanjut BNJ, didapatkan adanya konsentrasi optimum puerarin dalam menurunkan kadar H₂O₂ yaitu 200 μM. Sedangkan konsentrasi puerarin di atasnya (525 μM) menyebabkan kadar H₂O₂ meningkat.

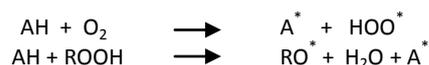


Gambar 9. Histogram hubungan konsentrasi puerarin pada kultur sel endotel yang diinduksi 0 ngml⁻¹ leptin dan 25 ng ml⁻¹ leptin terhadap kadar H₂O₂.

H₂O₂ merupakan hasil dari konversi superoksida (O₂^{*}) dari reaksi dismutasi yang dikatalis oleh SOD. H₂O₂ selanjutnya ditransformasi menjadi radikal hidroxil (OH^{*}) dengan keberadaan ion metal melalui reaksi Fenton atau Haber-Weiss [31]. Kadar H₂O₂ dalam penelitian ini dipengaruhi oleh perlakuan kombinasi 25 ng ml⁻¹ leptin dan puerarin, sesuai dengan pernyataan *Zmijewski et al.*, yang menyatakan bahwa jumlah H₂O₂ dalam sel dipengaruhi oleh produksi superoksida dari mitokondria [35].

Perlakuan kombinasi 25 ng ml⁻¹ leptin dan puerarin menunjukkan konsentrasi optimum puerarin dalam menurunkan kadar H₂O₂ yaitu 200 μM. Sedangkan konsentrasi di atasnya yaitu 525 μM kembali meningkatkan kadar H₂O₂. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi antioksidan yang berlebihan jika dibandingkan dengan kadar ROS akan menyebabkan efek negatif yaitu antioksidan

dianggap sebagai oksidan dalam sel yang menyebabkan over produksi H₂O₂. Hal ini dijelaskan oleh Gordon, bahwa konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, akti-vitas antioksidan sering lenyap, bahkan berubah sifatnya menjadi prooksidan. Sifat antioksidan yang berubah menjadi prooksidan dijelaskan pada gambar 10 [36].



Gambar 10. Antioksidan bertindak sebagai prooksidan pada konsentrasi tinggi [36]

Berdasarkan persamaan Gambar 10, dapat dimengerti bahwa keberadaan antioksidan yang tidak dibutuhkan (berlebih) akan terdisosiasi dan bersifat radikal. Radikal yang terbentuk akan menangkap oksigen (O₂) dan hidroperoksida (ROOH) stabil menghasilkan radikal HOO^{*} dan radikal lipida (RO^{*}). Keberadaan H₂O₂ yang menurun pada konsentrasi flavonoid optimum (200 μM) dan naik pada konsentrasi di atas optimum (525 μM) mengindikasikan dosis yang berlebih (di atas optimum) meningkatkan produksi radikal superoksida yang menghasilkan peningkatan produksi H₂O₂.

Apoptosis dan Nekrosis

Pengukuran apoptosis pada kultur sel endotel dilakukan berdasarkan banyaknya fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada sitoplasma (lisat), sedangkan pengukuran nekrosis dilakukan berdasarkan banyaknya fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada supernatan. Deteksi fragmen-fragmen DNA baik pada apoptosis maupun pada nekrosis menggunakan metode ELISA kit yang dibaca oleh ELISA reader pada λ 450 nm pada masing-masing perlakuan kultur sel endotel dengan adanya *substrate solution* (TMB). Penggunaan metode ELISA kit ini karena dianggap lebih sensitif sehingga hasil yang didapatkan lebih akurat, dan dapat digunakan pada sampel dalam jumlah yang banyak. Sedangkan λ 450 nm menunjukkan banyak sedikitnya fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada sitoplasma (apoptosis) dan fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada supernatan (nekrosis). Semakin tinggi nilai absorbansinya menunjukkan semakin banyak DNA yang terlabel *BrdU*. Untuk apoptosis, hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak sel yang mengalami apoptosis. Demikian juga halnya pada nekrosis

menunjukkan bahwa semakin banyak sel yang mengalami nekrosis.

BrdU merupakan analog *thymidine* yang sering digunakan dalam studi proliferasi sel. Dalam kultur, *BrdU* biasanya melakukan korporasi dengan DNA selama sintesis DNA [37]. Adapun tahapan pelabelan dan deteksi *BrdU* (Gambar 9) yaitu (1) MP *dicoated* dengan antibodi *Anti-DNA*, kemudian (2 dan 3) Antibodi *Anti-DNA* yang telah berikatan dengan MP menangkap fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* yang sudah didenaturasi dengan *microwave irradiation*. Selanjutnya (4) fragmen-fragmen DNA yang diberi label *BrdU* dideteksi dengan antibodi *Anti-BrdU-POD conjugate (anti-BrdU)* yang dikonjugasikan dengan *POD*, yang kemudian divisualisasikan dengan menambahkan *substrate solution (TMB)* untuk menghasilkan warna [38].

Berdasarkan hasil penelitian, rata-rata fragmen-fragmen DNA setiap perlakuan yang dilabel *BrdU* pada sitoplasma (apoptosis) dan supernatan (nekrosis) ditampilkan pada Tabel 3. Dari hasil pengukuran diketahui bahwa pada kultur sel endotel normal (tanpa induksi leptin dan puerarin), leptin 25 ng ml⁻¹, dan puerarin 5, 25, 200 dan 525 µM tanpa leptin, serta leptin 25 ng ml⁻¹ dan puerarin 5, 25, 200 dan 525 µM, rata-rata fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada sitoplasma (apoptosis) (Gambar 9 A) secara berurutan masing-masing adalah 1,600 ± 0,290 ; 1,175 ± 0,112 ; 1,155 ± 0,147 ; 1,275 ± 0,233 ; 1,222 ± 0,221 ; 1,343 ± 0,064 ; 1,065 ± 0,111 ; 1,124 ± 0,145 ; 1,359 ± 0,579 dan 1,757 ± 0,255. Sedangkan rata-rata fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada supernatan (nekrosis) (Gambar 9 B) secara berurutan masing-masing adalah 2,155 ± 0,466 ; 2,077 ± 0,189 ; 1,920 ± 0,131 ; 1,876 ± 0,426 ; 1,529 ± 0,299 ; 2,264 ± 0,610 ; 1,678 ± 0,292 ; 1,526 ± 0,173 ; 1,857 ± 0,597 dan 1,863 ± 0,307. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa leptin 25 ng ml⁻¹, dan puerarin 5, 25, 200 dan 525 µM tanpa leptin, serta leptin 25 ng ml⁻¹ dan puerarin 5, 25, 200 dan 525 µM tidak berpengaruh signifikan ($p > 0,05$) terhadap apoptosis dan nekrosis. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi puerarin tidak berpengaruh terhadap apoptosis dan nekrosis pada kultur sel endotel yang diinduksi leptin 25 ng ml⁻¹. Hal ini dikarenakan pada awal kultur sel endotel densitas selnya sudah tinggi, dan terjadi kematian sel secara spontan karena secara fisiologis sel endotel memerlukan ruang untuk hidupnya. Menurut Yasaka *et al.*, densitas sel

yang tinggi dapat menyebabkan kematian sel (apoptosis) [39], dan didukung oleh Roche Applied Science, bahwa semakin tinggi kepadatan sel, maka sel akan lebih cenderung mengalami apoptosis dibandingkan dengan nekrosis [38]. Selain densitas selnya yang tinggi, juga dipengaruhi oleh ROS akibat induksi leptin. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa pada mekanisme intraseluler, leptin dapat menginduksi apoptosis [40, 41], dan didukung oleh Bouloumie *et al.*, bahwa sel endotel (HUVECs) yang distimulasi dengan leptin akan meningkatkan akumulasi ROS intraseluler [13], serta Artwohl *et al.*, bahwa leptin juga *mentrigger* apoptosis pada jaringan lemak vaskulatur [42].

Mekanisme intraseluler leptin pada sel endotel dalam menginduksi apoptosis adalah dengan meningkatkan akumulasi ROS yang merupakan radikal bebas. Leptin berikatan dengan reseptor leptin (Ob-Rb) pada sel, kemudian leptin meng-aktivasi AMPK yang merupakan enzim *fuel sensing* yang akan teraktivasi apabila terjadi peningkatan rasio AMP/ATP. Fosforilasi AMPK mengaktivasi fosforilasi ACC (*Acetyl-CoA Carboxylase*) dan kemudian mengaktivasi Acetyl-CoA. Acetyl-CoA selanjutnya menghambat sintesis *Malonyl-CoA*, mengaktifkan CPT 1 (*Carnitine Palmitoyltransferase 1* yang merupakan enzim kunci dalam oksidasi asam lemak). Hal ini mengakibatkan peningkatan oksidasi asam lemak di mitokondria sehingga meningkatkan produksi ROS berupa radikal mitokondrial, akibatnya terjadi kondisi stress oksidatif [43, 44], akumulasi ROS pada sel-sel endotel sebagai akibat dari induksi leptin tersebut mengakibatkan terjadinya kondisi stress oksidatif, yang akhirnya dapat menyebabkan kematian sel (apoptosis atau nekrosis) secara langsung [44, 45]. Tetapi dengan adanya puerarin yang berperan sebagai antioksidan dapat menekan kematian sel akibat induksi leptin tersebut. Menurut Winarsi, reaktivitas oksidan (ROS) dapat dihambat dengan puerarin (anti-oksidan) dengan cara ketika isoflavon berinteraksi dengan senyawa oksidan, maka senyawa isoflavon memberikan satu gugus H kepada senyawa oksidan. Sehingga seketika itu juga, senyawa isoflavon berubah menjadi radikal isoflavon, sementara senyawa oksidan menjadi senyawa yang stabil. Meskipun isoflavon berubah menjadi senyawa radikal, namun senyawa tersebut tidak memiliki potensi untuk melakukan propagasi [46]. Radikal tersebut akan di non-aktifkan oleh senyawa radikal lain, sehingga

kembali menjadi senyawa stabil. Menurut Xiong *et al.*, puerarin dapat mencegah ROS sehingga menekan apoptosis [47], dan didukung juga oleh Nijveldt, bahwa flavonoid bertindak sebagai antioksidan untuk mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dengan penangkapan oksidan secara langsung (*direct scavenging*) [34]. Disatu sisi akibat dari induksi leptin yang dapat menyebabkan peningkatan kematian sel, dan disisi lain puerarin yang berperan sebagai *scavenger* yang dapat menurunkan kematian sel, sehingga interaksi antara dua faktor tersebut pada semua perlakuan (leptin 25 ng ml⁻¹, dan puerarin 5, 25, 200 dan 525 µM tanpa leptin, serta leptin 25 ng ml⁻¹ dan puerarin 5, 25, 200 dan 525 µM) pengaruhnya tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Selain itu, puerarin akan memberikan efek apabila diinduksi bersamaan dengan leptin dalam waktu lebih dari 6 jam. Menurut Semetisari, puerarin dengan konsentrasi 200 µM yang diinduksi bersamaan dengan leptin 25 ng ml⁻¹ selama 12 jam akan memberikan efek dalam menurunkan konsentrasi TNF-α (*Tumor Necrosis Factor-α*) pada kultur HUVECs secara signifikan [48], penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa puerarin dengan konsentrasi 200 µM yang diinduksi ber-samaan dengan leptin 25 ng ml⁻¹ selama 12 jam juga menurunkan kadar H₂O₂ pada kultur HUVECs secara signifikan.

Pada gambar 4.2.A dan B menunjukkan bahwa kultur sel endotel lebih cenderung mengalami nekrosis daripada apoptosis karena rata-rata fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada supernatan (nekrosis) yang terukur lebih tinggi dibandingkan dengan fragmen-fragmen DNA yang dilabel *BrdU* pada sitoplasma (apoptosis). Hal ini dikarenakan jumlah sel yang terlalu banyak (*overloading* diatas rata-rata) dan kekurangan medium sebagai sumber energi (ATP) sehingga sel lebih cenderung mengalami nekrosis daripada apoptosis. Menurut Tsujimoto, nekrosis merupakan kematian sel yang tidak membutuhkan ATP (Gambar 9), yang ditandai dengan adanya pembengkakan pada mitokondria dan retikulum endoplasma yang menyebabkan volume sel bertambah sehingga terjadi kerusakan fungsi plasma membran [49] dan akhirnya sel mengalami lisis [50]. Kematian sel pada apoptosis merupakan mekanisme proses aktif yang membutuhkan energi (ATP), dimana sel itu sendiri aktif dalam proses destruksi. Apoptosis disebut sebagai kematian sel yang terprogram dan merupakan suatu bentuk fisiologi normal

yang memegang peranan penting dalam homeostasis jaringan dewasa dan perkembangan embrio. Kematian sel pada apoptosis secara umum ditandai dengan terjadinya kondensasi kromatin, fragmentasi DNA dan pembentukan badan apoptotik (*apoptotic bodies*), yang akhirnya difagositosis oleh sel-sel didekatnya [49].

KESIMPULAN

Induksi 25 ng ml⁻¹ dapat meningkatkan ekspresi VCAM-1 (2,68 ± 0,15)% dibandingkan dengan perlakuan 0 ng ml⁻¹ (0,54 ± 0,15)%. Perlakuan induksi puerarin 5, 25, 200, 525 µM memberikan dampak negatif terhadap ekspresi VCAM-1 meskipun pengaruh ini tidak signifikan. Puerarin dapat menekan apoptosis dan nekrosis sel, 525 µM puerarin secara efektif dapat menekan ekspresi PPAR-γ. Puerarin tidak memberikan dampak yang signifikan terhadap aktivitas ekstraseluler berdasarkan hasil analisis aktivitas SOD dan H₂O₂.

DAFTAR PUSTAKA

1. Vander, A., J. Sherman., D. Luciano. 2001. Human Physiology: The Mecanisms of Body Function. McGraw-Hill Higher Education. New York.
2. Lau, D. C W., B. Dhillon., H. Yang., P. E. Szmilko., S. Verma. 2004. Adipokines: Molecular Links Between Obesity and Atherosclerosis. University of Toronto. Canada.
3. Libby, P., P. M. Ridker., A. Maseri. 2002. Inflammation and Aterosklerosis. *Circulation*. 105:1135-1143.
4. Ross, R. 1999. Aterosklerosis-An Inflammatory Disease. *N Engl J Medd*. 340:115-126.
5. Singh, P., M. Hoffmann., R. Wolk., Shamsuzzaman, S.M. Abbu., K. V. Somers. 2007. Leptin Induces C-Reactive Protein Expression in Vascular Endothelial Cells. American Heart Association, Inc. New York.
6. Kawanami D., K. Maemura., N. Takeda., T. Harada., T. Nojiri., T. Saito., I. Manabe., Y. Imae., R. Nagai. 2007. C-reactive protein induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB activation in vascular endothelial cells. University of Tokyo. Japan.
7. Liang Y.J., K.G. Shyu ., BW. Wang ., LP. Lai . 2007. C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB pathway and induces vascular cell adhesion molecule-1 expression through CD32 in human umbilical vein endothelial cells and aortic endothelial cells. National Taiwan University. Taiwan.

8. Hill, J. O., H. R. Wyatt., G. W. Reed., J. S. Peters. 2003. Obesity and The Environment: where do we go from here?. *Science*. 299:853-855.
9. Born V. dan J. Schwartz. 1997. *Vascular Endothel Physiology, Pathology and Therapeutic Oppurtunities*. Schattauer. Stuttgart. Berlin.
10. Marks, D.S., J. A. Vita., J. F. Keuney., G. N. Welch., J. Loscalzo. 1995. Inhibition of Neointimal Proliferation in Rabbit Following Vascular Injury by a Single Treatment With a Protein Adduct of Nitric Oxide. *J. Clin Invest*. 96:2630.
11. Sanyin, Z., C. Shilin., S. Yingjun., Y. Dajian., L. Xijing., S. Albert., X. Hongxi. 2007. Puerarin Induces Angiogenesis in Myocardium of Rat with Myocardial Infarction(Pharmacology). National Institute of Informatic. Japan.
12. Khotimah, H. 2003. Keterkaitan Pengaruh Pemberian Vitamin E dan C Terhadap Bioavailabilitas Endothelial-Derived Nitric Oxide (EDNO), Malondealdehyde (MDA) dan Kepadatan Sel Endotel Kultur HUVECs Kondisi Glukosa Tinggi. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang.
13. Boulomie, A., T. Marumo., M. Lafontan., R. Busse.1999. Leptin Induce Oxidative Stress in Human Endotelial Cells. *The FASEB Journal* Vol 13.hal:1231-1237.
14. Brian R., BR. Clapp., GM.Hirschfield. 2005. Inflammation and Endothelial Function Direct Vascular Effects of Human C-Reactive Protein on Nitric Oxide Bioavailability. *Circulation*. 111:530-1536.
15. Lawrence, G. S. 2007. Implikasi Klinis Disfungsi Endotel dan Radikal Bebas. Universitas Hasanudin. Makasar.
16. Ding, M.P., F. Feng, H.T. Hu. 2007. Effects of puerarin on expression of nuclear factor kappaB after cerebral ischemia/reperfusion `in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. Dec. 32. 23:2515-2518.
17. Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell. 2003. *Molecular Cell Biology*. 5th Edition. W.H. Freeman and Company. New York.
18. Prasain, J.K., K. Jones, N. Brissie, D.R. Moore, J.M. Wyss, S. Barnes. 2004. Identification of puerarin and its metabolites in rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 52:3708-3712.
19. Sun, X.H., J.P. Ding, H. Li, N. Pan, L. Gan, X.L. Yang, H.B. Xu. 2007. Activation of Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels by Puerarin: The Underlying Mechanism of Puerarin-Mediated Vasodilation. *JPET*. October. 323. 1:391-397.
20. Dadogo Jack S, Fanelli C, Paramore D, Brothers dan J, Landt M. 1996. Plasma leptin and insulin relationships in obese and non obese humans. *Diabetes*. 45:695-698.
21. Delerive P., Martin-Nizard F., Chinetti G., Trottein F., Fruchart JC., Najib J., Duriez P dan Staels B. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production. *Circ Res*. Sep 3. 85. 5:394-402.
22. Mdidea. 2007. What is Pueraria root (kudzu root)? Value of Pueraria root (kudzu root) and Pueraria root (kudzu root) extracts?. <http://www.mdidea.com/.../herbextract/kudzu/data.html>. Tanggal akses 12 Juni 2007.
23. Jia G.F., H.M. Xie. 1999. *New Usage of Clinical Medicine*. 1sted. People's Health Publishing House. Beijing.
24. Cimino, F., F. Esposito, R. Ammendola, T. Russo. 1997. Gene regulation by reactive oxygen species. *Curr. Top. Cell. Regul*. 35:123-147.
25. Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E., dan Woodgett, J. R. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature (London)*. 353:670-674.
26. Weaves, R.F. 2003. *Molecular Biology*, second edition. Mc-Graw Hill Companies, Inc. New York.
27. Banks A.S., S.M. Davis, S.H. Bates, M.G.Jr. Myers. 2000. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem*. 275:14563-14572.
28. Grayck, E.N., C.S. Dieterle., C.A. Piantadosi., J.J. Enghild., T.D. Oury. 2000. Secretion of extracellular superoksida dismutase in neonatal lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279:977-984
29. Brooks, P.S., Y. Yoon., J.L. Robotham., M.W. Anders., S.S. Sheu. 2004. Calcium, ATP, and ROS : a itochondroal love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287:C817-C833.
30. Yamagishi, S., D. Edelstein, X.L. Du, Y. Kaneda, M. Guzmán, M. Brownlee. 2001. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. Department of Medicine, Diabetes Research Center, Albert Einstein College of

- Medicine, Bronx. www.jbc.org. Tanggal 6 Agustus 2007
31. Hayden, M.R., S.C. Tyagi. 2002. Intimal Redox Stress: Accelerated Atherosclerosis in Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus. *Atherosclerosis. Cardiab.* 1:1- 27.
 32. Nijveldt R. J., Els van Nood, D.E.C. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren, P.A.M. van Leeuwen. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Society for Clinical Nutrition.* 74:418-425.
 33. Korkina L.G., I.B. Afanas'ev. 1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol.* 38:151-163.
 34. Hancock, J.T., R. Desikan, S.J. Neill. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *J. Biochemical Society Transactions.* Vol29. part 2.
 35. Zmijewski, J.W., A. Landar, N. Wanatabe, D.A Dickinson, N. Noguchi, V.M Darler-Usmr. 2005. Cell signaling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochemical Society Transactions.* Vol 33, part 6.
 36. Gordon, M.H. 1990. The mechanism of antioxidants action in vitro. dalam B.J.F. Hudson, editor. *Food Antioxidants.* Elsevier Applied Science. London.
 37. Biocompare. 2009. BrdU In-Situ Detection Kit From BD Biosciences. Biocompare.
 38. Roche Applied Science. 2005. Cellular DNA Fragmentation ELISA. Cat. No. 1 585 045. Instruction Manual. Version August 2005.
 39. Yasaka, T., S. Ichisaka., T. Katsumoto., H. Maki., M. Saji., G. Kimura., dan K. Ohno. 1996. Apoptosis Involved in Density-dependent Regulation of Rat Fibroblastic 3Y1 Cell Culture. *Cell Structure and Function.* 21: 483-489.
 40. Qian, H., G. J. Hausman., M. M. Compton., M. J. Azain., D. L. Hartzel, C. A. Baile. 1998. Leptin Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma, Tumor Necrosis Factor, and Uncoupling Protein-2 Expression in Adipose Tissues. *Biochem and Biophys Res Commun.* 246:660-667.
 41. Qian, H., M. J. Azain., M. M. Compton., D. L. Hartzel., G. J. Hausman, C. A. Baile. 1998. Brain Administration of Leptin causes Deletion of Adipocytes by Apoptosis. *Endocrinology.* 139:791-794.
 42. Artwohl M., M. Roden., H. Hölzenbein., A. Freudenthaler., W. Waldhäusl, S.M. Baumgartner-Parzer. 2002. Modulation by Leptin of Proliferation and Apoptosis in Vascular Endothelial Cells. *International Journal of Obesity.* 26:577-580.
 43. Minokoshi Y and B. B. Kahn. 2003. Role of AMP-Activated Protein Kinase in Leptin-Induced Fatty Acid Oxidation in Muscle. *Biochemical Society Transactions.* 31. 1:196-201
 44. Lum, H. dan K. A. Roebuck. 2001. Oxidant Stress and Endothelial Cell dysfunction. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 280:C719-C741.
 45. Halliwell, B., J. M. C. Gutteridge. 1996. *Antioxidant In Nutrition, Health and Disease.* Oxford University Press Inc. New York
 46. Winarsi, H. 2005. *Isoflavon.* Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
 47. Xiong, F. L., X. H. Sun., L. Gan., X. L. Yang, H. B. Xu. 2006. Puerarin Protects Rat Pancreatic Islets from Damage by Hydrogen Peroxide. *Eur J Pharmacol.* 529:1-7.
 48. Semetisari, R. 2008. Studi Efek Puerarin Dalam Menurunkan Konsentrasi *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) Pada Kultur *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) Yang Diinduksi Leptin. Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
 49. Tsujimoto, Y. 1997. Apoptosis and Necrosis: Intracellular ATP Level as A Determinant for Cell Death Modes. *Cell Death and Differentiation.* 4:429-434.
 50. Bezvenyuk, Z. 2001. Multiple Pathways of DNA Disintegration During Neuronal Apoptosis. Department of Neuroscience and Neurology. Series of Reports. No 56:1-59.