

Kajian Efek Alfa-Pinen Terhadap I-NOS (Inducible Nitric Oxide Synthase) Pada Kultur Sel Neuron-Glia Yang Dipapar Lipopolisakarida

Krisna Murtyastami¹, Sri Widyarti¹, Khusnul Khotimah²

¹ Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya

² Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
alamat korespondensi: farmakonumm@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this research was to study the effect of α -pinene on number of cell that express iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) on lipopolysaccharide (LPS)-induced neuron-glia culture. Neuron-glia culture were divided into eight groups: (1) normal; (2), (3) and (4) incubated with α -pinene (0.2; 0.4 and 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively, for 24 hours); (5) incubated with LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (6), (7) and (8) incubated with α -pinene (0.2; 0.4 and 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively, for 24 hours) and then induced with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, on 1 last hour of treatment period). The expression of iNOS in neuron-glia culture was detected by immunocytochemistry using anti-iNOS rabbit polyclonal IgG and goat anti-rabbit IgG Biotin Conjugated. The result shown that iNOS were expressed on normal group. Lipopolysaccharide 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induction causing iNOS expression increased approximately three times higher than normal (from 9.7 % became 28.7 %). Inducible NOS expression on non LPS-induced neuron-glia culture did not affected by α -pinene. Whereas α -pinene 0.2 and 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ could suppress iNOS expression on LPS-induced condition. α -pinene 0.2; 0.4 and 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ could help neuroglial cells survived on LPS-induced condition, but normal neuron-glia culture's density was decreased when incubated with α -pinene 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Key words: alpha-pinene, cell culture, glial, iNOS, LPS, neuron

Latar Belakang

Penyakit-penyakit neurodegeneratif, beberapa diantaranya adalah Alzheimer, Parkinson, stroke dan sklerosis, terjadi akibat adanya inflamasi pada jaringan saraf (neuroinflamasi). Neuroinflamasi terjadi apabila terdapat induksi senyawa-senyawa proinflamatori seperti lipopolisakarida (LPS atau endotoksin) dan sitokin (McGeer dkk, 2005). Lipopolisakarida menginduksi mikroglia untuk memproduksi nitric oxide (NO) (Liu dkk, 2002) dan laju pembentukan NO berkorelasi dengan tingkat neurodegenerasi yang terjadi (Jeohn dkk, 2000). Pembentukan NO dikatalis oleh nitric oxide synthase (NOS) dari L-arginin yang bereaksi dengan oksigen. (Bredt, 1999 dalam Liudkk, 2002). Enzim NOS memiliki 3 isoform, yaitu brain NOS (bNOS) atau neuronal NOS (nNOS atau NOS1), inducible calciumindependent NOS (iNOS atau NOS2) dan endothelial NOS (eNOS atau NOS3).

Neuronal NOS dan eNOS disebut sebagai constitutive NOS (cNOS) bertanggung jawab terhadap pelepasan NO dan membutuhkan kalsium-calmodulin secara terus-menerus untuk aktivasinya (Griffith dan Stuehr, 1995; Snyder, 1995). Inducible NOS hanya diekspresikan sebagai

bentuk respon terhadap adanya sitokin inflamatori dan lipopolisakarida (Nussler dan Billiar, 1993; Morris dan Billiar, 1994). Inducible NOS lebih banyak menghasilkan NO dibandingkan dengan cNOS (TIDbase, 2006), yaitu 100 sampai 1000 kali dari jumlah normal (Burke, 2003). Selama ini, non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) dipakai sebagai senyawa anti-inflamasi untuk mengobati neuroinflamasi. Namun, NSAIDs hanya dapat mengurangi gejala penyakit tetapi tidak dapat mengeliminasi inflamasi (Ford-Hutchinson dkk, 1981). Selain itu, akumulasi NSAIDs pada otak justru akan menurunkan aktivitas kerja otak (Gasparini dkk, 2004). Berkenaan dengan hal tersebut, maka perlu dicari senyawa antiinflamasi yang alami, aman dan mampu bekerja efektif. α -pinen merupakan senyawa anti-inflamasi yang diisolasi dari beberapa tanaman diantaranya pinus (*Pinus mercusii*), *Pistacia vera* dan *Eugenia jambolana* (Singh dkk, 2006; Orhan dkk, 2006; Sagrawat dkk, 2006).

Menurut Masruri dan Srihardyastuti (2005), α -pinen memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan hal tersebut, maka α -pinen diharapkan dapat dipakai untuk mencegah terjadinya inflamasi

akibat invasi bakteri pada sel atau jaringan saraf. Menurut Khotimah dkk, (2006), pemberian a-pinen 0,8 mikrogram/mL pada kultur sel neuron-glia yang dipapar LPS 1 mikrogram/mL menunjukkan adanya penurunan secara signifikan jumlah sel neuron-glia yang mengalami apoptosis (sebesar 26 %) dibandingkan dengan kultur sel neuron-glia yang hanya dipapar LPS 1 mikrogram/mL. Pada penelitian ini, keberhasilan a-pinen sebagai senyawa antiinflamasi diamati melalui penurunan ekspresi iNOS pada kultur sel neuron-glia yang dipapar LPS. Hal tersebut didasarkan pada asumsi bahwa apabila ekspresi iNOS menurun maka jumlah NO yang diproduksi juga menurun sehingga tidak akan menyebabkan terjadinya inflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek a-pinen terhadap jumlah sel yang mengekspresikan iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) pada kultur sel neuron-glia yang dipapar LPS.

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Mei 2007 sampai Maret 2008 di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat

Laminary Air Flow (ESCO), bunsen, sentrifus (MSE Mistral 1000), spuit 1, 3 dan 10 mL (Terumo), gunting, pinset, screwcap (botol ulir 100 mL) (Schott Duran), tabung sentrifus (Falcon), yellow tip 200 μ L (Treff Lab), blue tip 1000 μ L (Treff Lab), inkubator CO₂ (Binder), inkubator kering (Heraeus), cover slip 24x24 mm (Deckglaser dan Assistent), object glass (Sail brand), tabung eppendorf, mikroskop inverted (Olympus), mikropipet 1000 μ L (Pipetman), mikropipet 10 μ L (Eppendorf), microfilter berdiameter 0,20 μ m (Corning dan Sartorius), cawan Petri, 24 well-plate culture (Costar), refrigerator (Electrolux), neraca digital (Ohaus), autoclave (TOMY), pH meter (Jenway), handtally counter (Joy Art), kamera digital (Nikon) dan mikroskop bright field (Nikon).

Bahan

Otak janin tikus umur 16-17 hari kebuntingan, PBSA (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Calcium Chloride and Magnesium) (MP Biomedicals), DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) (MP Biomedicals), Newborn Calf Serum (NCS) (SIGMA), Penisilin, Streptomisin, Ampicilin B, Glutamine, Natrium bikarbonat, Newborn Calf Serum,

gelatin (SIGMA), Sterile Water for Irrigation (PT. Otsuka Indonesia), Lipopolisakarida (LOT No. 7380 H dari *Escherichia coli* cat. 199334) (MP Biomedical), alkohol 95 % (OneMed), a-pinen dari Pinus mercusii yang diekstrak oleh Masruri dan Srihardyastuti (2005) dengan metode GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy), PBS pH 7.4, methanol absolut (MERCK), 3 % hidrogen peroksida (MERCK), 0,25 % Triton X-100 (SIGMA), anti-iNOS rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology), goat anti-rabbit IgG Biotin Conjugated (Santa Cruz Biotechnology), Strep-Avidin Horseradish Peroxidase (SA15 HRP) (DakoCytomation), 3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Amresco), Mayer's Hematoxylin (LabVision) dan entellan (MERCK).

Isolasi dan Kultur Sel Neuron-Glia

Metode isolasi dan kultur sel neuron-glia yang dilakukan pada penelitian ini sesuai dengan metode Jeohn dkk. (2002) yang sudah dimodifikasi oleh Khotimah dkk. (2006). Tikus betina yang sedang bunting 16-17 hari dibunuh dengan cara dislokasi leher, kemudian bagian ventralnya dibedah. Uterus dikeluarkan dan dipotong, kemudian direndam dalam PBSA steril. Fetus dikeluarkan dari dalam uterus dan kepalanya dibuka dengan gunting, kemudian keseluruhan otaknya diambil dan direndam dalam PBSA steril. Otak tikus dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan diberi 500 μ L PBSA, kemudian didispersikan menggunakan blue tip (yang telah diberi kapas pada pangkalnya). Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm, suhu ruang selama 3 menit. Pelet yang diperoleh diresuspensi kembali dengan PBSA yang mengandung antibiotik, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm, suhu ruang selama 3 menit. Selanjutnya pelet yang diperoleh diresuspensi dengan medium kultur lengkap (DMEM, antibiotik, glutamin, natrium bikarbonat dan 20 % Newborn Calf Serum (NCS)), kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm, suhu ruang selama 3 menit. Pelet yang diperoleh diresuspensi kembali dengan medium kultur lengkap. Suspensi ditumbuhkan pada 12 well-plate culture yang telah diberi cover slip berlapis gelatin, kemudian diamati menggunakan mikroskop inverted. Plate diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5 % selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati dengan mikroskop inverted. Selanjutnya medium diganti dengan medium kultur lengkap yang baru, kemudian plate

diinkubasi kembali sampai kultur sel ± 75 % confluent (± 14 hari) dan dilakukan pengamatan setiap hari, serta dilakukan penggantian medium setiap 2 hari.

Paparan – Pinen dan LPS pada Kultur Sel Neuron-Glia

Kultur sel neuron-glia yang telah confluent dicuci dengan serum free media, kemudian diberi medium kultur baru. Selanjutnya sel neuron-glia dibagi secara acak menjadi 8 kelompok dan diberi perlakuan sesuai kelompoknya, yaitu (1) kontrol; (2), (3) dan (4) diinkubasi dengan α -pinen (0,2; 0,4 dan 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, selama 24 jam); (5) LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (selama 1 jam terakhir, yaitu pada jam ke-23 sampai jam ke-24); (6), (7) dan (8) diinkubasi dengan α -pinen (0,2; 0,4 dan 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, selama 24 jam) kemudian dipapar dengan LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, selama 1 jam terakhir). Setelah itu kultur sel neuron-glia difiksasi dengan methanol absolut, dilanjutkan dengan imunositokimia untuk mengamati ekspresi iNOS.

Imunositokimia

Kultur sel neuron-glia dicuci dengan PBS pH 7.4 sebanyak 2 kali selama 5 menit, kemudian difiksasi dengan methanol absolut selama 3 menit, lalu disimpan dalam refrigerator selama semalam. Selanjutnya direndam PBS pH 7.4 selama 5 menit, kemudian direndam 3% hidrogen peroksida selama 10 menit. Dicuci dengan PBS pH 7.4 sebanyak 3 kali selama 5 menit, kemudian diblocking dengan 5 % serum yang mengandung 0,25 % Triton X-100 dalam PBS selama 1 jam pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS pH 7.4. Selanjutnya antibodi primer (anti-iNOS rabbit polyclonal IgG) (1:200) diteteskan ke plate (tetapi untuk kontrol negatif direndam dalam serum 1 %) kemudian diinkubasi selama semalam dalam refrigerator. Dicuci dengan PBS pH 7.4 sebanyak 3 kali selama 5 menit, kemudian ditetesi antibodi sekunder (goat antirabbit IgG Biotin Conjugated) (1:400) dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7.4 sebanyak 3 kali selama 5 menit. Ditambah Strep-Avidin Horseradish Peroxidase (SA-HRP) (1:500) selama 40 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7.4 sebanyak 3 kali selama 5 menit. Ditambah chromogen, berupa DAB (3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) selama 40 menit pada suhu ruang. Dicuci PBS pH 7.4 sebanyak 3 kali selama 5 menit. Dilakukan counterstain dengan Mayer's Hematoxylin selama 5 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan air kran sampai bersih dari sisa Mayer's

Hematoxylin. Cover slip diambil dari well-culture, dikeringkan, dilakukan mounting menggunakan entellan dan ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan dan penghitungan jumlah sel yang mengekspresikan iNOS dilakukan dengan mikroskop bright field perbesaran 200X.

Analisis Data

Data diperoleh dari penghitungan jumlah sel neuron-glia yang mengekspresikan iNOS setelah imunositokimia, yang ditandai dengan sitosol sel neuron-glia berwarna coklat tua. Penghitungan dilakukan per 100 sel neuron-glia dengan 3 ulangan, kemudian hasil reratanya dikonversi ke dalam bentuk persentase dan selanjutnya dianalisis secara statistik dengan One-way Analysis of Variance (ANOVA) dan uji lanjutan Duncan.

Hasil Dan Pembahasan Kultur Sel Neuron-Glia

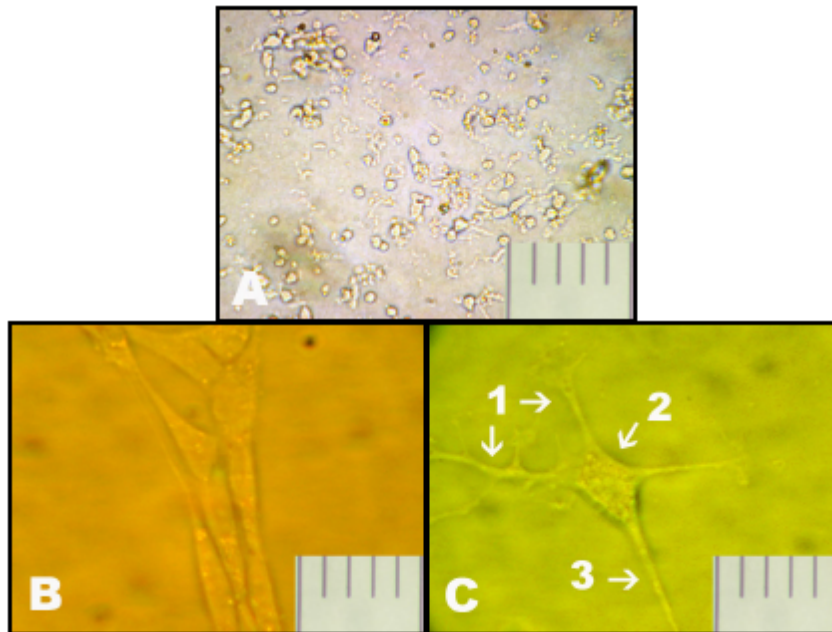
Kultur sel neuron-glia diperoleh dari otak janin tikus (*Rattus norvegicus*) yang ditumbuhkan sampai ± 75 % confluent (± 14 hari). Penggunaan otak janin sebagai sumber sampel kultur karena sel neuron pada otak janin masih bersifat totipoten sehingga kemampuan proliferasinya masih tinggi dibandingkan dengan sel neuron yang berasal dari jaringan otak dewasa (Kahle dan Frotscher, 2003). Dengan demikian sel neuron dari janin berpotensi tumbuh bila dikulturkan. Menurut Khotimah dkk. (2006), proporsi sel yang dominan tumbuh pada kultur sel-sel otak adalah sel neuron dan glia. Sel neuron bisa dideteksi menggunakan anti-MAP 2 (Microtubule-associated protein) (Soltani dkk, 2005), sedangkan sel glia dideteksi menggunakan anti-Mac-1 (Abbas dan Andrew, 2003). Kultur sel neuron-glia yang diperoleh pada penelitian ini ditampilkan pada Gambar 1.

Gambar 1.A merupakan kondisi yang terlihat tepat setelah suspensi otak tikus ditumbuhkan pada medium kultur lengkap. Pada gambar tersebut dapat dilihat agregat-agregat hasil dispersi otak tikus yang masih melayang dalam medium (belum menempel atau attach pada cover slip). Sel yang masih melayang sampai hari ke-2 dibuang melalui proses washing karena sel neuron-glia yang berpotensi untuk terus berkembang akan menempel sejak hari ke-1. Gambar 1.B memperlihatkan pertumbuhan kultur sel neuron-glia pada hari kedua yang menunjukkan beberapa sel yang saling berkomunikasi, tetapi belum dapat diketahui bagian-bagian selnya. Pada penelitian ini dokumentasi struktur sel neuron yang sudah

terdiferensiasi menjadi dendrit, cell body dan akson diperoleh pada inkubasi sampai hari keempat (Gambar .C). Berdasarkan hasil ini dapat diketahui bahwa semakin lama masa inkubasi maka komunikasi antar sel akan semakin baik karena masing-masing sel telah berdiferensiasi. Komunikasi antar sel sangat berpengaruh terhadap berlangsungnya transduksi sinyal dalam sel sebagai respon adanya perubahan pada lingkungan, yang dalam penelitian ini berupa paparan LPS, a-pinen maupun kombinasi keduanya.

bloodbrain barrier (BBB) dan mencapai target pada otak (Pardridge, 1998 dalam Pardridge 2002). Berat molekul a-pinen 136.23 g/mol atau sekitar 136 Dalton (Pherobase, 2007). Dengan demikian, a-pinen berpotensi sebagai substansi yang dapat diaplikasikan untuk inflamasi yang terjadi di otak.

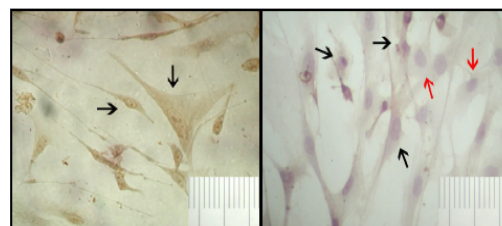
Jumlah sel yang mengekspresikan iNOS dihitung dari preparat hasil imunositokimia yang diamati per 100 sel neuron-glia dengan 3 kali ulangan kemudian



Gambar 1. Kultur sel neuron-glia. A. Kondisi sel pada hari ke-0. B. Pertumbuhan sel pada hari kedua. C. Struktur sel neuron pada hari keempat (1) Dendrit; (2) Cell body atau soma; (3) Akson. 1 skala = 0.01 mm

Ekspresi iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase)

Ekspresi iNOS pada penelitian ini tervisualisasi berwarna coklat pada sitoplasma sel (Gambar 2). Inducible NOS akan terekspresi apabila sel neuron-glia diinduksi untuk mengalami inflamasi menggunakan senyawa penginduksi inflamasi, yang dalam penelitian ini berupa LPS. Pemberian a-pinen pada penelitian ini dilakukan sebelum pemaparan LPS karena ingin mengetahui kemampuan a-pinen dalam mencegah terjadinya inflamasi melalui jalur iNOS sehingga nantinya diharapkan dapat diaplikasikan untuk mencegah terjadinya neurodegenerasi pada otak. a-pinen merupakan senyawa non polar dan memiliki afinitas yang tinggi dengan lipid pada membran sel (Abraham dkk, 2003). Karakteristik senyawa yang akan diaplikasikan terhadap otak biasanya memiliki ukuran molekul yang kecil (di bawah 400-500 Dalton), lipofilik dan non polar. Persyaratan tersebut harus dipenuhi supaya senyawa tersebut dapat menembus



Gambar 2. Hasil imunositokimia menggunakan anti-iNOS pada kultur sel neuronglia. Keterangan: Tanda panah hitam menunjukkan ekspresi iNOS. Tanda panah merah menunjukkan sel yang tidak mengekspresikan iNOS. 1 skala = 0.01 mm

dikonversi ke bentuk persentase. Rerata jumlah sel (%) yang mengekspresikan iNOS pada tiap perlakuan ditampilkan pada Gambar 3.

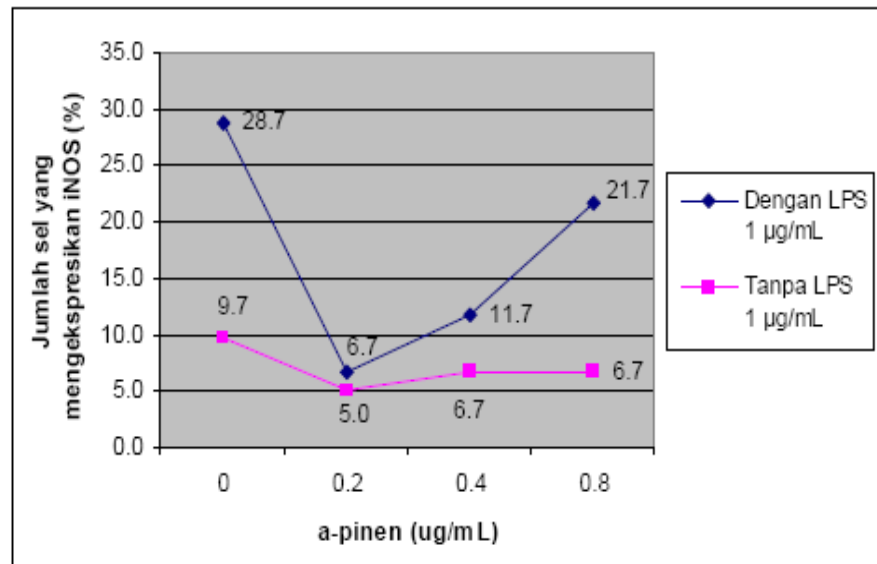
Hasil one-way ANOVA dengan uji lanjutan Duncan (Tabel 1) menunjukkan bahwa antar perlakuan tanpa LPS tidak berbeda nyata satu sama lain, begitu pula dengan perlakuan a-pinen 0,2 dan 0,4 mikrogram/ml yang dipapar LPS. Sedangkan untuk a-pinen 0,8 mikrogram/ml dengan

paparan LPS dinyatakan tidak berbeda nyata dengan perlakuan LPS saja

Berdasarkan hasil penghitungan (Gambar 3) diketahui bahwa paparan LPS meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan iNOS dibandingkan dengan kontrol (tanpa LPS), yaitu dari 9,7 % menjadi sebesar 28,7 %. Dari hasil tersebut tampak bahwa dalam kondisi tanpa LPS, sel neuron-glia juga dapat mengekspresikan iNOS. Hal ini dimungkinkan karena pada kondisi fisiologis, iNOS akan terekspresi bila ada stres oksidatif seluler yang diinduksi oleh lingkungan. Penelitian yang dilakukan oleh Khotimah dkk (2008) juga memperlihatkan terekspresinya iNOS pada kelompok kontrol kultur sel neuron-glia. Inducible NOS diproduksi oleh sel ketika terpapar sitokin dan LPS (Cavicchi dan Whittle, 1999) untuk mengatasi injury dan menghentikan infeksi yang terjadi (Burke, 2003). Pada perlakuan tanpa LPS, a-pinen tidak menginduksi sel untuk memproduksi iNOS. Pemberian a-pinen 0,2 dan 0,4 mikrogram/ml pada kelompok yang diberipaparan LPS dapat dikatakan mampu menurunkan produksi iNOS (menjadi 6,7 % dan 11,7 %) apabila dibandingkan dengan pemberian LPS saja (28,7 %). Hasil ini menunjukkan bahwa a-pinen 0,2 dan 0,4 mikrogram/ml mampu mengondisikan kultur sel yang dipapar LPS mendekati kondisi tanpa paparan LPS.

iNOS seharusnya diiringi dengan semakin meningkatnya kadar NO yang diekskresikan. Akan tetapi, menurut Listiani (belum dipublikasikan), paparan a-pinen justru menurunkan kadar NO pada medium kultur. Adanya perbedaan fenomena tersebut diduga karena tidak semua iNOS memproduksi NO. Hal ini dimungkinkan karena a-pinen menghambat aktivitas iNOS.

Menurut Khotimah dkk (2008) aktivitas iNOS dapat dihambat oleh L-NAME sehingga menurunkan produksi NO meskipun jumlah sel yang mengekspresikan iNOS sama dengan perlakuan LPS tanpa L-NAME. Jalur aktivasi gen iNOS oleh LPS bisa melalui jalur aktivasi p38- MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Gambar 4) atau jalur aktivasi NFIB (nuclear factor kappa B) (Gambar 5). Gambar 4 memperlihatkan adanya kompleks molekul pada permukaan luar membran sel yang terdiri dari LPS, LBP (LPS Binding Protein), CD14 (Cluster of Differentiation 14) dan TLR-4 (Toll-like receptor 4). Cluster of Differentiation 14 dan LBP merupakan mediator yang sangat berperan dalam aktivasi jalur inflamasi pada sel. Cluster of Differentiation 14 bukanlah molekul protein transmembran sehingga diperlukan molekul transmembran untuk menyampaikan stimulasi kepada sel akan adanya kompleks molekul yang terdiri dari LPS, LBP dan CD14 yang terikat pada membran.



Gambar 3. Jumlah sel neuron-glia yang mengekspresikan iNOS (%).

Pemberian a-pinen 0,8 mikrogram/ml dengan LPS semakin meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan iNOS, (dibandingkan dengan kombinasi a-pinen 0,2 dan 0,4 mikrogram/ml dan LPS) yaitu menjadi sebesar 21,7 % dan dinyatakan tidak berbeda nyata dengan perlakuan LPS saja. Semakin banyak sel yang mengekspresikan

Toll-like receptor 4 diketahui berfungsi sebagai komponen transmembran pada kompleks reseptor LPS dan sebagai transduser sinyal LPS (Nau dan Eiffert, 2002). Selanjutnya sinyal tersebut dibawa masuk ke dalam sel dan melalui kaskade kinase. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), khususnya stress-activated

protein kinases c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) dan p38-MAPK berhubungan dengan kaskade sinyal yang meregulasi kemampuan bertahan hidup (survival) sel, apoptosis dan produksi sitokin inflamatori (Koistinaho dan Koistinaho, 2005). Apabila aktivasi p38-MAPK dapat dihambat, maka transkripsi NFIB di dalam inti sel juga dapat dihambat sehingga tidak terjadi transkripsi gen iNOS. Hal ini berkaitan dengan peran NFIB sebagai faktor transkripsi bagi iNOS dan senyawa-senyawa proinflamatori.

sesudah sintesis iNOS (melalui penghambatan aktivasi iNOS).

Pengaruh a-pinen dan LPS terhadap Kepadatan Sel Neuron- Glia

Selain mempengaruhi jumlah sel yang mengekspresikan iNOS pada kultur sel neuron-glia, a-pinen juga mempengaruhi kepadatan sel (Gambar 6). Perbedaan kepadatan sel neuron-glia yang tumbuh dapat dijadikan sebagai sumber informasi efek

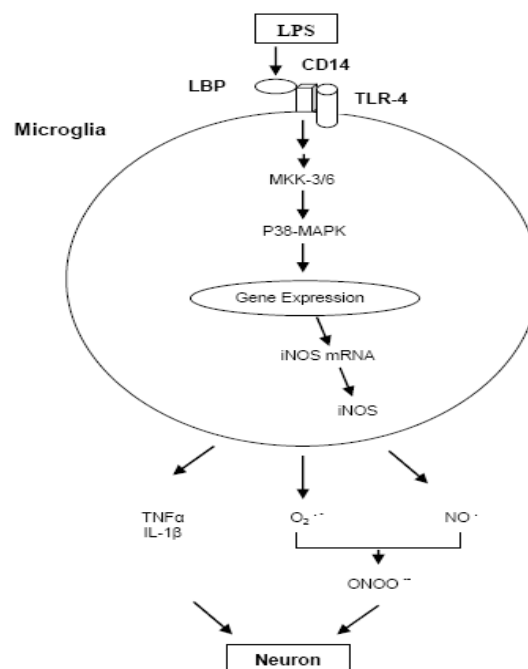
Tabel 1 Jumlah sel neuron-glia yang mengekspresikan iNOS (%)

α -pinen ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah Sel (%)	
	Tanpa LPS 1 $\mu\text{g/ml}$	Dengan LPS 1 $\mu\text{g/ml}$
0	9,67 \pm 9,07 ^{ab}	28,67 \pm 3,79 ^c
0,2	5,00 \pm 8,66 ^a	6,67 \pm 11,55 ^{ab}
0,4	6,67 \pm 7,64 ^{ab}	11,67 \pm 5,86 ^{ab}
0,8	6,67 \pm 4,62 ^{ab}	21,67 \pm 11,93 ^{bc}

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan berbeda nyata (α 0.05).

Hubungan antara NFIB dengan iNOS juga dapat terjadi karena adanya peranan ROS dalam aktivasi NFIB, yang akan diuraikan sebagai berikut (Gambar 5). Pada sel yang tidak terstimulasi, NFIB terdapat pada sitoplasma dalam keadaan tidak aktif, berikatan dengan protein peregulasi yang disebut inhibitor of IB (IIB), yaitu IIB/ dan IIBF. Molekul IIB/ berhubungan dengan keberlangsungan aktivasi NFIB, sedangkan IIBF terlibat dalam menjaga aktivasinya. Bentuk NFIB yang banyak diaktivasi adalah bentuk heterodimer p50 dan p65. Interaksi NFIB dengan IIB mengblokir kemampuan NFIB untuk berikatan dengan DNA menyebabkan kompleks tersebut banyak terdapat di sitoplasma. Adanya sitokin inflamatori atau reactive oxygen species (ROS) yang ada di dalam sitoplasma menyebabkan terjadinya fosforilasi sehingga ikatan antara IIB dengan NF-IB (nuclear factor kappa B) menjadi terputus, sehingga NF-IB menjadi bebas. Selanjutnya NF-IB bertranslokasi pada inti sel dan terikat pada IB enhancer dari gen target molekul inflamatori untuk menginduksi terjadinya transkripsi iNOS dan senyawa-senyawa proinflamatori lainnya misalnya sitokin, COX2 (cyclooxygenase 2) dan kemokin (Calbiochem, 2008; Leakey dkk, 2004).

Dua jalur aktivasi iNOS tersebut merupakan target utama dari senyawa anti-inflamasi. Dengan demikian, maka diduga jalur target penghambatan inflamasi oleh a-pinen terletak sebelum sintesis iNOS (melalui aktivasi p38-MAPK atau NFIB) dan



Gambar 4. Jalur produksi iNOS akibat adanya LPS; melalui jalur aktivasi p38-MAPK (Liu dkk, 2002).

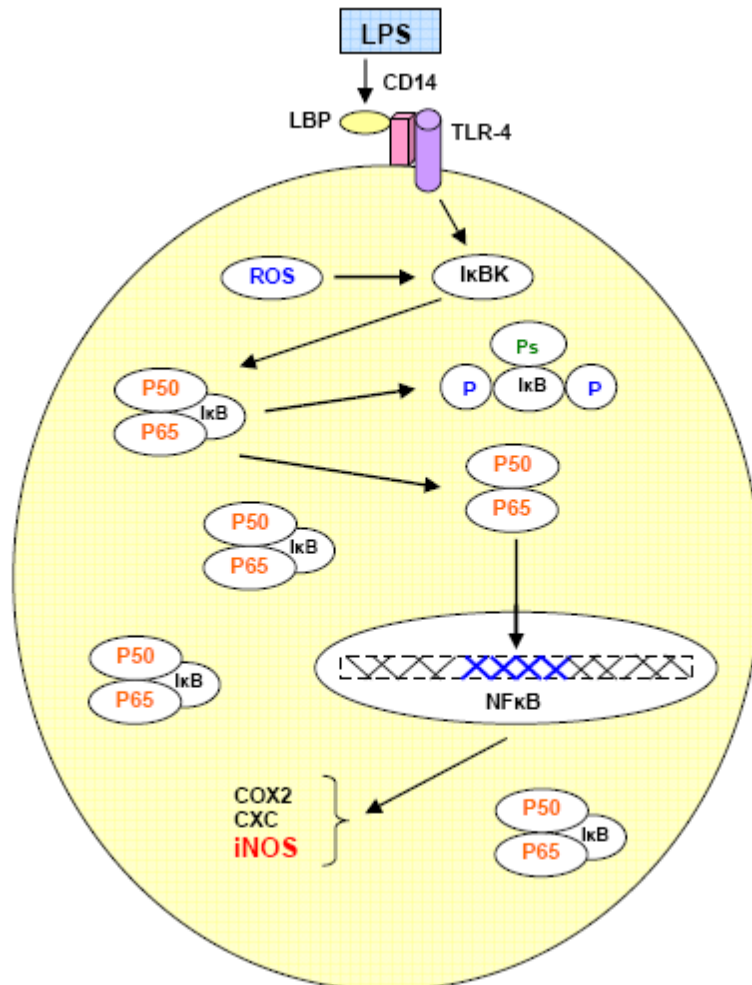
Keterangan: CD: Cluster of Differentiation; LBP: LPS Binding Protein; TLR: Toll-Like Receptor; MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase; MKK: MAP Kinase Kinase.

LPS, a-pinen dan kombinasi keduanya terhadap tingkat ketahanan hidup (survival) sel.

Melalui Gambar 6 diketahui bahwa terdapat kenaikan kepadatan sel pada pemberian a-

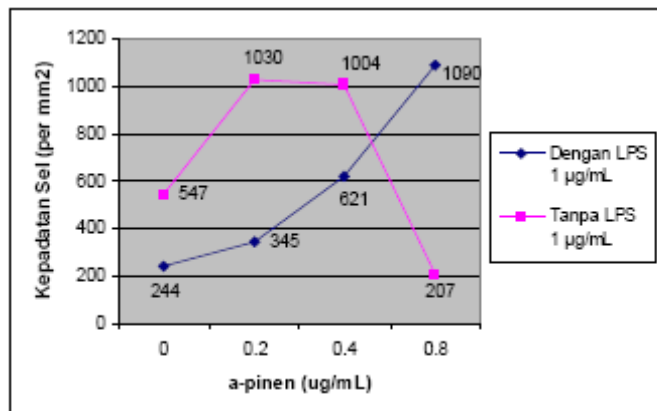
pinen 0,2 dan 0,4 mikrogram/ml dibandingkan kontrol, tetapi pemberian a-pinen 0,8 mikrogram/ml menunjukkan penurunan kepadatan sel. Pada perlakuan yang dipapar LPS terlihat adanya peningkatan kepadatan sel seiring dengan

peningkatan konsentrasi /- pinen yang diberikan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa secara umum a-pinen memiliki kemampuan untuk mempertahankan dan meningkatkan kemampuan hidup (survival)



Gambar 5 Jalur produksi iNOS akibat adanya LPS; melalui jalur aktivasi NFIB (Leakey dkk, 2004).

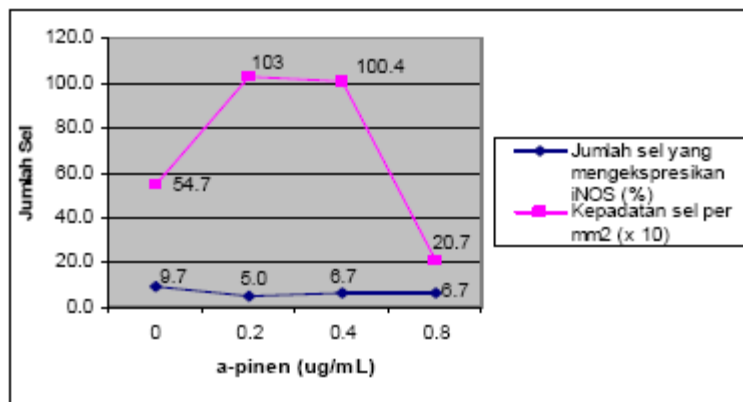
Keterangan: CD: Cluster of Differentiation; COX2: prostaglandin synthetase (cyclooxygenase) 2; CXC: chemokines; IEB: NFIB complex inhibitor protein; IEBK: IIB kinase; iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase; LBP: LPS Binding Protein; LPS: lipopolysaccharide; NFEB: nuclear factor kappa B (kompleks yang aktif tersusun dari dimer protein P50 dan P65); Ps: kompleks proteasome yang mendegradasi IIB yang terfosforilasi; ROS: reactive oxygen species; TLR: Toll- Like Receptor



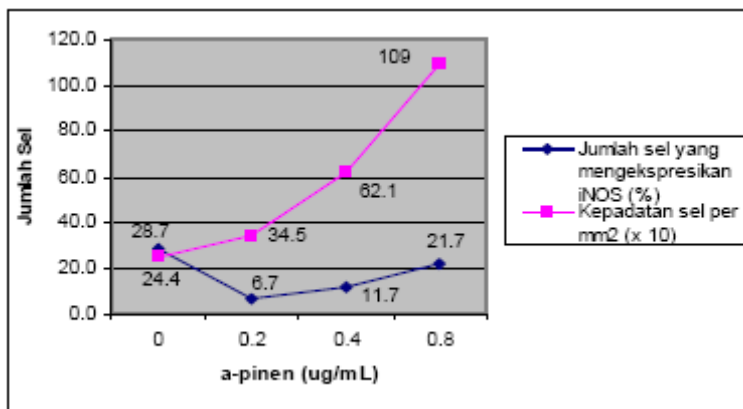
Gambar 6 Kepadatan sel neuron-glia (per mm²)

sel neuron-glia yang terpapar LPS. Hal ini diperkuat dengan hasil yang diperoleh Khotimah dkk. (2006) yang menunjukkan pemberian a-pinen 0,8 mikrogram/mL dapat menurunkan jumlah sel neuron-glia yang mengalami apoptosis (sebesar 26 %) ketika dipapar LPS 1 mikrogram/mL. Gambar 7 dan 8 menggambarkan hubungan antara kepadatan sel dengan jumlah sel yang mengekspresikan iNOS serta konsentrasi a-pinen yang diberikan. Kedua gambar berikut ini dibuat untuk mengetahui ada tidaknya kaitan atau kecenderungan hubungan antara jumlah sel yang mengekspresikan iNOS dengan kepadatan sel pada berbagai perlakuan.

oleh kadar a-pinen. Gambar 4.8 memberikan informasi bahwa pemberian a-pinen 0,2 dan 0,4 mikrogram/mL pada kultur sel neuroglia yang terpapar LPS 1 mikrogram/mL dapat meningkatkan kepadatan sel tetapi menurunkan jumlah sel yang mengekspresikan iNOS dibandingkan perlakuan LPS 1 mikrogram/mL. Akan tetapi, kepadatan sel meningkat disertai dengan peningkatan jumlah sel yang mengekspresikan iNOS pada perlakuan a-pinen 0,8 mikrogram/mL dengan LPS. Berdasarkan hasil penelitian ini a-pinen 0,8 mikrogram/mL tidak dapat diaplikasikan pada kondisi normal dan membutuhkan pengawasan dalam pengaplikasiannya,



Gambar 7. Hubungan antara jumlah sel yang mengekspresikan iNOS dengan kepadatan sel dan konsentrasi a-pinen pada perlakuan tanpa LPS.



Gambar 8. Hubungan antara jumlah sel yang mengekspresikan iNOS dengan kepadatan sel dan konsentrasi a-pinen pada perlakuan dengan LPS.

Gambar 7 menunjukkan hubungan pada perlakuan tanpa LPS, sedangkan untuk perlakuan dengan LPS dapat dilihat pada Gambar 8.

Berdasarkan Gambar 4.7 dapat dikatakan bahwa jumlah sel yang mengekspresikan iNOS tidak banyak berubah, tetapi kepadatan sel mengalami penurunan yang drastis pada kelompok yang diberi a-pinen 0,8 mikrogram/mL. Hasil ini menunjukkan bahwa kepadatan sel tidak dipengaruhi oleh jumlah sel yang mengekspresikan iNOS tetapi dipengaruhi

mengingat kemampuannya yang dapat menyebabkan terjadinya penurunan kepadatan sel neuron-glia. Mekanisme kerja a-pinen diduga terjadi pada dua titik, yaitu menginduksi aktivasi gen pengkode iNOS dan menghambat enzim iNOS secara langsung untuk memproduksi NO.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Pada kontrol (tanpa LPS), sel neuron-glia mengekspresikan iNOS. Paparan LPS 1

mikrogram/mL meningkatkan jumlah neuronglia yang mengekspresikan iNOS, yaitu dari 9,7 % menjadi 28,7 % (sekitar 3 kali lebih banyak).

2. Pemberian a-pinen pada sel neuron-glia yang tidak dipapar LPS tidak mempengaruhi jumlah sel yang mengekspresikan iNOS, sedangkan pemberian a-pinen 0,2 dan 0,4 mikrogram/mL pada neuron-glia yang dipapar LPS 1 mikrogram/mL dapat menurunkan jumlah sel yang mengekspresikan iNOS.

3. a-pinen dengan konsentrasi 0,2; 0,4 dan 0,8 mikrogram/mL dapat membantu survival sel neuron-glia yang terpapar LPS.

4. a-pinen konsentrasi 0,8 mikrogram/mL dapat menurunkan kepadatan sel neuron-glia normal (tidak terpapar LPS).

Saran

Pada penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan paparan LPS terlebih dahulu sebelum pemberian a-pinen, sehingga dapat dibandingkan dengan hasil yang diperoleh pada penelitian ini dan dapat dipastikan jalur kerja a-pinen adalah sebelum atau sesudah terjadinya inflamasi pada sel.

Daftar Pustaka

- Abbas, A. K dan A. H. Lichtman. 2005. Cellular and Molecular Immunology. Eighth Ed., Elseiver Saunders. Philadelphia.
- Abraham, D., A.C. Francischini., E.M. Pergo., A.M. Kelmer-Bracht dan E.L. Ishii-Iwamoto. 2003. Effect of a-pinene on the Mitochondrial Respiration of Maize Seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41:985-991.
- Akerud, P., J.M. Canals., E.Y. Snyder dan E. Arenas. 2001. Neuroprotection through Delivery of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor by Neural Stem Cells in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci*. 21(20):8108-8118.
- Akutsu, H., T. Kikusui., Y. Takeuchi., K. Sano., A. Hatanaka dan Y. Mori. 2002. Alleviating effects on plant-derived fragrances on stress-induced hyperthermia in rats. *Physiology and Behavior*. 75:355-360.
- Berglund, C. M. D. 2005. Cell Interactions in the CNS and their Consequences for Neuronal Apoptosis. Thesis. Karolina Institutet. Stockholm.
- Block, M. L. dan J.-S. Hong. 2005. Microglia and inflammation mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *J. Neurobio*. 76:77-98.
- Burke, T. 2003. Nitric Oxide and Its Role in Health and Diabetes. <http://diabetesincontrol.com>. Tanggal akses 8 Februari 2007.
- Calbiochem. 2008. Inhibitor SourceBook. Second Ed. Merck Biosciences. Darmstadt. Germany
- Chartrain, N.A., D.A. Geller., P.P. Koty., N.F. Sitrin., A.K. Nussler., E.P. Hoffman., T.R. Billiar., N.I. Hutchinson dan J.S. Mudgett. 1994. *Molecular Cloning, Structure*
- Abbas, A. K dan A. H. Lichtman. 2005. Cellular and Molecular Immunology. Eighth d., Elseiver Saunders. Philadelphia.
- Abraham, D., A.C. Francischini., E.M. Pergo., A.M. Kelmer-Bracht dan E.L. Ishii-Iwamoto. 2003. Effect of a-pinene on the Mitochondrial Respiration of Maize Seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41:985-991.
- Akerud, P., J.M. Canals., E.Y. Snyder dan E. Arenas. 2001. Neuroprotection through Delivery of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor by Neural Stem Cells in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci*. 21(20):8108-8118.
- Akutsu, H., T. Kikusui., Y. Takeuchi., K. Sano., A. Hatanaka dan Y. Mori. 2002. Alleviating effects on plant-derived fragrances on stress-induced hyperthermia in rats. *Physiology and Behavior*. 75:355-360.
- Berglund, C. M. D. 2005. Cell Interactions in the CNS and their Consequences for Neuronal Apoptosis. Thesis. Karolina Institutet. Stockholm.
- Block, M. L. dan J.-S. Hong. 2005. Microglia and inflammation mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *J. Neurobio*. 76:77-98.
- Burke, T. 2003. Nitric Oxide and Its Role in Health and Diabetes. <http://diabetesincontrol.com>. Tanggal akses 8 Februari 2007.
- Calbiochem. 2008. Inhibitor SourceBook. Second Ed. Merck Biosciences. Darmstadt. Germany
- Flamini, G., P. L. Cioni., I. Morelli., S. Celik., R. S. Gokturk dan O. Unal. 2005. Essential oil of *Stachys aleurites* from Turkey. *Biochemical Systematic and Ecology*. 33:61-66.
- Ford-Hutchinson, A. W., M. A. Bray., F. M. Cunningham., E.M. Davidson dan M.

- J. H. Smith. 1981. Isomers of leukotriene B possess different biological potencies. *Prostaglandins*.21:143-151.
- Fraser, N. 1998. The Biological Neuron. <http://www.virtualventures.ca/neural/neuron.html>. Tanggal akses 7 Februari 2007.
- Fu-Berlin. 2006. Alpha - Pinene. <http://www.chemie.fu-berlin.de>. Tanggal akses 7 Februari 2007.
- Furukawa, T., H. Kohno., R. Tokunaga dan S. Taketani. 1995. Nitric oxide-mediated inactivation of mammalian ferrochelatase in vivo and in vitro: possible involvement of the iron-sulphur cluster of the enzyme. *Biochem. J.* 310:533-538.
- Gasparini, L., E. Ongini dan G. Wenk. 2004. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action. *J. Neurochem.* 91:521-536.
- Griffith, O. W. dan D. J. Stuehr. 1995. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 57:707-736.
- Harrison, K. 1998. Alpha-pinen. <http://www.3dchem.com>. Tanggal akses 7 Februari 2007.
- James, S. L. 1995. Role of Nitric Oxide in Parasitic Infection. *Microbiological Reviews.* 59:533-547.
- Jeohn, G-H., B. Liu., H-M Gao., J-Y Wang., C. L. Cooper dan J-S Hong. 2002. Role of Nitric Oxide in Inflammation-Mediated Neurodegeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 962:318-331.
- Kandel, E.R., J.H. Schwartz dan T.M. Jessell. 1995. *Essentials of Neural Science and Behaviour*. Appleton & Lange. Norwalk.
- Kahle, W. dan M. Frotscher. 2003. *Color Atlas of Human Anatomy*. Vol. 3. Nervous System and Sensory Organs. Thieme. New York. Halaman 18.
- Khotimah, H., D. Lyrawati dan Masruri. 2006. Antiinflammatory effects of Alpha-pinen Extracted from *Pinus mercusii* on Levels of TNF-Alpha Signaling, Morphological Dynamic and Apoptosis of Neuronal Cells. *ASOMPS Proceeding*.
- Khotimah, H., D. Lyrawati., Masruri dan W. Riawan. 2008. Antiinflammatory Effect of Alpha-pinen Extracted from *Pinus mercusii* on Level of TNFa Signaling, iNOS and Apoptosis of Neuronal Cells. Poster Seminar Herbal dalam Rangka Dies Natalis Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Kim, W.-K., Y. Kan., D. Ganea., R. P. Hart., I. Gozes dan G. M. Jonakait. 2000. Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylyl Cyclase-Activating Polypeptide Inhibit Tumor Necrosis Factor- α Production in Injured Spinal Cord and in Activated Microglia via a cAMPDependent Pathway. *Neuroscience.* 20(10):3622-3630.
- Koistinaho, M. dan J. Koistinaho. 2005. Interaction Between Alzheimer's Disease and Cerebral Ischemia – Focus on Inflammation. *Brain Research Reviews.* 48:240-250.
- Kubes, P., M. Suzuki dan D.N. Granger. 1991. Nitric Oxide : An Endogenous Modulator of Leukocyte Adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:4651-4655.
- Leakey, J.E.A., J.E. Seng dan W.T. Allaben. 2004. Influence of Body Weight, Diet, and Stress on Aging, Survival and Pathological Endpoints in Rodents: Implications for Toxicity Testing and Risk Assessment. *Regulatory Research Perspectives*. Vol. 4. Issue 1.
- Lee, B. H., W. S. Choi., S. E. Lee dan B. S. Park. 2001. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds toward the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Crop Protection.* 20:317-320.
- Listiani, F.D. Belum dipublikasikan. Liu, B., H-M Gao., J-Y Wang., G-H Jeohn., C. L. Cooper dan J-S Hong. 2002. Role of Nitric Oxide in Inflammation-Mediated Neurodegeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 962:318-331.
- Masruri dan A. Srihardyastuti. 2005. Reaksi asiloksilasi-hidrolaksi terhadap alfa-pinena: pemanfaatan produk reaksinya sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Natural.* 9(1):6-11.
- McGeer, E.G., A. Klegeris dan P.L. McGeer. 2005. Inflammation, the complement system and the diseases of aging. *J. Neurobiolaging.* 26S:S94-S97.
- Mollace, V., C. Muscoli., E. Masini., S. Cuzzocrea dan D. Salvemini. 2005. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev.* 57:217-252.
- Morris, S.M. dan T.R. Billiar. 1994. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J.*

- Physiol. 266:E829–E839.
- Mourey, A. dan N. Canillac. 2002. Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. *Food Contamination*. 13:289-292.
- Nathan, A.K. dan Q.W. Xie. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269:13275–13278.
- Nussler, A. K. dan T. R. Billiar. 1993. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukocyte Biol.* 54:171–178.
- Orhan, I., E. Kupeli., M. Aslan., M. Kartal dan E. Yesilada. 2006. Bioassay-guided evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive. *J. Ethnopharm.* 105(1-2):235-240.
- Pardridge, W.M. 1998. CNS drug design based on principals of blood-brain barrier transport. *J. Neurochem.* 70:1781-1792.
- Pardridge, W.M. 2002. Blood-brain barrier drug targeting enables neuroprotection in brain ischemia following delayed intravenous administration of neurotrophins. *molecular and cellular biology of neuroprotection in the CNS*. Editor: C. Alzheimer. Plenum Publisher. New York. Halaman 397-401.
- Pherobase. 2007. Compound – Alpha-pinen. <http://www.pherobase.com>. Tanggal akses 7 Februari 2007.
- PTCL Safety. 2003. Safety Data for Alpha-pinen. <http://ptcl.chem.ox.ac.uk>. Tanggal akses 7 Februari 2007.
- Sadraei, H., G. R. Ashgari., V. Hajhashemi., A. Kolagar dan M. Ebrahimi. 2001. Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula gummosa* Boiss. on ileum contractions. *Phytomedicine*. 8:370-376.
- Sagrawat, H., A.S. Mann dan M.D. Kharya. 2006. Pharmacological Potential of *Eugenia jambolana* : A Review. *Pharmacognosy Magazine*. 2.(6):96-105.
- Savelev, S., E. Okello., N. S. L. Perry., R. M. Wilkins dan E. K. Perry. 2003. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacological and Biochemical Behavior*. 75:661-668.
- Singh, H. P., D. R. Batish., S. Kaur., K. Arora dan R. K. Kohli. 2006. α -pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. *Annals of Botany*. 98(6):1261-1269.
- Snyder, S.H. 1995. Nitric oxide: NO endothelial NO. *Nature*. 377:196–197.
- T1Dbase. 2006. iNOS. <http://t1dbase.org>. Tanggal akses 8 Februari 2007.
- Universe-review. 2007. Nervous System. <http://universe-review.ca>. Tanggal akses 12 Agustus 2007.
- UCSF. 2004. Central Nervous System. <http://www.ucsf.edu>. Tanggal akses 7 Mei 2008.
- Weninger, S. C. dan B. A. Yankner. 2001. Inflammation and Alzheimer Disease: The Good, The Bad and The Ugly. *Nature Medicine*. 7:527-528.
- Wong, D., S. Li dan S. Anderson. 2006. Alpha-pinen. http://umbbd.msi.umnedu/apn/apn_map.html. Tanggal akses 7 Februari 2007.