

Utilization Of Indole-3-Carbinol As Flavin Monooxygenase 3 (Fmo3) Inhibitor In Aterosklerotic Prevention

Bagus Indra Kusuma, Brenda Desy Romadhon, Silvi Ahmada Chasya,
Hazmi Dwinanda Nurqistan, Lusi Padma Sulistianingsih Mata

Cardiovascular disease is the leading cause of death in the world, reaching 30% of all mortality. The most common cause of cardiovascular disease is the formation of atherosclerotic plaque in blood vessels. Treatment has been done to overcome atherosclerosis only curative and still no preventive. Processes that play a role in the formation of atherosclerotic plaque is very complex and one of the causes deposition of plaques is the formation of the compound trimethylamine oxide (TMAO) in the body. TMAO that has produced can increase the accumulation of cholesterol in macrophages so that increasing the formation of foam cells in the arterial wall. These compounds are derived from trimethylamine (TMA), which is converted into TMAO by enzyme flavin monooxygenase (FMO). FMO enzyme that is able to make an impact in the formation of TMAO is flavin monooxygenase 1 (FMO1) and flavin monooxygenase 3 (FMO3). However, FMO3 showed activity ten times greater than FMO1 in turning TMA into TMAO. Indole-3-carbinol can be a role for this enzyme inhibitor so that the therapeutic use of indole-3-carbinol is expected to inhibit TMAO. Therefore, the authors propose the use of research in the form of indole-3-carbinol as an inhibitor of flavin monooxygenase 3 (FMO3) in atherosclerosis prevention efforts. The study design used was pure experimental research design (true experimental design) with post test only randomized control group design. Mice (*Mus musculus*) males were treated indole-3-carbinol and then is given atherogenic diet for the provision of intravenous adrenaline 0.00084 mg / 20 gBW and egg yolks 0.2 cc / day. The treatment group consisted of a positive control, negative control, treatment A (10 mg / kg BW of indole-3-carbinol), B (200 mg / kg BW I3C), and C (500 mg / kg BW I3C). The data observed in the form of cholesterol, foam cell histopathological picture of the aorta and the density of the band FMO3 activity. Blood cholesterol levels showed a decrease in accordance with increase in dose. Cholesterol control of negative group, positive, A, B and C respectively of 119.4 ± 28.94 mg / dL, 246 ± 8.52 mg / dL, 224 ± 15.30 mg / dL, 170.6 ± 12.54 mg / dL, and 154.8 ± 14.46 mg / dL ($p < 0.05$). Histopathologic features foam cell in the aorta of mice showed an improvement with the increase in dose. FMO3 enzyme activity also showed a decrease when compared to the positive control in the optical density relative scale along with rising doses of indole-3-carbinol given. This shows that the use of indole-3-carbinol is very effective in atherosclerosis prevention efforts.

Fakultas Kedokteran
Universitas Jember

(J Kardiol Indones. 2015;36:196-201)

Keyword: indole-3-carbinol, atherosclerosis, FMO3

Pemanfaatan *Indole-3-Carbinol* Sebagai Inhibitor *Flavin Monooxygenase 3 (FMO3)* Dalam Upaya Prevensi Aterosklerosis

Bagus Indra Kusuma, Brenda Desy Romadhon, Silvi Ahmada Chasya,
Hazmi Dwinanda Nurqistan, Lusi Padma Sulistianingsih Mata

Penyakit kardiovaskuler merupakan penyebab kematian tertinggi di dunia yakni mencapai 30% dari seluruh mortalitas. Penyebab tersering terjadinya penyakit kardiovaskuler ialah terbentuknya plak aterosklerosis pada pembuluh darah. Proses yang berperan dalam pembentukan plak aterosklerosis bersifat kompleks dan salah satu penyebabnya adalah akselerasi pengendapan plak akibat pembentukan senyawa trimethylamine oxide (TMAO) di dalam tubuh. Senyawa TMAO yang dihasilkan dapat meningkatkan akumulasi kolesterol di makrofag sehingga meningkatkan pembentukan foam cell pada dinding arteri. Senyawa ini berasal dari trimethylamine (TMA) yang diubah menjadi TMAO oleh enzim flavin monooxygenase (FMO). Enzim FMO yang mampu memberi pengaruh dalam pembentukan TMAO adalah flavin monooxygenase form 1 (FMO1) dan flavin monooxygenase form 3 (FMO3). Akan tetapi, FMO3 memperlihatkan aktivitas sepuluh kali lipat lebih besar daripada FMO1 dalam mengubah TMA menjadi TMAO. *Indole-3-carbinol* dapat berperan menjadi inhibitor bagi enzim ini sehingga terapi menggunakan *indole-3-carbinol* diharapkan dapat menghambat TMAO. Tujuan penelitian ini yakni untuk membuktikan *indole-3-carbinol* mampu menghambat FMO3, menurunkan kolesterol darah, dan mencegah pembentukan foam cell. Desain penelitian yang digunakan adalah desain penelitian eksperimental murni (true experimental design) dengan rancangan post test only randomized control group design. Mencit (*Mus musculus*) jantan diberi terapi *indole-3-carbinol* kemudian diberi diet aterogenik berupa pemberian adrenalin intravena 0,00084 mg/20 gBB dan kuning telur 0,2 cc/hari. Kelompok perlakuan terdiri atas kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan A (10 mg/kg BB *indole-3-carbinol*), B (200 mg/kgBB I3C), dan C (500 mg/kgBB I3C). Data yang diamati berupa kadar kolesterol, gambaran histopatologi foam cell pada aorta dan aktivitas FMO3 pada densitas band. Kadar kolesterol darah menunjukkan penurunan sesuai dengan kenaikan dosis. Kadar kolesterol kelompok kontrol negatif, positif, A, B dan C berturut-turut sebesar 119,4 ± 28,94 mg/dL, 246 ± 8,52 mg/dL, 224 ± 15,30 mg/dL, 170,6 ± 12,54 mg/dL, dan 154,8 ± 14,46 mg/dL. Gambaran histopatologi foam cell pada aorta mencit pun mengalami perbaikan seiring dengan kenaikan dosis. Hal ini menunjukkan bahwa pemanfaatan *indole-3-carbinol* sangat efektif dalam upaya prevensi aterosklerosis.

(J Kardiol Indones. 2015;36:196-201)

Kata kunci: *Indole-3-carbinol*, *Flavin Monooxygenase 3*, foam cell

Alamat Korespondensi

Dr. Bagus Indra Kusuma, Fakultas kedokteran universitas Jember
E-mail: bagusindra.kusuma@yahoo.com

Pendahuluan

Penyakit kardiovaskuler merupakan penyebab kematian tertinggi di dunia yakni mencapai 30% dari seluruh mortalitas. Delapan puluh persen dari seluruh kematian tersebut terjadi di negara dengan pendapatan menengah ke bawah seperti Indonesia.¹ Penyebab tersering terjadinya penyakit kardiovaskuler ialah terbentuknya plak aterosklerosis pada pembuluh darah seperti yang terjadi pada penyakit jantung koroner dan stroke. Oleh sebab itu, menyelesaikan masalah aterosklerosis merupakan modalitas utama dalam pengendalian penyakit kardiovaskuler.

Pengobatan yang selama ini dilakukan untuk mengatasi aterosklerosis hanya bersifat kuratif padahal patofisiologi pembentukan aterosklerosis berjalan secara progresif. Penggunaan obat golongan inhibitor *HMG CoA reduktase* seperti statin sebatas mengurangi kadar kolesterol. Selain itu, antitrombotik seperti aspirin dan clopidogrel juga hanya menghambat dan melisiskan bekuan darah yang ada setelah terjadinya ruptur plak aterosklerosis.² Kelemahan golongan obat tersebut ialah hanya diberikan setelah gejala muncul padahal jika plak yang terbentuk dapat dicegah pada penderita yang memiliki faktor resiko maka jutaan manusia dapat terhindar dari kecacatan yang ditimbulkan oleh berbagai penyakit kardiovaskuler.

Proses yang berperan dalam pembentukan plak aterosklerosis bersifat kompleks. Penelitian terbaru menyebutkan bahwa salah satu penyebab akselerasi pengendapan plak adalah pembentukan senyawa *trimethylamine oxide* (TMAO) di dalam tubuh.³ Senyawa TMAO yang dihasilkan dapat meningkatkan akumulasi kolesterol di makrofag sehingga meningkatkan pembentukan *foam cell* pada dinding arteri. Senyawa ini berasal dari *trimethylamine* (TMA) yang diubah menjadi TMAO oleh enzim *flavin monooxygenase* (FMO). TMA sendiri berasal dari asupan makanan yakni *phosphatidilcholine* dan *l-carnitin* yang disintesis menjadi *trimethylamine* (TMA) oleh bakteri usus.⁴ Manipulasi pada enzim yang berperan dalam oksidasi TMA menjadi TMAO di hepar, yaitu enzim FMO memiliki potensi besar untuk dilakukan. Oleh sebab itu, inhibisi pada enzim ini diharapkan dapat digunakan untuk mencegah aterosklerosis.

Enzim FMO pada mamalia terdiri atas FMO1 sampai FMO5. Namun, enzim yang mampu memberi pengaruh dalam pembentukan TMAO adalah

flavin monooxygenase form 1 (FMO1) dan *flavin monooxygenase form 3* (FMO3). FMO1 dan FMO3 merupakan isoform yang dominan berada di hepar daripada isoform lainnya. Namun, berdasarkan Bennett et al. (2013), FMO3 memperlihatkan aktivitas sepuluh kali lipat lebih besar daripada FMO1 dalam mengubah TMA menjadi TMAO.⁵ Berdasarkan penelitian tersebut overekspresi dari FMO3 secara signifikan meningkatkan kadar TMAO plasma.

Indole-3-carbinol merupakan senyawa yang berasal dari tanaman kubis-kubisan dan terbukti sebagai senyawa antikanker baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.⁶ Namun, pemanfaatan *indole-3-carbinol* berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut menjadi senyawa yang dapat mencegah aterosklerosis karena senyawa ini mampu menghambat aktivitas dan ekspresi enzim FMO3 yang ada di dalam hepar.

Indole-3-carbinol mampu bekerja sebagai inhibitor kompetitif FMO3 sehingga diharapkan produksi TMAO dapat berkurang.⁷ Hal ini akan menjadi nilai tambah terhadap tanaman kubis-kubisan di masa yang akan datang. Belum pernah ada penelitian maupun jurnal yang membahas pemanfaatan *indole-3-carbinol* sebagai inhibitor FMO3 dalam upaya pencegahan aterosklerosis.

Tujuan dari penelitian ini ialah untuk membuktikan *indole-3-carbinol* dapat menurunkan kadar kolesterol, dapat memperbaiki gambaran histopatologi *foam cell* pada aorta mencit (*Mus musculus*) dengan diet aterogenik dan dapat menghambat aktivitas FMO3 pada hepar mencit (*Mus musculus*).

Metode

Penelitian menggunakan desain eksperimental murni (*true experimental*) dengan rancangan *post test only randomized control group design* yang berlangsung mulai bulan Januari sampai dengan Juni 2015 di Universitas Jember. Penelitian ini merupakan penelitian *in vivo* dan *in vitro*.

a. Bahan

Indole-3-carbinol 17256-5G dipesan secara *online* di Sigma Aldrich, Singapore pada 20 Januari 2015.

b. Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan ialah 25 ekor mencit (*Mus musculus*) dengan kriteria inklusi berupa mencit jantan berumur 2-3 bulan dengan

berat 25-35 gram. Pembelian mencit dan pakan dilakukan pada 1 April 2015 kemudian diadaptasi selama dua minggu hingga mencit siap diinduksi. Variabel bebas berupa pemberian diet aterogenik dan dosis *indole-3-carbinol* sedangkan variabel terikat berupa kadar kolesterol darah, densitas pita *western blotting* dan gambaran histopatologi *foam cell* aorta mencit.

Hewan coba diadaptasikan selama 14 hari dan diberi pakan *ad libitum*. Peneliti mengelompokkan hewan coba menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol positif, kontrol negatif, A, B, dan C. Masing-masing kelompok berisi 5 mencit.

c. **Induksi Aterosklerosis**

Pemberian diet aterogenik dilakukan selama 14 hari. Diet aterogenik yang diberikan merupakan kuning telur yang disondekan sekali sehari sebanyak 0,2cc pada setiap kelompok mencit kecuali kelompok kontrol negatif. Pemberian diet aterogenik ini bertujuan untuk membuat mencit yang diinduksi mempunyai plak aterosklerosis pada aorta akibat adanya kerusakan endotel. Sebelum diberikan diet aterogenik mencit tersebut terlebih dahulu diinjeksi adrenalin intravena sebanyak 0,00084 mg/20g BB pada vena lateralis ekor mencit pada hari pertama perlakuan.

d. **Pemberian *Indole-3-carbinol***

Pemberian *Indole-3-carbinol* dilakukan selama 14 hari. *Indole-3-carbinol* diberikan sebelum mencit diinduksi diet aterogenik. Hal ini dilakukan agar peneliti dapat melihat upaya pencegahan dari *indole-3-carbinol* yang diberikan. *Indole-3-carbinol* diberikan kepada kelompok perlakuan A sebanyak 10mg/kg berat badan, B sebanyak 200mg/kg berat badan, dan C sebanyak 500mg/kg berat badan. Kelompok kontrol positif dan negatif tidak diberikan *indole-3-carbinol*. *Indole-3-carbinol* dilarutkan dalam aquades dan dihomogenisasi dengan mortar sebelum disondekan kepada mencit kelompok perlakuan A, B, dan C. Perlakuan mencit tersebut dapat dilihat pada tabel berikut.

e. **Pengukuran Kadar Kolesterol**

Pemeriksaan kolesterol berupa metode digital menggunakan *test strip* alat *check* darah *portable Easy Touch*. Alat ini memiliki rentang hasil pengukuran sebesar 100-400 mg/dL.

f. **Ekstraksi Mikrosom Hepar**

Bahan yang digunakan adalah larutan pencuci yaitu KCL 1,15%, *buffer* I yakni *buffer* homogenisasi dengan komposisi 0,25 M sukrosa, 50 mM *potassium fosfat* (pH 7,4), dan 1 mM EDTA. Selain itu, *Buffer* II dengan komposisi 20% gliserol, 100 mM *potassium fosfat*, dan 1 mM EDTA.

Sampel hepar mencit yang digunakan sebanyak 0,5 g. Hepar dicuci didalam 1,15% KCL dan jaga dalam es, kemudian hepar dihaluskan. Homogenisasi jaringan hepar yang telah dibersihkan di 3 volume larutan *buffer* I, kemudian homogenisasi menggunakan *ultra sonication*. Selanjutnya, memisahkan nukleus dan sel debris melalui sentrifuge pada 670 g selama 10 menit. Supernatant diambil kemudian disentrifuge kembali dengan kecepatan 10.000 g selama 15 menit. Mikrosom dipelletkan dengan sentrifuge pada cairan supernatant postmitokondrial pada 13000 rpm selama 60 menit. Pellet yang dihasilkan dicuci dengan *buffer* I sampai volume 1 mL dan sentrifuge kembali dengan kecepatan 13000 rpm selama 60 menit. Resuspensi final pellet dengan *buffer* II hingga volume mencapai 1 mL.⁸ Hasil ekstraksi diukur kadar proteinnya menggunakan Uji Bradford.

g. **Elektroforesis SDS PAGE**

Gel yang digunakan ialah gel *polyacrylamide* 10% karena protein target yakni FMO3 memiliki berat molekul berkisar 55 kDa. Elektroforesis dilakukan menggunakan voltase sebesar 80 volt dengan jumlah protein yang di *running* sebesar 75µg.

h. **Western Blotting**

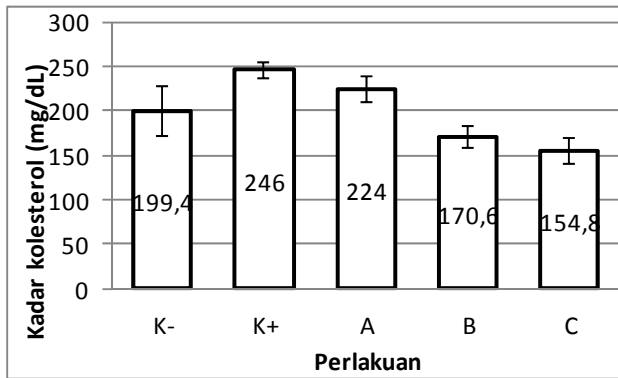
Gel SDS PAGE ditransfer pada membran nitro-selulose menggunakan *blotting semi dry* Biorad. Protein dideteksi menggunakan antibodi primer berupa *rabbit* poliklonal antibodi FMO3 dan antibodi sekunder berupa *goat anti rabbit alkaline phosphatase*.

Hasil

a. **Kadar Kolesterol Darah Mencit**

Pemeriksaan kadar kolesterol darah mencit dilakukan pasca pemberian diet aterogenik dan *indole-3-carbinole* selama dua minggu.

Perlakuan	Kadar Kolesterol total(mg/dL)
Kontrol negatif	199,4 ± 28,94
Kontrol positif	246 ± 8,52
Kelompok A	224 ± 15,30
Kelompok B	170,6 ± 12,54
Kelompok C	154,8 ± 14,46

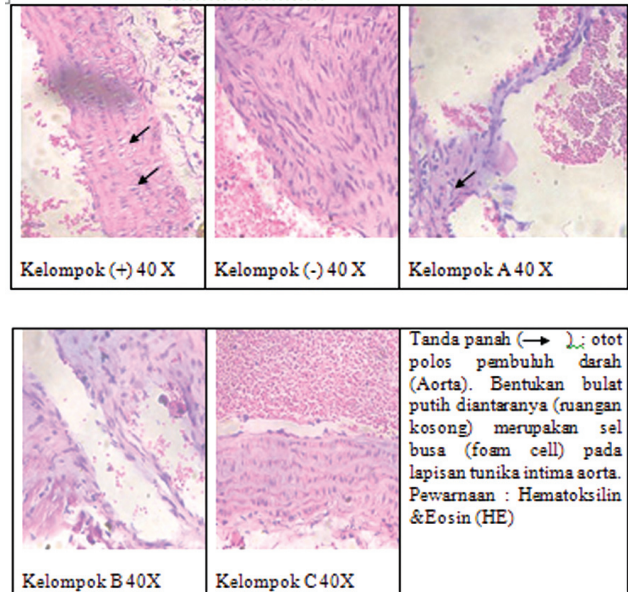


Kadar normal kolesterol darah pada mencit (*Mus musculus*) ialah sebesar 26,0 – 82,4 mg/dL. Namun, pada penelitian ini, data kadar kolesterol pada kontrol negatif merupakan standar yang digunakan dalam menetapkan kadar kolesterol normal pada mencit. Hal ini disebabkan rentang hasil pengukuran alat pengukur kolesterol *portable Easy Touch* yang masih cukup tinggi. Meskipun demikian, penggunaan alat ini tetap menjadi pilihan utama karena kelebihanannya yakni tidak memerlukan jumlah darah yang banyak, praktis, serta murah.

Berdasar data yang didapatkan, pemberian *indole-3-carbinole* dapat mencegah peningkatan kadar kolesterol di dalam darah. Peningkatan dosis *indole-3-carbinole* yang dilakukan pada kelompok perlakuan A, B dan C menunjukkan adanya peningkatan efek terhadap kadar kolesterol darah mencit. Hal ini ditunjukkan dengan menurunnya kadar kolesterol darah mencit sesuai dengan peningkatan dosis yakni A (10 mg/kgbb), B (200 mg/kgbb), dan C (500 mg/kgbb) secara berturut-turut 224 ± 15,30 mg/dL, 170,6 ± 12,54 mg/dL dan 154,8 ± 14,46 mg/dL. Bahkan pada kelompok B dan C, data menunjukkan nilai yang lebih rendah daripada kontrol negatif sebesar 199,4 ± 28,94 mg/dL. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *indole-3-carbinole* dapat mencegah peningkatan kadar kolesterol darah di dalam tubuh.

b. Gambaran Histopatologi Aorta Mencit

Gambaran histopatologi aorta mencit menunjukkan perbaikan seiring peningkatan dosis terapi, terlihat berkurangnya jumlah *foam cell* pada kelompok A dan B serta tidak terbentuknya *foam cell* pada kelompok C.



c. Ekstraksi Mikrosom Hepar

Ekstraksi mikrosom hepar menghasilkan kadar protein dengan rentang 1,6-4,9 ug/uL.

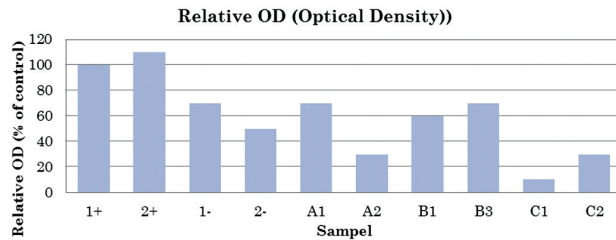


d. SDS PAGE

Protein FMO3 dideteksi pada *gel polyacrylamide* 10% dengan berat molekul 55 kDa.

e. Western Blotting

	+1	+2	-1	-2	A1	A2	B1	B3	C1	C2	
	1.1	0.7	0.5	0.7	0.3	0.6	0.7	0.1	0.3		55 kDa
1	1.1	0.7	0.5	0.7	0.3	0.6	0.7	0.1	0.3		Optical Density (OD)
+	+	-	-	+	+	+	+	+	+		Diet Aterogenik
-	-	-	-	-	10	10	200	200	500	500	Indole-3-carbinol (mg/kgBB)



Hasil ini menunjukkan bahwa *indole-3-carbinol* mampu menghambat aktivitas FMO3.

Daftar Pustaka

1. WHO. 2013. Cardiovascular Disease. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. 28 April 2014 (15:23)

2. Gunawan, S.G. 2008. *Farmakologi dan Terapi FK UI*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
3. Tang, W. H., Wang, Z., Levison, B. S., Koeth, R. A., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., dan Hazen, S. L. 2013. Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidilcholine and Cardiovascular Risk. *The New England Journal of Medicine*. 368: 1575-84.
4. Mandelsohn, A. R. dan J. W. Larrick. 2013. Dietary Modification of the Microbiome Affects Risk for Cardiovascular Disease. *Rejuvenation research*. 16(3): 241-4.
5. Bennett B.J., V. T. Q. de Aguiar, Wang Z., D. M. Shih, Meng Y., J. Gregory, H. Allayee, Lee R., M. Graham, R. Crooke, P. A. Edwards, S. L. Hazen, dan A. J. Lusis. 2013. Trimethylamine-N-oxide, a Metabolite Associated With Atherosclerosis, Exhibits Complex Genetic and Dietary Regulation. *Cell Metabolism*. 17(1): 49-60.
6. Aggarwal, B. B. dan Ichikawa, H. 2005. Molecular target and anticancer potential of I3C and its derivatives. *Cell Cycle*. 4(9):1201-15
7. Chang, X., Tou, J. C., Hong, c., Kim, H. A., Riby, J. E., Firestone, G. L., Bieldanes, L. F. 2005. 3,3 diindolmethane inhibits angiogenesis and The Growth of Transplantable Human Breast Carcinoma in Athymic mice. *Carcinogenesis*. 26:771-778.
8. Hayes, A.W. Principles and Method of Toxicology. Fifth Edition