



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2001

KKC
KK
573.15
Mas
P

**PENGARUH ANTIOKSIDAN PROBUCOL TERHADAP KADAR
MALONDIALDEHIDE (mda) DALAM DARAH DAN JUMLAH
"CIRCULATING ENDOTHEL" PADA TIKUS PUTIH
YANG MENERIMA STRESSOR**

3000240023141



Peneliti :

drh. LILIK MASLACHAH, M.Kes.
drh. SRI AGUS SUDJARWO, Ph.d.
drh. RAHMI SUGIHARTUTI

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia
DIP Nomor : 059/XXIII/1/--/2001 Tanggal 1 Januari 2001
Kontrak Nomor : 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001
Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 11

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2001



UNIVERSITAS AIRLANGGA
JALAN MOJOKERTO 3
SURABAYA 60132

PENGARUH ANTIOKSIDAN PROBUCOL...
MILIK PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

UNIVERSITAS AIRLANGGA
JALAN MOJOKERTO 3
SURABAYA 60132

UNIVERSITAS AIRLANGGA
JALAN MOJOKERTO 3
SURABAYA 60132

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

UNIVERSITAS AIRLANGGA
JALAN MOJOKERTO 3
SURABAYA 60132

DEPARTEMEN PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA**

1. a. Judul Penelitian : Pengaruh Antioksidan Probucol Terhadap Kadar Malondialdehide (MDA) Dalam Darah Dan Jumlah " *Circulating Endothel* " Pada Tikus Putih Yang Menerima Stressor.
- b. Macam Penelitian : I / II / III *)
2. Kepala Proyek Penelitian
 - a. Nama Lengkap dan Gelar : Lilik Maslachah, M.Kes., drh.
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. Pangkat/Golongan dan NIP. : Penata Muda TK I / III b/ 132 061 818
 - d. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
 - e. Fakultas / Puslit / Jurusan : Fakultas kedokteran Hewan
 - f. Univ./Inst./Akademi/ST. : Universitas Airlangga
 - g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Kesehatan
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 Orang
Lilik Maslachah, M.Kes., drh.
Sri Agus Sudjarwo, Ph.D., drh.
Rahmi Sugihartuti, M.Kes., drh.
4. Lokasi Penelitian : Laboratorium
5. Bila Penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama kelembagaan sebutkan : -
6. Jangka waktu Penelitian : 5 Bulan
7. Biaya yang Diperlukan : Rp. 5.000.000,-
(Lima Juta Rupiah)

Surabaya, 17 agustus 2001

Ketua Peneliti



Lilik Maslachah, M.Kes., Drh.
NIP. 132 061 818

Mengetahui :
Dekan Fak./Puslit :

Dr. Ismudiono, MS., Drh.
NIP. 130 687 297

Menyetujui:

Ketua Lembaga Penelitian Unair,

Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S.
NIP. 130 701 125



RINGKASAN

PENGARUH ANTIOKSIDAN PROBUCOL TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDE (MDA) DALAM DARAH DAN JUMLAH "CIRCULATING ENDOTHEL" PADA TIKUS PUTIH YANG MENERIMA STRESSOR
(Lilik Maslachah, Sri Agus Soedjarwo, Rahmi Sugihartuti)

Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian antioksidan Probucol terhadap kadar Malondialdehyde (MDA) dalam darah dan jumlah "Circulating Endothel" pada tikus putih yang menerima stressor.

Sampel penelitian ini menggunakan binatang percobaan tikus albino Wistar jantan dengan berat badan sekitar 200 gram, umur 3 bulan.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap. Variabel penelitian terdiri dari variabel bebas yaitu pemberian stressor dan pemberian antioksidan Probucol, variabel tergantung yaitu kadar Malondialdehyde, jumlah sel endotel pada "Circulating Endothel" akibat pemberian antioksidan Probucol pada tikus putih yang menerima stressor, dan variabel kendali yaitu tikus berjenis kelamin jantan, umur 3 bulan dengan berat badan yang seragam serta kandang kondisi sama, pakan tikus adalah pakan ayam yang dibuat pellet.

Prosedur penelitian pada penelitian ini meliputi pemberian stressor pada tikus dilakukan dengan memberikan beban kerja aktivitas fisik (*swimming stress*) "behavior Despair" dengan beban ekor 2 % dari berat badan tikus, kemudian dimasukkan kedalam air. Perincian mengenai perlakuan terhadap masing-masing kelompok adalah sebagai berikut :
Kelompok kontrol (Po1) : 7 ekor tikus hanya diberi pelarut obat selama 3 minggu.
Kelompok (Po2) : 7 ekor tikus diberi pelarut obat dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu.
Kelompok perlakuan (P1) : 7 ekor tikus diberi Probucol dosis I, 5 mg/ekor dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu.
Kelompok (P2) : 7 ekor tikus diberi Probucol dosis II, 10 mg/ekor dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu.
Kelompok (P3) : 7 ekor tikus diberi Probucol dosis III, 20 mg/ekor dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu.

Penetapan kadar Malondialdehyde dalam darah dilakukan dengan metode "Epsinosa Mansila 1973" sedangkan pemeriksaan jumlah "Circulating Endothel" menggunakan metode Hladovic and Rossman 1973 yang dimodifikasi dan dikembangkan oleh Widjayanto 1996.

Data yang terkumpul dari pemeriksaan kadar Malondialdehyde (MDA) dan jumlah "Circulating Endothel" dianalisis dengan uji analisis varian (Anava). Bila terdapat perbedaan diantara kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji LSD. Untuk melihat korelasi kadar MDA dalam darah dengan jumlah "Circulating Endothel" digunakan uji korelasi dengan "Scater plot". Untuk mengetahui apakah koefisien korelasi suatu sampel dari suatu perlakuan tidak terjadi karena suatu kebetulan saja dilakukan uji " r " (ρ).

Hasil penelitian dan analisis statistik menunjukkan pada kelompok kontrol (Po1) jika dibandingkan dengan kelompok stressor (Po2) rata-rata kadar MDA menunjukkan peningkatan yang bermakna pada $P < 0,05$, kelompok kontrol (Po1) dibandingkan dengan kelompok stressor yang diberi antioksidan Probucol pada berbagai dosis (P1,P2,P3) menunjukkan penurunan kadar MDA yang bermakna pada $P < 0,05$. Kelompok stressor (Po2) dibandingkan dengan kelompok stressor yang diberi antioksidan Probucol pada berbagai dosis (P1,P2,P3) menunjukkan penurunan kadar MDA yang bermakna pada $P < 0,05$. Sedangkan jumlah "Circulating Endothel" menunjukkan pada kelompok kontrol (Po1) jika dibandingkan dengan kelompok stressor (Po2) rata-rata jumlah "Circulating Endothel" menunjukkan peningkatan yang bermakna pada $P < 0,05$. Kelompok kontrol (Po1) dibandingkan dengan kelompok stressor yang diberi antioksidan Probucol pada berbagai dosis (P1) menunjukkan perbedaan yang bermakna pada $P < 0,05$ dan dengan (P2,P3) tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna $P > 0,05$. Kelompok stressor (Po2) jika dibandingkan dengan kelompok stressor yang diberi antioksidan Probucol pada berbagai tingkat dosis (P1,P2,P3) menunjukkan perbedaan yang bermakna pada $P > 0,05$.

Korelasi antara kadar MDA dalam darah dan jumlah "Circulating Endothel" = 0,719. Hubungan kadar MDA dalam darah dengan jumlah "Circulating Endothel" dengan uji

"r"(rho) hasilnya menunjukkan H1 diterima pada P,0,05. Model regresinya $Y = 2,49 + 2,07x$.

Kesimpulan dari Penelitian ini adalah pemberian stressor pada tikus putih dapat menyebabkan peningkatan kadar MDA dalam darah dan "Circulating Endothel". Pemberian Antioksidan Probucol dosis 5, 10, 20 mg/ekor dapat menyebabkan penurunan kadar MDA dan jumlah "Circulating Endothel" pada tikus putih yang menerima stressor.

SUMMARY

THE EFFECT OF ANTIOXIDANT PROBUCOL ON BLOOD MALONDIALDEHYDE (MDA) LEVEL AND TOTAL CIRCULATING ENDOTHELIUM IN RATS EXPOSED TO STRESSOR.

Lilik Maslachah, Sri Agus Soedjarwo, Rahmi Sugihartuti
Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University

The influence of antioxidant Probuocol administration on blood malondialdehyde (MDA) level and total Circulating endothelium in rats exposed to stressor has been studied.

Sample were 3 months old male Albino Wistar Rats with body weight of about 200 gram. This study used complete random design. Variables consisted of independent variables, i.e., stressor and antioxidant Probuocol administration., dependent variables i.e., Malondialdehyde level, total circulating endothelium caused by antioxidant Probuocol administration in rats exposed to stressor, and control variables i.e., male rats about 3 mounths old with similar body weight, fed wih chicen food pellet produced by PT Charoen Pokphand ,and placed in cages with similar condition.

Procedures used in this study was done by exposing the rats to stressor, i.e., by giving "Behavior despair", a physical activity working load (swimming stress) with tail load as much as 2 % of rats body weight. Rats were then put into the water. Details of treatment to each group were as follows : Control groups consisted of Po1 Group of 7 rats that were given per oral Probuocol solutio for 3 weeks, and Po2 Group of 7 rats that were given Probuocol solution and stress behavior for 3 weks. Treatment groups consisted of P1 groups of 7 rats that were given Probuocol dose I (5 mg/rat) and stress behavior for 3 weeks; P2 Group of 7 rats that were given Probuocol dose II (10 mg/rat0 and stress behavior for 3 weeks;and P3 Group of 7 rats that were given Probuocol dose III(20 mg/rat) and stress behavior for 3 weeks.

Blood Malondialdehyde level determination was done using "Epsinosa mansila 1973" method, while total circulating endothelium examination was done using "Hladovic and Rossman 1973" method, modified and developed by Widjayanto (1996)

Data collected from malondialdehyde (MDA) level examination and Circulating endothelium was analyzed using variance analysis (Anava). When the difference between treatment group was found, the analysis was continued using LSD test. To find whether correlation test with "Scatter plot" was used, and "r" (rho) test was used to find whether correlation coefficient of sample in any treatment occurred due to coincidence.

Results and statistical analysis showed that there was a significant increase of mean MDA level ($P < 0,05$) in control group (Po1) than in stressor group (Po2). Significant decrease of MDA level ($P < 0,05$) was found in control group (Po1) than in stressor group with antioxidant Probucol in various doses (P1,P2,P3), while MDA level decreased significantly ($P < 0,05$) in stressor group (Po2) than in stressor groups with antioxidant Probucol in various doses (P1,P2,P3).

In addition, result and statistical analysis also showed that mean Circulating endothelium increased significantly ($P < 0,05$) in control group (Po1) than in stressor group (Po2). Comparison between control group (p01) and stressor group with antioxidant Probucol in various doses (P1,P2) showed significant difference ($P < 0,05$), and with (p3) showed no significant difference ($P > 0,05$). Stressor group (po2), compared to stressor with antioxidant Probucol in various doses (P1,P2,P3), showed significant difference ($P < 0,05$).

It can be concluded that stressor administration to rats may increase blood MDA level and total circulating endothelium. Administration of antioxidant Probucol with dose of 5,10,20 mg/rat may decrease MDA and total circulating endothelium in rats exposed to stressor.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Hipotesis	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	35
IV. METODE PENELITIAN	36
4.1 Rancangan Penelitian	36
4.2 Sampel dan Besar Sampel	36
4.3 Variabel Penelitian	36
4.4 Definisi Operasional Variabel	37
4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian	37

4.6 Waktu Dan Tempat Penelitian.....	38
4.7 Prosedur Penelitian	39
4.8 Pemeriksaan Sampel Darah	40
4.9 Analisis Data	42
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	44
5.1 Hasil Penelitian	44
5.2 Analisis Data	48
5.3 Pembahasan	53
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	59
6.1 Kesimpulan	59
6.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	65

DAFTAR TABEL

Tabel No:	Halaman
<p>1. Kadar MDA Dalam Darah Pada Tikus Yang Menerima Stressor Dan Penambahan Antioksidan Probucol Pada Berbagai Dosis $\mu\text{M} / \text{ml}$</p>	44
<p>2. Jumlah "<i>Circulating Endothel</i>" Pada Tikus Yang Menerima Stressor Dan Pemberian Antioksidan Probucol Pada Berbagai Dosis /1,8 Cmm.....</p>	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar No :	Halaman
1. Hubungan Antara Berbagai Senyawa Oksigen Reaktif.....	11
2. Penyebab Kematian Sel Karena Peningkatan Reaksi Radikal Bebas Dalam Jaringan	16
3. Proses Transduksi Signal Sel Endotel	19
4. Rangsangan Terjadinya Disfungsi Endotel	26
5. Proses Transduksi Signal Pada Disfungsi Sel Endotel	27
6. Disfungsi Endotel	27
7. Struktur Kimia Probucol	
8. Rata-rata Kadar MDA Dalam Darah Pada Tikus Putih Yang Menerima Stressor Dan Pemberian Antioksidan Probucol Pada Berbagai Dosis	45
9. Rata-rata Jumlah " <i>Circulating Endothel</i> " Pada Tikus Putih Yang Menerima Stressor Dan Pemberian Antioksidan Probucol Pada Berbagai Dosis	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran No :

	Halaman
1. Data Hasil Penelitian Kadar MDA dalam Darah Dan “ <i>Circulating Endothel</i> “	65
2 . Plot MDA vs “ <i>Circulating Endothel</i> “	66
3. Data MDA	67
4. Data “ <i>Circulating Endothel</i> ”	68
5. Analisa Ada Tidaknya Korelasi Antara MDA Dan “CE”	69
6. Analisa Korelasi Data Regresi Kadar MDA vs Bacaan.....	70
7. Grafik Analisa Korelasi dan Regresi Kadar MDA vs Bacaan.....	71

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Dalam keadaan yang semakin kompleks menjelang era globalisasi dan adanya tekanan kesulitan hidup yang semakin berat saat ini membuat banyak orang tidak dapat beradaptasi, yang akhirnya akan mempengaruhi keseimbangan (homeostasis) didalam tubuhnya, yang pada keadaan kronik dapat menimbulkan gangguan terhadap sistem organ dengan tingkatan yang berbeda-beda. Makhluk hidup akan memberikan respon terhadap pengaruh lingkungan hidupnya, respon ini dimaksudkan untuk menjaga kondisi homeostasis individu tersebut. Tetapi lingkungan hidup tidak selamanya bersahabat, bila lingkungan tidak dijaga dengan baik maka akan menjadi sumber atau penyebab stress (stressor). Stress merupakan suatu respon dari organisme terhadap suatu rangsangan fisik, kimia, somatik, psikis, psikososial kultural dan lain-lain, heterogenitas rangsangan dapat berasal dari luar atau dalam organisme itu sendiri (Covelli, 1992).

Bila beban rangsangan yang diberikan melebihi batas ambang, maka akan menimbulkan respon stress, yaitu respon yang terjadi pada saat individu tidak mampu mengatasi beban fisik atau psikologik (Riley, 1981). Latihan fisik berat bisa merupakan stressor yang dapat menyebabkan seseorang berada dalam kondisi yang patologik (Chandrasoma, Taylor, 1991).

Studi terbaru menunjukkan bahwa kejadian depresi, hipertensi dan penyakit jantung, adalah penyakit yang diperkirakan ada hubungannya dengan respon stres



yang memegang peranan penting dalam masalah kesehatan (Atkinson, *et al.*, 1993).

Selama latihan fisik yang berat dapat dilepaskan radikal bebas yang salah satunya berasal dari xanthine oxida yang terdapat dalam sel endotel pembuluh darah kapiler. Xanthine oxida dilaporkan terlibat dalam sejumlah penyakit termasuk kerusakan jaringan selama iskemia pada usus, paru, otak, jantung dan otot rangka. xanthine oxidase mengalami oksidasi menghasilkan hipoxanthine \longrightarrow xanthine \longrightarrow asam urat. Selama stress metabolik xanthine dehidrogenase berubah secara reversibel dan irreversibel menjadi bentuk enzim xanthine oxidase dan peningkatan pembentukan AMP yang harus dieliminasi secara terus-menerus dari sel. Penumpukan AMP ini menyebabkan hipoxanthine menumpuk pada intra dan ekstra seluler yang menyebabkan aktivitas enzim xanthine oxidase semakin tinggi. Peranan xanthine oxida sebagai penghasil radikal oksigen sangat besar selama stress oksidatif karena efek xanthine oxida memperkecil hambatan kerusakan jaringan. Telah dilaporkan juga bahwa aktivasi neutrofil disebabkan oleh perubahan xanthine dehidrogenase menjadi xanthine oxidase pada sel endotel, dan penyumbatan dapat terjadi karena akumulasi dan adhesi neutrofil pada dinding endotel dan jaringan yang lain dan dalam waktu yang lama dapat menimbulkan iskemia dan nekrosis sel (Sjodin, Westing, Apple, 1990).

Endotel mempunyai peran yang sangat penting dalam menjaga integritas pembuluh darah. Pada keadaan normal mediator vasodilatasi pada pembuluh darah adalah EDRF (*Endothelium-Derive Relaxing Factor*) dan Prostaglandin. EDRF tidak hanya bekerja untuk dilatasi otot polos pembuluh darah, tetapi juga berperan menghambat proliferasi otot polos, agregasi platelet, merangsang disagregasi platelet

dan menghambat adhesi platelet pada permukaan endotel. Selain itu juga EDRF bekerja sebagai agen antiinflamasi dengan menghambat adhesi dari monosit dan neutrofil pada permukaan endotel dan bekerja sebagai anti oksidan. EDRF dapat mencegah oksidasi LDL sebagai mediator oksidasi atherogenik, yang ditunjukkan dengan EDRF bekerja menghambat atherosklerotik. Proses atherosklerotik disebabkan oleh peningkatan dan akumulasi LDL (*Low Density Lipoprotein*) pada ruang subendotel. Dengan menurunnya pelepasan EDRF peranan perlindungan terhadap endotel juga menurun sehingga sel aktif meningkatkan proses atherogenesis yang prosesnya diperantai oleh peningkatan oksidasi dari LDL dan stress oksidan dalam dinding pembuluh darah (Flavahan and Vanhoutte , 1995).

Endotel merupakan target organ salah satu penyakit yaitu hipertensi, hal ini terjadi karena adanya atherosklerotik pada pembuluh darah. Hipertensi merupakan faktor risiko pada morbiditas dan mortalitas untuk penyakit kardiovaskuler (Luscher and Tanner , 1993).

Perbaikan fungsi endotel dengan pemberian terapi antioksidan belum banyak diketahui. Probucol sebagai obat dislipidemia mempunyai efek antioksidan yang dapat menghambat proses atherogenik karena adanya oksidasi LDL pada dinding pembuluh darah arteri, sehingga dapat menghambat ateroma yang tidak tergantung efeknya pada lemak darah (Opie , 1991). Radikal bebas mempunyai kemampuan untuk inaktivasi EDRF atau berinteraksi dengan transduksinya yang dapat dicegah atau dihambat oleh antioksidan Probucol, disamping itu antioksidan Probucol dapat meningkatkan pelepasan EDRF (Evans , and Bruckdorfer , 1992).

Probucol sebagai antioksidan yang poten berpengaruh terhadap AOE (*Antioxidant Enzyme*) dan kadar MDA pada tikus yang mengalami nefrektomi subtotal pada tingkat kronik. Hal ini menunjukkan bahwa terapi dengan Probucol sangat nyata pada gangguan fungsi renal yang dihubungkan dengan kemampuannya mempertahankan pertahanan glomerular AOE (Zhang, D Ji, L Li, *et al.*, 1996).

Probucol dapat menurunkan kadar basal VCAM-1, MCSF sangat nyata, hasil ini mendukung bahwa VCAM-1, MCSF memainkan peran penting dalam proses atherogenesis dan diyakini bahwa antiatherogenik dari Probucol mempunyai peran penting (J Fruebis, *et al.*, 1997).

Dengan merujuk pada fakta diatas penulis mencoba menggunakan antioksidan Probucol untuk mencegah disfungsi endotel yang disebabkan oleh adanya stressor.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang permasalahan yang diuraikan sebelumnya, permasalahan dalam penelitian ini dirumuskan sebagai berikut :

1. Apakah pemberian antioksidan Probucol dapat menghambat peningkatan kadar Malondialdehyde tikus putih yang menerima stressor ?
2. Apakah pemberian antioksidan Probucol dapat menghambat peningkatan jumlah "Circulating Endothel" tikus putih yang menerima stressor ?

1.3 Hipotesis

Berdasarkan permasalahan dan tinjauan teori diajukan hipotesis sebagai berikut

1. Pemberian antioksidan Probucol pada tikus putih dapat menghambat peningkatan kadar Malondialdehyde pada tikus yang menerima stressor.
2. Pemberian antioksidan Probucol pada tikus putih dapat menghambat peningkatan jumlah "Circulating Endothel" pada tikus yang menerima stressor.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Stress

Stress merupakan suatu keadaan yang esensial untuk kehidupan, artinya tanpa stress kehidupan itu juga akan berhenti. Bila kehidupan tidak terpenuhi, baik fisik, psikis maupun sosial maka akan terjadi gangguan keseimbangan, lalu ada upaya untuk mengembalikan keseimbangan yang terganggu maka keadaan ini dinamakan stress. Sumber stress bersifat holistik, demikian pula stress artinya punya dimensi fisik, psikik maupun sosial (Handoko, 1999).

Latihan fisik merupakan pemberian beban fisik bagi tubuh yang teratur, terprogram dan memenuhi prinsip latihan, sehingga fungsi-fungsi sistem tubuh tetap faali. Tetapi bila beban yang diberikan melebihi batas ambang, maka akan menimbulkan respon stress, yaitu respon yang terjadi pada saat individu tidak mampu mengatasi beban fisik. Latihan fisik yang menimbulkan respon stress merupakan suatu stressor (Riley, 1981).

Reaksi stress sebenarnya adalah suatu reaksi daripada faktor-faktor pembebanan. Selain itu tidak semua individu mempunyai reaksi stress yang sama, karena itu suatu keadaan dinamakan stressor tergantung juga pada bagaimana individu menanggapi kejadian tersebut. Orang bisa mengatasi stressnya akan menjadi semakin matang dan kuat, sebaliknya akan menjadi sakit, misalnya timbul gangguan cemas, depresi, psikosis atau gangguan medik lainnya (Notosoedirdjo, 1998).

2.1.1 Hubungan Stress Dengan Penyakit

Selama latihan dengan intensitas tinggi aliran oksigen kedalam sel otot rangka meningkat sangat besar, bersamaan dengan ini kebutuhan ATP yang berlebihan dan lebih cepat dari pada pembentukan ATP. Pada stress metabolik, didalam sel dapat terjadi beberapa perubahan biokimia, yaitu peningkatan kecepatan pembentukan radikal bebas dari semiquinone dan xanthine oxida. Peningkatan pembentukan radikal bebas yang sangat cepat ini, yang melebihi kemampuan kapasitas dari sistem pertahanan seluler akan menyebabkan serangan dari radikal bebas pada membran sel sehingga dapat menimbulkan hilangnya permeabilitas dan nekrosis sel serta dapat menyebabkan kerusakan otot rangka dan inflamasi yang terjadi dari reaksi kimia pada tingkat subseluler. Radikal bebas dihasilkan oleh kerusakan dalam sistem metabolik akibat "*stress oksidatif*", dan pembentukan radikal ini kemudian dapat menimbulkan proses traumatik didalam jaringan yang diawali dengan reaksi kimia berantai seperti peroksidasi lipid (Sjodin , *et al.*, 1990).

2.1.2 Mediator Yang Dilepaskan Pada Keadaan Stress

Peranan xanthine oxidase sebagai penyebab kerusakan jaringan melalui pembentukan radikal oksigen dimulai dari proses katalisis xanthine oxidase pada oksidasi hypoxanthin menjadi xanthine, juga pada oksidasi xanthine menjadi asam urat. NAD^+ digunakan sebagai pemberi elektron dalam reaksi ini. Hasil oksidasi xanthine dehidrogenase ini menggunakan molekul oksigen (O_2) dari NAD^+ sebagai pemberi elektron. Molekul oksigen ini direduksi dan membentuk radikal superoksida anion (O_2^-) (Sjodin , *et al.*, 1990).

Seiring dengan perubahan xanthine dehidrogenase menjadi xanthine oxidase selama stress metabolik, sistem adenylate kinase digunakan untuk menghasilkan ATP dan AMP dari 2 molekul ADP (Gollnick, 1986). Hasil kedua dari reaksi ini salah satunya adalah AMP yang fungsinya sebagai inhibitor yang terus menerus dieliminasi dari sel. Pemecahan AMP menyebabkan hipoxanthine menumpuk dalam intra dan ekstra seluler dan akhirnya menyebabkan aktivitas xanthine oxidase meningkat (Van Bilsen, *et al.*, 1989).

Xanthine oxida sebagai pembentuk radikal bebas oksigen selama stress oksidatif memberikan efek hambatan minimal terhadap kerusakan jaringan juga perubahan xanthine dehidrogenase menjadi xanthine oxidase dapat mengaktifkan neutrofil (Massey, *et al.*, 1970).

Radikal Superoksida anion (O_2^-) mempunyai efek toksik terhadap sel atau jaringan yang ringan tetapi adanya akumulasi radikal superoksida anion dapat juga berperan terhadap patogenesis kerusakan jaringan yang diikuti oleh mobilisasi dan aktivasi sel inflamasi. Transport O_2^- melalui chanel anionik dari sel membran terjadi dalam intraseluler tempat dimana terjadi reduksi feritin yang menghasilkan radikal hidroksil (HO^{\cdot}) yang dibentuk dari H_2O_2 melalui reaksi dismutase (Ward, *et al.*, 1988).

2.1.3 Peranan Xanthine Oxida Selama Pemberian Stressor

Peranan xanthine oxida sebagai pembentuk radikal oksigen selama stress metabolik dapat juga terjadi pada hewan yang mengalami iskemia. Akumulasi AMP menyebabkan meningkatnya hipoxanthine dalam otot rangka dan plasma. Selanjutnya hipoxanthine diubah menjadi asam urat melalui xanthine oxidase selama latihan dengan intensitas tinggi. Kadar asam urat yang tinggi yang

dihasilkan selama latihan menunjukkan bahwa xanthine dehidrogenase aktif karena xanthine dehidrogenase juga menyebabkan sumber asam urat pada waktu istirahat. Penurunan kadar ATP intraseluler dan adanya akumulasi hipoxanthine dan asam urat dalam plasma sebagai implikasi kelelahan latihan akibat stress metabolik seperti juga pada iskemia (Rubayi, and Vanhoutte, 1986; Sjodin, *et al.*, 1990).

Selama kelelahan latihan, pembentukan ATP terganggu, bukan karena kekurangan oksigen tetapi karena kecepatan pembentukan ATP yang tidak seimbang dengan pemakaian ATP yang sangat tinggi sehingga menyebabkan penurunan ketersediaan ATP di dalam sel. Oleh karena itu pada perubahan xanthine dehidrogenase menjadi xanthine oxidase, oksigen terus menerus direduksi menjadi superoksida anion (Stainsby, *et al.*, 1989).

2.1.4 Stress Oksidatif

Apabila pertahanan antioksidan tubuh tidak betul-betul efektif, maka dapat menyebabkan peningkatan pembentukan radikal bebas. Hal ini akan mengakibatkan kerusakan jaringan yang sering dinyatakan sebagai stress oksidatif. Stress oksidatif dapat ditimbulkan oleh panas, trauma, sinar ultraviolet, ultrasound, infeksi, radiasi, racun, olah raga berlebih, iskemia yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan selanjutnya dapat menimbulkan :

1. Fagositosis dan aktivasi yang dapat menghasilkan : O_2^- , H_2O_2 , NO , $HOCl$.
2. Pelepasan asam arakhidonat, pembentukan enzim peroksidase oleh aktivasi enzim lipoksigenase, siklooksigenase.
3. Pelepasan ion metal dari protein penyimpanan dan transport (Fe, Cu) akan merangsang pembentukan $OH\cdot$.

4. Pelepasan protein heme, yang akan bereaksi dengan peroksidase dan melepaskan ion Fe^{2+} .
5. Gangguan pada pertahanan antioksidan (misalnya kehilangan glutathion dari sel).

Stress oksidatif dapat merusak sel-sel, dan menimbulkan penyakit. Jadi kegagalan sistem antioksidan tubuh akan menyebabkan perlindungan terhadap serangan antioksidan hilang (Wijaya, 1996).

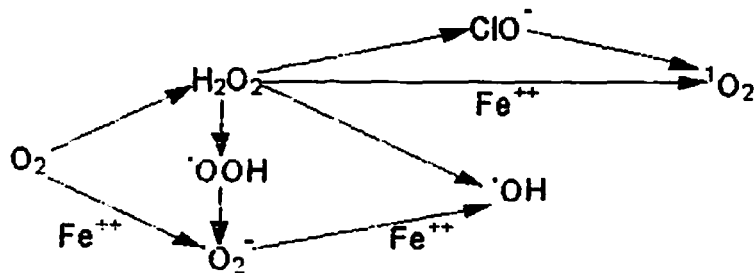
2.2 Radikal Bebas

2.2.1 Macam-macam Radikal Bebas

Oksidan dapat berasal dari luar tubuh (eksternal oksidan) misalnya berupa bahan pencemar (*pollutant*), obat-obatan, asap rokok, kekurangan nutrisi, radiasi sinar gamma, UV, sedangkan oksidan yang terbentuk dalam tubuh sendiri (internal oksidan) seperti misalnya H_2O_2 dll. Oksidan yang terlibat dalam berbagai proses patologis sebagian besar merupakan oksidan endogen yang terbentuk dalam tubuh kita sendiri, yang disebut sebagai senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Compound, ROC, atau Reactive Oxygen Spesies, ROS*). ROS sebagian berbentuk radikal seperti radikal hidroksil (OH^\cdot), radikal peroksil ($\cdot OOH$) dan superoksida (O_2^\cdot), sebagian lagi bukan radikal: hidrogen peroksida (H_2O_2), anion hipoklorit (ClO^-) dan oksigen singlet (1O_2) (Suryohudoyo, 1997).

Dalam keadaan fisiologis peristiwa ini terjadi di mitokondria, melalui apa yang disebut rantai respirasi. Pada peristiwa ini NADH bertindak sebagai senyawa pelepas elektron. Dari keempat senyawa oksigen reaktif H_2O_2 dan O_2 merupakan senyawa induk untuk terbentuknya senyawa-senyawa reaktif yang lain. Diantara

senyawa-senyawa oksigen reaktif, radikal hidroksil (OH^\cdot) merupakan senyawa yang paling reaktif dan oleh karena itu paling berbahaya (Wijaya, 1996; Suryohudoyo, 1997).



Gambar 1. Hubungan antara berbagai senyawa oksigen reaktif yang lain (Sumber : Gutteridge, *et al.*, 1990; Suryohudoyo, 1997).

2.2.2 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Pelepasan Radikal Bebas

Radikal bebas secara berkesinambungan dibuat oleh tubuh kita melalui:

1. Reaksi redok biokimiawi yang melibatkan oksigen, yang merupakan bagian dari metabolisme sel normal. Superoksida dibuat dengan menambahkan satu elektron pada molekul oksigen. Superoksida ini dibuat secara tidak sengaja, dimana banyak molekul dalam tubuh bereaksi langsung dengan oksigen untuk membentuk superoksida contohnya Katekolamin, Tetrahydrofolat dan lain-lain. Superoksida jenis ini tidak dapat dihindarkan.
2. Proses fagositosis, yang merupakan bagian dari reaksi inflamasi yang terkontrol. Proses fagositosis ini akan menghasilkan sejumlah besar superoksida sebagai bagian dari mekanisme yang bertujuan untuk membunuh mikroorganisme asing. Pada inflamasi kronis mekanisme perlindungan normal ini akan bersifat merusak.

3. Respons terhadap radiasi, sinar ultraviolet, polusi lingkungan, merokok, olahraga yang berlebihan dan iskemia. Radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang rendah (misalnya sinar gamma) dapat memecah air dalam tubuh untuk menghasilkan radikal Hidroksil ($\text{OH}\cdot$), radikal ini akan menyerang molekul yang berdekatan dengannya, dan dapat menimbulkan reaksi berantai.

Jadi setiap radikal bebas yang terbentuk oleh tubuh dapat memulai suatu reaksi berantai yang akan terus berlanjut sampai radikal bebas itu dihilangkan oleh radikal bebas yang lain dan lebih penting oleh sistem antioksidan tubuh (Evan, and Bruccdorfer, 1992; Wijaya, 1996).

2.2.3 Implikasi Radikal Bebas Terhadap Berbagai Penyakit

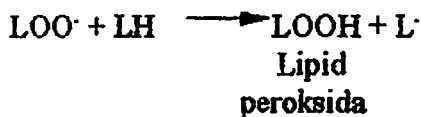
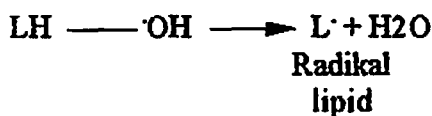
ROS merupakan senyawa oksigen reaktif dan semuanya merupakan oksidan yang sangat kuat, walaupun derajat kekuatannya berbeda-beda. Dampak aktivitas oksidan dapat sangat luas, dan sering mekanisme molekulernya masih belum diketahui secara jelas. Pada dasarnya semua oksidan dapat bereaksi dengan semua senyawa yang dapat melepaskan elektron, tetapi yang paling penting adalah reaksinya terhadap tiga jenis senyawa yang berfungsi untuk mempertahankan integritas sel yaitu :

1. Asam lemak khususnya asam lemak tak jenuh jamak (*Polyunsaturated Fatty Acid*, PUFA) yang merupakan komponen membran sel.
2. DNA yang merupakan perangkat genetik sel.
3. Protein yang melaksanakan berbagai peran penting seperti : enzim, reseptor, antibodi dan pembentuk matrik ekstra sel serta sitoskeleton.

Diantara senyawa oksigen reaktif, radikal hidroksil merupakan senyawa yang paling reaktif, karena itu paling berbahaya dan dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel (Evan, and Brucdorfer, 1992; Wijaya, 1996; Suryohudoyo, 1997).

1. Dampak Terhadap Asam Lemak Tak Jenuh Jamak (PUFA)

Komponen terpenting membran sel adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol. Dua komponen pertama mengandung asam tak jenuh jamak (*Polyunsaturated Fatty Acid*, PUFA). Justru asam-asam tak jenuh ini (linoleat, linolenat, arakidonat) dan asam-asam tak jenuh turunannya: asam eikosahek saenoat dan asam dokosahek saenoat sangat rawan terhadap serangan radikal, terutama radikal hidroksil. Radikal hidroksil dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan nama lipid peroksidasi :



Akibat akhir dari reaksi rantai ini adalah terputusnya rantai karbon asam lemak yang menghasilkan berbagai senyawa antara lain aldehid-aldehid seperti malondialdehid (MDA), 9-hidroksi nonenal serta senyawa hidrokarbon seperti etana (C_2H_6), pentana (C_5H_{12}) yang bersifat toksik terhadap sel. Dapat pula terjadi ikatan silang (*cross linking*) antara 2 rantai asam lemak yang timbul karena reaksi antara dua radikal :



semua ini mengakibatkan kerusakan parah pada membran sel, sehingga membahayakan kehidupan sel (Evan, and Brucdorfer, 1992; Wijaya, 1996; Suryohudoyo, 1997).

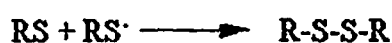
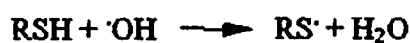
2. Dampak Terhadap DNA

Radikal hidroksil dapat menimbulkan berbagai perubahan pada DNA yang antara lain berupa hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan cincin purin dan pirimidin serta terputusnya rantai fosfodiester DNA. Bila kerusakan tak terlalu parah, maka masih dapat diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA (*DNA repair system*).

Akan tetapi jika kerusakannya terlalu parah, misalnya rantai DNA terputus di banyak tempat, maka kerusakan ini tak dapat diperbaiki, akhirnya sel mati. Pada perbaikan DNA, nukleotida yang biasanya rusak, dapat diganti namun sering tak sempurna, sehingga terjadi mutasi. Bila mutasi ini terjadi pada jenis gen khusus, yaitu proto-onkogen atau anti onkogen maka dapat menimbulkan kanker. Rantai DNA yang terputus dapat disambung kembali, tetapi penyambungannya sering kurang sempurna sehingga terjadi delesi atau translokasi (Evan, and Brucdorfer, 1992; Wijaya, 1996; Suryohudoyo, 1997).

3. Dampak Terhadap Protein

Oksidan dapat merusak protein karena dapat bereaksi dengan asam amino penyusun protein, khususnya asam amino sistein yang mengandung gugusan sulfidril (-SH):



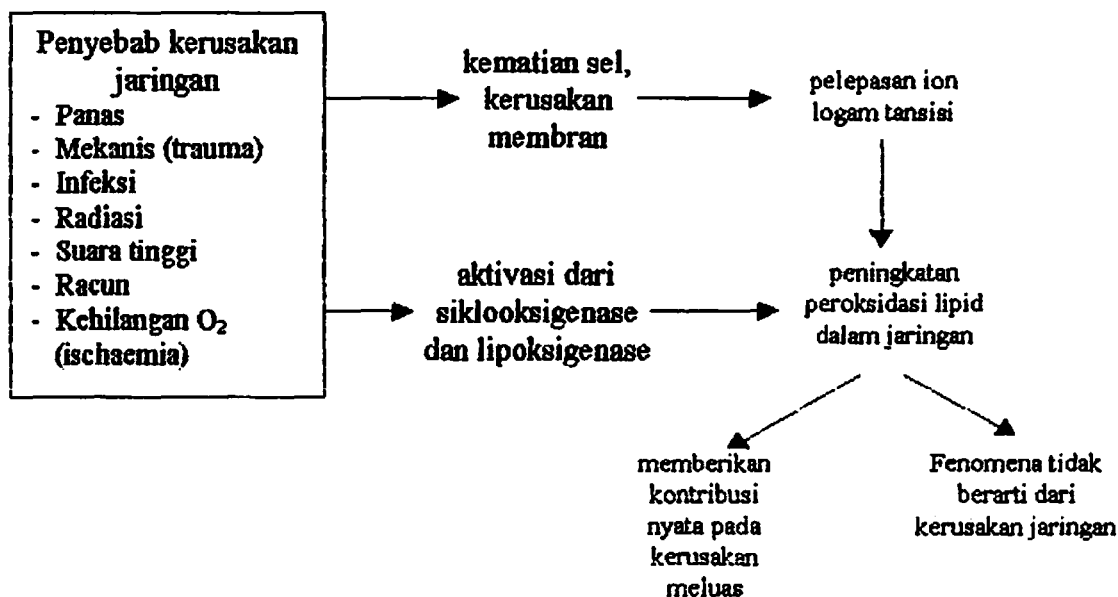
Pembentukan ikatan disulfida (S-S) menimbulkan ikatan intra maupun antar molekul protein sehingga protein kehilangan fungsi biologisnya (Misalnya enzim kehilangan aktivitasnya). Protein dapat juga bereaksi dengan aldehid hasil peroksidasi lipid sehingga menimbulkan apa yang disebut AGE (*Advanced Glycosylated Endproducts*) yang dapat merusak fungsi biologis protein (Evan, and Brucdorfer, 1992; Wijaya, 1996; Suryohudoyo, 1997).

2.2.4 Mekanisme Kerusakan Jaringan Akibat Radikal Bebas

(Jarasch, *et al.*, 1981; Bruder, *et al.*, 1982) didalam (Ward, 1988) mengatakan bahwa Xanthine oxida terdapat dalam sel endotel dan sebagai sumber radikal superoksida anion (O_2^-). Kemudian O_2^- memerlukan besi dan bersama-sama dengan H_2O_2 menyebabkan kematian sel endotel melalui reaksi fenton menghasilkan pembentukan radikal hidroksil ($HO\cdot$) yang dapat meng-aktifkan neutrofil sehingga dapat meningkatkan kemampuan neutrofil untuk membunuh sel endotel.

Produk-produk oksigen yang dihasilkan menyebabkan pelepasan epitel dan sel endotel dari membran dasar yang menimbulkan kerusakan atau gangguan permeabilitas (Harlan, *et al.*, 1981). Kemampuan makrofag untuk menghasilkan radikal oksigen dengan melepaskan sitokin interleukin (IL-1) dan tumor necrosis factor (TNF). IL-1 dan TNF dapat secara langsung mengawali produksi oksidan. Sitokin ini akan meningkatkan radikal oksigen sebagai perantara kerusakan. Kontak sel endotel dengan IL-1 dan TNF menyebabkan perubahan dalam sel endotel seperti peningkatan kepekaan terhadap radikal oksigen sebagai perantara kerusakan jaringan dengan aktivasi neutrofil. Kerusakan sel endotel terjadi dengan adanya H_2O_2 dan besi. Kemampuan sitokin untuk mempengaruhi kepekaan sel

endotel terhadap kerusakan karena makrofag mempunyai efek positif terhadap neutrofil yang secara bersamaan menyebabkan kerusakan jaringan (Ward, *et al* 1988).



Gambar 2. Penyebab kematian sel karena peningkatan reaksi radikal bebas dalam jaringan (Sumber : Gutteridge, *et al.*, 1990).

2.3 Endotel

2.3.1 Fungsi Endotel Pada Sistem Biologis.

Sel endotel mempunyai peranan sangat penting dalam menjaga fungsi fisiologis normal dari dinding pembuluh darah, jika sel ini menjadi disfungsi maka akan terjadi perubahan patofisiologi dalam pembuluh darah.

Dalam keadaan normal endotel memainkan peranan penting dalam melindungi dan menjaga fungsi fisiologis dari dinding pembuluh darah, menghambat kontraksi dan juga migrasi dan pertumbuhan dari sel otot polos pembuluh darah. Juga aktif menghambat proses koagulasi dan merangsang

pelarutan gumpalan yang telah dibentuk di dalam lumen (Fibrinolisis). Endotel juga mempunyai peran penting sebagai anti inflamasi dan mengatur adhesi dan migrasi sel inflamasi kedalam dan menembus dinding pembuluh darah juga aktif dalam mengatur fungsi organ (Flavahan, and Vanhouten, 1995).

Sel endotel dapat melepaskan bermacam-macam mediator vasoaktif yang diaktivasi oleh berbagai rangsangan. Pada kondisi normal mediator vasodilator yang dilepaskan adalah "*Endothelium Derived Relaxing Factor*" (EDRF, NO atau NO donor) dan prostasiklin. Prostrasiklin menyebabkan relaksasi dari otot polos pembuluh darah dengan merangsang adenyl siklase sehingga terjadi peningkatan kadar siklik AMP otot polos. EDRF merangsang guanylate siklase dan meningkatkan kadar siklik GMP. Endotel juga melepaskan substansi yang dapat meningkatkan hiperpolarisasi dari otot polos pembuluh darah dan relaksasi. Studi terbaru menunjukkan bahwa NO dapat menyebabkan hiperpolarisasi, efek ini mungkin diperantarai oleh siklik GMP atau efek langsung dari NO pada Ca channel. Efek EDRF untuk menyebabkan hiperpolarisasi tergantung juga pada adanya atau tidak adanya regangan pada pembuluh darah. Regangan ini langsung memodulasi aktivitas otot polos Ca channel atau sensitivitasnya pada NO (Flavahan, 1992; Busse, *et al.*, 1993; Flavahan, and Vanhoutte, 1995).

Mediator "*endothelium derived vasodilator*" mempunyai efek penting yang lain pada dinding pembuluh darah yang memberi kontribusi untuk berperan menjaga endotel. Agen ini bekerja tidak hanya untuk dilatasi pembuluh darah, ia juga dapat menghambat proliferasi otot polos, agregasi platelet, menghambat adhesi platelet pada permukaan endotel. EDRF juga bekerja sebagai antiinflamasi dengan menghambat adhesi monosit dan neutrofil pada permukaan endotel, dan

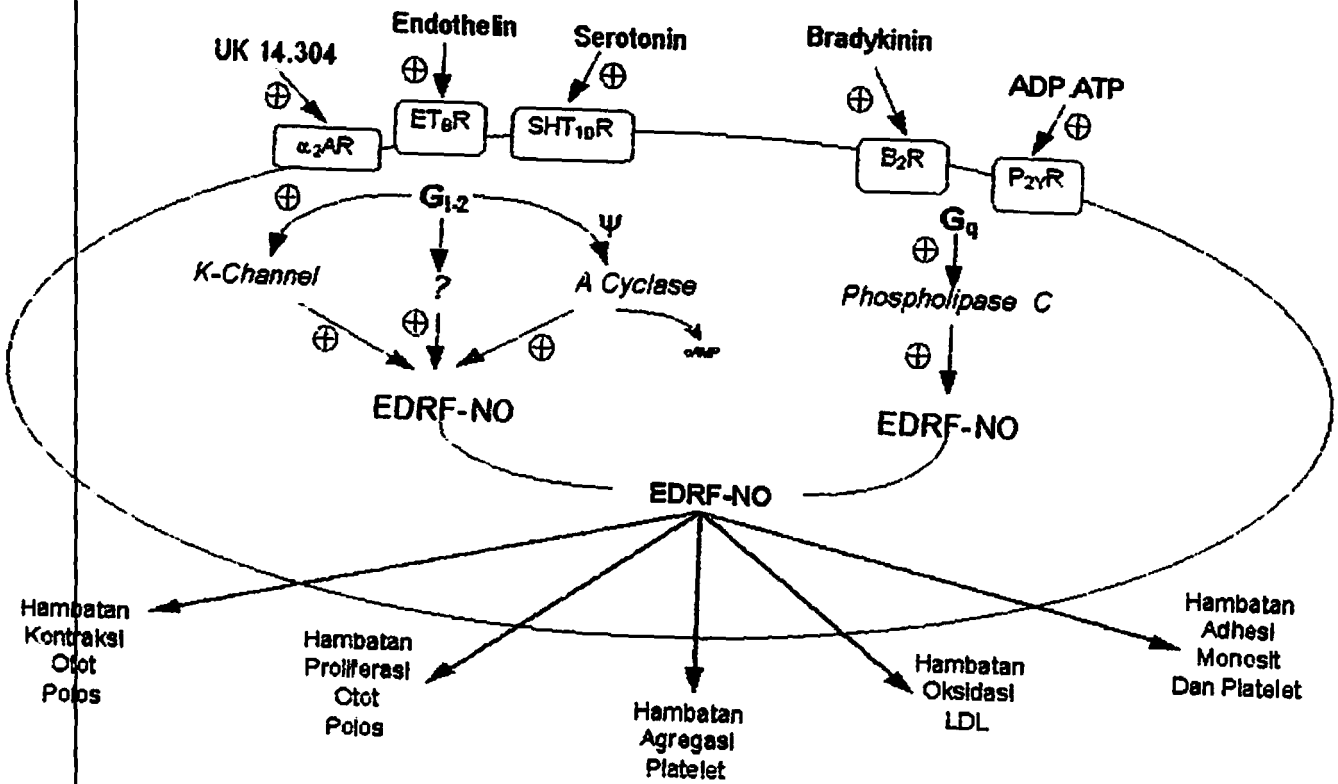
bekerja sebagai antioksidan. EDRF dapat mencegah oksidasi LDL sebagai mediator atherogenik. Kemampuan kerja EDRF untuk menghambat peningkatan pertumbuhan lesi atherosklerosis ditunjukkan dengan kemampuan dari L-arginine sebagai prekursor EDRF untuk menghambat pertumbuhan lesi (Flavahan, and Vanhoutte, 1995).

"*Endothelium derived vasodilator*" yang lain yang juga memberi kontribusi untuk berperan menjaga endotel adalah prostasiklin, seperti juga EDRF ia juga dapat menghambat pertumbuhan otot polos dan aktivasi platelet. Endotel juga melepaskan mediator kontraktile yang disebut "*Endothelium Derived Contracting Factor*" (EDCFs) yang disebut juga endotelin. Endotelin ini menyebabkan kontraksi dengan mengaktivasi reseptor spesifik pada otot polos. EDCFs juga dapat dihasilkan dari metabolisme siklooksigenase dari asam arakhidonik, yang menghasilkan tromboxane dan prostaglandin H₂ yang mengaktivasi reseptor yang sama serta superoksida yang dapat menyebabkan kontraksi secara langsung atau tidak langsung dengan inaktivasi NO (Vanhoutte, 1993).

2.3.2 Endotel Sebagai Pengatur Tonus dan Pertumbuhan Vaskuler

Sel endotel menjadi pusat perhatian sekarang ini. Pada tahun 1980 telah diketahui bahwa sel endotel sebagai sumber utama dari prostasiklin yang berfungsi sebagai vasodilator dan inhibitor platelet yang disebut sebagai "*Endothelium Derived Relaxing Factor*". "*Endothelium Derived Relaxing Factor*" ini diidentifikasi sebagai nitric oxide yang diketahui berfungsi sebagai pengatur tonus vaskuler dan platelet. Konsep ini kemudian berkembang bahwa sel endotel juga dapat mempengaruhi respon dari sel otot polos pembuluh darah.

Baru-baru ini diketahui juga bahwa nitric oxide bekerja sebagai modulator pertumbuhan (Luscher, Rubanyi, *et al.*, 1993).



Gambar 3. Proses transduksi signal sel endotel (Sumber: Flavahan, *et al.*, 1995).

Endotel dalam mengatur tonus vascular dengan melepaskan faktor relaksasi dan kontraksi yang keduanya dalam keadaan basal diaktivasi oleh neurotransmitter, hormon, atau rangsangan fisik. Rangsangan fisik seperti shear stress mempengaruhi "endothelium dependent vasodilatasi" (Luscher TF, and Tanner FC, 1993).

Modulasi irama vaskuler dilaksanakan oleh endotel melalui sintesis dan pelepasan NO. NO yang dihasilkan oleh endotel, disintesis dari L-arginin dengan

bantuan enzim NO sintase (NOS). Pada sintesis ini L-arginin mula-mula akan dihidrolisis menjadi hasil antara N-hidroksil-L-arginin, dan kemudian akan teroksidasi dan menghasilkan NO dan sitrulin. NO akan mengaktifasi guanilat siklase, dan mengakibatkan terbentuknya siklik GMP (cGMP) dan menyebabkan relaksasi sel otot polos dari dinding vaskuler (Wijaya A, 1998).

Sel endotel koroner mengatur irama vaskuler melalui modulasi konsentrasi vasoaktiv lokal (seperti nukleotida adenin, amin biogenik dan bradikinin), dan melalui sintesis dan pelepasan NO, EDHF (*Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor*) dan prostasiklin. Shear stress yang dihasilkan dari hemodinamik aliran darah merupakan stimulus untuk produksi NO basal secara berkesinambungan, yang akan mencegah kontraksi neurogenik dan mitogenik. Pelepasan NO yang tergantung pada shear stress ini mewakili sistem parakin yang sangat efektif untuk menjaga aliran darah yang cukup. Pada tingkat transkripsi NO yang dihasilkan oleh endotel akan menurunkan pengaturan ekspresi beberapa macam gen (MCP-1, P-selektin, dan VCAM-1), dan akan menginhibisi adhesi leukosit dan trombosit. EDHF dapat ikut mengatur irama vaskuler, terutama pada situasi pengurangan produksi NO yang berkaitan dengan disfungsi endotel. Prostrasiklin meningkatkan siklik AMP dalam otot polos dan platelet sehingga dapat menyebabkan relaksasi dan dapat menghambat interaksi monosit dengan endotel, menghambat adhesi dan agregasi trombosit, merangsang relaksasi sel otot polos dan menurunkan akumulasi lipid (Wijaya, 1988).

Endotel sebagai sumber dari faktor kontraksi. Hasil dari siklooksigenase seperti tromboxan A₂ (TX A₂) dan prostaglandin H₂ (PGH₂) mempunyai pengaruh langsung kontraksi vaskuler sedangkan anion superoksid (O₂⁻)

menginduksi peningkatan kontraksi dengan menginaktivasi nitrik Oxide (NO). Endotelin (ET) juga angiotensin II (A II) sebagai faktor “*endothelium derived contracting*” yang dihasilkan oleh sel endotel (Vanhoutte, 1993; Luscher, and Tanner, 1993).

Endotel juga sebagai pengatur pertumbuhan vaskuler dengan menghasilkan faktor pertumbuhan seperti *Fibroblast Growth Factor (FGF)*, *Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)* dan juga endotelin. Faktor-faktor ini mempunyai peranan pada respon proliferasi sel otot polos vaskuler. Pada endotel yang rusak atau mengalami disfungsi akan terjadi peningkatan aktivitas prokoagulan, terutama yang disebabkan oleh interaksi antara faktor jaringan (TF) dan faktor VIIa. TF merupakan kofaktor untuk VIIa, untuk mengaktivasi faktor IX dan X yang menghasilkan trombin, dan dapat merangsang migrasi sel otot polos melalui adhesi platelet, dan pelepasan faktor pertumbuhan seperti PDGF dan FGF (Wijaya, 1998)

2.3.3 Peran Endotel Pada penyakit Kardiovaskuler

Endotel mempunyai peran penting dalam mengatur sirkulasi dengan melepaskan mediator yang dapat mempengaruhi bukan hanya reaktivitas vaskuler tetapi juga remodeling vaskuler dan koagulasi. EDRF adalah endogenous nitroglicerin memainkan peranan dalam pengaturan tonus vaskuler dan menjaga aliran darah koroner selama peningkatan kebutuhan metabolik. Gangguan endotel pembuluh darah untuk melepaskan NO sebagai mediator vasodilatasi dapat disebabkan karena penurunan pembentukannya, peningkatan degradasi, penurunan sensitivitas pada pembentukan NO atau gabungan dari faktor tersebut.

fungsional dari endotel. Pada pembuluh darah hipertensi sel endotel volumenya meningkat, ada penonjolan kedalam lumen, fibrin dan sel adhesi meningkat pada ruang subintimal. Interaksi dari platelet dan monosit dengan endotel meningkat pada pembuluh darah hipertensi. Beberapa pengaruh dari endotel sebagai pengatur vaskuler yang terjadi pada arteri hipertensi meliputi penurunan pembentukan NO dan peningkatan pembentukan prostaglandin H₂ dan penurunan kepekaan pada NO dan peningkatan kadar endotelin. Keseimbangan dari relaksasi yang tergantung endotel dan kontraksi pada pembuluh darah hipertensi memberikan peran pada peningkatan resistensi pembuluh darah perifer atau komplikasi penyakit kardiovaskuler (Luscher, 1990; Luscher, Boulanger *et al.*, 1993; Luscher, and Tanner, 1993).

Hiperlipidemia dan Atherosklerosis

Hiperlipidemia dan atherosklerosis berhubungan dengan pembentukan dan respon otot polos pembuluh darah pada NO dan stimulasi jalur siklooksigenase, faktor kontraking, anion superoksid, angiotensin II dan endotelin. Pada atherosklerosis LDL khususnya LDL teroksidasi terjadi akumulasi, LDL teroksidasi ini akan menginduksi ekspresi preproendotelin messenger RNA dan meningkatkan pelepasan endotelin. LDL teroksidasi juga secara langsung mengaktifasi produksi endotelin dengan mengaktifasi fosfolipase C selanjutnya mengaktifkan protein kinase C untuk melepaskan endotelin. Peningkatan endotelin ini berperan sebagai vasokonstriktor pada pembuluh darah arterosklerosis dan pada tempat tertentu akan berkembang menjadi plak atherosklerosis. Plak artherosklerosis ini mengandung sejumlah elemen seluler abnormal yang meliputi leukosit, makrofag dan adhesi platelet, yang melepaskan agen vasoaktif, termasuk

Ketidakepaan mekanisme ini menimbulkan gangguan patologi yang sering disebut disfungsi endotel (Sozmen, *et al.*, 1988).

Letak endotel secara anatomi yang strategis antara aliran darah (lumen) dan otot polos Vaskuler (lapisan media dinding pembuluh darah), endotel sangat tepat sebagai organ target dan modulator dari tekanan darah atau dari pengaruh hormonal. Pengaruh fungsi endotel seperti gangguan pelepasan EDRF atau peningkatan pelepasan EDCF merupakan faktor penting dalam menimbulkan kondisi patologi termasuk penyakit kardiovaskuler dan adanya pengaruh "Mechanical Forces" seperti tekanan dan shear stress khususnya pada tempat percabangan dimana aliran darah tidak laminar (Luscher, and Tanner, 1993; Drexler, 1996).

Aging (Penuaan)

Umumnya aging (penuaan) dihubungkan dengan penurunan pembentukan faktor relaksasi dan meningkatkan pembentukan faktor kontraksi. Aging (Penuaan) merupakan salah satu faktor penting yang menentukan penyakit vaskuler. Pada aorta dari tikus, aging (Penuaan) berhubungan dengan peningkatan pembentukan dari EDCF (prostaglandin H_2) juga menurunkan pelepasan EDRF (Luscher, 1990; Luscher, Boulanger, *et al.*, 1993; Luscher, and Tanner, 1993).

Hipertensi

Endotel sangat nyata sebagai target dari peningkatan tekanan darah. Sel endotel sangat peka terhadap pengaruh fisik seperti aliran darah. Pada hipertensi perubahan morfologi yang menyolok terjadi pada lapisan intima. Pengaruh fisik seperti shear stress, kelenturan dan tekanan meningkatkan perubahan fungsional dari sel endotel. Hipertensi berhubungan dengan perubahan morfologi dan



tromboksen A2 dari platelet dan leukosit, leukotrine dari leukosit, oksigen derived radikal dari leukosit dan makrofag dan vasokonstriktor prostanoid dari leukosit. LDL teroksidasi menurunkan relaksasi yang tergantung endotel yang merupakan efek dari penurunan pembentukan NO. Pada arteriosklerosis juga terjadi defisiensi signal membran dalam sel endotel, defisiensi arginin dan peningkatan degradasi EDRF oleh anion superoxide (Luscher, Boulanger, *et al.*, 1993; Luscher, and Tanner, 1993; Drexler, 1996).

Ada beberapa langkah strategis yang dapat dilakukan untuk memperbaiki kerusakan endotel pada proses atherosklerosis antara lain dengan jalan : Terapi untuk menurunkan kholesterol, konsumsi makanan yang kaya minyak ikan, pemberian L-arginine sebagai prekursor NO dan mencegah degradasi NO melalui inaktivasi radikal bebas superoksida dengan superoksida dismutase. Langkah ini penting dalam pencegahan penyakit arteria koronaria khususnya penyakit kardiovaskuler (Meredith, *et al.*, 1993).

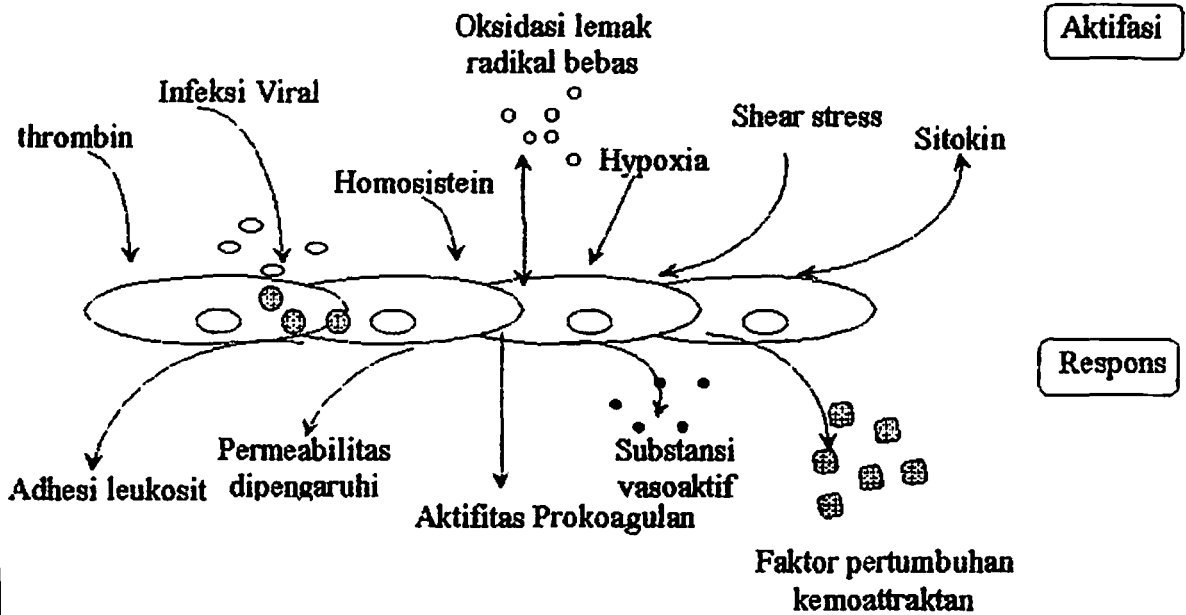
2.3.3 Disfungsi Sel Endotel

Modulasi sel endotel untuk melepaskan EDRF dalam jumlah sedikit akan menghilangkan peranan molekul ini. Sel juga akan aktif meningkatkan proses atherogenik dengan mengekspresikan molekul adhesi dari monosit sirkulasi (VCAM, ICAM-1) dan dengan melepaskan molekul khemotaktik sebagai target pengambilan monosit (MCP1 = *Monosit Chemotaktik Molekul*), faktor deferensiasi monosit (M-CSF, *Macrophage Colony Stimulating Factor*) yang mengatur migrasi, proliferasi, deferensiasi dan metabolisme monosit, makrofag dan signal khemotatik dan mitogenik untuk otot polos vascular (PDGF, bFGF)

yang menstimulasi infiltrasi dan proliferasi sel otot kedalam ruang subendotel (Flavahan, and Vanhoutte, 1995; Wijaya, 1998).

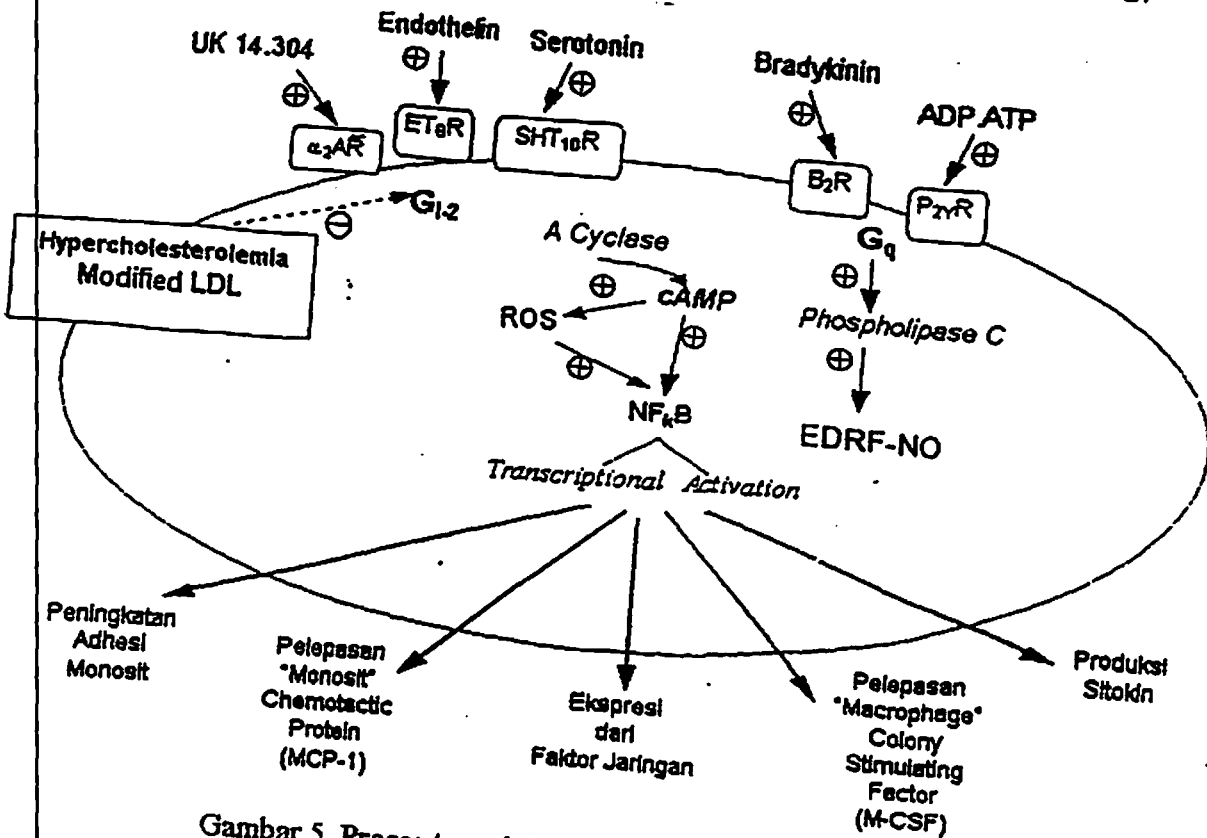
Modulasi sel endotel juga menghasilkan spesies oksigen reaktif seperti superoksida anion yang mempunyai kontribusi pada oksidasi LDL dan meningkatkan oksidan stress dalam dinding pembuluh darah. Perubahan molekuler yang terjadi pada disfungsi atau modulasi sel endotel juga diinduksi oleh minimal modifikasi LDL (MM LDL). MM LDL akan meningkatkan adhesi monosit pada permukaan endotel, menginduksi ekspresi MCP-1, M-CSF, G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) dan GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage CSF*) dan meningkatkan aktivitas prokoagulan pada sel endotel dengan menginduksi ekspresi faktor jaringan, reseptor dan kofaktor dari faktor VII/VIIa (Wijaya, 1998).

Gangguan signal dari endotel protein G_{12} akan menurunkan peranan protektif dari endotel dengan menurunkan pelepasan EDRF sebagai respon aktivasi fisiologik dari sel. Gangguan signal protein G_{12} juga menyebabkan endotel aktif mengembangkan proses penyakit. Endotel protein G_{12} menghambat adenyl siklase yang menyebabkan penurunan kadar siklik AMP dalam endotel. Hambatan fungsi protein G_{12} akan menyebabkan peningkatan siklik AMP dalam endotel yang merupakan "*dependent activation*" dari faktor transkripsi nuklear NF κ B yang menyebabkan peningkatan adhesi monosit, pelepasan *Monosit Chemotatik Protein* (MCP-1), faktor jaringan, pelepasan *Makrofag Colony Stimulating Factor* (M-CSF) dan faktor pertumbuhan sitokin (Flavahan, and Vanhoutte, 1995; Wijaya 1998).

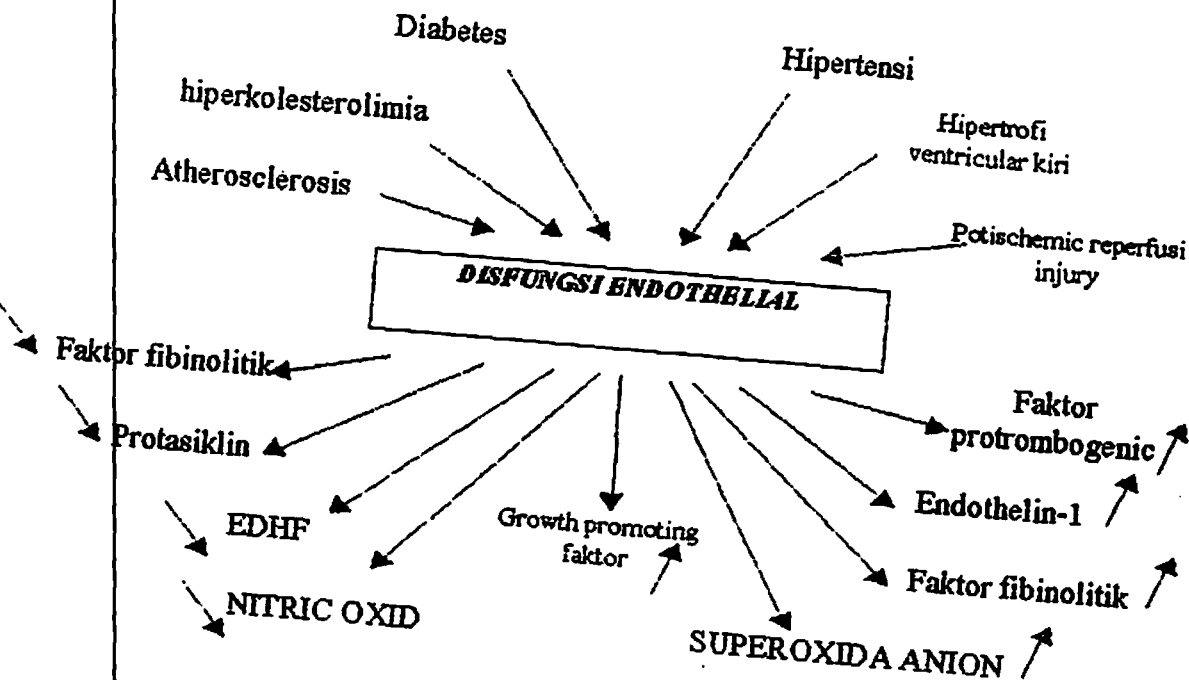


Gambar 4. Rangsangan Terjadinya Disfungsi Endotel
(Sumber:Wijaya, 1998).

Reaktif oksigen spesies dapat secara langsung mempengaruhi proses signal transduksi protein G (Pieper GM, and Gross GJ, 1989). Peningkatan stress oksidatif dapat terjadi sebagai penyebab dari disfungsi dalam protein G_{12} . Aktivasi NF κ B selalu dihubungkan dengan stress oksidatif dan dapat meningkat oleh peningkatan spesies oksigen reaktif. Oleh karena siklik AMP merupakan perantara aktivasi NF κ B disebabkan oleh gangguan protein G_{12} atau oleh MM LDL juga oleh peningkatan stress oksidatif (Collins, 1993).



Gambar 5. Proses transduksi signal pada disfungsi sel endotel (Sumber : Flavahan, 1995).



Gambar 6. Disfungsi Endotel (Sumber:Wijaya, 1998)

2.4 ANTI-OKSIDAN

Aktivitas oksidan dapat diredam oleh anti-oksidan. Dalam pengertian kimia antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*elektron donor*), tetapi dalam arti biologis, pengertian antioksidan lebih luas yaitu semua senyawa yang dapat meredam dampak aktivitas oksidan, termasuk enzim dan protein pengikat logam.

Terdapat dua kelompok antioksidan dalam tubuh kita :

1. Anti-oksidan pencegah (*preventive anti-oxidant*), mencegah terhimpunnya senyawa oksidan secara berlebihan.

Pada dasarnya antioksidan jenis ini tertuju pada terbentuknya radikal hidroksil, yaitu radikal yang paling berbahaya. Untuk membentuk radikal hidroksil diperlukan tiga komponen yaitu : logam transisi Fe atau Cu, H_2O_2 dan O_2^- . Agar reaksi tak terjadi, maka harus dicegah adanya ion Fe^{+++} atau Cu^{++} bebas, untuk itu berperan sebagai protein pengikat logam adalah :

- transferrin dan ferritin untuk Fe dan
- seruloplasmin dan albumin untuk Cu

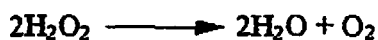
A. Antioksidan yang menghambat pembentukan O_2^- adalah :

Enzim superoksida dismutase (SOD) yang mengkatalisis reaksi dismutase :

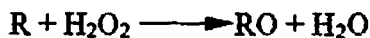


B. Antioksidan yang menghambat pembentukan H_2O_2 melalui dua jenis enzim yaitu:

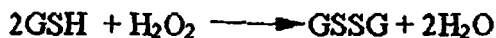
-Katalase, yang menghasilkan reaksi dismutase H_2O_2 :



-Peroksidase, yaitu sekumpulan enzyme yang mengkatalisis reaksi sebagai berikut :



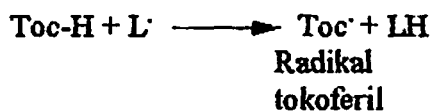
Diantara peroksidase, yang paling penting adalah glutathion peroksidase (GSP_x), yang mengkatalisis reaksi :



Apabila radikal hidroksil masih saja terbentuk, maka masih ada sarana untuk meredamnya tanpa memberi kesempatan untuk memulai reaksi rantai. Sarana tersebut berupa senyawa-senyawa sulfidril (sistein dan glutathion) dan asam askorbat (vitamin C) (Evan, and Bruedorfer, 1992; Wijaya, 1996; Suryohudoyo, 1997).

2. Anti-oksidan pemutus rantai (*chain breaking-anti-oxidant*). Mencegah reaksi rantai yang berkelanjutan.

Dalam kelompok antioksidan ini termasuk vitamin E (tokoferol), beta karoten dan tiga senyawa yang juga berperan sebagai antioksidan pencegah, yaitu sistein, glutathion dan asam askorbat. Tokoferol dan beta karoten bersifat lipofilik (larut dalam lemak), sisanya hidrofilik (larut dalam air). Anti oksidan lipofilik berperan pada membran sel, sedangkan antioksidan hidrofilik berperan dalam sitosol dan cairan ekstra sel. Reaksi rantai terutama terjadi pada membran sel, berupa reaksi peroksidasi lipid. Karena membran sel hanya dapat ditembus oleh senyawa lipofilik, maka yang berperan disini adalah antioksidan lipofilik khususnya vitamin E (tokoferol). Didalam membran sel, tokoferol bereaksi dengan radikal lipid (L[•]) dan peroksilipid (LOO[•]).





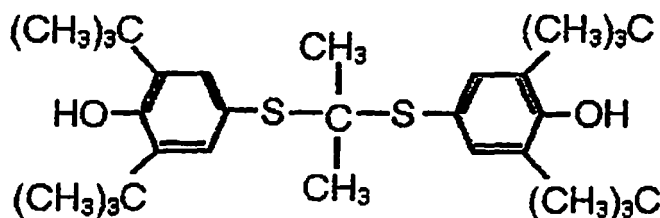
Radikal tokoferil (Toc[·]) tak terlalu reaktif karena terjadinya resonansi yang disebabkan oleh delokalisasi elektron intramolekuler. Radikal tokoferil ini dapat hilang dengan dua cara :

1. Radikal tokoferil mengalami reaksi intramolekul, menghasilkan tokoferil quinon (TQ) yang non radikal.
2. Radikal tokoferil bila mencapai permukaan membran akan bereaksi dengan antioksidan hidrofilik seperti asam askorbat, sistein dan glutation (Evan CR, and Brucdorfer, 1992; Wijaya, 1996; Suryohudoyo, 1997).

2.5 Antioksidan Probucol

2.5.1 Struktur Kimia

Probucol mengandung dua molekul tertiary butylatedhydroxytoluene yang dihubungkan dengan jembatan sulfur-carbon-sulfur, Srtukturnya dianalogkan dengan t.butyl-hydroxytoluene yang merupakan antioksidan BHT, umumnya digunakan sebagai food additive (Godmen, 1995). Struktur Probucol sebagai berikut :



Gambar 7. Stuktur kimia Probucol
(Sumber : Evan, *et al.* , 1992; Godmen, 1995).

2.5.2 Sifat Kimia Fisik

Probucol berupa serbuk kristal putih, tidak larut dalam air tetapi larut dalam alkohol, spirtus, sangat larut dalam kloroform dan propil alkohol, dan harus terlindung dari sinar matahari (Reynolds, 1993).

2.5.3 Mekanisme Kerja

Penurunan kadar LDL dihubungkan dengan peningkatan kecepatan pembersihan LDL dari plasma. Pada individu normal pembersihan terjadi lewat reseptor LDL. Pembersihan LDL oleh Probucol lewat mekanisme reseptor independen. Probucol menginduksi perubahan komposisi LDL sehingga menyebabkan peningkatan kecepatan pembersihan LDL. Efek penurunan kadar kholesterol HDL oleh Probucol belum diketahui dengan jelas. Studi kinetik mengatakan bahwa Probucol menginduksi penurunan kecepatan produksi Apo A-1. Disamping itu Probucol juga meningkatkan jumlah dan aktivitas Cholesterol Ester Transfer Protein (CETP) yang mengakibatkan transfer ester kholesterol HDL pada lipoprotein lain untuk masuk kedalam hati. Probucol meningkatkan pengangkutan kholesterol roden yang disebut "*Selective Uptake Pathway*" yang memperantarai pengangkutan kholesterol dari lipoprotein pada sel independen untuk uptake partikel lipoprotein (Godmen, 1995).

Mekanisme dari Probucol menurunkan kadar HDL dan efeknya pada Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) menunjukkan bahwa terapi dengan Probucol dapat meningkatkan kadar CETP mRNA dan aktivitas CET spesifik pada hCETP-CHO cel line, dan juga Probucol dapat meningkatkan pengeluaran

kholesterol dari hCETP-CHO yang dapat menyebabkan penurunan kadar kholesterol intarseluler (Ou J, Saku, *et al.*, 1998).

2.5.4 Probucol Sebagai Antioksidan

Probucol adalah komponen antioksidan lipofilik yang poten. Perkembangan sebagai antioksidan digunakan dalam pabrik atau industri "tires", tetapi Probucol mempunyai aktivitas penurunan kadar kholesterol dan mulai dipasarkan selama beberapa tahun ini untuk agen hipolipidemi. Potensinya sebagai antioksidan ditemukan sekitar tahun 1986 dan tahun 1987 dilaporkan bahwa Probucol dapat menghambat atherosklerosis pada kelinci. Efek aktivitasnya sebagai antioksidan dihubungkan dengan kemampuannya menghambat atau melindungi LDL dari oksidasi (Godmen, 1995).

Probucol dapat mengurangi oksidasi LDL yang dapat mengganggu sintesis dari PGI₂ dan vWF. Hasil ini menunjukkan bahwa Probucol dapat memberikan keuntungan dalam pencegahan atherosklerosis oleh adanya intervensi adhesi monosit pada sel endotel. Efek ini dihubungkan dengan pengaruh oksidasi LDL dalam menginduksi ekspresi P-selektin dan mencegah sintesis PGI₂ (Li, Chen, *et al.*, 1998).

Oksidasi LDL memainkan peran pada proses atherogenesis, mekanisme efek biologi dari oksidasi LDL ini secara *invivo* berhubungan dengan aktivasi dari faktor transkripsi nuklear kappa B dalam endotel, seperti juga ekspresi endotel pada intercelluler adhesion molekul-1. Pada pemberian injeksi LDL bersama dengan antioksidan Probucol menunjukkan adanya akumulasi apolipoprotein B

didalam arteri tetapi aksresi dari oksidasi LDL-spesifik epitope mengalami penurunan dalam waktu 24 jam (Calara, Dimayuga, *et al.*, 1998).

Antioksidan Probucol tidak hanya mencegah oksidasi LDL tetapi LDL juga dapat menginduksi sekresi ET-1 pada sel endotel pembuluh darah. Peningkatan Ca^{2+} dari sel endotel akan membuka "voltage dependent Ca^{2+} chanel", untuk menginduksi pelepasan ET-1 (Chen, Tseng, *et al.*, 1998).

Data terbaru menunjukkan bahwa pengobatan dengan Probucol dapat mencegah superoksida anion radikal yang dapat menginduksi inaktivasi EDRF dan menurunkan stress oksidan melalui penurunan kadar superoksida anion radikal (Inoue, Ohara, *et al.*, 1998).

2.5.5 Farmakokinetika

Absorpsi Probucol dipengaruhi oleh kandungan lemak dalam diet. Konsentrasi puncak dalam darah meningkat jika obat diberikan bersama makanan. Probucol ditransport kedalam celah hidrophobik partikel lipoprotein yang kaya partikel LDL. Dalam jaringan lemak Probucol sebagai partisi. Pemakaian selama 4 bulan tidak memperlihatkan peningkatan kadar puncak dalam plasma. Efek pada kadar lipoprotein khususnya HDL dapat dilihat selama 6 bulan. Ekskresinya sebagian besar lewat empedu. Probucol tersedia untuk pemberian oral, dose 500 mg 2X sehari bersama makanan (Reynolds, 1993; Godmen, 1995).

2.5.6 Penggunaan Terapi

Probucol digunakan dalam pengobatan hiperkholesterolaemia dengan mekanisme kerjanya meningkatkan pembersihan (*clirens*) HDL dan LDL

kholesterol dari sirkulasi tanpa mempengaruhi trigliserida dengan meningkatkan ekskresi kholesterol dari empedu. Probucol mempunyai efek antioksidan pada proses atherogenik karena oksidasi LDL yang dalam jumlah tinggi akan mudah masuk kedalam dinding arteri sehingga Probucol dapat menghambat ateroma dengan tidak tergantung efeknya pada lipid darah (Opie, 1991; Reynolds, 1993; Godmen, 1995).

Efek Probucol menurunkan kadar kholesterol plasma tanpa mempengaruhi kadar trigliserida, penurunan kadar kholesterol LDL cukup bervariasi, pada sebagian besar subyek penurunan antara 20 % atau lebih. Penggunaan sebagai agen tunggal rata-rata penurunannya antara 10-15 %. Sedangkan penurunan kadar kholesterol HDL cukup konstan dan rata-rata penurunannya antara 20-30 % (Godmen,1995).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian antioksidan Probucol pada tikus putih yang menerima stressor.

3.1.2 Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan bahwa antioksidan Probucol dapat menghambat peningkatan kadar Malondialdehyde pada tikus putih yang menerima stressor.
2. Untuk membuktikan bahwa antioksidan Probucol dapat menghambat peningkatan jumlah "*Circulating Endothel*" tikus putih yang menerima stressor.

3.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat secara ilmiah sebagai berikut :

Memberikan informasi bahwa pemberian antioksidan khususnya Probucol dapat mencegah peningkatan efek kadar Malondialdehyde, dan perubahan jumlah "*Circulating Endothel*" akibat pelepasan radikal bebas yang berhubungan dengan stressor.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan memakai Rancangan Acak Lengkap (Steel and Torrie, 1981).

4.2 Sampel dan Besar Sampel

Dalam penelitian ini digunakan binatang percobaan tikus albino Wistar jantan dengan berat badan sekitar 200 gram, sehat dengan umur sekitar 3 bulan. Besar sampel untuk setiap perlakuan sebanyak 7 ekor.

4.3 Variabel Penelitian

A. Variabel Bebas.

Dalam penelitian ini digunakan kombinasi 2 variabel bebas, yaitu :

1. Variabel pemberian stressor
2. Variabel penambahan antioksidan Probucol

B. Variabel Kendali

Dalam penelitian ini digunakan beberapa variabel kendali, Yaitu ;

- Tikus yang digunakan berjenis kelamin jantan
- Usia tikus kurang lebih 3 bulan
- Digunakan tikus dengan berat badan yang seragam
- Pakan tikus adalah pakan ayam dari PT Charoen Pokphand yang dibuat pellet
- Kandang dengan kondisi sama

C. Variabel Akibat (Tergantung)

- Kadar Malondialdehyde akibat pemberian antioksidan Probucol pada tikus yang menerima stressor.
- Jumlah sel endotel pada "*Circulating Endothel*" akibat pemberian antioksidan Probucol pada tikus yang menerima stressor.

4.4 Definisi Operasional Variabel

- a. Stressor adalah pemberian beban kerja aktivitas fisik dengan memasukkan hewan percobaan tikus dengan diberi beban pada ekor 2 % BB (Brady, *et al.*, 1979) kedalam air supaya berenang hingga lelah, dengan menggunakan stop watch tiap hari dimulai pukul 07.00 –07.30 pagi selama 3 minggu.
- b. Kadar Malondialdehyde adalah hasil dari reaksi peroksidasi lipid yang terjadi akibat peristiwa oksidasi pada lipid yang mengandung asam lemak dengan banyak ikatan rangkap didalam sel tubuh tikus dan ditandai dengan terbentuknya senyawa Malondialdehyde yang diperoleh dengan mengukur selisih konsentrasi tes dengan absorbansi dari hasil pemeriksaan serum dengan menggunakan Na Thiobarbiturat.
- c. "*Circulating Endothel*" (CE) adalah endotel yang lepas (terdapat inti) dan berada dalam sirkulasi (per 1,8 Cmm).

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Hewan Percobaan

Dalam penelitian ini digunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan, umur 3 bulan, sehat dengan berat badan sekitar 200 gram.

4.5.2 Bahan Pakan dan Minuman

Pakan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pakan anak ayam buatan PT Charoen Pokphand Indonesia, animal Feedmill Co. Ltd.

Air minum yang digunakan adalah air bersih dari PDAM Surabaya

Pemberian pakan dan air minum dilakukan secara adlibitum.

4.5.3 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah reagensia dengan derajat kemurnian p.a (program analisis) yang meliputi : Disodium EDTA, TEP (1,1,3,3-tetraetoksipropana), asam tiobarbiturat, asam klorida pekat, asetonitril, air demineralisata, serbuk Probucol, Na Citrat, Adrenalin, Na Cl , eter anestesi.

4.5.4 Instrumen

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah : kandang tikus, bak air, sonde lambung, alat-alat bedah, stop watch, alat suntik 5 ml sekali pakai, pot plastik, neraca analitis, tabung reaksi beserta raknya, pipet ukur, mikroskop, Improve Neubauer dan dan spektrofotometer.

4.6 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan dimulai awal bulan Mei hingga Agustus 2001. Pemeriksaan kadar Malon dialdehide dan "*Cirkulating Endothel*" dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Farmasi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

4.7 Prosedur Penelitian

I. Tahap Persiapan

Seluruh hewan percobaan yang berumur 3 bulan dikondisikan dengan lingkungan, pakan, selama 7 hari, sambil diamati kondisi kesehatannya.

II. Pemberian Stressor pada tikus

Pemberian stressor pada tikus dilakukan dengan memberikan beban kerja aktivitas fisik renang "*Behavioural despair*" (Willner, 1990). Satu hari sebelum direnangkan tikus ditimbang berat badannya untuk menentukan berat beban pada ekor, dengan beban ekor 2 % dari berat badan tikus, kemudian memasukkan hewan coba kedalam air dan diusahakan supaya hewan berenang, kemudian hewan coba dirangsang 3x secara mekanik (menekan pantatnya) tidak memberikan gerakan berenang atau dengan menghitung sampai 5 kali, maka hewan coba diangkat dari air. Dilakukan setiap hari selama 3 minggu tiap pukul 07.00 WIB selama 30 menit.

III. Tahap Perlakuan

Seluruh hewan percobaan dibagi secara acak dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus. Probucol diberikan secara oral dengan menggunakan sonde sehari sekali selama 3 minggu setelah kira-kira 30 menit tikus diberi perlakuan stressor selama 3 minggu juga. perincian mengenai perlakuan terhadap masing-masing kelompok adalah sebagai berikut :

Kelompok Kontrol:

Kelompok Po1 : 7 ekor tikus hanya diberi pelarut Probucol peroral selama 3 minggu.

Kelompok Po2 : 7 ekor tikus diberi pelarut Probuocol dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu.

Kelompok perlakuan :

Kelompok P1 : 7 ekor tikus diberi Probuocol dosis I (5 mg/ekor) dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu.

Kelompok P2 : 7 ekor tikus diberi Probuocol dosis II (10 mg/ekor) dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu.

Kelompok P3 : 7 ekor tikus diberi Probuocol dosis III (20 mg/ekor) dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu.

Pada hari ke-terakhir setelah mendapat perlakuan seluruh hewan percobaan dari semua kelompok dianestesi dengan eter dan diambil darahnya sebanyak 5-8 ml melalui jantung (*cardiac puncture*), dimasukkan dalam tabung yang telah diisi dengan anti koagulansia Na Sitrat 3,8 % (1:10) untuk sampel pemeriksaan "*Circulating Endothel*" yaitu sekitar 2 ml darah dan 200 μ l asam sitrat. Untuk pemeriksaan Kadar MDA serum sisa darah tanpa koagulansia kemudian didiamkan selama 1/2 jam, selanjutnya dipusingkan selama 10 menit, serum diambil dan disimpan pada -20°C , sampai dilakukan pemeriksaan MDA selanjut

4.8 Pemeriksaan sampel darah

4.8.1 Penetapan kadar malondialdehida dalam darah

Penetapan kadar Malondialdehida dalam darah dilakukan dengan metoda Epsinosa Mansila (1973). Pengukurannya berdasarkan jumlah Malondialdehida yang bereaksi dengan reagen asam Tiobarbiturat. Kadar Malondialdehida yang terdeteksi ini dianggap proporsional dengan konsentrasi peroksida lipid plasma.

Tahap penetapan kadarnya adalah sebagai berikut :

1. Kedalam 0,5 ml plasma ditambahkan 2,5 ml larutan 20 % TCA, kemudian campuran dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar.
2. Campuran disentrifugasi pada 3500 rpm selama 10 menit dan supernatannya didekantasi.
3. Endapan dicuci satu kali dengan larutan 0,05 M H_2SO_4 .
4. Selanjutnya kedalam endapan ditambahkan 2,5 ml 0,05 M H_2SO_4 dan 3,0 ml 0,2 % TBA dan 2 M Natrium Sulfat dan campuran dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 30 menit.
5. Setelah pendinginan di dalam air dingin, kromogen yang dihasilkan diekstraksi dengan 4,0 ml n-butanol dengan pengocokan terus menerus selama 10 menit.
6. Fase n-butanol dipisahkan dengan sentrifugasi pada 300 rpm selama 10 menit, dan serapannya diamati pada panjang gelombang 533 nm.
7. Dihitung kadar Malonaldehyde dalam plasma dengan menggunakan persamaan garis regresi dari kurva baku larutan Malondialdehyde.

4.8.2 Cara memperoleh dan penghitungan endotel

Pemeriksaan "*Circulating Endothel*" menggunakan metode Hladovec and Rossman (1973), dengan modifikasi metode yang dikembangkan oleh Widjayanto, Widodo, Rudiyo (1995).

1. Darah tikus sebanyak 2 ml ditambah Na Citrat 3,8 % 0,2 ml (10:1), sentrifugasi dengan suhu 4°C, 395 g selama 20 menit (Membuat PRP).

2. Ambil 1 ml PRP ditambah 0,2 ml adrenalin 1 mg/ml (sebagai agregator) kemudian digoyang-goyang selama sekitar 10 menit. Sentrifugasi pada suhu 4°C, 395 g selama 20 menit.
3. Supernatan (mengandung endotel) dipisahkan kemudian disentrifugasi lagi pada suhu 4°C, 2100 g selama 20 menit.
4. Supernatan dibuang dan endapan ditambah 0,1 ml Na Cl (0,9 %) kemudian diaduk.
5. Teteskan kekamar hitung (Improve Neubauer) dan dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran obyek 10 X. Hitung pada dua kamar hitung (masing-masing 9 area/kotak) dan kemudian dinyatakan dalam CE/1,8 Cmm.

4.9 Analisis Data

Data yang terkumpul dari pemeriksaan kadar MDA dan Circulating endothel dianalisis dengan uji analisis varian (Anava). Bila terdapat perbedaan diantara kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji LSD.

Untuk melihat korelasi kadar Malondialdehyde (MDA) serum dengan jumlah "Circulating Endothel" digunakan uji korelasi dengan "Scarter plot" dengan memperhatikan r (rho), dan square (r^2) nya untuk melihat pengaruhnya dengan rumus:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

atau

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{(n(\sum X^2) - (\sum X)^2)(n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2)}}$$

Untuk mengetahui apakah koefisien korelasi suatu sampel dari suatu perlakuan tidak terjadi karena suatu kebetulan saja seperti hubungan kadar MDA serum dengan jumlah "*Circulating Endothel*" dilakukan uji r (rho) bahwa $H_1 : r \neq 0 : df = n-1$, tingkat signifikansi (*level of confidence*) 95 % atau (1,96) menggunakan rumus :

$$t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Apabila $t > 1,96$, maka H_0 ditolak ($H_1 : r \neq 0$) pada "*level of confidence*" 95%, artinya kita yakin bahwa ada hubungan (korelasi) antara MDA serum dengan "*Circulating Endothel*" dan bukan karena kebetulan.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Pengaruh Antioksidan Probucol Terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA)

Dalam Darah Pada Tikus Putih Yang Menerima Stressor.

Hasil penelitian pengaruh antioksidan Probucol terhadap kadar Malondialdehyde (MDA) dalam darah pada tikus putih yang menerima stressor disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Kadar MDA dalam darah pada tikus yang menerima stressor dan penambahan antioksidan Probucol pada berbagai dosis $\mu\text{M}/\text{ml}$.

Ulangan No.	Perlakuan				
	Po1	Po2	P1	P2	P3
1	2,341	6,571	1,918	1,241	1,721
2	2,736	6,386	1,692	1,580	1,692
3	2,426	5,633	1,682	1,467	2,116
4	2,313	5,826	1,749	1,523	1,692
5	2,679	5,957	2,003	1,551	1,889
6	2,649	6,268	1,974	1,269	2,256
7	3,179	5,738	1,861	1,156	1,861
$\bar{X} \pm \text{SD}$	2,618 \pm 0,300	6,054 \pm 0,356	1,8656 \pm 0,113	1,398 \pm 0,1716	1,889 \pm 0,2209

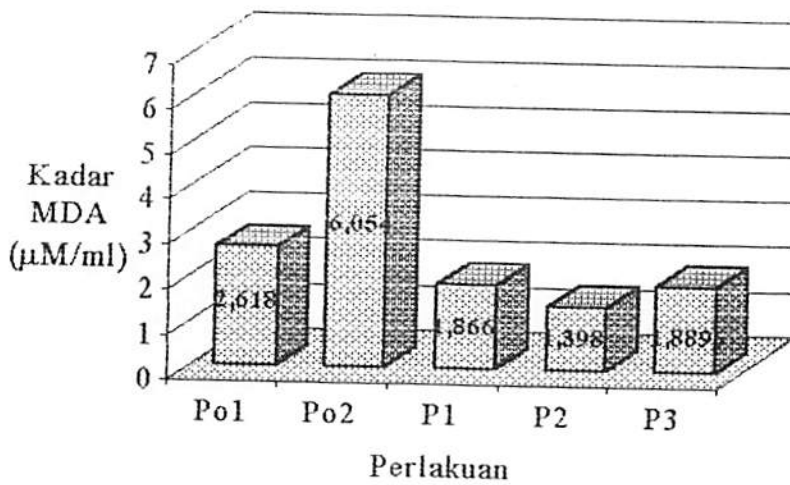
Keterangan : Po1 : Kontrol

Po2 : Kontrol stressor

P1 : Stressor + antioksidan Probucol dosis 5 mg/ekor

P2 : Stressor + antioksidan Probucol dosis 10 mg/ekor

P3 : Stressor + antioksidan Probucol dosis 20 mg/ekor



Gambar 8. Rata-rata kadar MDA dalam darah ($\mu\text{M/ml}$) pada tikus putih yang menerima stressor dan penambahan antioksidan Probuocol pada berbagai dosis.

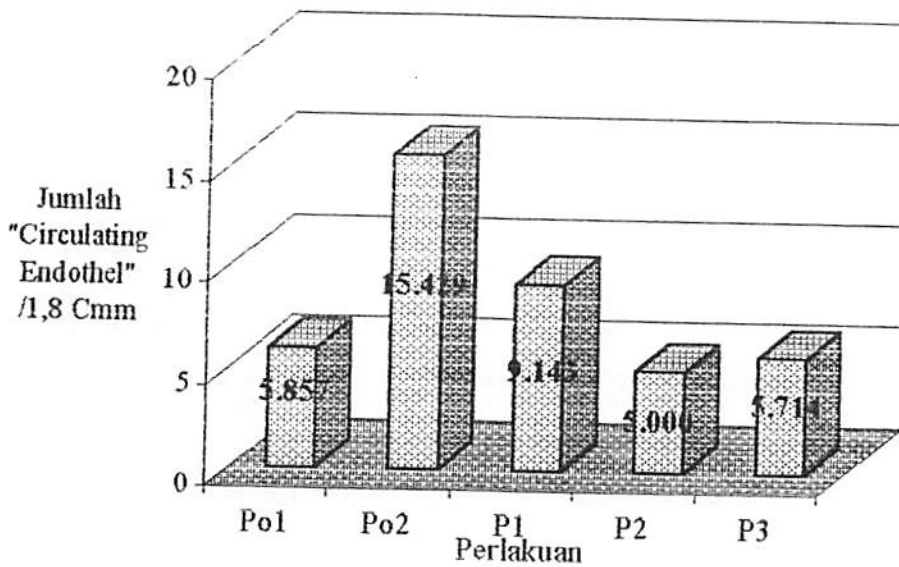
Pada tabel 1. dan gambar 8. menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA dalam darah tikus putih yang menerima stressor, bila dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan pada pemberian antioksidan Probuocol terdapat penurunan. Rerata dan simpangan baku di tikus putih yang tidak mendapat perlakuan/kontrol (Po1) kadar MDA dalam darah $2,618 \pm 0,300 \mu\text{M/ml}$. Sedangkan pada tikus putih yang menerima stressor (Po2) kadar MDA dalam darah $6,054 \pm 0,356 \mu\text{M/ml}$. Pada tikus putih yang menerima stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol pada dosis I, 5 mg/ekor (P1) kadar MDA dalam darah $1,866 \pm 0,113 \mu\text{M/ml}$. Antioksidan Probuocol dosis II, 10 mg/ekor (P2) kadar MDA dalam darah $1,398 \pm 0,172 \mu\text{M/ml}$. Antioksidan Probuocol dosis III, 20 mg/ekor (P3) kadar MDA dalam darah $1,889 \pm 0,221 \mu\text{M/ml}$.

5.1.2 Pengaruh Antioksidan Probucol Terhadap Jumlah "Circulating Endothel" Pada Tikus Putih Yang Menerima Stressor.

Hasil penelitian pengaruh antioksidan Probucol terhadap jumlah "*Circulating Endothel*" pada tikus putih yang menerima stressor dan pemberian antioksidan Probucol pada berbagai dosis disajikan pada tabel 2 dan gambar 9.

Tabel 2. Jumlah "*Circulating Endothel*" pada tikus putih yang menerima stressor dan antioksidan probucol pada berbagai dosis. /1,8Cmm.

Ulangan	Perlakuan				
	Po1	Po2	P1	P2	P3
1	6	14	13	4	7
2	4	8	6	4	5
3	2	16	8	4	6
4	6	20	10	9	3
5	6	19	13	2	9
6	8	22	6	7	7
7	9	9	8	5	3
$\bar{X} \pm SD$	5,857±2,340	15,43±5,41	9,14±2,97	5,000±2,309	5,714±2,215



Gambar 9. Rata-rata jumlah "Circulating Endothel" pada tikus putih yang menerima stressor dan penambahan antioksidan Probuocol pada berbagai dosis/1,8Cmm.

Pada tabel 2. dan gambar 9. terlihat bahwa pada tikus putih yang menerima stressor jumlah "Circulating Endothel" meningkat dibanding dengan kontrol. Rerata dan simpangan baku di tikus putih yang tidak menerima perlakuan/kontrol (Po1) jumlah "Circulating Endothel" $5,857 \pm 2,340/1,8\text{Cmm}$, tikus putih yang menerima stressor (Po2) jumlah "Circulating Endothel" $15,43 \pm 5,41/1,8\text{Cmm}$, dan pada tikus putih yang menerima stressor dan pemberian antioksidan Probuocol pada dosis 5, 10, 20 mg/ekor (P1,P2, P3) jumlah "Circulating Endothel" menurun berturut-turut $9,143 \pm 2,97/1,8\text{Cmm}$, $5,000 \pm 2,309/1,8\text{Cmm}$, $5,714 \pm 2,215/1,8\text{Cmm}$.

5.2. Analisis Data

5.2.1. Data Pengukuran Kadar MDA dalam Darah

Dari perhitungan statistik kadar MDA dalam darah diperoleh hasil sebagai berikut :

Analisis varian (Anava) dari kadar MDA dalam darah diantara kelompok perlakuan, menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$) (lampiran 3).

Untuk membandingkan antar masing-masing kelompok dilanjutkan dengan uji "t" (lampiran 3) yang hasilnya menunjukkan :

Pada kelompok yang tidak menerima perlakuan/kontrol (Po1) diperoleh nilai rata-rata kadar MDA dalam darah $2,618 \pm 0,300 \mu\text{M/ml}$ jika dibandingkan dengan kelompok yang hanya menerima stressor (Po2) yang nilai rata-rata kadar MDA dalam darah $6,054 \pm 0,356 \mu\text{M/ml}$ menunjukkan peningkatan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

Pada kelompok yang tidak menerima perlakuan/kontrol (Po1) nilai rata-rata kadar MDA dalam darah $2,618 \pm 0,300 \mu\text{M/ml}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor yang diberi antioksidan Probucol pada berbagai dosis (P1,P2,P3) nilai rata-rata kadar MDA dalam darahnya berturut-turut sebagai berikut, $1,866 \pm 0,113 \mu\text{M/ml}$, $1,398 \pm 0,172 \mu\text{M/ml}$, $1,889 \pm 0,221 \mu\text{M/ml}$ menunjukkan penurunan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

Pada kelompok yang menerima stressor (Po2) nilai rata-rata kadar MDA dalam darah $6,054 \pm 0,356 \mu\text{M/ml}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol pada berbagai dosis (P1,P2,P3) yang nilai

rata-rata kadar MDA dalam darahnya berturut-turut sebagai berikut, $1,866 \pm 0,113 \mu\text{M/ml}$, $1,398 \pm 0,17 \mu\text{M/ml}$, $1,889 \pm 0,221 \mu\text{M/ml}$ menunjukkan penurunan yang bermakna pada $\alpha = 5 \% (P < 0,05)$.

Pada kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis I, 5 mg/ekor (P1) nilai rata-rata kadar MDA dalam darah $1,866 \pm 0,113 \mu\text{M/ml}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis II, 10 mg/ekor (P2) yang nilai kadar MDA dalam darah sebesar $1,398 \pm 0,172 \mu\text{M/ml}$ menunjukkan penurunan yang bermakna pada $\alpha = 5 \% (P < 0,05)$.

Pada kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis I, 5 mg/ekor (P1) nilai rata-rata kadar MDA dalam darah $1,866 \pm 0,113 \mu\text{M/ml}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis III, 20 mg/ekor (P3) nilai rata-rata kadar MDA dalam darah sebesar $1,889 \pm 0,221 \mu\text{M/ml}$ menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna pada $\alpha = 5 \% (P > 0,05)$.

Pada kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis II, 10 mg/ekor (P2) yang nilai rata-rata kadar MDA dalam darahnya sebesar $1,398 \pm 0,172 \mu\text{M/ml}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis III, 20 mg/ekor (P3) yang nilai rata-rata kadar MDA dalam darah sebesar $1,889 \pm 0,221 \mu\text{M/ml}$ menunjukkan perbedaan yang bermakna pada $\alpha = 5 \% (P < 0,05)$.

5.2.2 Data Perhitungan Jumlah "Circulating Endothel"

Dari perhitungan statistik jumlah "*Circulating Endothel*" diperoleh hasil sebagai berikut :

Analisis varian (Anava) dari jumlah "*Circulating Endothel*" diantara kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$). (lampiran 4).

Untuk membandingkan antar masing-masing kelompok dilanjutkan dengan uji "t" (lampiran 4) yang menunjukkan :

Pada kelompok yang tidak menerima perlakuan/kontrol (Po1) diperoleh nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" $5,857 \pm 2,340/1,8\text{Cmm}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor (Po2) yang nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" $15,43 \pm 5,41/1,8\text{Cmm}$ menunjukkan peningkatan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

Pada kelompok yang tidak menerima perlakuan/kontrol (Po1) nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" $5,857 \pm 2,340/1,8\text{Cmm}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis I, 5 mg/ekor (P1) yang nilai rata-ratanya $9,14 \pm 2,97/1,8\text{Cmm}$ menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

Pada kelompok yang tidak menerima perlakuan/kontrol (Po1) nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" $5,857 \pm 2,97/1,8\text{Cmm}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis II, 10 mg/ekor (P2) yang nilai rata-ratanya $5,000 \pm 2,309/1,8\text{Cmm}$ menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P > 0,05$).

Pada kelompok yang tidak menerima perlakuan/kontrol (Po1) nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" $5,857 \pm 2,340/1,8\text{Cmm}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis III, 20 mg/ekor (P3)

yang nilai rata-ratanya $5,714 \pm 2,215/1,8\text{Cmm}$ menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P > 0,05$).

Pada kelompok stressor (Po2) nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" $15,43 \pm 5,41/1,8\text{Cmm}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol pada berbagai tingkat dosis (P1,P2,P3) yang nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" berturut-turut $9,14 \pm 2,97/1,8\text{Cmm}$, $5,000 \pm 2,309/1,8\text{Cmm}$, $5,714 \pm 2,215/1,8\text{C}$ menunjukkan perbedaan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

Pada kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis I, 5 mg/ekor (P1) nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" $9,14 \pm 2,97/1,8\text{Cmm}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis II, 10 mg/ekor (P2) dengan nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" $5,000 \pm 2,309/1,8\text{Cmm}$ menunjukkan perbedaan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

Pada kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis I, 5 mg/ekor (P1) nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" $9,14 \pm 2,97/1,8\text{Cmm}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis III, 20 mg/ekor (P3) dengan nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" $5,714 \pm 2,215/1,8\text{Cmm}$ menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

Pada kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probucol dosis II, 10 mg/ekor (P2) nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" $5,000 \pm 2,309/1,8\text{Cmm}$ jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pembe

rian antioksidan Probucol dosis III, 20 mg/ekor (P3) yang nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel*" $5,714 \pm 2,215/1,8\text{Cmm}$ menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P > 0,05$).

5.2.3 Hubungan/Korelasi Kadar MDA Dalam Darah Dan Jumlah "*Circulating Endothel*"

Untuk melihat korelasi kadar MDA dalam darah dengan jumlah "*Circulating Endothel*" digunakan uji korelasi dengan "Scarter plot" yang hasilnya menunjukkan bahwa korelasi antara kadar MDA dalam darah dan jumlah "*Circulating Endothel*" sebesar 0,719 (lampiran 2) artinya ada keterkaitan antara kadar MDA dalam darah dengan jumlah "*Circulating Endothel*".

Untuk membuktikan bahwa koefisien korelasi suatu sampel dari suatu perlakuan tidak terjadi karena kebetulan saja, hubungan kadar MDA dalam darah dengan jumlah "*Circulating Endothel*" dilakukan uji "r" (rho) yang hasilnya menunjukkan bahwa H_0 ditolak dan H_1 diterima pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$) artinya kita yakin bahwa ada hubungan (korelasi) antara MDA dalam darah dengan jumlah "*Circulating Endothel*" dan bukan karena kebetulan (lampiran 5).

Untuk melihat regresinya diperoleh model regresi $Y = 2,49 + 2,07X$ artinya makin tinggi jumlah "*Circulating Endothel*" yang ditemukan dalam sirkulasi darah menunjukkan makin besar kadar MDA dalam darah (lampiran 2).

5.3 PEMBAHASAN

Pemberian stressor pada tikus putih dengan memberikan beban kerja aktivitas fisik yang berlebihan menyebabkan peningkatan kadar malondialdehyde (MDA) dalam darah dan jumlah "*Circulating Endothel*" jika dibandingkan dengan tikus putih yang tidak menerima perlakuan/kontrol. Brady, *et al.*, 1979 telah melaporkan bahwa ada peningkatan lipid peroksida pada jaringan hati dan otot segera setelah aktivitas fisik yang diukur dengan menggunakan tes TBARS. Hal ini karena pada keadaan stress akibat latihan fisik yang berlebihan dan stress emosional dapat menyebabkan sympatoadrenal discharge, yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan kadar noradrenalin dan adrenalin yang sangat tinggi (Kestin, Ellis, *et al.*, 1993). Sozmen, *et al.*, 1998 juga melaporkan bahwa katekolamine (noradrenalin dan adrenalin) sebagai sumber yang sangat penting dalam pembentukan radikal bebas oksigen, yaitu dengan cara autooksidasi dalam reaksi yang kompleks.

Peningkatan jumlah "*Circulating Endothel*" pada tikus yang menerima stressor disebabkan oleh peningkatan produksi radikal bebas sehingga menyebabkan peningkatan kadar peroksidasi fosfolipid yang ditunjukkan dengan peningkatan kadar MDA dalam darah dari hasil peroksidasi lipid, hal ini dapat menyebabkan efek sitotoksik, kerusakan jaringan dan disfungsi sel endotel sehingga endotel lepas dari membran dasar ikut sirkulasi darah yang dapat dilihat dengan peningkatan jumlah "*Circulating Endothel*" (Ward, 1988, Sozmen, 1998).

Disfungsi sel endotel dapat mengganggu keseimbangan antara faktor relaksasi dan kontraksi dari otot polos pembuluh darah sehingga dapat menyebabkan spasme

arterial (Sozmen, *et al.*, 1998). Hal ini menunjukkan bahwa endotel mempunyai peran yang sangat penting sebagai pengatur vaskuler, sebagai target dari peningkatan tekanan darah. Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Baumann, *et al.*, 1973) menunjukkan bahwa pemberian stress psikhik pada orang normal dan hipertensi dapat meningkatkan tekanan darah baik sistole maupun diastole.

Sedangkan pada tikus yang menerima stressor dengan pemberian Probucol pada berbagai tingkat dosis menunjukkan penurunan kadar MDA dalam darah dan penurunan jumlah "*Circulating Endothel*" yang bermakna jika dibandingkan dengan tikus putih yang menerima stressor. Simon, *et al.*, 1993 telah melakukan penelitian yang hasilnya menunjukkan bahwa pemberian antioksidan Probucol dapat menurunkan peroksidasi lipid plasma pada hewan yang menerima kholesterol, dan mempunyai efek perlindungan terhadap sel endotel. Hal ini menunjukkan bahwa efek perlindungan Probucol pada fungsi sel endotel mungkin berhubungan dengan efek Probucol sebagai antioksidan yang mempunyai kemampuan dalam menurunkan peroksidasi lipid yang mengganggu fungsi relaksasi yang tergantung endotel pada atherosklerosis. Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa radikal bebas menginduksi peroksidasi lipid yang dapat menyebabkan kerusakan atau disfungsi sel endotel dan dapat dihambat /dicegah oleh antioksidan Probucol.

Probucol bekerja sebagai antioksidan pemutus reaksi berantai dan mempunyai kemampuan menghambat peroksidasi lipid dan modifikasi oksidasi partikel LDL. Pemberian antioksidan Probucol pada kelinci dengan diet tinggi kholesterol menunjukkan bahwa efek antioksidan Probucol dapat meningkatkan respon relaksasi yang tergantung endotel. Diketahui bahwa pada keadaan hiperkholesterolemia dapat

merangsang peningkatan pembentukan superoksida oleh endotel, superoksida ini secara langsung dapat menginaktivasi nitric oxide dan juga dapat meningkatkan oksidasi LDL dengan membentuk peroksinitrit. Studi terbaru menunjukkan bahwa Probucol dapat meningkatkan respon endotel dependent vasodilator, tidak hanya mencegah oksidasi LDL tetapi juga memberantas radikal bebas oksigen dalam dinding pembuluh darah (Anderson, *et al.*, 1995).

Dikatakan oleh (Chen, *et al.*, 1998) bahwa efek antioksidan Probucol 10 kali lebih kuat dibanding dengan vitamin E jika dilihat pada kemampuan 50 % kosentrasi hambatannya (IC50) terhadap MDA yang berturut-turut Probucol > Vitamin E > Vitamin C. Hasil ini menunjukkan bahwa antioksidan Probucol efektif mencegah oksidasi LDL dalam sistim sel bebas.

Studi terbaru menunjukkan bahwa Probucol dapat menurunkan pembentukan O_2^- endotel pada pembuluh darah dari kelinci hiperkholesterolemia, yang ditunjukkan dengan penurunan TBARS plasma dan peningkatan endotel dependent relaksasi pada pembuluh darah hiperkholesterolemia. Mekanisme Probucol menurunkan kecepatan produksi O_2^- masih belum jelas, mungkin Probucol menghambat pembentukan O_2^- dan/atau meningkatkan pemberantasan O_2^- dalam dinding pembuluh darah. Peningkatan produksi O_2^- dalam pembuluh darah dapat menyebabkan inaktivasi nitric oxide dan pembentukan peroksinitrit yang sangat kuat efeknya pada sel endotel. Probucol tidak hanya menurunkan inaktivasi dari nitric oxide tetapi juga mempunyai efek perlindungan terhadap oksigen reaktif melalui penurunan produksi O_2^- endotel. Induksi nitroglicerine pada relaksasi pembuluh darah dengan pemberian antioksidan Probucol tidak mempunyai efek, ini menunjukkan

bahwa efek perlindungan Probucol pada disfungsi dan relaksasi pembuluh darah melalui fungsi endotel, tidak langsung mempengaruhi pada sel otot polosnya (Inoue, *et al.*, 1998).

Pada pemberian antioksidan Probucol pada berbagai tingkat dosis menunjukkan bahwa pada dosis 5 mg/ekor (P1) dibandingkan dengan dosis 10 mg/ekor kadar MDA dalam darah dan jumlah "Circulating Endotel" menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hasil ini menunjukkan bahwa peningkatan pemberian dosis 2 kali P1 memberikan hasil yang lebih baik pada penurunan kadar MDA dalam darah dan jumlah "Circulating Endothel".

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh (Dujovne, *et al.*, 1994) yang hasil penelitiannya menunjukkan bahwa Probucol dosis 1.000 mg/hari (*full dose*) dan 500 mg/hari (*half dose*) efektif dalam mencegah induksi tembaga terhadap oksidasi VLDL dan LDL. Prosen rata-rata hambatannya sampai 2 minggu setelah pemberian Probucol berkisar 95% dan efeknya masih tetap setelah pemberian Probucol selama 4 minggu. Maka jelas bahwa pemberian terapi antioksidan Probucol dosis 10 mg/ekor efektif menghambat oksidasi kolesterol LDL sehingga dapat menurunkan kadar MDA dalam darah sebagai hasil peroksidasi lipid yang dapat meningkatkan efek sitotoksik, sehingga pengaruh kadar MDA yang rendah dapat meningkatkan perlindungan terhadap sel endotel pembuluh darah.

Antioksidan Probucol dosis 10 mg/ekor dibandingkan dengan pemberian antioksidan Probucol dosis 20 mg/ekor menunjukkan peningkatan kadar MDA yang bermakna tetapi jumlah "Circulating Endothel" yang tidak bermakna. Sedangkan pada pemberian antioksidan Probucol pada dosis 20 mg/ekor dibandingkan dengan

pemberian antioksidan Probucol dosis 5 mg/ekor menunjukkan perbedaan kadar MDA dalam darah yang tidak bermakna tetapi penurunan jumlah "*Circulating Endothel*" yang bermakna. Pemberian antioksidan Probucol dosis 10 mg/ekor memberikan kadar MDA dalam darah paling rendah diantara kelompok perlakuan. Ini menunjukkan bahwa antioksidan Probucol dosis 10 mg/ekor merupakan dosis efektif, sedangkan pemberian antioksidan Probucol dosis 20 mg/ekor yang menunjukkan peningkatan kadar MDA yang bermakna tetapi jumlah "*Circulating Endothel*" yang tidak bermakna dengan kelompok P2 dapat dijelaskan bahwa pada dosis 20 mg/ekor efek perlindungan oleh antioksidan Probucol masih efektif, jika dibandingkan dengan pemberian antioksidan Probucol dosis 5 mg/ekor yang masih menunjukkan peningkatan jumlah "*Circulating Endothel*" yang tinggi dibandingkan dengan kontrol. Dikatakan oleh (Dujovne, 1994) bahwa pemberian antioksidan Probucol dosis 1.000 mg/hari cepat mencapai efek antioksidan yang sempurna tetapi waktu bersihan obat juga terjadi lebih cepat dari pada pasien yang menerima dosis 500 mg/hari, sehingga dapat dikatakan pemberian antioksidan Probucol pada dosis 10 mg/ekor dan 20 mg/ekor pada tikus putih yang menerima stressor mempunyai efek perlindungan yang sempurna terhadap endotel pembuluh darah.

Jika dibandingkan dengan kelompok P2 kadar MDA yang meningkat pada kelompok P3 mungkin disebabkan oleh struktur yang dimiliki oleh antioksidan Probucol yang memiliki cincin aromatik, cincin aromatik ini mempunyai sifat yang sangat stabil karena mampu mengadakan resonansi sehingga sukar untuk diadisi, akibatnya sifat lipofilitas tinggi. Untuk dapat diekskresi obat harus bersifat polar sehingga antioksidan Probucol diabsorpsi kembali untuk menjadikan lebih polar

sehingga terjadi akumulasi. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Miyake, Shibamoto, (1998) menunjukkan bahwa antioksidan Probucol dapat memicu pembentukan Malondialdehyde sehingga dapat dikatakan pada pemberian antioksidan Probucol dosis 20 mg/ekor sudah dapat memicu terbentuknya MDA dalam darah sehingga penggunaan dosis lebih dari 20 mg/ekor harus hati-hati.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Hasil penelitian pengaruh antioksidan Probucol terhadap kadar Malondialdehyde (MDA) dalam darah dan jumlah "*Circulating Endothel*" dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Pemberian stressor pada tikus putih dapat menyebabkan peningkatan kadar MDA dalam darah dan jumlah "*Circulating Endothel*".
2. Pemberian antioksidan Probucol dosis 5, 10, 20, mg/ekor dapat menyebabkan penurunan kadar MDA pada tikus putih yang menerima stressor.
3. Pemberian antioksidan Probucol dosis 5, 10, 20, mg/ekor dapat menyebabkan penurunan jumlah "*Circulating Endothel*" pada tikus putih yang menerima stressor

6.2 Saran

1. Pemberian stressor dan penambahan antioksidan Probucol pada pembuluh darah aorta terpisah untuk melihat efeknya terhadap sel endotel yang dapat mempengaruhi relaksasi dan kontraksi otot polos pembuluh darah
2. Pemberian antioksidan dapat digunakan untuk melindungi sel endotel dan kerusakan vaskuler pada keadaan stress yang disebabkan karena latihan fisik yang berat.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian antioksidan Probucol dengan menggunakan model stressor yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Alwi, 1996. Peran Triad Lipid Pada Penyakit Jantung Koroner, Medika. Desember. No. 12. Thn. XXII. Hal. 963-973.
- Anderson, Meredith, Yeung, 1995. The Effect Of Cholesterol Lowering And Antioxidant Therapy On Endothelium Dependent Coronary Vasomotion, N Engl, J Med 332 : 488-93.
- Atkinson, *et al.* 1993. Introduction To Psychology. 8th Ed. Harcourt Brace Jovanovich, Inc. pp. 222-237.
- Baumann, Ziprian, Godicke, 1973. The Influence Acute Psychic Stress Situations On Essential Hypertensive At The Early Stage Of The Disease, Psychother, Psychosom 22 : 131-140.
- Biebuyck, Phil, 1990. The Metabolic Response To Stress. Antioksidan Probuocol Overview And Update. Review Article Anesthesiology. 73 : 308-327.
- Brady, Bady, Ullrey, 1979. Selenium, Vitamin E And The Response To Swimming Stress In The Rat. J. Nutr 109 : 1103-1109.
- Busse, Mulsch, Fleming, Hecker, 1993. Mechanisms Of Nitric Oxide Release From The Vascular Endothelium. Circulation. May. 87 (5) ; V.18-25.
- Calara, Dimayuga, Niemann, 1998. Antioksidan Probuocol Animal Model To Study Local Oxidation Of LDL And Its Biological Effect In The Arterial Wall Arterioscler Thromb Vasc Boil, 18 : 884-893.
- Chandrasoma, Taylor, 1991. Concise Pathologi. London : Prentise-Hall International Inc. Pp. 48-70.
- Chen, Tseng, *et al.*, 1998. Effect Of Antioxidant In Endothelial Cell Exposed To LDL. Life Sci. 62 (19) ; P 1277-82.
- Chen, Tseng, Yang, 1998. Effect Of Antioxidan In Endothelial Cells Exposed For Oxidized Low Density Lipoprotein. Life Sciences (62) 19 : 277-282.
- Coveli , 1992. What Is Stress. How Does It Correlate With The Immune System. In Stress And The Immune System. Annals New York Academy Of Sciences. Pp. 212-215.

- Drexler, 1996. Endothelial Function In Heart Failure ; Some Unsolved Issues. *European Heart Journal*. 17 ; 1775-1777.
- Dujovne, Harris, Collegerrond, 1994. Comparison Of Effects Of Probucol Versus Vitamin E On Ex Vivo Oxidation Susceptibility Of Lipoprotein In Hyperlipoproteinemia. *The American Journal Of Cardiology*. July 1 (74) : 38-42.
- Evan, And Bruckdorfer, 1992. Free Radical, Lipoprotein And Cardiovascular Dysfunction. *A.J.H* February. 8. Part 2.(5) : 28s-41s.
- Gilman, 1991. Drug Used In The Treatment Of Hyperlipoproteinemia In The Pharmacological Basis Of Therapeutics 8th Ed. Pergamon Press Inc. New York. Pp. 875-897.
- Gollnick, 1986. Metabolic Regulation In Skeletal Muscle : Influence Of Endurance Training Exerted By Mitochondrial Protein Concentration. *Acta Physiologica Scandinavica*. 128 : 53-56.
- Gutteridge, And Halliwell B, 1990. The Measurement And Mechanism Of Lipid Peroxidation In Biological System. Elsevier Science Publishers Ltd. Tibs. April. 15 : 129 -134.
- Handoko, 1999, Psikobiologi Stress, Pertemuan Ilmiah Gramik FK Unair.
- Harrison, 1994. Endothelial Dysfunction In Atherosclerosis. In. *Atherosclerosis New Insights Into Pathogenetic Mechanisms And Prevention*. Supplement To *Basic Research In Cardiology*. 89 (1) : 87-99.
- Hladovec, and Prerovski, 1981 . Effects of Hydroxyethylrutoside on Circulating Endothelial Cell in Experimental Animals and Man. in *Hydroxyethylrutosid in Vascular Disease*. Royal Society of Medicine International Congress and symposium Series No.42.
- Hladovec, and Rossmann, 1973 . Circulating Endothelial Cells Isolated Together With Platelets And The Experimental Modification Of Their Counts In Rats. *Thrombosis Research*. 3: 665-674
- Inoue, Ohara, *et al.* 1998. Probucol Improves Endothelial-dependent Relaxation and Decreases vascular Superoxide Production in Cholesterol -fed Rabbits. *Am j Med sci*. Apr. 8(8):4-6.
- Fruebis, Gonzalez, *et al.* 1997. Effect Probucol Treatment on Gen Expression of VCAM-1, MCP-1and M-CSF in the Aortic Wall of LDL Receptor -

- Deficient Rabbits During Early Atherogenesis. *Arterioscler- Tromb- Vasc- Biol.* July. 17 (7):1289-1303.
- Kestin, Ellis, Barnard, 1993. Effect Of Strenuous Exercise On Platelet Activation State And Reactivity *Circulation* 88 (1) : 1502-1511.
- Lee, Choi, Pak, 1999. Inhibition Of Expression Of P-Selecting By Antioxidan In Cholesterol. *Fed Rats. J Korean Med Sci.* 14 : 8-14.
- Li, Chen, *et al.* 1998. Probucol Inhibits Oxidized LDL- induced adhesion of Monocytes to Endothelial Cells by reducing P- selectin synthesis in vitro. *Endothelium.* 6 (1):1-8.
- Luscher, Boulanger, Yang, *et al.* 1993. Interactions Between Endothelium- Derived Relaxing and Contracting Factor in Health and Cardiovascular Disease. *Circulation.* May. 87(5): V 36-44.
- Luscher, 1990. the Endothelium Target and Promoter of Hypertension. *J. Hypertension.* May. 15(5):482-485.
- Luscher, Rubanyi, Masaki, *et al.* 1993. Introduction Endothelial Control of Vascular Tone and Growth. *Circulation.* May. 87(5): V1-V2.
- Lusher, Tanner, 1993. Endothelial Regulation of Vascular Tone and Growth. *A.J.H.* July. Part 2. 6 (7) : 283S-293S.
- Massey, *et al.* 1970 . On Mechanism of Inactivation of Xanthine Oxidase by allopurinol. *journal of Biological chemistry.* 245:2837-2844.
- Meredith, Yeung, Weidinger, *et al.* 1993. Role of Impaired Endothelium- Dependent Vasodilation in Ischemic manifestation of Coronary Artery Disease. *Circulation.* May. 87 (5):V 56-66.
- Muselman, Tmer, Manatunga, 1996. Exaggerated Platelet Reactivity In Major Depression *Am. J Psychiatry* 153 : 1313-1317.
- Notosoedirdjo, 1998. Coping Dan Psikopatologi, Pertemuan Ilmiah Psikoneuroimmonologi, FK Unair 20 Oktober 1998.
- Opie, 1991. Lipid Lowering and Anti Atherosclerotic Drug. In. *Drug For The Heart.* 3th. Ed . Sanders Company philadelphia. pp. 247-261.
- Ou, Saku, *et al.* 1998. Mechanism of Action of Probucol on Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) mRNA in a Chinese Hamster Ovary Cell Line

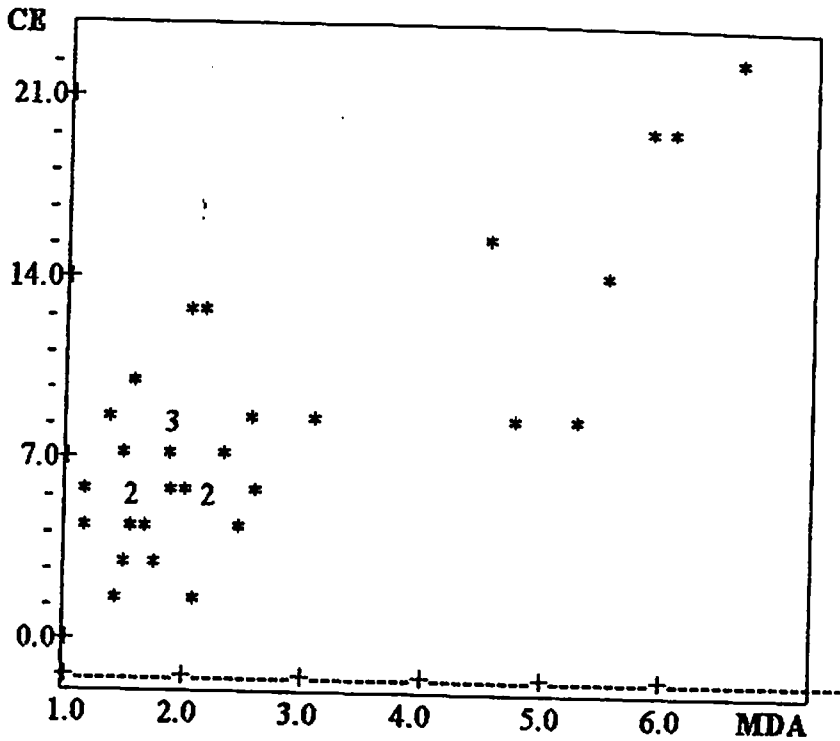
- thad Had Benn Stable Transfected With A Human CETP gene. *Biochim Biophys Acta*. Jul 31.1393 (1):153-60.
- Packer, 1989. *Oxidants And Antioxidants And The Biological Effect Of Physical Exercise In Biological Effects Of Physical Activity*, Vol 2 Human Kinetics Books Champaign Illinois.
- Rang, 1991. *Control of Lipoprotein Metabolism in Pharmacology*. 2 nd Ed, Logman Group Ltd. pp.369- 376.
- Reynolds, 1993. *Martindale The Extra Pharmacopeia*.30th. Ed. London . The Pharmaceutical Press. pp.993.
- Riley. 1981. *Psychoneuroendocrinologi on Immono compehence and Neoplasia*, *Science*. 212:1100-1109.
- Segoifo, D Boer, Haller, 1996. *Individual Differences In Plasma Catecholamine And Corticosterone Stress Responses Of Wild Type Rats : Relationship With Aggression Physiology & Behaviour*, 60 : 6 : 1403-1407.
- Simon, Haudenschild, And Cohen (1993). *Reservation Of Endothelium Dependent Relaxation In Atherosclerotic Rabbit Aorta By Probucol*. *J. Cardiovasc Pharmacol* (21) : 6.
- Sozmen, Kazaz, Taskiran, Tuzun, and Sozmen, 1998. *Effect of N Dicycloprorylmethyl-amino-2-oxazoline (s-3341) on Antioxidant Status and Nitric Oxide in Hypertensive patients*, *Current Medical Research and Opinion*. 14(2): 89-96
- Stainsby, Brechere, *et al.* 1989. *Oxidation Reduction State of Cytochrome Oxidase During Repetitive Contraction*. *Journal Aplied Physiology*. 67 (5): 2158-2162.
- Suryohudoyo, 1997. *Oksidan dan Antioksidan Pada Diabetes mellitus*. *Diabetes Update III*. Surabaya 14-15 November 1997. Hal. 27-39
- Syodin, West, and Apple, 1990. *Biochemical Mechanisms During for Oxygen Free Radical Formation During Exercise*. *Sport Medicine*. 10(4):236-254.
- Vanhotte, 1993. *other Endothelium Derived vasoactive Factors*. *Circulation*. May. 87(5):V9-V17.
- Ward, Warren, and Johnson, 1988. *Oxygen Radicals, Inflammation and Tissue Injury*. *Free Radical Biology & Medicine*. 5:403-408.

- Widjajanto, Widodo, Rudianto, 1996. Circulating Endothel Dan Lipid Profile Pada Penderita Diabetes Melitus. Konggres Nasional III, Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia dan The Fourth Conference on Clinical Pathology, Yogyakarta, 30 juni- 4 Juli 1996
- Wijaya, 1996. Radikal Bebas dan Parameter Status Antioksidan. Forum Diagnosticum Prodia Diagnostics Educational Services. hal. 1-12.
- Wijaya, 1998. Disfungsi endotel. Aterosklerosis dan Trombosis. Forum Diagnosticum Prodia Diagnostics Educational Services. Hal. 1-24.
- Willner, 1990. Animal Models of Depression: an overview. *Pharmac. Ther.* 45:423-455.
- Z Tang, D ji, L Li, *et al.* 1996. Effect of Probucol on mRNA Expression of Glomerular Antioxidant Enzymes in Rat with Subtotal Nephrectomy. *Chin Med J Engl.* Oct. 109 (10): 780-786.

LAMPIRAN**Lampiran 1 : Data Hasil Penelitian Kadar MDA Dalam Darah Dan
"Circulating Endothel"**

ROW	MDA	CE
1	2.341	6
2	2.736	4
3	2.426	2
4	2.313	6
5	2.679	6
6	2.649	8
7	3.179	9
8	6.571	14
9	6.386	8
10	5.633	16
11	5.826	20
12	5.957	19
13	6.268	22
14	5.738	9
15	1.918	13
16	1.692	6
17	1.862	8
18	1.749	10
19	2.003	13
20	1.974	6
21	1.861	8
22	1.241	4
23	1.580	4
24	1.467	4
25	1.523	9
26	1.551	2
27	1.269	7
28	1.156	5
29	1.721	7
30	1.692	5
31	2.116	6
32	1.692	3
33	1.889	9
34	2.256	7
35	1.861	3

Lampiran 2: Plot MDA vs "Circulating Endothel"



Correlation of CE and MDA = 0.719

The regression equation is :

CE = 2.49 + 2.07 MDA

Predictor	Coef	Stdev	t-ratio	p
Constant	2.493	1.135	2.20	0.035
MDA	2.0744	0.3493	5.94	0.000

s = 3.525 R-sq = 51.7% R-sq(adj) = 50.2%

Analysis Of Variance

SOURCE	DF	SS	MS	F	p
Regression	1	438.22	438.22	35.28	0.000
Error	33	409.95	12.42		
Total	34	848.17			

Unusual Observations

Obs.	MDA	CE	Fit	Stdev.Fit	Residual	St.Resid
9	6.39	8.0	15.740	1.398	-7.740	-2.39R
13	6.27	22.0	15.495	1.361	6.505	2.00R

R denotes an obs. with a large st. resid.

Lampiran 3 : Data Asli MDA

ROW	MP01	MP02	MP1	MP2	MP3
1	2.341	6.571	1.918	1.241	1.721
2	2.736	6.386	1.692	1.580	1.692
3	2.426	5.633	1.862	1.467	2.116
4	2.313	5.826	1.749	1.523	1.692
5	2.679	5.957	2.003	1.551	1.889
6	2.649	6.268	1.974	1.269	2.256
7	3.179	5.738	1.861	1.156	1.861

Desripsi Data MDA

	N	MEAN	MEDIAN	TRMEAN	STDEV	SEMEAN
MP01	7	2.618	2.649	2.518	0.300	0.113
MP02	7	6.054	5.957	6.054	0.356	0.135
MP1	7	1.8656	1.8620	1.8656	0.1134	0.0429
MP2	7	1.3981	1.4670	1.3981	0.1716	0.0649
MP3	7	1.8896	1.8610	1.8896	0.2209	0.0835
	MIN	MAX	Q1	Q3		
MP01	2.313	3.179	2.341	2.736		
MP02	5.633	6.571	5.738	6.386		
MP1	1.6920	2.0030	1.749	1.974		
MP2	1.1560	1.5800	1.241	1.551		
MP3	1.6920	2.2560	1.692	2.116		

UJI ADA TIDAKNYA PERBEDAAN MEAN**Analysis Of Variance**

SOURCE	DF	SS	MS	F	p
FACTOR	4	999.869	249.967	405.68	0.000
ERROR	30	18.485	0.0616		
TOTAL	34	1.018.354			

PERBANDINGAN

ANTAR LEVEL	\bar{X}_i	\bar{X}_j	S^2_i	S^2_j	S^2_p	t-hit	t-tab
MP01-MP02	2.618	6.0540	0.090	0.127	0.108	-19.529	2.18 *)
MP01-MP1	2.618	1.8656	0.090	0.013	0.051	6.206	2.18 *)
MP01-MP2	2.618	1.3981	0.090	0.029	0.060	9.341	2.18 *)
MP01-MP3	2.618	1.8896	0.090	0.049	0.069	5.173	2.18 *)
MP02-MP1	6.054	1.8656	0.127	0.013	0.070	29.659	2.18 *)
MP02-MP2	6.054	1.3981	0.127	0.029	0.078	31.178	2.18 *)
MP02-MP3	6.054	1.8896	0.127	0.049	0.088	26.300	2.18 *)
MP1-MP2	1.866	1.3981	0.013	0.029	0.021	6.014	2.18 *)
MP1-MP3	1.866	1.8896	0.013	0.049	0.031	-0.256	2.18
MP2-MP3	1.398	1.8896	0.029	0.049	0.039	-4.650	2.18 *)

*) beda nyata pada $\alpha = 5\%$

Lampiran 4 Data Asli "Circulating Endothel"

ROW	CP01	CP02	CP1	CP2	CP3
1	6	14	13	4	7
2	4	8	6	4	5
3	2	16	8	4	6
4	6	20	10	9	3
5	6	19	13	2	9
6	8	22	6	7	7
7	9	9	8	5	3

DESCRIPSI DATA "CIRCULATING ENDHOTHKL"

	N	MEAN	MEDIAN	TRMEAN	STDEV	SEMEAN
CP01	7	5.857	6.000	5.857	2.340	0.884
CP02	7	15.43	16.00	15.43	5.41	2.05
CP1	7	9.14	8.00	9.14	2.97	1.12
CP2	7	5.000	4.000	5.000	2.309	0.873
CP3	7	5.714	6.000	5.714	2.215	0.837
	MIN	MAX	Q1	Q3		
CP01	2.0	9.0	4.0	8.0		
CP02	8.0	22.0	9.0	20.0		
CP1	6.0	13.0	6.0	13.0		
CP2	2.0	9.0	4.0	7.0		
CP3	3.0	9.0	3.0	7.0		

UJI ADA TIDAKNYA PERBEDAAN MEAN
Analysis Of Variance

SOURCE	DF	SS	MS	F	p
FACTOR	4	525.3	131.3	12.2	0.000
ERROR	30	322.9	10.8		
TOTAL	34	848.2			

PERBANDINGAN

ANTAR LEVEL	\bar{X}_i	\bar{X}_j	S^2_i	S^2_j	S^2_p	t-hit	t-tab
CP01-CP02	5.857	15.430	5.476	29.268	17.372	-4.297	2.18 *)
CP01-CP1	5.857	9.140	5.476	8.821	7.148	-2.297	2.18 *)
CP01-CP2	5.857	5.000	5.476	5.332	5.404	0.690	2.18
CP01-CP3	5.857	5.714	5.476	4.906	5.191	0.117	2.18
CP02-CP1	15.430	9.140	29.268	8.821	19.045	2.696	2.18 *)
CP02-CP2	15.430	5.000	29.268	5.332	17.300	4.691	2.18 *)
CP02-CP3	15.430	5.714	29.268	4.906	17.087	4.397	2.18 *)
CP1-CP2	9.140	5.000	8.821	5.332	7.076	2.912	2.18 *)
CP1-CP3	9.140	5.714	8.821	4.906	6.864	2.447	2.18 *)
CP2-CP3	5.000	5.714	5.332	4.906	5.119	-0.590	2.18

*) beda nyata pada $\alpha = 5\%$

Lampiran 5 : Analisa Ada Tidaknya Korelasi antara MDA dan CE

$$H_0 : r = 0$$

$$H_1 : r \neq 0$$

$$t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

$$t = \frac{0,719\sqrt{35-2}}{\sqrt{1-0,719^2}}$$

$$t = 5,94$$

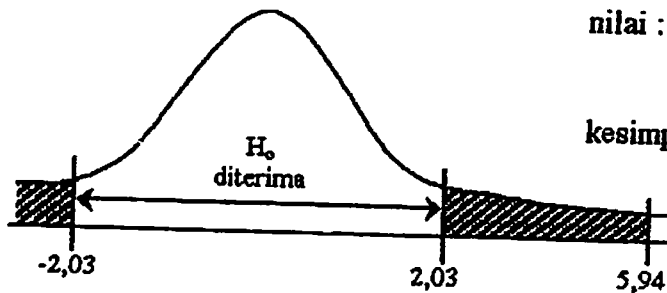
$t \sim -t_{(1-\alpha/2)} < t < t_{(1-\alpha/2)}$ dengan taraf nyata; $\alpha = 5\%$; $df = n-2 = 33$

diperoleh; $t = 2,03$

nilai : $t_{hitung} > t_{tabel}$

$5,94 > 2,03$

kesimpulan : tolak H_0 , berarti antara MDA dan CE memang ada korelasi.



Lampiran 6 : Analisa Korelasi Dan Regresi Kadar MDA vs Bacaan

X	Y	(X-X _r)	(Y-Y _r)	(X-X _r)(Y-Y _r)
2	74	-2,6666667	-94	250,66666667
2	74	-2,6666667	-94	250,66666667
4	153	-0,6666667	-15	10,00000000
4	152	-0,6666667	-16	10,66666667
8	276	3,3333333	108	360,00000000
8	279	3,3333333	111	370,00000000

Keterangan : X = Kadar MDA
 Y = Bacaan
 $X_r = 4.666667$
 $Y_r = 168$
 Jumlah (X-X_r) = 9.536743E-07
 Jumlah (Y-Y_r) = 0
 Jumlah (X-X_r)(X-X_r) = 37.33334
 Jumlah (Y-Y_r)(Y-Y_r) = 42138
 Jumlah (X-X_r)(Y-Y_r) = 1252

ANTARA KEDUA PARAMETER INI ADA KORELASI
 KARENA r_{hitung} (0.9982033) LEBIH BESAR DARI r_{tabel}

KOEFISIEN KORELASI = 0.9982033

PERSAMAAN GARIS REGRESINYA ADALAH :

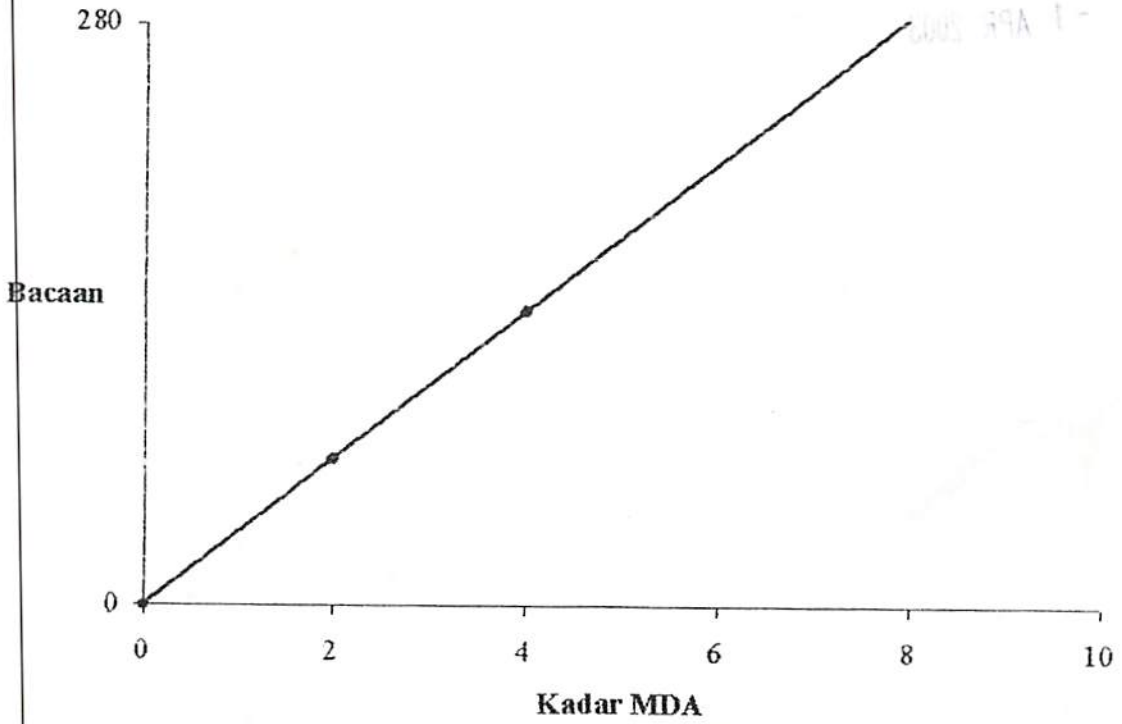
$$Y = 33.5371 X + 11.50002$$

PERSAMAAN GARIS REGRESI MELALUI TITIK NOL :

$$Y = 35.45238 X$$

Lampiran 7 : Grafik Analisa Korelasi Dan Regresi Kadar MDA vs Bacaan

GRAFIK
ANALISA KORELASI DAN REGRESI
KADAR MDA vs BACAAN



PAMERAN

-1 APR 2003