

FLAVONOIDS
ANTIOXIDANT
CEREBRAL ARTERIES

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

TESIS

**EFEK PEMBERIAN ISOFLAVONOID TERHADAP KADAR MDA
DARAH DAN KETEBALAN TUNIKA INTIMA-MEDIA A. CAROTIS
COMMUNIS TIKUS PUTIH JANTAN YANG DIBERI STRESSOR**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



TKD 01/08
Leg
e

DJOKO LEGOWO

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

**EFEK PEMBERIAN ISOFLAVONOID TERHADAP KADAR MDA
PLASMA DARAH DAN KETEBALAN TUNIKA INTIMA-MEDIA A.
CAROTIS COMMUNIS TIKUS PUTIH JANTAN YANG DIBERI
STRESSOR**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**DJOKO LEGOWO
NIM 099913298M**

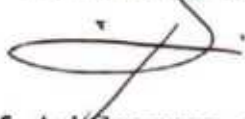
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

Lembar Pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL TANGGAL 1 AGUSTUS 2002**

Oleh

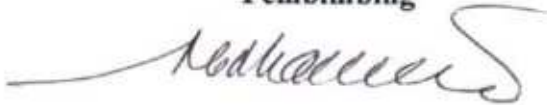
Pembimbing Ketua



Prof. Ari Gunawan, dr., PhD.

NIP:130531759

Pembimbing



Abdoel Kamid Iskandar, dr., MS.

NIP: 130541811

Mengetahui

**Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga**



Soetjipto, dr., MS., PhD.

NIP:130687606

SUSUNAN TEAM PENGUJI

Ketua : Abdoel Khamid Iskandar, dr., MS.

Anggota : 1. Prof. Ari Gunawan, dr., PhD.
2. Chairul Anwar, drh., MS.
3. Dr. Soenarko Setyawan, dr., MS.
4. Iskantiyah Budi Raharjo, dr., MS.
5. Soenarjo, dr., MS., MSc.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Profesor dr. Ari Gunawan, PhD., yang telah mendorong dan memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program magister ini, dan sebagai Pembimbing Ketua saya ucapkan terima kasih atas segala bimbingan dan saran, serta motivasinya.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada dr. Abdoel Khamid Iskandar, MS., sebagai Pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, saran, serta izin yang diberikan untuk menggunakan sarana penelitian di Laboratorium Anatomi Histologi Universitas Airlangga, sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Saya ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia melalui Menteri Pendidikan dan Kebudayaan atas beasiswa BPPS yang diberikan, bantuan finansial tersebut sangat membantu saya dalam menyelesaikan studi ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Rektor Universitas Airlangga, Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Dr. drh. Ismudiono MSc, yang telah memberikan izin dan kesempatan kepada saya untuk menempuh program ini. Kepada Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana, dr. Soetjipto, MS., PhD.

Terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya ucapkan kepada Tim Penguji Proposal Tesis, yang telah memberikan masukan yang sangat berharga, sehingga pelaksanaan penelitian menjadi lebih mudah. Kepada Dr. Soenarko Setyawan, dr., saya ucapkan terima kasih atas segala bantuan referensi dan saran-sarannya. Kepada drh. Chairul Anwar, MS., saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala saran dan dorongan, serta izin yang diberikan untuk membuat sediaan histologis

dan fotomikroskopik. Kepada dr. Iskantiyah Budi Raharjo, MS., saya ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya atas saran dan perhatiannya. Kepada dr. Sunarjo MS., MSc., saya ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya atas bimbingan, saran dan koreksi yang diberikan khususnya terhadap metodologi tesis ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada saudara Drs. Saukir, yang telah sangat membantu dalam membuat sediaan histologis, Bapak Yitno, Bapak Ngatiman, dan Bapak Yono serta semua pihak, yang telah membantu selesainya tesis ini.

Akhirnya untuk seluruh keluarga besar, saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas doa restu, dorongan dan pengorbanannya, terutama untuk istri tercinta Sawitri Dharmastuti SH dan kedua anak saya yang tersayang Dhito dan Tata, semoga seluruh jerih payah ini dapat membahagiakan mereka semua.

Surabaya, Juli 2002

Penulis

RINGKASAN

Tingginya kadar isoflavonoid dalam kandungan diet tradisional pada penduduk di negara-negara Asia, diyakini merupakan faktor penentu yang menyebabkan rendahnya insiden kematian yang disebabkan oleh Penyakit Kardiovaskular Atherosklerosis (PKVAS) di wilayah ini (Papas, 1999). Berbagai penelitian *in vitro* melaporkan bahwa selain berpotensi sebagai **antioksidan**, isoflavonoid juga memiliki berbagai potensi biologis lainnya seperti, antiproliferatif, antihipertensif, antimutagenik, serta efek estrogenik dan antiestrogenik lemah (Knight *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 1998). Namun demikian, hingga saat ini masih sangat jarang penelitian yang melaporkan potensi isoflavonoid secara *in vivo*, khususnya terhadap sistem kardiovaskular.

Radikal bebas terbukti terlibat dan mendasari lebih dari 100 jenis penyakit dan gangguan, termasuk atherosklerosis. Bahkan diyakini bahwa, radikal bebas baik secara langsung maupun melalui peroksidasi LDL serta semua produk metabolitnya (seperti, **MDA**), merupakan faktor utama penyebab cedera endotel, dimana diketahui bahwa cedera endotel merupakan faktor kunci yang dapat memicu proses atherogenesis berikutnya, yang pada tahap awal dapat diamati dengan meningkatnya ukuran ketebalan tunika intima media (*intima-media thickness/IMT*) pembuluh darah (Constantinides, 1994; Navab *et al.*, 1996; Halliwell dan Guetteridge, 1998).

Bila hipotesis yang menyatakan bahwa atherosklerosis dapat timbul akibat radikal bebas dan ketidakseimbangan sistem pertahanan antioksidan tubuh adalah benar, maka suplemen antioksidan, seperti isoflavonoid merupakan tindakan pencegahan yang utama (Wijaya, 1996).

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris yang bertujuan untuk menguji secara *in vivo* potensi atheroprotektif dari isoflavonoid, dengan cara mengukur kadar MDA darah dan ketebalan tunika intima-media (IMT) arteri carotis communis, pada tikus putih jantan yang diberi stressor (*swimming stress*).

Dengan menggunakan rancangan penelitian *postest-only control group design*, sebanyak 40 ekor tikus putih (*rattus novergicus*) jantan strain Wistar dengan berat rata-rata 200 gram, dibagi dalam 5 kelompok perlakuan, yaitu P0; P1; P2; P3; dan P4, masing masing kelompok kontrol (hanya diberi placebo); kelompok yang hanya diberi isoflavonoid 0.7 mg/ekor; kelompok yang hanya diberi stressor, diberi stressor

dan isoflavonoid 0.7 mg/ekor, diberi stressor dan isoflavonoid 1.4 mg/ekor. Perlakuan diberikan setiap hari selama 30 hari. Pada hari ke 30 seluruh hewan coba dikorbankan dan dilakukan pengambilan data. Kadar MDA diukur dengan metode TBARS dan tebal a. caortis communis diukur dengan mikrometer yang telah ditera.

Berdasarkan hasil uji anova satu arah yang dilanjutkan dengan uji LSD diketahui bahwa, terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.01$) kadar rata-rata MDA plasma darah dan IMT a. carotis communis diantara kelompok perlakuan. Pada kelompok yang diberi stressor (P2, P3 dan P4), pemberian isoflavonoid terbukti signifikan ($p < 0.05$) dapat mencegah peningkatan kadar MDA darah dan penebalan tunika intima-media a. carotis communis. Melalui hasil uji korelasi Pearson diketahui terdapat korelasi yang nyata antara peningkatan kadar MDA plasma darah dengan ukuran IMT a. carotis communis ($r = 0.711$; $0.50 \leq \rho \leq 0.84$) pada harga $\alpha = 0.05$.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa, stressor (*swimming stress*) dapat menyebabkan peningkatan MDA dan penebalan pada tunika intima-media a. carotis communis. Pemberian antioksidan isoflavonoid dengan dosis 0.7 mg/ekor dan 1.4 mg/ekor, terbukti dapat mencegah peningkatan kadar MDA plasma darah dan penebalan tunika intima-media a. carotis communis pada tikus putih jantan yang diberi stressor. Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang (1) potensi *in vivo* pemberian antioksidan isoflavonoid, dengan mengukur variabel tergantung yang lebih spesifik seperti, kadar radikal bebas atau LDL-Ox plasma darah; (2) pengaruh peningkatan MDA plasma darah terhadap cedera endotel dan penebalan pembuluh darah.

ABSTRACT

High levels of soy isoflavonoids diet among Asian people has been suggested correlation with low incidence of heart disease in these areas. Several *in vitro* studies proved that isoflavonoid have many beneficial effects on the cardiovascular system, eventhough it's *in vivo* potency is still uncertain.

The aim of this study was to examine *in vivo* antioxydant and antiatherogenic potency of isoflavonoid by assessed it's effect administration, against plasma MDA levels and carotid intima-media thickness on stressed-rat.

Fourty male rats (*Rattus norvegicus*) of Wistar strain, with the age of 3 months, grouped randomly into five groups (n = 8 per group) as P0; P1; P2; P3 and P4 respectively for; control group given by placebo only; group given by isoflavonoid dose of 0.7 mg/rat; group that was given by stressor only; group that was given by stressor dan isoflavonoid dose of 0.7 mg/rat; group that was given by stressor and isoflavonoid dose of 1.4 mg/rat.

Treatment was given everyday, as long as 30 days. On the 30th day all rats were scraficed for data measurements. Blood plasma MDA levels was measured with TBARS method and the intima-media thickness of carotid artery was measured by micrometer.

Results of analysis of variances test revealed there was significant difference ($p < 0.01$) between groups, the effect of isoflavonoid administration on the blood plasma MDA levels and on the IMT of carotid artery.

These research showed that isoflavonoid administration was effective inhibited intima-media thickness of a. carotis communis, as well as it's decreasing MDA level on stressed-rat. It was also mean that isoflavonoid was potencial as antioxydant and antiatherogenic agents *in vivo*.

DAFTAR ISI

Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia Penguji	v
Ucapan terima kasih	vi
Ringkasan	viii
Abstract	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Sistem Pembuluh Darah	4
2.1.1. Anatomi Arteri	5
2.2. Atherosklerosis.....	7
2.2.1. Patogenesis Atherosklerosis	9
2.3. Ketebalan Tunika Intima-Media a. Carotis dan Kaitannya dengan Atherosklerosis.....	15
2.3.1. Mekanisme Proliferasi Miosit Arteri	19
2.4. Fungsi Endotel	21
2.4.1. Fungsi Regulasi.....	22
2.4.2. Fungsi Pelindung.....	25
2.5. Cedera endotel	26
2.5.1. Faktor-Faktor Penyebab Cedera Endotel	28
2.6. Radikal Bebas dan Stress Oksidatif	29
2.6.1. Peran Radikal Bebas dalam Atherosklerosis	31
2.7. LDL	32
2.7.1. Peroksidasi LDL	34
2.8. MDA	36
2.8.1. Peran MDA dalam Atherosklerosis	38
2.9. Stress Sebagai Sumber Radika Bebas	41
2.10. Antioksidan	44
2.11. Flavonoid	46
2.11.1. Antioksidan Isoflavonoid	47
2.11.2. Efek Biologis Pada Sisitem Kardiovaskular	49
2.11.3. Metabolisme Isoflavonoid	52

BAB 3 KERANGKA KOSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1. Kerangka Konseptual	54
3.2. Hipotesis Penelitian	57
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	
4.1. Rancangan Penelitian	58
4.2. Sampel dan Besar Sampel	58
4.3. Variabel Penelitian	59
4.3.1. Definisi Operasional Variabel	59
4.4. Alat dan Bahan Penelitian	61
4.4.1. Bahan Perlakuan	61
4.4.2. Bahan Pemeriksaan	61
4.4.3. Alat-Alat Penelitian	61
4.5. Posedur Penelitian	62
4.5.1. Adaptasi	62
4.5.2. Pembagian Kelompok Perlakuan	62
4.5.3. Pelaksanaan Penelitian	63
4.5.4. Pengumpulan Data	63
4.6. Waktu dan Tempat Penelitian	64
4.7. Analisis Data	65
BAB 5 HASIL PENELITIAN	
5.1. Deskripsi Data Efek Pemberian Isoflavonoid Terhadap Kadar MDA darah	66
5.1.1 Hasil Uji Anova Satu Arah Data MDA	67
5.2. Deskripsi Data Efek Pemberian Isoflavonoid Terhadap Ukuran IMT a. Carotis Communis	68
5.2.1. Hasil Uji Anova Satu Arah Data IMT a. Carotis Communis	70
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1. Stress Fisik dan Peningkatan Kadar MDA	72
6.1.1. Efek Pemberian Isoflavonoid Terhadap Peningkatan Kadar MDA darah	73
6.2. Alasan Penggunaan Ukuran IMT Arteri Carotis Communis Sebagai Sampel Penelitian	75
6.3. Stress Fisik dan Proses Penebalan Tunika Intima- Media Arteri Carotis Communis	75
6.4. Efek Pemberian Isoflavonoid Terhadap Ukuran IMT Arteri Carotis Communis Pada Tikus Putih Jantan	77
BAB KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1. Kesimpulan	84
7.2. Saran-Saran	84

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
2.1. Contoh- contoh radikal bebas	30
2.2. Komposisi Lipoprotein plasma darah	33
2.3. Perubahan-perubahan yang terjadi selama aktifitas fisik	43
2.4. Klasifikasi Flavonoid	47
2.5. Kandungan daidzein dan genestein pada berbagai bahan	49
5.1. Rata-rata dan SD kadar MDA darah pada tiap perlakuan	66
5.2. Hasil uji anova satu arah data kadar MDA	68
5.3. Rata-rata dan SD ukuran IMT pada tiap perlakuan	69
5.4. Hasil uji anova satu arah data IMT	70

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Fotomikrograf arteri kecil	6
2.2. Arteri besar	7
2.3. Proses atherosklerosis menurut teori cedera endotel	10
2.4. Arteri carotis normal abnormal	14
2.5. Percabangan a. carotis communis	16
2.6. <i>Color coded ultrasound</i> a. carotis communis	18
2.7. Skema jalur sinyal intra seluler selama proliferasi	21
2.8. Struktur LDL	32
2.9. Peroksidasi PUFAs	36
2.10. Metabolisme MDA	38
5.1. Box plot data kadar MDA	66
5.3. Box plot data IMT	69

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan jumlah sampel	87
2. Perhitungan dosis isoflavonoid	88
3. Pembuatan sediaan histologis	90
4. Gambar a. carotis communis Tikus Setelah Perlakuan	92
5. Data hasil penelitian dan uji statistik	93
6. Jadwal Penelitian	98
7. Rincian biaya penelitian	99

BAB 1 PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang

Isoflavonoid diketahui merupakan antioksidan yang potensial, karena kandungan phenolnya yang sangat tinggi. Phenol adalah suatu senyawa yang memiliki gugus hidroksil yang terikat pada cincin benzene, dimana gugus-gugus hidroksil (-OH) pada senyawa phenol inilah sebenarnya yang memainkan peranan penting dalam memberikan efek sebagai antioksidan, karena Gugus hidroksil mampu mengikat dan menetralkan radikal bebas (Halliwell and Guetteridge, 1998).

Selain berkhasiat sebagai antioksidan, isoflavonoid juga diketahui memiliki berbagai potensi biologis lainnya seperti, antiproliferatif, antihipertensif, antimutagenik, serta efek estrogenik dan antiestrogenik lemah (Knight *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 1998).

Secara *in vitro*, potensi atheroprotektif isoflavonoid telah banyak dilaporkan. Isoflavonoid diketahui dapat berkonjugasi ke dalam LDL dan meningkatkan resistensi LDL terhadap reaksi peroksidasi, sehingga dapat mencegah cedera pada sel endotel (Tikannen *et al.*, 1998); isoflavonoid yang diekstrak dari kedelai, terbukti dapat menghambat absorpsi glukosa, dan mencegah peroksidasi LDL yang diinduksi oleh glukosa (Vedanam *et al.*, 1999); menghambat agregasi platelet (Nakashima, 1999); menghambat proliferasi miosit (Fotsis *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 1998; Shimokado *et al.*, 1995) dan meningkatkan produksi NO oleh endotel, melalui aktivitasnya dalam mengatur pertukaran Ca^{2+} (Fillipeanu, 1995).

Perhatian dunia kedokteran terhadap antioksidan dan radikal bebas semakin meningkat akhir-akhir ini, terutama setelah diketahui adanya keterkaitan antara peningkatan jumlah radikal bebas dan penurunan sistem kekebalan antioksidan tubuh, serta timbulnya penyakit (Papas, 1999). Radikal bebas terbukti terlibat dan mendasari lebih dari 100 jenis penyakit dan gangguan, dari *rheumatoid arthritis*, *cystic fibrosis*, AIDS hingga **atherosklerosis** (Halliwell and Guetteridge, 1998).

Peroksidasi LDL merupakan proses yang sangat penting dalam atherogenesis dan merupakan salah satu contoh dimana radikal bebas memainkan peranan yang sangat sentral. LDL yang teroksidasi (LDL-Ox) serta produk-produk metabolitnya seperti, malodialdehid (**MDA**), 4-hidroksinonenal (HNE) dan F₂-isoprostenes, diketahui

merupakan penyebab **cedera endotel yang utama** (Navab *et al.*, 1996; Halliwell and Guetteridge, 1998).

Cedera endotel merupakan peristiwa pertama yang sangat penting, dalam menimbulkan kerusakan pada dinding arteri, karena cedera endotel dapat memicu serangkaian proses selanjutnya seperti, penurunan produksi EDRF-NO, infiltrasi sel-sel radang, proliferasi miosit, dan fibroblas, yang akhirnya menyebabkan **pemenebalan** dinding arteri. Perubahan awal ini dapat berlanjut pada atherogenesis, bila jejas penyebab cedera terus terjadi (Constantinides, 1994).

Penebalan dinding arteri merupakan perubahan struktur pertama yang dapat diamati dari atherogenesis. Penebalan ini terutama diakibatkan oleh proliferasi otot polos dan jaringan ikat pada kompleks lapisan (tunika) intima-media dinding arteri. Meskipun dapat terjadi pada semua arteri (besar atau sedang), namun pada **a. carotis communis** proses penebalan biasanya terjadi lebih cepat, sehingga biasanya timbul lebih awal (Raitakari *et al.*, 1998; Constantinides, 1994). Oleh karena itu, sekarang ini pengukuran ketebalan tunika intima-media (*intima-media thickness* atau **IMT**) a. carotis communis dengan cara non-invasif telah banyak dilakukan, sebagai usaha diagnosa dini untuk mengetahui adanya atherosklerosis (Raitakari *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 1996).

Stress yang berat (baik fisik maupun psikis) diketahui dapat menyebabkan stress oksidatif (ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dan antioksidan tubuh). Berbagai penelitian baik pada manusia atau hewan coba melaporkan bahwa, aktivitas fisik yang berlebihan dapat meningkatkan jumlah radikal superoksida ($O_2^{\cdot-}$) darah hingga 75 kali (Halliwell and Guetteridge, 1998). Aktifitas fisik yang berat (misalnya, *swimming stress*), dilaporkan dapat meningkatkan kadar MDA plasma darah pada tikus (Harjanto and Santoso, 2001; Maslachah, 2000; Davies *et al.*, 1992; Alessio *et al.*, 1998) dan penurunan jumlah enzim antioksidan (antioksidan internal), seperti, SOD dan glutathion (Kanter *et al.*, 1995; Reznick *et al.*, 1988).

Bila hipotesis yang menyatakan bahwa atherosklerosis dapat timbul akibat radikal bebas dan ketidakseimbangan sistem pertahanan antioksidan tubuh adalah benar, maka suplemen antioksidan merupakan tindakan pencegahan yang utama (Wijaya, 1996).

Meskipun secara *in vitro* dan dari berbagai penelitian epidemilogis telah terbukti bahwa, isoflavonoid banyak memberikan keuntungan pada sistem

kardiovaskular dan merupakan senyawa **atheroprotektif** yang potensial, namun potensi *in vivo* dari senyawa ini masih belum jelas (Papas, 1996). Oleh karena itu masih sangat diperlukan penelitian-penelitian lebih lanjut, yang menguji potensi atheroprotektif isoflavonoid secara *in vivo*.

Dengan meneliti dampak pemberian isoflavonoid terhadap kadar MDA darah dan ketebalan tunika intima-media a. carotis communis (IMT) pada tikus putih jantan yang diberi stressor, maka dari penelitian ini diharapkan dapat diketahui potensi atheroprotektif dari isoflavonoid secara *in vivo*.

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian isoflavonoid dapat mencegah penebalan tunika intima-media arteri carotis communis tikus putih jantan yang diberi stressor ?
2. Apakah pemberian isoflavonoid dapat mencegah peningkatan kadar MDA plasma tikus putih jantan yang diberi stressor ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mempelajari potensi atheroprotektif isoflavonoid sebagai antioksidan pada tikus putih jantan yang diberi stressor .

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Menguji secara *in vivo* potensi atheroprotektif dari isoflavonoid, dengan cara mengukur ketebalan tunika intima-media (Intima-Media Thickness/IMT) arteri carotis communisnya.
2. Menguji secara *in vivo* potensi atheroprotektif dari isoflavonoid dengan cara mengukur kadar MDA darah.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Melalui pengukuran kadar MDA darah dan ketebalan tunika intima-media arteri carotis communis, diharapkan dapat diperoleh kejelasan peran isoflavonoid dalam mencegah terjadinya atherogenesis.
2. Menjadi pengetahuan yang berguna bagi masyarakat luas, mengingat isoflavonoid terdapat dalam jumlah yang besar pada kacang kedelai dan produk hasil olahannya seperti, tempe, tahu dan susu kedelai.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sistem Pembuluh Darah

Sistem sirkulasi adalah suatu sistem pengangkut yang berfungsi untuk membawa O₂ dan senyawa-senyawa yang diabsorpsi dari traktus gastrointestinalis ke seluruh sel-sel tubuh, dan mengembalikan CO₂ beserta produk metabolit lain ke paru-paru dan ginjal. Selain itu, sistem ini juga berperan dalam regulasi suhu badan, distribusi hormon dan zat-zat lain yang berguna dalam pengaturan fungsi sel (Ganong, 1995).

Sistem sirkulasi terdiri dari, darah; sistem pembuluh darah dan sistem pembuluh limfe. Sedangkan sistem pembuluh darah, terdiri atas; jantung dan serangkaian pembuluh darah yaitu **arteri**, kapiler dan vena. (Lesson *et al.*, 1995).

Semua jenis pembuluh darah mempunyai sel endotel yang melapisi lumennya. Pada pembuluh kapiler, lapisan sel endotel ini merupakan bagian utama dari dindingnya. Dengan meningkatnya ukuran pembuluh, terlihat penambahan lapisan pada dindingnya. Pada umumnya urutan lapisan-lapisan pembuluh darah dari dalam ke luar adalah sebagai berikut ;

1. Tunika (lapisan) intima.

Lapisan ini terdiri atas selapis sel endotel yang membatasi permukaan pembuluh darah dengan darah sirkulasi. Tepat dibawah sel endotel terdapat lapisan subendotel, yang terdiri atas jaringan ikat fibroelastis halus dan sel-sel otot polos (miosit). Bagian terluar dari lapisan ini dibentuk oleh sabuk jaringan ikat elastis yang disebut membran elastika interna (tunika elastika interna). Membran elastika interna merupakan struktur yang khas, yang terlihat jelas pada arteri kecil dan arteri sedang. Struktur ini menjadi batas pemisah antara tunika intima dengan tunika media.

2. Tunika Media

Lapisan ini terutama terdiri dari sel-sel otot polos yang tersusun melingkar. Pada lapisan ini juga ditemukan jaringan ikat elastis dan kolagen dalam jumlah beragam yang terselip diantra sel-sel otot polos.

3. Tunika adventisia (lapisan luar).

Lapisan ini terutama terdiri atas jaringan ikat yang sebagian besar tersusun memanjang (sejajar dengan sumbu panjang pembuluh). Lapisan ini merupakan lapisan terluar dari pembuluh darah, yang pada umumnya berhubungan dengan jaringan ikat dari organ yang dilalui. Pada pembuluh darah besar, pada lapisan ini dapat dijumpai adanya vasa vasorum, yaitu pembuluh darah yang berfungsi memberikan nutrisi pada pembuluh darah lainnya (*vessel of vessels*) (Constantinides, 1994; Lesson *et al.*, 1995).

2.1.1. Anatomi Arteri

Berdasarkan ukurannya, pembuluh darah arteri dapat dibagi menjadi 3 jenis yaitu, (1) arteriol, (2) arteri kecil dan sedang dan (3) arteri besar.

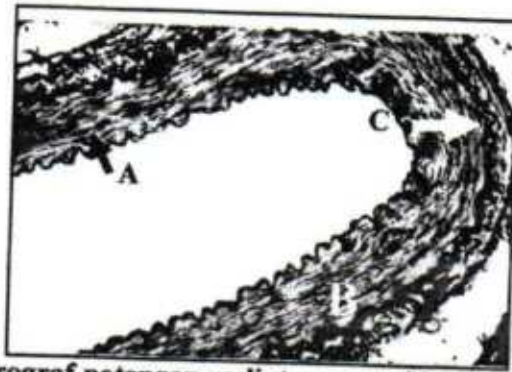
1. Arteriole

Merupakan jenis arteri terkecil, dimana pada manusia umumnya berdiameter antara 50 μm hingga 100 μm . Arteriol memiliki lumen yang relatif sempit dibandingkan dengan tebal dinding pembuluhnya. Tunika intimanya hanya terdiri dari sel-sel endotel dan membrana elastika interna saja, dan tidak didapati jaringan subendotel. Dengan mikroskop cahaya, membrana elastika interna nampak sebagai garis tipis berkilau tepat dibawah endotel. Tunika medianya terdiri dari 1-5 lapis sel otot polos dengan sabut-sabut elastis yang tersebar diantaranya. Tunika adventisiannya sangat tipis, terdiri dari selapis jaringan ikat yang mengandung sabut elastis dan kolagen, dengan arah memanjang. Lapisan ini menyatu dengan jaringan ikat disekitarnya, dan tidak memiliki membran elastika eksterna. Arteriol mampu mengontrol distribusi darah ke dalam berbagai jaringan kapiler yang berbeda, melalui mekanisme vasodilatasi dan vasokonstriksi lokal. Sebagian besar penurunan tekanan darah terjadi pada arteriol ini, dan sehingga tekanan aliran darah akan menurun (lunak) ketika memasuki kapiler.

2. Arteri Kecil dan Sedang

Golongan ini meliputi hampir semua arteri yang termasuk dalam *tipe muskular* dan mencakup semua arteri yang bernama dan semua arteri kecil yang belum dinamai. Tunika intimanya mempunyai 3 lapisan yang jelas, yaitu lapisan endotel,

subendotel dan membran elastika interna. Sebagian besar tunika medianya ditempati oleh lapisan sel-sel otot polos (antara 6 hingga 40 lapis), yang tersusun melingkar. Diantara lapisan tersebut terdapat sejumlah kecil jaringan ikat yang mengandung sabut elastis, kolagen dan retikulin, serta sedikit fibroblas. Tunika adventisianya sering memiliki tebal yang sama dengan tunika media. Tunika adventisia mengandung jaringan ikat kolagen dan elastis yang tersusun memanjang, dimana sabut elastis yang terdapat di bagian dalamnya membentuk membran elastika eksterna. Berdasarkan fungsinya, arteri kecil dan sedang dapat digolongkan sebagai arteri distribusi atau arteri pembagi, karena mereka membagi darah ke berbagai organ dan mengatur supli darah sesuai dengan kebutuhan faal yang berbeda (Gambar 2.1).

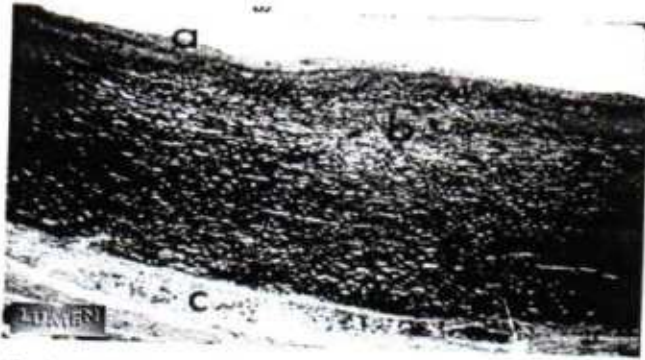


Gambar 2.1. fotomikrograf potongan melintang arteri kecil dan sedang. Arteri jenis ini memiliki batas-batas antar lapisan yang paling jelas. Membran elastika interna (A) merupakan batas antara tunika intima dengan tunika media (B), dan membran elastika eksterna (C) merupakan batas antara tunika media dengan tunika adventisia (Royce dan Harting, 1997).

3. Arteri Besar

Arteri besar juga sering disebut sebagai *arteri elastis*. Di dalam golongan ini termasuk aorta dan cabang-cabang utama terbesarnya seperti, a. brakiosefalis, a. subklavia, a. iliaka communis dan a. carotis communis. Dinding arteri besar biasanya relatif tipis dibandingkan dengan ukuran pembuluhnya. Sel endotel tunika intimanya berbentuk poligonal, dan memiliki jaringan subendotel yang disusun oleh jaringan ikat kolagen elastis dan sel-sel otot polos. Membrana elastika internanya tidak begitu jelas. Tunika medianya dicirikan oleh banyaknya sabut elastis (40-60 lapis) yang tersusun melingkar. Ruangan diantara sabut elastis tersebut diisi oleh sel otot polos, sel fibroblas dan bahan dasar amorf. Tunika adventisianya berupa selubung tipis yang sulit dibedakan dengan jaringan sekitarnya. Karena struktur dindingnya, arteri besar

mampu meredam tekanan darah yang besar, yaitu dengan cara mengembangkan sabut-sabut elastis yang terdapat pada tunika medianya. Menurut fungsinya, arteri besar dapat digolongkan sebagai arteri penghubung, yang bertugas mengantarkan darah ke dalam cabang-cabang arteri yang lebih kecil (Lesson *et al.*, 1995).



GAMBAR 2.2. Arteri besar. Batas antar lapisannya tidak jelas. Tunika intima terdiri dari sel endotel berbentuk poligonal dan jaringan subendotel (a). Tunika media merupakan lapisan paling tebal terutama terdiri dari jaringan ikat elastis dan otot polos (b). Pada tunika adventisianya (c), memperlihatkan adanya vasa vasorum (panah bawah) (Royce dan Harting, 1997).

2.2. Atherosklerosis.

Artherosklerosis adalah istilah umum yang digunakan untuk menyebutkan semua jenis penyakit pada pembuluh darah arteri (dari bahasa Yunani *atherio* atau arteri, dan *sclerosis* yang berarti pengerasan). Istilah “pengerasan” yang digunakan disini sebenarnya kurang tepat, karena tidak sepenuhnya menggambarkan bentuk-bentuk kelainan yang terjadi. Jenis-jenis artherio-sklerosis antara lain; **atherosklerosis**, **arteriolar sklerosis** (fibroelstic hyperplasia dan hyaline arteriolar sclerosis) dan **medial calcific sclerosis** atau **Monckeberg's**.

Fibroelastic hyperplasia (atau intimal fibrosis) adalah penyempitan lumen arteri, yang diakibatkan oleh peningkatan proliferasi miosit, pembentukan jaringan ikat fibrous dan sabut elastis pada tunika intima (tanpa disertai penimbunan lipid). Hal ini terutama terjadi pada arteri kecil dan arteriole. Kelainan ini biasanya merupakan hal yang normal, terutama karena proses penuaan, tetapi seringkali prosesnya menjadi lebih cepat oleh karena hipertensi.

Hyaline arteriolar sklerosis, adalah penebalan dinding arteri yang terjadi sebagai akibat peningkatan jaringan ikat, dimana pada kondisi yang lebih lanjut mengakibatkan rusaknya struktur normal dinding arteri. Peristiwa ini biasanya hanya

terjadi pada arteriole, yang disebabkan oleh; (1) hipertensi kronis; (2) hyperglycemia kronis; (3) radiasi, dan (4) *focal-segmental glomerulosclerosis*.

Monckeberg's medial calcific sklerosis adalah proses kalsifikasi pada tunika media dinding arteri (terutama pada arteri besar). Kadaan ini sering terjadi karena proses penuaan, dan tidak terlalu berbahaya, kecuali bila terjadi sebagai komplikasi pada atherosklerosis stadium lanjut (*fibro fatty* lanjut) (Unger, 1999).

Atherosklerosis merupakan penyakit arteri yang paling kompleks. Selain karena penyebabnya yang sangat beragam (multifaktor), kompleksitas dari atherosklerosis juga dikibatkan oleh banyaknya proses dan sel yang terlibat (terutama dalam pembentukan plak sklerotik). Atherosklerosis pada umumnya terjadi pada arteri besar dan arteri sedang. Pada stadium awal dari perkembangannya, **proliferasi miosit** merupakan kejadian yang dominan, tetapi pada tahap selanjutnya sebagian besar miosit dan jaringan ikat elastis normal dinding arteri akan hancur, digantikan masa kolagen, lipid, dan kalsium. Keseluruhan proses patologis tersebut, mengakibatkan dinding arteri menjadi menebal, kasar, tetapi sangat rapuh (Constantinides, 1994).

Meskipun atherosklerosis dapat mengakibatkan kalsifikasi (pengerasan) dinding arteri, namun hal tersebut bukanlah menjadi masalah yang sebenarnya, atherosklerosis sangat berbahaya karena; (1) dapat mengakibatkan penyumbatan pada arteri (yang terjadi perlahan-lahan), dengan manifestasi kliniknya yaitu; *angina pectoralis, leg claudication, intestinal angina*; (2) penyumbatan mendadak oleh rupturnya plak (thrombosis, atheroembolisasi) atau perdarahan didalam plak, dengan manifestasi kliniknya yaitu, *myocardial infarct, atherosclerotic stroke, gangrene* pada rahang; (3) melemahnya dinding arteri (*atherosclerotic aneurysms*) (Unger, 1998; Constantinides, 1994).

Atherosklerosis yang terjadi bersama-sama dengan hipertensi (arteriolar sklerosis), merupakan penyebab kematian yang pertama di Amerika dan Eropa saat ini (Papas, 1999; Knight, 1998). Sedangkan di Indonesia, menurut Hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 1993 dan 1995, Penyakit Kardiovaskular Atherosklerosis (PKVAS), diduga merupakan penyebab kematian yang pertama (Tjokroprawiro, 1998).

2.2.1. Patogenesis Atherosklerosis

Hingga sekarang, patogenesis dari atherosklerosis sebenarnya masih belum jelas, dan hanya merupakan teori. Teori-teori tersebut adalah, (1) infiltrasi lemak; (2) cedera endotel (*endothelial injury*); (3) trombogenik atau *Rokitansky theory*; (4) sintesis lemak lokal; (5) tumorigenik. Dari teori-teori tersebut, kombinasi dari 3 teori pertama adalah yang paling banyak diterima saat ini (Rokitansky, 1992).

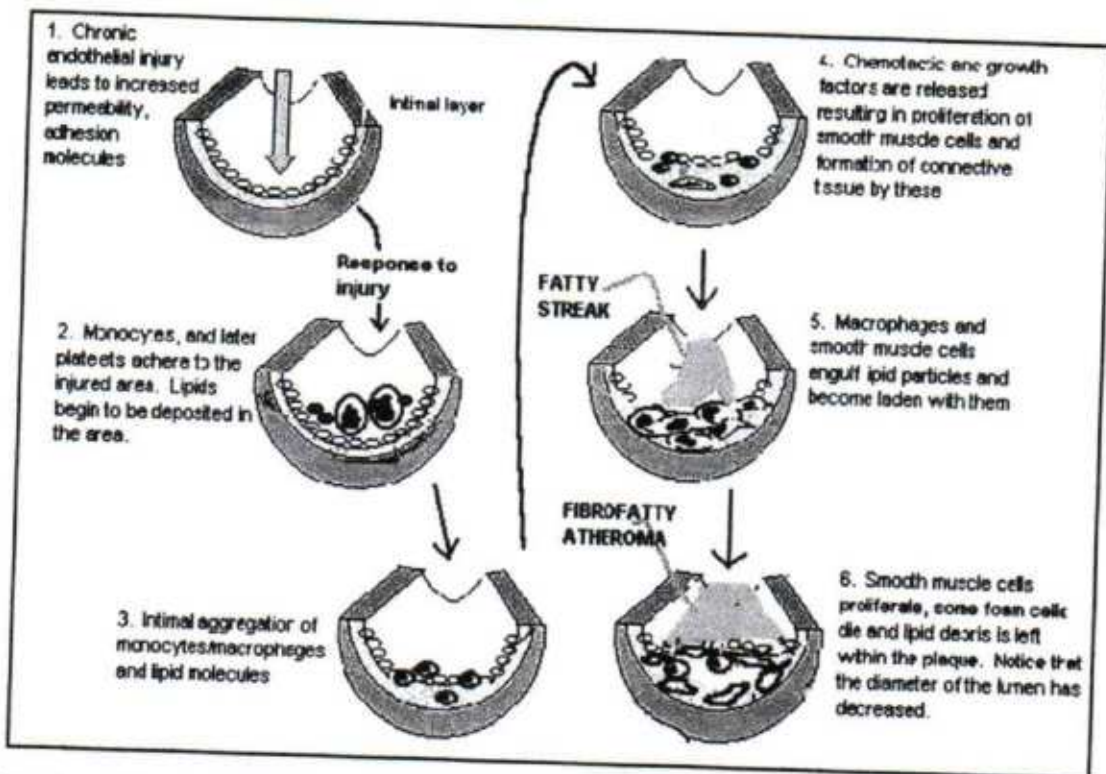
Menurut Constantinides (1994), setiap teori tentang patogenesis dari atherosklerosis, harus dapat mengakomodasi semua komponen yang terlibat dari fenomena alam yang sangat kompleks ini, serta harus dapat menjelaskan kapan dan dimana masing-masing komponen itu bekerja.

Patogenesis atherosklerosis merupakan proses yang sangat kompleks, karena selain penyebabnya multifaktor, juga melibatkan banyak proses dan komponen yang berbeda. Proses-proses tersebut yaitu; (1) cedera endotel; (2) *uptake* lipid oleh miosit, monosit dan makrofag; (3) infiltrasi monosit dan perubahan monosit menjadi makrofag; (4) proliferasi sel otot polos dinding vaskular; (4) proses pembentukan sel busa (*foam cell*) dari miosit, monosit dan makrofag; (5) disintegrasi sel busa; (6) kerusakan sabut elastis; (7) akumulasi mucopolisakarida; (8) penimbunan lipid ekstraselluler; (9) deposit kalsium dan (10) pembentukan *gruel* (masa seperti "bubur" atau disebut juga atheroma). Sedangkan sel-sel dan komponen yang terlibat antara lain, sel endotel, otot polos (miosit) dinding vaskular, monosit, makrofag, fibrosit, trombosit, lipid dan kalsium (Pratanu, 1997; Constantinides, 1994).

Atherogenesis pada dasarnya merupakan suatu bentuk respon inflamasi, yang dilakukan oleh permukaan dalam dinding arteri terhadap berbagai jenis gangguan. Tunika intima merupakan bagian yang sangat penting dari dinding arteri, terutama dalam memelihara fungsi normal dinding arteri. Peran tersebut terutama dijalankan oleh endotel, yang antara lain berfungsi, (1) menjaga agar permukaan pembuluh tetap licin; (2) kontraksi dan dilatasi pembuluh darah; (3) memperbaiki kerusakan dinding pembuluh.

Selain endotel, sel miosit dan sel makrofag yang terdapat didalam sub endotel tunika intima juga merupakan sel-sel yang sangat penting. Perubahan sifat sel makrofag yang menjadi sangat aktif dalam mefagosit kolesterol LDL, merupakan hal yang sangat menentukan perjalanan penyakit ini.

Peningkatan respon makrofag (dalam memfagosit kolesterol LDL) yang terjadi secara mendadak (pada awal atherosklerosis), telah menjadi pertanyaan selama bertahun-tahun. Akhirnya diketahui bahwa, LDL teroksidasi (LDL-Ox) adalah merupakan faktor kuncinya. Makrofag menjadi lebih aktif dalam memfagosit LDL, terutama setelah LDL mengalami peroksidasi, sebagai suatu respon perlindungan seperti pada proses inflamasi umumnya (Unger, 1998). LDL-Ox adalah *chemotactic* bagi makrofag, yang merangsang sel ini untuk aktif memfagosit melalui reseptor *scavenger*. LDL-Ox bersifat sitotoksik, yang antara lain menyebabkan makrofag aktif mengekspresikan berbagai faktor pertumbuhan (seperti, sitokin). Sitokin-sitokin yang dikeluarkan makrofag selanjutnya bekerja pada endotel dan sel miosit, yang pada akhirnya mengakibatkan perubahan-perubahan yang lebih nyata, mengarah pada pertumbuhan plak sklerotik.



Gambar 2.3. Proses atherogenesis menurut teori cedera endotel. Akibat cedera yang kronis, permeabilitas endotel meningkat dan aktif mengekspresikan molekul-molekul adhesi (seperti ICAM-1 dan VCAM) (1). Molekul adhesi menarik monosit dan platelet menempel pada permukaan pembuluh di area yang mengalami cedera (2). Monosit, makrofag dan lipid bermigrasi ke dalam tubika intima (3). Faktor-faktor pertumbuhan yang dikeluarkan oleh makrofag merangsang proliferasi miosit dan sabut elastis (4). Makrofag, monosit dan miosit memfagosit lemak, dan berubah menjadi sel-sel busa (5). Sebagian miosit berproliferasi membentuk tudung plak, sementara itu sebagian besar sel busa hancur membentuk *gruel*, dan lumen pembuluh darah semakin menyempit

LDL-Ox yang teroksidasi tidak sempurna didalam makrofag (*Minimally Modified LDL/MM-LDL*) merupakan kolesterol paling berbahaya bagi endotel dan merupakan penyebab cedera endotel yang utama. MM-LDL juga diketahui merupakan faktor pemicu, yang mengakibatkan *fatty streaks* (lesi awal pada atherosklerosis) berkembang menjadi plak lanjut.

Selain melalui peran makrofag, LDL-Ox juga dapat menyebabkan cedera endotel secara langsung, ketika LDL-Ox ini melintasi sel endotel menuju lapisan sub endotel. Melalui beberapa mekanisme tersebut, pada akhirnya endotel akan mengalami cedera, sehingga kehilangan fungsi normalnya (disfungsi endotel).

Fakta tersebut sekaligus menjelaskan tentang peran penting dari radikal bebas (dari manapun sumbernya) dalam atherosklerosis. Bahkan diyakini bahwa, radikal bebas baik ROS maupun RNS merupakan **faktor utama yang memulai terjadinya proses atherogenesis** (Halliwell and Gutteridge, 1998).

Berdasarkan pada komposisi bahan penyusun tudung plak-nya (*plaques cap*), tahap perkembangan plak dapat dibagi menjadi, (1) *Fatty streaks* (lesi awal yang sangat tipis dan belum mempunyai tudung plak); (2) plak *musculo-fatty* muda (memiliki tudung plak yang terutama terdiri dari otot polos); dan (3) plak *fibrous-fatty* lanjut (tudung plaknya terutama disusun oleh sabut ikat fibrous) (Unger, 1999; Constantinides, 1994).

Tahap-tahap perkembangan plak tersebut dapat digambarkan sebagai berikut;

(1) Lesi Awal Tipis (*fatty streaks*)

Fatty streaks merupakan bentuk lesi paling awal yang dapat terlihat dengan "mata telanjang", sebagai goresan berwarna kuning pada dinding arteri, dimana pada pengamatan mikroskopis, keadaan ini menggambarkan adanya cedera endotel, reaksi proliferasi miosit dan penimbunan lemak (yang menyebabkan kesan warna kekuningan) pada tunika intima dinding arteri.

Permeabilitas endotel yang meningkat akibat cedera, menyebabkan infiltrasi beberapa komponen plasma seperti, fibrinogen, glikoprotein, dan lipoprotein pada dinding pembuluh darah. Dengan mikroskop elektron diketahui bahwa, pada endotel yang cedera nampak gambaran *interendotelial junction* yang terbuka dan perluasan retikulum endoplasmik kasar (Thomas, 1998; Constantinides, 1994).

Fatty streaks merupakan **prekursor** bagi pertumbuhan plak sklerotik berikutnya. Lesi awal ini biasanya stabil dan dapat bertahan selama bertahun-tahun.

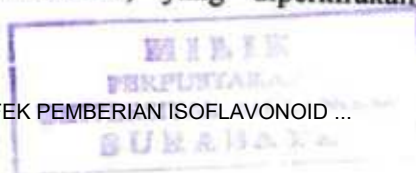
Diperkirakan *fatty streaks* terdapat pada hampir semua bayi yang baru lahir (sebagai akibat kadar kolesterol maternal), dan kadang juga ditemukan pada aorta orang dewasa, tanpa menimbulkan gangguan yang berarti (Napoli, 1997). *Fatty streaks* akan aktif dan berkembang secara progresif setelah teroksidasi oleh MM-LDL yang terbawah masuk kedalam dinding oleh arteri makrofag (Navab *et al.*, 1998)

(2) Plak *musculo-fatty* muda

Pada tahap ini, ketebalan dinding arteri bertambah, dan plak sklerotiknya menjadi lebih menonjol seperti bukit disekitar dinding arteri normal. Besarnya ukuran plak tersebut antara lain disebabkan oleh; (1) **proliferasi dari otot polos** yang semakin cepat; (2) akumulasi lipid (baik ekstra maupun intra seluler) (3) peningkatan jumlah infiltrasi sel monosit; serta (4) akibat pembentukan sel busa (*foam cell*) atau sel lemak dari miosit dan monosit.

Sel busa yang terus terbentuk mengakibatkan jumlah sel miosit pada tunika media semakin berkurang, dan digantikan oleh sekumpulan masa sel busa, atau disebut sarang lemak (*lipid nest*). Sementara itu, sel-sel miosit yang membentuk tudung plak atau *muscular cap*, diatas sarang lemak menunjukkan peningkatan respon pembelahan, sehingga membentuk dinding arteri baru, menggantikan sel miosit lama yang secara bertahap telah berubah menjadi sel busa dan rusak. Sel-sel miosit penyusun *muscular cap* diduga mengalami mutasi, dengan kehilangan reseptor LDL, sehingga tidak pernah berubah menjadi sel busa. Dengan mikroskop elektron nampak gambaran perluasan REK (Retikulum Endoplasmik Kasar), dan peningkatan sintesis berbagai jenis protein pada sel miosit (sel miosit sintetik).

Perubahan pada endotel antara lain, permeabilitas endotel (terutama yang terletak pada daerah tudung plak) meningkat hingga lebih dari 100 kali, baik terhadap molekul-molekul makro maupun mikro. Dengan mikroskop elektron terlihat nampak terbukanya interendotelial junction, hingga permukaan vaskular menyerupai "ayakan". Selain itu, pada endotel juga ditemukan inklusi dalam jumlah yang besar, yang berarti permeabilitas lemak melalui jalur transitolasmik juga meningkat. Membesarnya kantong-kantong dari retikulum endoplasmik kasar (REK) sel endotel, menunjukkan adanya peningkatan sekresi protein tertentu yang belum diketahui dengan pasti jenisnya (diperkirakan semacam enzim). Pada endotel supra-plak juga dapat diamati adanya sel-sel multinukleus, yang diperkirakan berasal dari



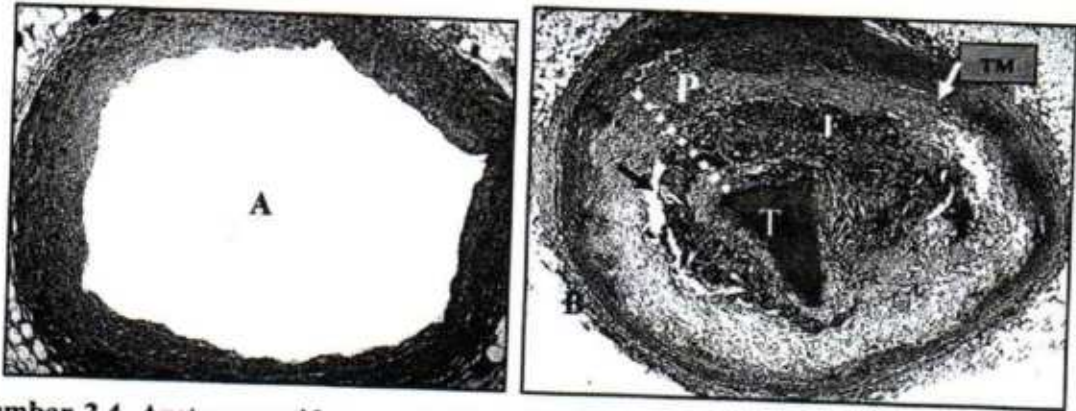
bergabungnya beberapa sel endotel yang menyatukan intinya dan bukan akibat dari mitosis, hal ini dapat diketahui dengan tidak ditemukannya pasangan sentriole.

(3) Plak Fibro-Fatty Lanjut

Tiga kejadian utama yang menandai tahap ini adalah;

- a. Semakin besarnya ukuran sel-sel busa (baik yang berasal dari miosit atau monosit), yang pada akhirnya akan hancur dan melepaskan sitoplasmanya diruang interselluler. Lemak dan protein serta komponen sitoplasma lainnya yang turut dikeluarkan, terkumpul bersama-sama dengan timbunan lemak ekstraselluler yang telah ada, membentuk masa yang disebut *gruel*, yang menggantikan sarang lemak. Berbeda dengan sarang lemak, *gruel* terutama berisi kristal-kristal lemak dan lemak tak berbetuk (*amorphous lipid*), trigliserida, asam lemak, lysolecithin, dan kristal-kristal kolestrol, dan protein. *Gruel* atau atheroma yang berarti "bubur", merupakan ciri yang khas pada plak ini (Unger, 1998).
- Penyebab nekrosisnya sel-sel busa, yang terjadi secara besar-besaran pada fase ini, masih belum dapat diketahui dengan pasti. Kematian sel busa diperkirakan karena (1) atropi organel; (2) akibat inklusi lemak yang semakin besar; (3). karena bahan sitotoksik yang merupakan produk metabolit peroksidasi (seperti, MDA dan HNE). Selain itu dimungkinkan juga karena proses autoimun oleh antibodi host, terutama terhadap sel busa yang berasal dari sel-sel miositik yang telah berubah profil antigennya.
- b. Miosit-miosit yang mengelilingi sarang *gruel* juga mengalami nekrosis akibat adanya enzim-enzim litik yang terdapat pada *gruel*, sedangkan miosit yang masih utuh, bertahan dengan cara menghasilkan sejumlah besar masa kolagen (tipe I, IV dan V), yang kemudian mengganti seluruh jaringan arteri disekitar *gruel*, termasuk *muscular cap* menjadi *fibrous cap*. Hingga saat ini belum diketahui dengan tepat penyebab nekrosis pada miosit, dan produksi kolagen yang sangat berlimpah, tetapi diduga hal ini dilakukan oleh sel miosit sintetik.
 - c. Setelah menempati hampir seluruh tebal dinding arteri, selanjutnya *gruel* mulai meluas ke tunika adventisia. Ketika batas terakhir antara *gruel* dan lapisan ini menjadi semakin tipis, maka akan terjadi hal-hal berikut; (1) vasa vasorum dengan sel-sel mesenkimal akan masuk dalam lesi sklerotik, dan menyebabkan terjadinya kapilerisasi didalam plak; (2) infiltrasi limfosit terjadi secara langsung pada daerah dibawah *gruel*, dimana sebagian besar

menggambarkan adanya sel-sel autoimmune terhadap hasil degradasi lipoprotein yang dianggap sebagai antigen. Bersamaan dengan itu juga terjadi respon autoimmune humoral yang membawa antibodi ke bagian dalam plak.



Gambar 2.4. Arety carotid normal (A) dan a. carotid dengan plak fibro fatty lanjut. Nampak lumen yang menyempit dan dipenuhi masa trombus (T). Plak tumbuh mengelilingi dinding arteri dan tudung menyatu (P). Tudung terutama dibentuk oleh jaringan ikat fibrous (F). Ruang-ruang kosong (panah hitam) adalah *gruel* dan ruang kosong seperti jarum adalah kristal-kristal kolesterol. Tunika media yang tersisa semakin menipis (TM) dibandingkan dengan tebal plak (garis putus-putus) (Constantinides, 1994).

Sel-sel multinukleus raksasa sering ditemukan, karena bergabungnya beberapa sel monosit. Pada akhir dari proses atherosklerosis, seluruh substansi normal dinding arteri (*musculo-elastis*) akan rusak, digantikan oleh 3 komponen utama yaitu *gruel*, kalsium dan kolagen, dengan komposisi yang bervariasi. Plak lanjut yang didominasi oleh masa *gruel* atau kolagen mempunyai kesamaan, yaitu, dinding vaskular menjadi keras tetapi relatif masih fleksibel, sedangkan bila masa kalsium yang mendominasi, pembuluh darah menjadi lebih keras dan kurang fleksibel.

Perubahan ultrastruktur yang terjadi pada tahap ini, tidak jauh berbeda dengan tahap sebelumnya, kecuali frekuensinya saja yang meningkat. Perubahan itu diantaranya, *interendotelial junction* supra-plak semakin terbuka, jumlah inklusi lemak pada endotel semakin besar dan ditemukan beberapa endotel dengan inti banyak dan raksasa. Pada arteri coronaria dan arteri cerebralis, proses yang sering terjadi pada tahap ini yaitu; (1) tudung plak bisa rata oleh tekanan arteri (khususnya sebelum menjadi kaku oleh deposit kalsium) dan masa *gruel* terdorong keluar, (2) pada saat lesi fibrotik yang kaya akan *gruel* terus tumbuh dan volume *gruel* membesar, mereka akan saling bertemu dan bergabung, menghasilkan atheroma yang sirkuler mengelilingi lumen arteri.

Tiga komplikasi utama yang sering terjadi pada tahap ini yaitu; (1) melemahnya dinding pembuluh darah terhadap tekanan darah, sehingga menyebabkan terjadinya aneurisma (dilatasi lokal) dan pecahnya pembuluh darah, dengan perdarahan yang hebat, seperti yang sering terjadi pada aorta abdominalis; (2) nekrosis pada tudung plak yang menyebabkan ulcerasi plak dan terbentuknya trombus di atasnya; (3) terbentuknya trombus di atas plak yang utuh (tidak didahului ulcerasi). Komplikasi kedua dan ketiga merupakan bentuk komplikasi yang paling banyak ditemui pada PJK dan stroke (Thomas, 1988;.Constantinides, 1994).

2.3. Ketebalan Tunika Intima-Media (IMT) Arteri Carotis Communis dan Kaitannya dengan Dengan Atherosklerosis.

Atherosklerosis merupakan penyakit yang pada awal perjalanannya, sering berlangsung tanpa menimbulkan gejala. Oleh karena itu, berbagai upaya medis telah dilakukan, untuk mengetahui lebih dini gejala-gejala dari penyakit ini. Salah satu upaya diagnosa dini yang banyak dilakukan saat ini adalah mengukur ketebalan kompleks tunika media a. carotis communis, dengan metode noninvasif (menggunakan ultrasonografi resolusi tinggi).

Metode ini diyakini sangat akurat dalam mendiagnosa adanya atherosklerosis, karena telah terbukti bahwa penebalan kompleks tunika media a. carotis communis, ternyata mempunyai korelasi dengan atherosklerosis. Ukuran ketebalan kompleks tunika media a. carotis communis, juga berkorelasi dengan adanya berbagai faktor resiko penting pada penderita (seperti, hipertensi, dan diabetes) (Lonn, 1999).

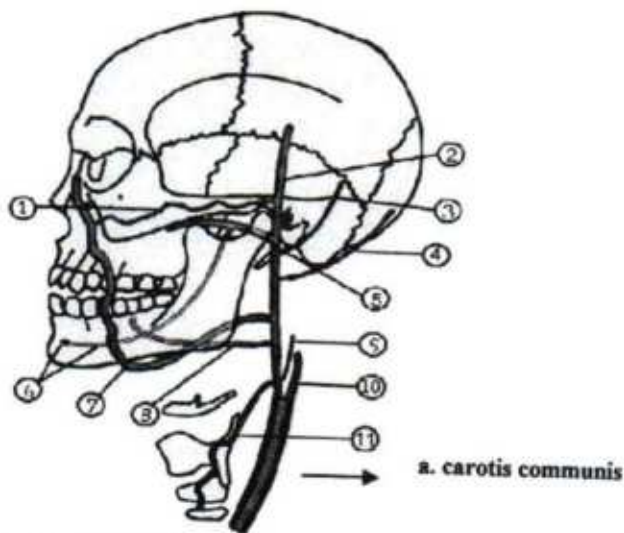
Arteri carotis communis kanan dan kiri adalah arteri utama yang menyuplai darah pada daerah kepala dan leher. Pada leher bagian atas posisi kedua arteri nampak sama, namun pada bagian pangkalnya (dasar leher) ada sedikit perbedaan, yang dikarenakan oleh perbedaan asal percabangannya. Arteri carotis communis kanan berasal dari arteri *innominate* (a. brakio-sefalik) yang merupakan cabang dari arcus aorta, sedangkan a. carotis communis kiri merupakan cabang langsung (dan merupakan cabang terbesar) dari arcus aorta.

Pada leher bagian bawah a. carotis communis tertanam lebih dalam (profundal), dibandingkan dengan di bagian atas leher (lebih superfisial). Kedua arteri berjalan miring keatas dari persendian sterno-clavicular, hingga batas teratas yaitu tulang rawan hyoid, atau disekitar vertebre cervical yang ke-4, dimana kemudian kedua

arteri tersebut terbagi menjadi dua cabang yaitu, a. carotis communis eksterna dan interna. Arteri carotis eksterna berfungsi menyuplai darah pada bagian superfisial kepala dan wajah, serta sebagian besar leher, sedangkan a. carotis communis interna, menyuplai darah pada cavum cranial (Gambar 2.3.) (Gray, 1977).

Berdasarkan strukturnya, a. carotis communis tergolong sebagai arteri besar. Sedikit berbeda dengan jenis arteri besar lainnya (misalnya, aorta), maka tebal dinding arteri ini relatif tipis dibandingkan dengan ukuran lumennya. Tunika intima disusun oleh selapis sel endotel berbentuk poligonal dan jaringan subendotel yang terdiri dari jaringan ikat elastis dan otot polos.

Tunika medianya merupakan lapisan yang paling tebal, dan terutama dibentuk oleh jaringan ikat elastis, dengan sel otot polos yang tersebar diantaranya. Sedangkan tunika adventisiannya merupakan selubung tipis, yang susah dibedakan dengan jaringan ikat disekitarnya (Lesson et al, 1995; Constantinides, 1994).



Gambar 2.5. Arteri carotis communis dan percabangannya (*Lumen Atlas of Human Anatomy*, 1998).

Karena letaknya yang berdekatan dengan jantung, maka a. carotis communis menderita tekanan aliran darah yang relatif lebih besar. Saat ini telah diketahui bahwa semua jenis stress mekanik yang ditimbulkan oleh aliran darah (*shears stress*, *stretch stress* dan turbulansi) merupakan sumber penghasil radikal bebas (superoksida radikal) yang hebat pada skala mikro dipermukaan endotel. Oleh karena itu dapat dimengerti, mengapa lokasi tertentu dari arteri dapat menjadi tempat yang

lebih beresiko untuk berkembangnya atherosklerosis dibandingkan tempat lainnya (Halliwell and Guetteridge, 1998).

Meskipun dapat terjadi pada semua jenis arteri, tetapi arteri-arteri tertentu diketahui mempunyai resiko yang lebih besar terhadap timbulnya atherosklerosis, dan mengalami perubahan-perubahan fungsi dan struktur yang lebih awal. Biasanya jenis arteri tersebut merupakan tempat yang paling menderita oleh stress haemodinamik, seperti pada a. carotis communis (khususnya pada bifurcasio carotis) dan arteri coronaria (Raitakari *et al.*, 1998; Sperelakis, 1998).

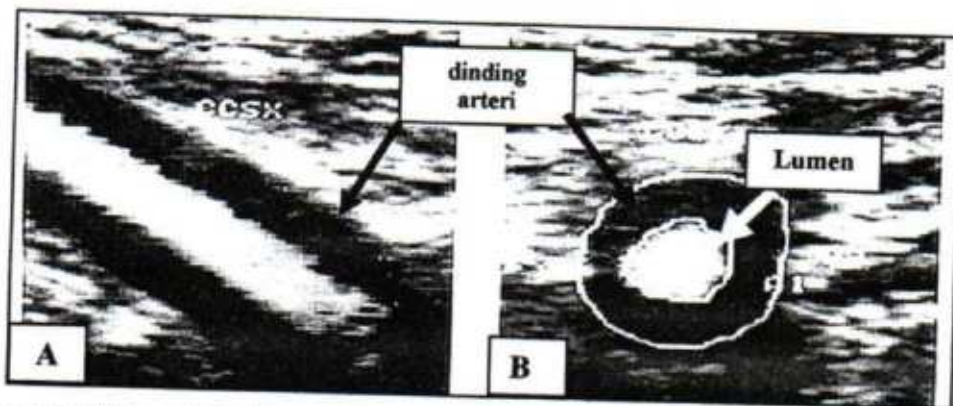
Selain jenisnya, lokasi-lokasi tertentu dalam sebuah pembuluh arteri juga sangat menentukan. Oleh karena menerima *shears stress* dan turbulansi aliran darah yang lebih besar, dinding sebelah lateral bifurcatio arteri carotis interna, merupakan tempat yang lebih beresiko terhadap perkembangan atherosklerosis, dibandingkan dengan sisi medialnya, serta bila dibandingkan dengan arteri carotis eksterna. Hal ini dapat diketahui dari adanya perbedaan kekuatan ekspresi lokal molekul adhesi (khususnya ICAM-1) antara dinding lateral dengan medial dari a. carotis communis. Nampak bahwa sisi lateral lebih kuat mengekspresikan ICAM-1 dibandingkan dengan sisi medial. Ekspresi ICAM-1 menggambarkan adanya cedera pada endotel (Endreset *et al.*, 1996).

Rangsangan mekanik yang terlalu kuat dan terjadi terus menerus dalam waktu yang lama, diketahui dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif dan menimbulkan berbagai efek biologis pada endotel seperti, (1) endotel akan aktif mengekspresikan berbagai faktor transkripsional (seperti, NF- κ B, AP-1, SSRE dengan tipikal GAGACC-*sequence*); (2) diekspresikannya gen-gen pertumbuhan (seperti, c-myc, c-jun, c-fos); (3) *platelet-derived growth factor* (PDGF-B); (4) tissue factor (TF) untuk mengawali terjadinya proliferasi fibroblas; (5) plasminogen; (6) endotelin (Sperelakis, 1998).

Lebih dari satu dekade yang lalu, pengukuran ketebalan tunika intima-media (Intima-Media Thickness/IMT) a. carotis communis dengan *ultrasonografi resolusi tinggi cara B* (juga disebut *quantitative carotid B mode ultrasonography*), telah digunakan sebagai satu metode pilihan untuk menentukan adanya atherosklerosis, serta untuk memperkirakan adanya faktor-faktor resiko pada penderita.

Hasil penelitian *in vitro* dan *in vivo* mengindikasikan bahwa, peningkatan IMT a. carotis, terbukti mempunyai korelasi sangat nyata dengan adanya gangguan-

gangguan fungsi yang mengarah pada berkembangnya atherosklerosis. Dari penelitian yang dilakukan terhadap pria dan wanita dari berbagai kelompok umur dan ras diketahui bahwa, pada mereka yang memiliki faktor-faktor resiko (seperti, hipertensi, diabetes, hiperkolesterolemia), maka juga ditemukan adanya peningkatan ukuran IMT a. carotis (Lonn, 1999). Ukuran IMT a. carotis juga digunakan sebagai prediktor terjadinya atherosklerosis pada bagian lain yang merupakan percabangannya seperti a. cerebralis, a. carotis ekstena dan interna, serta arteri lain yang bukan merupakan percabangannya seperti a. coronaria (Ding *et al.*, 1996).



Gambar 2.6. Color coded ultrasound a. carotis communis. Longitudinal (A) dan Axial (B) section dari a. carotid communis pada pria (27 tahun) dengan faktor resiko diabetes dan hipertensi. Penebalan pada kompleks tunika-intima (dibatasi lingkaran putih), mengakibatkan berkurangnya suplai darah hingga 70% dan meningkatnya tekanan darah pada percabangannya (Aminbakhsh and Mancini, 1999).

Hasil studi epidemiologis yang dilakukan oleh berbagai pusat-pusat penelitian melaporkan bahwa, resiko kejadian *myocardial infraction* diketahui meningkat, pada individu memiliki rata-rata IMT 0.822 mm atau lebih, dan resiko kejadian stroke, diketahui lebih tinggi pada individu dengan IMT a. carotis communis 0.75 mm atau lebih. Dari hasil penelitian ini dilaporkan pula bahwa, pasien-pasien penyakit jantung koroner mempunyai rata-rata IMT a. carotis communis 1 atau 2 di atas *standart* deviasi, dibandingkan dengan orang normal. Mengingat bahwa, atherosklerosis merupakan penyakit yang *asymptomatic*, maka upaya deteksi dini melalui pengamatan terhadap IMT a. carotis communis, merupakan usaha yang sangat berguna (Aminbakhsh and Mancini, 1999).

Penebalan tunika intima-media merupakan perubahan struktur dinding arteri paling awal yang dapat diamati secara klinis. Pada prinsipnya, perubahan struktur ini selalu didahului oleh adanya perubahan terhadap fungsi normal dari sel-sel penting

dinding arteri yaitu, sel endotel dan sel-sel otot polos dinding arteri. Dengan metode ultrasonografi diketahui bahwa, terdapat hubungan yang sangat signifikan antara penebalan dinding arteri dengan gangguan dilatasi arteri yang diperantarai oleh endotel dan miosit (*endothelium-dependent and smooth muscle-dependent arterial dilatation*) (Raitakari *at al.*, 1998).

Secara mikroskopik pada arteri yang mengalami penebalan menunjukkan gambaran sebagai berikut; (1) cedera endotel, yang diketahui dari terbukanya *interendotelial junction*, adanya perluasan retikulum endoplasmik kasar, serta peningkatan permeabilitas endotel (yang diketahui dari meningkatnya akumulasi komponen plasma seperti, fibrinogen, glikoprotein, dan lipoprotein pada jaringan subendotel tunika intima); (2) proliferasi miosit; dan (3) penimbunan lemak ekstraseluler, yang terjadi akibat meningkatnya permeabilitas endotel (Thomas, 1998; Constantinides, 1994).

2.3.1. Mekanisme Proliferasi Miosit Arteri

Penebalan kompleks tunika intima-media dinding arteri terutama dikarenakan oleh proliferasi miosit, yang merupakan salah satu dampak dari cedera endotel. Proliferasi otot polos vaskular dapat terjadi melalui beberapa mekanisme yaitu;

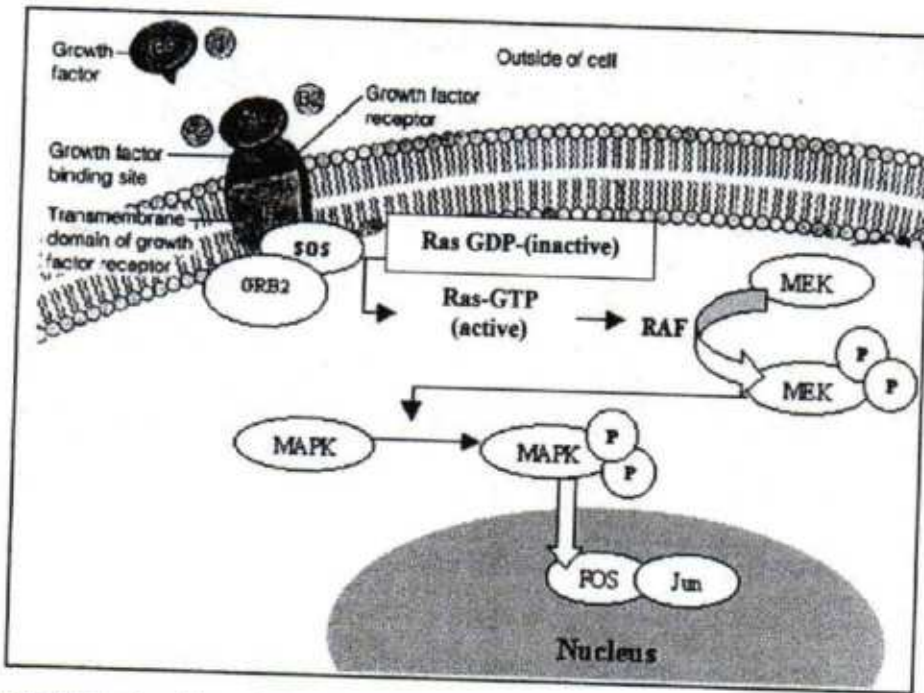
1. Sistem yang melibatkan heparinoid *mitosis inhibitor*, yang dihasilkan oleh sel miosit sehat/normal, untuk mengontrol mitosis sel lainnya. Perubahan yang drastis, yang diakibatkan oleh adanya cedera atau nekrosis pada miosit, akan menyebabkan hilangnya mekanisme penekan mitosis tersebut dan menyebabkan timbulnya rangsangan mitosis pada sel miosit disebelahnya (sel tetangga).
2. Reaksi proliferasi yang melibatkan *mitosis inhibitor factors* (MIF) yang dihasilkan oleh sel endotel (seperti, prostaglandin E₂ dan heparinoid) yang berfungsi menghambat proliferasi miosit. Produksi MIF akan berkurang atau hilang, bila sel endotel mengalami cedera atau rusak, yang mengakibatkan terjadinya proliferasi miosit.
3. Sistem yang melibatkan faktor-faktor pertumbuhan (*growth factor* atau *mitogenic factor*) yang berasal dari sel-sel darah, seperti platelet, monosit, dan makrofag yang dapat merangsang proliferasi miosit dan sel endotel. Senyawa mitogen ini merupakan protein yang disebut *platelet derived growth factor* (PDGF). Istilah PDGF juga digunakan untuk senyawa yang sama, yang dikeluarkan oleh monosit.

PDGF platelet dan monosit merupakan penyebab proliferasi yang utama pada lesi awal. Selain PDGF, faktor faktor pertumbuhan lainnya dapat berasal dari; fibroblas (yang menghasilkan bFGF atau *basic fibroblast growth factor*); makrofag (sel endotel yang menghasilkan dan dari sumber lainnya. Platelet, monosit dan makrofag bermigrasi ke subendotel, melalui *interendothelial junction* yang terbuka selama terjadinya cedera (Constantinides, 1994).

Pada sitoplasma otot polos terdapat suatu protein kinase yang disebut MAPK-1,2 (*Mitogen Activated Protein Kinase 1,2*). MAPK merupakan protein golongan serin kinase, yang berperan dalam menyalurkan signal ekstraselluler ke inti sel, untuk memacu terjadinya mitogenesis dan diferensiasi (gambar 2.7.) (Vied *et al.*, 2000).

Aktivasi MAPK oleh *growth factor*, dimulai dari ikatan antara *growth factor* dengan reseptor tirosine kinase. Ikatan ini mengakibatkan terjadinya fosforilasi Ras. Ras kemudian mengaktifasi RAF, yang mengakibatkan terjadinya stimulasi pada MEKs (*MAPK effector kinase*) atau disebut juga MAPKK (*MAPK kinase*). MEKs yang teraktivasi mengakibatkan fosforilasi MAPK. MAPK yang teraktivasi menyebabkan teraktifkannya beberapa target yang berbeda pada inti sel, seperti, gen cJNK (*c-Jun amino terminal kinase*) (Slieght dan Lieberman, 1998; Greene *et al.*, 2000). MAPK yang aktif mengakibatkan pembentukan kompleks faktor transkripsi seperti AP-1 (*activator protein -1*), dan peningkatan ekspresi protooncogen c-fos dan c-jun (gen-gen yang berhubungan dengan proliferasi dan diferensiasi). Hasil akhirnya adalah otot polos berproliferasi (Greene *et al.*, 2000).

4. Sistem yang melibatkan lipoprotein mitogenik, khususnya IDL dan LDL, serta mitogenik protein dan peptida (seperti, insulin dan arginine-vasopresine). Mekanisme yang tepat dari mitogenik-mitogik ini belum begitu jelas, yang pasti hiperlipemik yang lama, diketahui sangat signifikan dalam menyebabkan proliferasi miosit (Ziats and Robertson, 1990; Constantinides, 1994;).



Gambar 2.7. Jalur sinyal intraseluler proliferasi otot polos oleh aktivasi *growth factor* (Becker *et al.*, 1996)

2.4. Fungsi Endotel

Endotel merupakan sel epitel selapis pipih, yang terletak memanjang menutupi permukaan dalam dinding semua jenis pembuluh darah dan limfe. Sel endotel berbentuk poligonal dengan ukuran panjang 20-50 μm dan lebar antara 10-15 μm . Dengan mikroskop elektron, dapat diamati adanya *Weibel-Palade bodies* dengan diameter 0,1 μm dan panjang 3 μm , sebagai ciri khas dari sel ini (Dale *et al.*, 1999).

Saat pertama kali ditemukan (oleh Malphigi) pada kira-kira seratus tahun yang lalu, fungsi biologis endotel belum banyak diketahui. Baru pada sekitar tahun 1970-an, setelah ditemukan senyawa-senyawa vasoaktif yang dihasilkan oleh endotel yaitu, *Endothelial-derived Relaxation Factor* (EDRF-NO), prostacyclin (PGI_2) dan *Endothelial-derived Contraction Factor* (endothelin), diketahui bahwa sel ini memiliki fungsi biologis yang amat penting bagi pembuluh darah (Harijanto, 1999)

Endotel juga berfungsi menghasilkan beberapa jenis jaringan ikat subendotel dan memelihara metabolisme normal seluruh dinding vaskular, dengan mengatur transport air, ion-ion inorganik kecil, transport protein dan lipoprotein (LDL) secara pinositosis (Unger, 1999). Sel endotel merupakan sel fagositik (Yuwono, 1997). Selain itu, sel endotel juga diketahui merupakan sel mekanosensor, yang secara aktif dapat merespon semua bentuk rangsangan mekanik yang berasal dari aliran darah, seperti *stretch-activated channels (SACs)*/ *biaxial tensile stress*, *shear stress-*

activated channels (SSCs) dan turbulansi aliran darah (Sperelakis, 1997). Secara garis besar, fungsi-fungsi sel endotel tersebut dapat dibagi menjadi 2 fungsi pokok yaitu; (1) sebagai regulator aliran darah dan (2) pelindung dinding pembuluh.

2.4.1. Fungsi endotel dalam regulasi aliran darah.

Sistem regulasi kardiovaskular adalah suatu sistem yang berfungsi untuk mempertahankan jumlah aliran darah pada organ atau jaringan agar tetap konstan. Dalam menghadapi tantangan yang berat (misalnya pada kasus perdarahan yang hebat), maka sistem ini berperan dalam mempertahankan aliran darah ke daerah yang vital (misalnya aliran darah ke otak dan ke jantung), sambil mengorbankan sirkulasi ke bagian tubuh yang lain.

Sistem regulasi ini dilakukan dengan cara merubah pengeluaran pompa jantung (regulasi curah jantung) dan merubah diameter pembuluh darah resistans (terutama arteriole). Pembuluh darah mempunyai kemampuan untuk mengubah diameternya, melalui pengaturan tonus vaskular untuk melebar (vasodilatasi), atau menyempit (vasokonstriksi). Dalam menjalankan fungsi regulasi ini, selain endotel, sel-sel miosit juga mempunyai peranan yang sangat penting. Pengaturan tonus vaskular dilakukan melalui dua cara yaitu, **regulasi sistemik** dan **regulasi lokal**, dimana kedua mekanisme tersebut bekerja secara sinergis.

Regulasi sistemik dilakukan oleh senyawa yang bersirkulasi dan oleh saraf vasomotor. Senyawa di dalam sirkulasi yang menimbulkan vasodilatasi mencakup, senyawa kinin (yaitu bradikinin dan lisisbradikinin), senyawa VIP dan ANP. Vasokonstriktor yang berada dalam sirkulasi meliputi, vasopresin, norepinefrin, epinefrin dan angiotensin II. Sedangkan saraf vasomotor turut mengatur tonus vaskular melalui norepinefrin.

Regulasi lokal (autoregulasi) merupakan kemampuan intrinsik pembuluh darah dalam mengkompensasi terjadinya perubahan sedang dalam tekanan aliran darah, sehingga aliran darah dapat dipertahankan. Kapasitas autoregulasi sangat baik diperlihatkan oleh arteri-arteri yang mengalir pada ginjal, otak, jantung, dan hati (Ganong, 1995).

Pada regulasi lokal, sel endotel merupakan pemegang kendali yang utama. Fungsi ini terutama dilakukan oleh senyawa-senyawa vasoaktif, yaitu EDRF-NO dan prostasiklin (vasodilator) dan endothelin (vaokonstriktor). Proses sekresi jenis

senyawa vasoaktif ini sangat tergantung pada sinyal yang berasal dari perubahan lingkungan kimiawi dan fisik yang bersifat lokal disekitar pembuluh darah.

Rasangan fisik yang dapat menjadi sinyal bagi endotel antara lain *stretch-activated channels (SACs)*/ *biaxial tensile stress*, *shear stress-activated channels (SSCs)* dan turbulansi aliran darah, perubahan tekanan oksigen, PH, dan perubahan suhu badan (Sperelakis, 1997). Sedangkan sinyal-sinyal kimiawai yang dapat mempengaruhi sekresi vasoaktif endotel adalah semua senyawa kimia antara lain, senyawa-senyawa kinin, senyawa P, adenosin, histamin dan serotonin (Sperelakis, 1998; Ganong, 1995).

Suatu observasi kebetulan yang dilakukan beberapa tahun yang lalu, telah membawa pada penemuan tentang faktor perelaksasi otot polos yang berasal dari endotel (EDRF= *endothelium-derived relaxing factor*), yaitu suatu senyawa yang sekarang diketahui sebagai nitric oksida (NO) atau EDRF-NO, dan prostaglandin prostasiklin (PGI₂). Kedua senyawa vasoaktif ini menyebabkan dilatasi arteri (senyawa vasodilator) (Ganong, 1995)

Proses sintesis EDRF-NO dimulai dari terbukanya saluran-saluran ion, melalui mekanisme yang tergantung pada reseptor membran (baik yang terikat pada protein G atau oleh reseptor yang terikat protein kinase). Tipe rangsangan menentukan saluran ion yang akan diaktifkan seperti; (1) rangsangan regang (*strain* atau *stretch*), akan menyebabkan diaktifkannya saluran Ca⁺ (*stretch-activated Ca⁺ channels/ SACs*); (2) rangsangan gesek (*shear*) akan mengaktifkan secara tidak selektif saluran Ca⁺ dan saluran kation lainnya seperti K⁺ (*shear stress-activated non selective kation channels/SSCs*), dan (3) senyawa kinin mengaktifkan saluran Ca⁺; (4) peningkatan suhu badan akan mengaktifkan saluran K⁺ (Sperelakis, 1998; Ganong 1995).

Semua jenis rangsangan melalui reseptornya masing-masing, mengaktifkan siklus cGMP, dan terbukanya saluran-salaura ion. Ion kalsium memegang peran kunci dalam sintesis EDRF-NO, dan peningkatan konsentrasi Ca²⁺ intarselluler merupakan tahap yang penting, karena Ca²⁺ merupakan *second messenger* utama. Dalam sitoplasma endotel, pertama-tama Ca²⁺ akan berikatan dengan protein kalmodulin (yang inaktif), membentuk kompleks kalsium-kalmodulin yang sangat aktif (kalmodulin akan aktif, bila [Ca²⁺] intraselluler melebihi kadar normalnya (10⁻⁴ mM). **Kompleks kalsium-kalmodulin** kemudian mengaktifkan enzim NOS (*nitric oxide syntetase*), yang terikat pada membran sel. NOS kemudian menghasilkan

EDRF-NO dan sitrulin, dengan cara mengoksidasi guanidin dari residu asam amino L-arginine.

Prostasiklin juga merupakan vasodilator penting endotel. Prostasiklin dihasilkan dari asam arakhidonat, dengan bantuan prostasiklin sintetase (suatu kofaktor non spesifik yang tak tergantung kalsium intraselluler). Asam arakhidonat disintesa dari fosfolipase A2 dengan proses yang tergantung pada kalsium. Oleh karena itu, baik produksi EDRF-NO maupun prostasiklin, sangat ditentukan oleh kadar kalsium intraselluler (Sperelakis, 1998; Becker *et al.*, 1998; Flavahan and Vanhoutten, 1995).

Konsentrasi Ca^{2+} intraselluler diturunkan melalui beberapa mekanisme, yaitu; (1) melalui pompa kalsium pada membran sel; (2) pemompaan kalsium kedalam retikulum endoplasmik; (3) melalui pompa sodium-kalsium; (4) menyimpan kalsium pada mitokondria (Sperelakis, 1998).

Selain oleh rangsangan mekanik, pelepasan senyawa vasodilator oleh endotel juga, dirangsang oleh hormon seperti, kinin, senyawa P dan serotonin, sedangkan histamin, adenosin, epinefrin dan ANP, merupakan senyawa-senyawa vasodilator, yang bekerja langsung pada otot polos vaskular (Sperelakis, 1998; Ganong, 1995).

Senyawa kinin khususnya bradikinin dan lisilbradikinin, diproduksi didalam jaringan dari kininogen, dengan bantuan enzim proteolitik kalikrein, yang banyak ditemukan pada ginjal, usus, kelenjar keringat dan saliva. (Ganong, 1995). Meskipun sama-sama tergantung Ca^{2+} , namun sekresi EDRF-NO yang diakibatkan oleh rangsangan kinin, sedikit berbeda dengan produksi EDRF-NO oleh rangsangan mekanik, karena kinin meningkatkan konsentrasi Ca^{2+} sitosol dengan melepaskan simpanan kalsium yang terdapat pada REK endotel, melalui mekanisme yang diperantari oleh inositol -1,4,5- triphosphate ($InsP_3$ atau IP_3) (Becker *et al.*, 1998).

Melalui reseptor khusus, EDRF-NO menyebabkan relaksasi sel otot polos vaskular, dengan cara merangsang guanylate siklase dan meningkatkan siklik GMP (cGMP), sedangkan prostasiklin merangsang adenyllyl siklase dan meningkatkan siklik AMP (cAMP) (Flavhan NA and Vanhaouten PM, 1995).

Selain senyawa vasodilator, endotel juga menghasilkan senyawa vasokonstriktor seperti, endotelin (*endothelium-derived contracting factor* /EDCF). Endotelin merupakan senyawa polipeptida yang memiliki 21 gugusan asam amino, dengan 2 jembatan disulfida. Senyawa ini bekerja sebagai agonis endogen bagi saluran ion kalsium yang sensitif dihidroperidin pada otot polos vaskular (Ganong, 1995).

Endotelin akan disekresikan, oleh adanya rangsangan mekanik yang kuat. Endotelin kemudian bekerja pada sel otot polos vaskular melalui reseptor membran ET, dan menyebabkan kontraksi melalui mekanisme yang tergantung pada InsP_3 (becker *et al.*, 1998). Mediator vasokonstriktor lain yang bukan berasal dari endotel antara lain, vasopresin, angiotensin II (dihasilkan oleh ginjal) dan norepinefrin (Ganong, 1995).

2.4.2. Fungsi Endotel Sebagai Pelindung Pembuluh Darah

Fungsi perlindungan endotel terhadap pembuluh darah, antara lain meliputi; (1) menghambat agregasi trombosit; (2) mencegah terjadinya proses trombosis dan koagulasi, serta merangsang pelarutan gumpalan yang terbentuk didalam lumen arteri (fibrinolisis); (3) menghambat proliferasi sel otot polos dinding vaskular (Robbin dan Kumar, 1995; Flavhan NA and Vanhaouten PM, 1995).

(1) Fungsi endotel dalam menghambat agregasi trombosit.

Dalam keadaan normal trombosit mengalir dalam aliran darah dan tidak melekat pada endotel. Fungsi antitrombosit ini merupakan sifat intrinsik membran endotel yang terutama dilakukan oleh prostasiklin (PGI_2). Mekanisme antitrombosit dilakukan dengan cara mendegradasi ADP, yaitu agen agregasi kuat yang dikeluarkan oleh trombosit yang teraktivasi (Robbins dan Kumar, 1995; Sperelakis 1998).

(2) Fungsi endotel dalam mencegah trombosis, koagulasi, dan fibrinolisis.

Sel endotel merupakan pertahanan pertama diantara trombosit dan faktor-faktor koagulan dengan jaringan subendotel. Disatu pihak endotel bersifat antitrombosit dan antikoagulan, tetapi dalam keadaan tertentu, sebaliknya endotel bersifat prokoagulan (misalnya, pada peristiwa pembekuan darah). Dalam hal ini peran endotel kurang lebih merupakan *barrier* yang memisahkan trombosit dan protein-protein koagulasi dari komponen-komponen trombogenik yang terdapat pada jaringan subendotel (terutama sabut kolagen) (Robbins dan Kumar, 1995)..

Fungsi antikoagulan endotel terutama dilakukan oleh zat mirip heparin (diduga merupakan heparan sulfat) dan protein trombomodulin. Heparan sulfat bekerja tidak langsung. Zat ini sangat mempermudah kerja protein antikoagulan antitrombin III yang telah ada. Antitrombin III menginaktivasi trombin dan faktor koagulasi lain seperti faktor Xa. Kerja antikoagulan antitrombin III dipercepat 2000 kali setelah berikatan dengan heparan sulfat endotel. Sedangkan trombomodulin

bekerja tidak langsung dengan cara mempercepat pengaktifan antikoagulan alami yang disebut protein C. Protein C yang aktif menghambat pembekuan dengan melarutkan secara proteolitik faktor V dan VIII (Robbins dan Kumar, 1995).

(3) Fungsi endotel dalam menghambat proliferasi miosit.

Selain berfungsi sebagai *antivasospasme* lokal, EDRF-NO juga diketahui dapat mencegah proliferasi miosit yang tidak diinginkan (Schinit dan Vanhoutten, 1993). Sel endotel dapat menghasilkan faktor-faktor pertumbuhan (*growth factors*) sekaligus inhibitor pertumbuhan (*growth inhibitor*). Dalam kondisi fisiologis, efek *growth inhibitor* lebih dominan dari pada *growth factors*, sehingga pada kondisi endotel yang sehat proses proliferasi miosit dapat dihambat. Selain EDRF-NO, dalam mencegah proliferasi sel endotel juga mensekresi *mitosis inhibitor factors* (MIF) (seperti, prostaglandin E₂ dan heparinoid). Produksi MIF akan berkurang atau hilang, bila sel endotel mengalami cedera atau rusak (Castelott *et al.*, 1984; Constantinides, 1994).

2.5. Cedera Endotel

Peranan cedera endotel didalam atherogenesis dengan sangat jelas dapat tergambarkan pada semua hewan coba, mulai dari yang paling peka terhadap kolesterol (kelinci), hingga yang paling tahan terhadap kolesterol (tikus).

Pada kelinci hiperlipemik, dengan kadar kolesterol darah 500 mg/ml (normal 100 mg/100ml), kurang lebih dibutuhkan waktu 2 bulan, untuk mendapatkan pertumbuhan plak sklerotik yang jelas (dengan proliferasi miosit dan pembentukan sel busa). Akan tetapi, dengan memanipulasi terjadinya cedera endotel terlebih dahulu (dengan cara apapun misalnya, dengan epinefrin, calsiferol imun kompleks), maka pertumbuhan plak dapat terjadi hanya dalam waktu 2 minggu (dengan kadar kolesterol darah hanya 150 mg/ml).

Dengan cara yang sama, pada tikus, plak sklerotik dapat terbentuk hanya dalam waktu 2 minggu (dengan kolesterol darah normal yaitu 50mg/100ml). Sementara itu, pada tikus yang tidak dimanipulasi cedera endotel, tidak didapatkan adanya pertumbuhan plak, meskipun kadar kolesterol darahnya telah dinaikan hingga 500 mg/100ml (Schwenke *et al.*, 1998). Fakta ini sekaligus telah merubah pendapat (yang dipertahankan hingga pertengahan tahun 1970-an), yang mengatakan bahwa, atherosclerosis terjadi semata-mata dikarenakan oleh hiperlipemik (Constantinides, 1994). Cedera endotel oleh apapun penyebabnya, akan mengakibatkan terganggunya

fungsi normal sel tersebut. Gangguan terhadap sintesis EDRF-NO dan prostasiklin, serta peningkatan produksi *endothelin-derived contracting factor/EDCF* (endotelin), merupakan bentuk gangguan yang paling serius bagi endotel (Sperelakis, 1998)..

Setiap faktor penyebab cedera endotel, pada prinsipnya merupakan penyebab terganggunya gangguan sinyal pada reseptor terikat protein G, sehingga menurunkan sekresi EDRF-NO dan prostasiklin pada endotel. Disamping itu, gangguan pada sinyal tersebut juga menghambat sintesis adenyl siklase, sehingga meningkatkan kadar cAMP endotel, yang merupakan *dependant activation* dari faktor transkripsi nuklear (**NFκB/nuclear factors kappa binding**).

Pengaktifan **NFκB** merupakan hal kedua terpenting pada endotel yang terjadi akibat cedera, setelah menurunnya produksi NO. Karena hal ini mengakibatkan, endotel akan mengekspresikan berbagai jenis molekul seperti, (1) ELAM-1 (*endothelial leukocyte adhesion molecule*), yang secara selektif menyebabkan agregasi sel neutrofil. (2) ICAM-1 (*intercelluler adhesion molecule-1*); (3) VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), yaitu molekul-molekul adhesi untuk limfosit dan monosit; (4) IL-8, yaitu sebuah faktor khemotaktik yang sangat poten, yang berperan untuk menarik neutrofil memasuki dinding vaskular; (5) IFN-γ (gamma interferon), yang diketahui dapat menarik makrofag dan mengarahkannya pada daerah yang mengalami cedera. IFN-γ dan TNF-α bersama-sama menyebabkan meningkatnya fungsi fagosit dari makrofag dan neutrofil, peningkatan aktivitas fagosit ini, juga menyebabkan meningkatnya pelepasan enzim litik interselluler. (Constantinides, 1994; Kuby, 1998; Unger, 1999).

Selain itu, cedera endotel juga menyebabkan menurunnya trombomodulin dan prostasiklin, keadaan ini mengakibatkan terjadinya agregasi dan aktivasi platelet. Melalui faktor pertumbuhan yang dikeluarkannya (*platelet derived growth factor/PDGF* dan *fibroblast growth factors/FGF*), platelet menyebabkan terjadinya proliferasi miosit dan fibroblas. Proliferasi miosit juga dipicu oleh kelangkaan MIF, akibat disfungsi endotel. Pada stadium akhir dari atherosklerosis, agregasi dan aktivasi platelet menyebabkan terjadinya trombosis (Constantinides, 1994). PDGF sebenarnya juga dihasilkan oleh monosit, PDGF yang dihasilkan oleh monosit, diketahui merupakan penyebab proliferasi miosit yang utama pada awal dari atherosklerosis (Ziats and Robertson, 1990).

2.5.1. Faktor-Faktor Penyebab Cedera Endotel

Hingga saat ini, telah diketahui 32 faktor resiko (sindroma-32) penyebab atherosklerosis, yang juga berarti merupakan faktor yang bertanggungjawab terhadap kualitas kualitas pembuluh darah, yaitu : *genetic, insulin resistance, glucosa intolerance, uric acid, lipids, obesity, cigareta, hypertension, inactivity, platelet disfungsi, stress, sex, age, fibrinogen, F-VII dan F-VIIIc, free radical, alcohol abuse, race, inhibitors (growth inhibitors), left ventricel hypertrophy, PAF, androgen, cortisol, cytokines, catecolamin, growth hormon, estrogen, leptin, TNF- α , homocystein, Cu dan ferritin*. Sedangkan menurut pengalaman klinik, dari semua faktor tersebut 3 diantaranya merupakan faktor yang paling sering menyebabkan cedera endotel, yaitu faktor hipertensi, diabetes, dan dislipedemia (sindroma-HDL). Dalam praktek sindroma-HDL merupakan yang paling sering mengakibatkan serangan jantung akut dan stroke (Tjokroprawiro, 1998).

Sedangkan menurut Constantinides (1994), dari berbagai faktor resiko yang diketahui dapat menyebabkan atherosklerosis pada hewan coba, ternyata hanya beberapa saja yang relevan dan dapat menimbulkan atherosklerosis pada manusia, dan faktor-faktor tersebut dibagi dalam 7 kelompok, yaitu : (a) faktor haemodinamik (hipertensi, *high blood shears and turbulence*); (b) faktor metabolik (contoh: dislipidemia, peningkatan kadar asam empedu darah, diabetes, perubahan asam amino, peningkatan kadar katekolamin dan angiotensin, penyakit-penyakit pada ginjal, perubahan metabolisme mineral); (c) bahan kimia beracun eksogen (nicotine, endotoxin, cianida, alkaloid crotalaria); (d) virus (virus Coxsackie B); (e) gangguan sistem imun; (f) radikal bebas; dan (g) genetik (Unger, 1999).

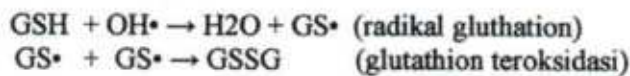
Dari berbagai faktor resiko diatas, maka berdasarkan pada faktor-faktor yang menjadi penggerak utama timbulnya atherosklerosis, dapat dirumuskan bahwa, "atherosklerosis = (hiperlipemia x cedera endotel) + trombosis". Rumusan ini menekankan bahwa, baik cedera endotel maupun hiperlipemia merupakan variabel yang sama-sama dominan, sementara trombosis hanya merupakan faktor tambahan yang peranannya tergantung oleh dua faktor sebelumnya.

Meskipun sebagian besar faktor-faktor penyebab hiperlipemia telah diketahui dan secara klinik mudah dikenali dan diukur pada penderita, namun sebaliknya sebagian besar faktor-faktor yang dapat mengakibatkan cedera endotel (kecuali faktor haemodinamik seperti, shears stress dan turbulansi), masih sulit dikenali dan sukar

diukur. Hal inilah barangkali yang dapat digunakan sebagai jawaban, atas pertanyaan mengapa pada kasus-kasus atherosklerosis, tidak selalu disertai dengan adanya faktor-faktor resiko utama (seperti hipertensi, dislipidemia, diabetes, dan merokok) pada penderitanya (Costantinides, 1994).

2.6. Radikal Bebas dan Stress Oksidatif

Dalam pengertian yang sederhana oksidan adalah senyawa yang dapat mengoksidasi senyawa lain, atau dalam pengertian kimia oksidan adalah penerima elektron. **Radikal bebas** adalah semua senyawa yang mempunyai satu atau lebih elektron tak berpasangan. Keberadaan elektron tak berpasangan menyebabkannya menjadi sangat reaktif, dan mempunyai kecenderungan untuk menarik elektron dari atom atau senyawa lain. Sebagai contoh, reaksi antara radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$) dengan glutathion peroksidase (GSH) berikut ini :



Karena dapat menarik elektron, maka radikal bebas merupakan akseptor (penerima) elektron, atau dengan kata lain radikal bebas adalah suatu oksidan. Setiap radikal bebas adalah oksidan, tetapi belum tentu semua oksidan adalah radikal bebas (contoh oksidan yang bukan radikal bebas adalah, senyawa oksigen) (Halliwell and Guetteridge, 1998; Suryohudoyo, 1997).

Reaktivitas radikal bebas tergantung dengan apa radikal bebas tersebut bereaksi. Jika dua radikal bebas bertemu, maka mereka dapat saling menggunakan elektron tak berpasangannya, menjadi senyawa non-radikal melalui ikatan kovalen, seperti jika dua atom hidrogen bertemu. Namun demikian, bila radikal bebas bereaksi dengan non-radikal, maka akan dihasilkan radikal bebas baru dan dapat menyebabkan reaksi berantai.

Dalam sistem biologis, radikal-radikal bebas yang penting antara lain; ion-ion logam transisional (Hampir semua logam dalam tabel sistem periodik menunjukkan adanya beberapa elektron tak berpasangan); superoksida radikal; hidroksil radikal; peroksil dan alkalosil radikal; sulfur radikal; dan nitric oksida (Halliwell and Guetteridge, 1998).

Tabel.2.1 Contoh-Contoh Radikal Bebas

Nama	Rumus Kimia	Keterangan/Contoh
Atom Hidrogen	H^{\bullet}	Radikal bebas paling sederhana
Tricloromethyl	CCl_3^{\bullet}	Merupakan radikal dengan pusat C (elektron tak berpasangan terletak pada atom C). CCl_3^{\bullet} merupakan hasil metabolisme CCl_4 didalam hepar. Radikal-radikal carbon biasanya segera bereaksi dengan O_2 membentuk radikal peroksil
Superoksida	$O_2^{\bullet -}$	Radikal bebas dengan pusat oksigen
Hidoksil radikal	OH^{\bullet}	Radikal dengan pusat oksigen yang paling reaktif. Dapat menyerang semua biomolekul
Thiyl/perthiyl	RS^{\bullet} atau RSS^{\bullet}	Kelompok radikal bebas dengan atom tak berpasangan terletak pada sulphur
Peoksil/alkaloksil	$RO_2^{\bullet}/RO^{\bullet}$	Raikal bebas dengan pusat oksigen (yang terbentuk melalui proses yang lain), yaitu pada pemecahan peroksida organik dan reaksi carbon dengan oksigen (O_2)
Oksida-oksida Nitrogen	NO, NO^{\bullet}_2	<i>In vivo</i> nitric oksida dibentuk dari asam amino L-arginine.
Radikal dengan pusat Nitrogen	$C_6H_5N=N^{\bullet}$	Terbentuk selama oksidasi phenyldrazine oleh erytrosit
Ion-ion logam transisional	Fe, Cu, dll.	Sebagai katalisator reaksi radikal bebas

Sumber : *Free Radical in Biology and Medicine*. (Halliwell and Guetteridge, 1998).

Pada organisme aerob yang sehat, produksi radikal bebas baik reactive oxygen species (ROS) maupun reactive nitrogen species (RNS), hampir seimbang dengan sistem pertahanan antioksidanya. Meskipun keseimbangan ini tidak sempurna, tetapi dalam kondisi normal, jumlah antioksidan tersebut cukup untuk memperbaiki kerusakan-kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas yang terjadi secara terus-menerus. Bila keseimbangan ini terganggu maka dapat menyebabkan **stress oksidatif**, yang telah terbukti menyebabkan berbagai gangguan pada sistem biologi.

Dalam proses perjalanan suatu penyakit, peran radikal bebas bisa sebagai penyebab utamanya, atau hanya sebagai faktor ikutan yang akan memperparah keadaan. Namun yang pasti diketahui adalah, bahwa setiap penyakit atau gangguan tersebut, dapat menyebabkan terjadinya **stress oksidatif**.

Pada prinsipnya **stress oksidatif** dapat terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu;

1. Berkurangnya jumlah antioksidan tubuh, misalnya karena adanya mutasi yang berdampak pada gen-gen enzyme antioksidan (seperti, CuZnSOD, MnSOD dan glutathione peroksidase/GSH) atau oleh karena penyakit yang dapat menurunkan sistem pertahanan antioksidan. Diketahui bahwa, sebagian besar xenobiotik dimetabolisme dengan cara berkonjugasi dengan GSH, oleh karenanya pemakaian xenobiotik yang berlebihan, merupakan salah satu penyebab stress oksidatif, meskipun xenobiotik sendiri tidak menghasilkan ROS/RNS. Faktor lain yang dapat menurunkan jumlah antioksidan adalah karena **kekurangan diet antioksidan** atau bahan-bahan makanan penting (seperti, protein)
2. Peningkatan produksi ROS/RNS, yang diakibatkan antara lain oleh; jejas yang dapat meningkatkan kadar O₂; proses metabolisme yang menghasilkan ROS/RNS; meningkatnya sistem-sistem produksi ROS/RNS alami/*natural ROS/RNS-producing systems* (misalnya, peningkatan aktifitas makrofag yang berlebihan pada penyakit-penyakit kronis, stress baik fisik maupun psikis)

Respon terhadap oksidatif stress dapat berupa adaptasi, cedera atau nekrosis pada sel (Sies, 1991).

2.7. Peran Radikal Bebas Dalam Atherosklerosis.

Dalam literatur-literatur biomedik sepenuhnya dinyatakan bahwa radikal bebas dan senyawa-senyawa reaktif lainnya, terlibat dan mendasari lebih dari 100 jenis penyakit dan gangguan, mulai dari rheumatoid arthritis dan shock haemorrhagis, sampai cardiomyopathy, iskemia, AIDS, dan atherosklerosis. Dilaporkan bahwa, pada penderita yang mengalami penyakit-penyakit tersebut, diketahui selalu terjadi peningkatan kadar ROS/RNS (*reactive oxygen species/reactive nitrogen species*), seperti superoksida radikal (O₂⁻), radikal hidroksil (OH^{*}), nitrit oksida (NO^{*}) dan ion-ion logam transisi (Fe, Cu) (Southorn, 1988; Halliwell and Guetteridge, 1998).

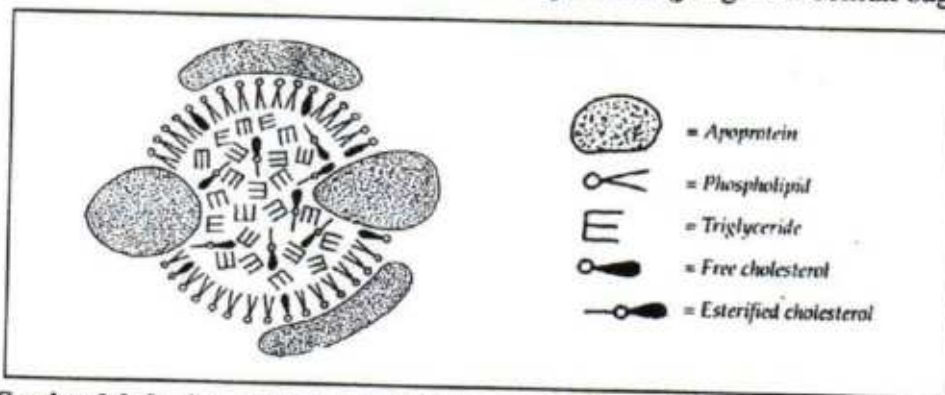
Dalam kaitannya dengan atherosklerosis, keterlibatan radikal bebas sangat nyata karena, radikal bebas merupakan penyebab cedera endotel yang utama. Radikal bebas dapat menyebabkan cedera endotel melalui berbagai 2 cara yaitu; (1) secara langsung; atau (2) melalui peroksidasi LDL (*low density lipoprotein*) dan produk-produk metabolitnya seperti malodialdehyde (**MDA**) (Helpert, 1996)..

2.7.1. Low Density Lipoprotein (LDL)

Keberadaan kolesterol didalam lipoprotein telah menjadikan senyawa ini menjadi pusat perhatian selama bertahun-tahun, karena peningkatan kadar kolesterol plasma (hiperkolesterolemia) dianggap sebagai faktor resiko yang utama pada penyakit-penyakit kardiovaskular (Ganong, 1995).

Lipoprotein merupakan kompleks molekul, yang dibentuk oleh kolesterol, trigliserida, fosfolipid dan protein. Senyawa ini berbentuk *lipid droplet* (butir-butir lemak), dimana molekul-molekul pembentuknya terangkai dalam 2 bagian pokok yaitu, (1) bagian membran (*monolayer lipid*) dan (2) bagian inti (*core lipid*). Bagian membran lipoprotein dibentuk oleh fosfolipid dan kolesterol bebas, serta protein, sedangkan bagian intinya terutama terdiri atas ester kolesterol dan trigliserida.

Pada membran lipoprotein, bagian kepala dari molekul fosfolipid yang bersifat polar (hidrofilik) menghadap keluar dan berhubungan dengan bagian luar dari kompleks molekul tersebut. Sedangkan bagian ekor yang non-polar (hidrofobik) mengarah kebagian dalam. Membran *monolayer lipid* ini tersusun mengelilingi/membungkus kolesterol dan trigliserida (yang membentuk bagian inti.).



Gambar 2.8. Struktur dasar dari molekul lipoprotein (Constantinides, 1994)

Dalam struktur (gambar 2.8) seperti ini, maka kolesterol yang bersifat hidrofobik dimungkinkan untuk didistribusikan dalam cairan tubuh (darah, limfe), dari tempat produksinya (usus dan hepar) ke tempat dimana mereka digunakan atau disimpan (hampir semua jaringan dan organ tubuh, termasuk otot bergaris, jantung, jaringan ikat, glandula mammae, jaringan haemopoitik dan otot polos vaskular). Kelebihan produksi lipoprotein terutama disimpan pada jaringan lemak dan hati (Becker *et al.*, 1998; Martin, 1990).

Kolesterol pada lipoprotein dapat dibagi menjadi dua yaitu kolesterol bebas (*free cholesterol*) dan ester kolesterol. Ester kolesterol memiliki rantai asam lemak yang lebih panjang dari kolesterol bebas, oleh karena itu lebih bersifat hidrofobik dan lebih berat, sehingga posisinya terletak pada bagian dalam, bersama-sama dengan trigliserida, sedangkan kolesterol bebas terletak pada permukaan (Becker *et al.*, 1998).

Tabel 2.2. Komposisi lipoprotein utama darah

Fraksi	Densitas	Protein (%)	Lemak Total (%)	Prosentase dari Lemak Total			
				Phospolipid	Ester Kolesterol	Kolesterol Bebas	Trigliserida
Kilomikron	0.96	1-2	98-99	8	3	1	88
VLDL	0.96-1.006	1-10	90-93	20	15	8	56
IDL	1.006-1.019	11	89	26	34	9	29
LDL	1.019-1.063	21	79	28	48	10	13
HDL	1.125-1.210	57	43	46	29	6	13

(Sumber : General Phatobiology. Constantinides, 1994).

Selain lipid, makromolekul lain pembentuk lipoprotein yang penting adalah protein, terutama karena fungsinya sebagai *ligand*. Terdapat lima jenis protein (apoprotein) yang terdistribusi didalam keenam jenis lipoprotein utama, yaitu apo-A, apo-B, apo-C, apo-D, dan apo-E.

Apo-A dan D hanya ditemukan pada HDL, apo-B (terdapat pada semua jenis lipoprotein, sedangkan apo-C dan apo-E sebenarnya berasal dari HDL, tetapi kemudian ditransfer ke semua jenis lipoprotein. Apoprotein mempunyai fungsi yang sangat penting dalam metabolisme lipoprotein karena; (1) merupakan bagian dari lipoprotein yang dapat berikatan dengan reseptor (ligand); (2) dapat mengaktifkan enzim dan proses tertentu yang penting pada metabolisme lipoprotein; (3) menentukan kelarutan lipoprotein (Becker *et al.*, 1998).

Berdasarkan pada perbedaan densitasnya, lipoprotein plasma darah manusia dapat dibagi dalam 6 *class* yaitu; chylomicron, *very low-density lipoproteins* (VLDL), *intermediate-desity lipoproteins* (IDL), *low-density lipoproteins* (LDL), *high-density lipoproteins* (HDL) dan lipoprotein-a [Lp(a)]. Selanjutnya HDL berdasarkan densitas hidratnya, dapat dibagi menjadi HDL2, dan HDL3.

Lipoprotein merupakan molekul yang sangat penting bagi tubuh, karena; (1) merupakan alat transport kolesterol yang utama kedalam sel (terutama dilakukan oleh lipoprotein LDL). Dari seluruh kolesterol tubuh, kira-kira 93% terdapat didalam sel dan hanya 7% yang berada didalam plasma. Namun demikian peningkatan yang sedikit saja, yang terjadi pada kolesterol plasma (hiperkolesterolemia), dapat menjadi ancaman bagi timbulnya atherosklerosis; (2) lipoprotein merupakan sumber energi utama bagi sel (kira-kira 50% - 70 % energi yang digunakan oleh otot rangka, berasal dari oksidasi asam lemak dari trigliserida; (3) bahan baku untuk membran sel maupun organel; (4) lipoprotein merupakan bahan baku semua hormon steroid, asam empedu dan air susu (Becker *et al.*, 1998; Ganong, 1995; Constantinides, 1994).

Dalam keadaan normal lipoprotein dapat memasuki dinding pembuluh darah melalui beberapa cara; (1) melalui *receptor-mediated endocytosis* (RME); (2) melalui *pinocytosis* cairan tak spesifik; (3) difusi melalui matriks interselluler. Banyaknya jumlah LDL yang dapat masuk kedalam sel endotel ditentukan oleh; (1) jumlah konsentrasi kolesterol intraselluler dan dikontrol oleh HMG reductase; (2) permeabilitas membran sel. Cedera endotel akan memfasilitasi infiltrasi LDL antara lain melalui terbukanya *interendothelial junction* (Becker *et al.*, 1998; Morel *et al.*, 1994).

2.7.2. Peroksidasi LDL

Peroksidasi lipid adalah reaksi berantai yang terjadi pada asam lemak tak jenuh jamak (*polyunsaturated fatty acids* atau PUFAs), yang sangat merugikan. PUFAs merupakan molekul yang memiliki dua atau lebih ikatan rangkap atom carbon. Seperti halnya membran sel dan organel, LDL mengandung PUFAs rantai samping yang sangat panjang, oleh karena itu sering menjadi target serangan radikal bebas (Halliwell and Guettridge, 1998).

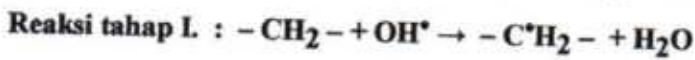
Peroksidasi LDL bermula dari serangan radikal hidroksil (OH^{\bullet}) pada PUFAs permukaan, yang membentuk bagian kepala dari fosfolipid (*LDL-surface phospholipid*), yang kemudian terus berkembang ke *core lipid* LDL (Wijaya, 1996).

Radikal bebas yang terlibat dalam peroksidasi PUFAs adalah **radikal hidroksil (OH^{\bullet})**, **radikal peroksil (HO^{\bullet}_2)** dan **radikal alkoksil (RO^{\bullet})**. Tingkat reaktivitas suatu radikal bebas terhadap PUFAs ditentukan oleh besarnya potensial reduksi dan

sifat listrik dari atom atau molekulnya. Reaktivitas radikal bebas berkorelasi positif dengan besar potensial reduksinya. Potensial reduksi PUFAs diketahui sebesar 0.6 V, sedangkan untuk ketiga radikal bebas diatas masing-masing adalah, sebesar 2.31 V untuk OH^{\bullet} , 1.60 V (RO^{\bullet}) dan 1.06 V untuk HO^{\bullet}_2 (Koppenol *et al.*, 1990).

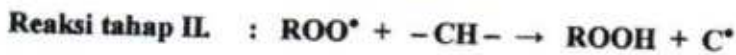
Tahap-tahap peroksidasi LDL dapat dibagi dalam 3 bagian yaitu ;

1. Reaksi abstraksi (penarikan) atom-atom hidrogen (H) *bis allylic* pada gugus metil ($-\text{CH}_2-$) dari PUFAs oleh OH^{\bullet} . Hidrogen *bis allylic* adalah atom hidrogen yang terletak diantara dua atom carbon, yang mempunyai ikatan rangkap $[=\text{CH}=]$. Atom hidrogen yang berada pada posisi ini mempunyai energi ikatan yang lemah.

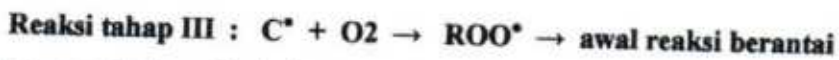


Penarikan atom hidrogen dari gugus metil oleh OH^{\bullet} , menyebabkan atom karbon kehilangan satu elektronnya dan berubah menjadi atom karbon radikal (C^{\bullet}). Karbon radikal kemudian dapat menyebabkan berbagai reaksi, tetapi pada umumnya karbon reaktif ini, selanjutnya akan berikatan dengan O_2 membentuk radikal peroksil (ROO^{\bullet}) atau radikal alkaloksil (RO^{\bullet}). Peroksil dan alkaloksil radikal, adalah jenis radikal bebas dimana pusat radikalnya terletak pada atom oksigen.

2. Reaksi antara peroksil radikal (ROO^{\bullet}) dengan atom hidrogen (H) *bis allylic* yang lain. Peroksil radikal (ROO^{\bullet}) mempunyai kemampuan untuk menarik atom H dari PUFA's molekul lipid yang lain seperti kolesterol (bukannya hanya yang terdapat pada fosfolipid). Namun biasanya ROO^{\bullet} lebih cenderung untuk menarik atom H dari PUFA's yang berdekatan. Reaksi antara peroksil radikal dengan H menghasilkan atom carbon radikal kembali.

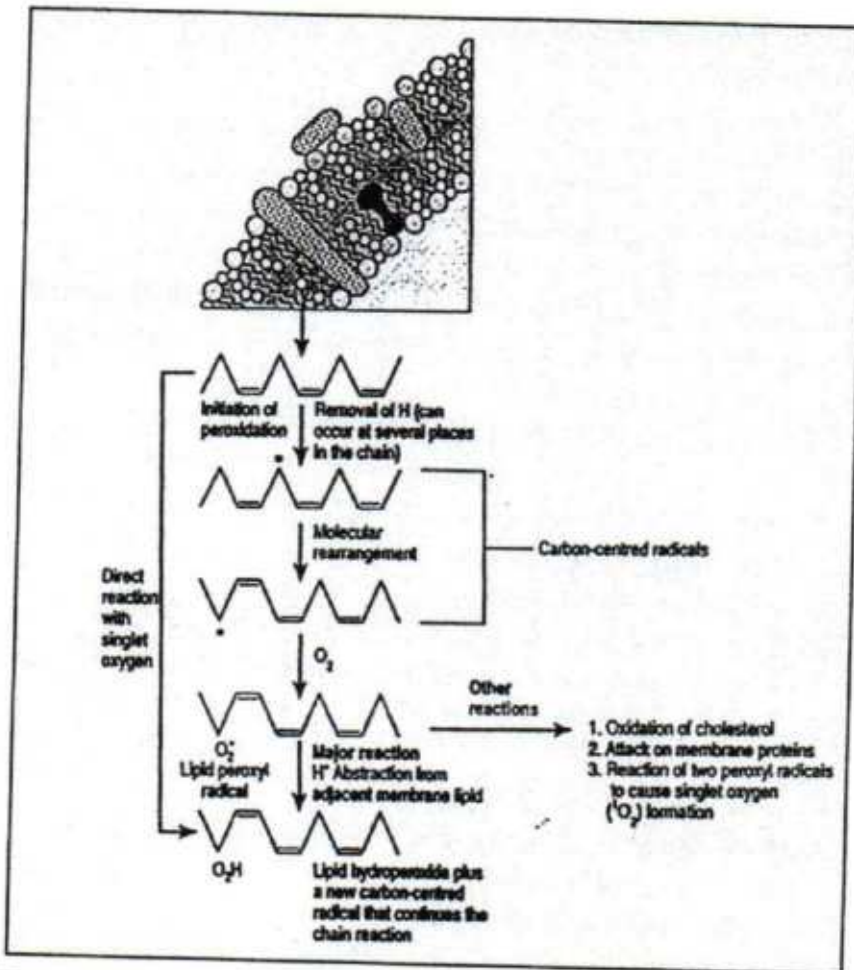


3. Pemulaan reaksi berantai dimulai, ketika atom karbon radikal berikatan dengan oksigen membentuk radikal peroksil yang baru.



Ikatan antara peroksil radikal dengan atom H, menghasilkan senyawa non-radikal yaitu lipid hidroperoksida (LOOH/ROOH) atau lipid peroksida. Senyawa ini merupakan salah satu bentuk metabolit dari peroksidasi PUFAs, yang jumlahnya ditentukan oleh banyaknya ikatan rangkap pada asam lemak awal, misalnya asam arakhidonat akan menghasilkan 6 senyawa lipid peroksida, sedangkan untuk asam

linoleat, asam linolenat, asam eicosapenonat dan docosaheksaeonat masing-masing akan menghasilkan sebanyak 2, 4, 8 dan 10 senyawa lipid peroksida (Halliwell and Guetteridge, 1998; Martin, 1990).



Gambar 2.9. Peroksidasi PUFAs pada membran endotel (Halliwell and Guetteridge, 1998).

Selain LDL-Ox, ternyata diketahui pula bahwa semua produk-produk dekomposisinya (metabolit), juga merupakan senyawa-senyawa yang sitotoksik. Produk-produk metabolit tersebut adalah malondialdehyde (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) dan F2-isoprostenes (Navab *et al.*, 1996).

2.8. Malondialdehyde (MDA)

Malondialdehyde (MDA) atau *malonaldehyde*, telah menjadi fokus perhatian selama bertahun-tahun yang lalu, hal ini disebabkan MDA merupakan bentuk senyawa yang paling sering ditemukan sebagai salah satu produk akhir dari

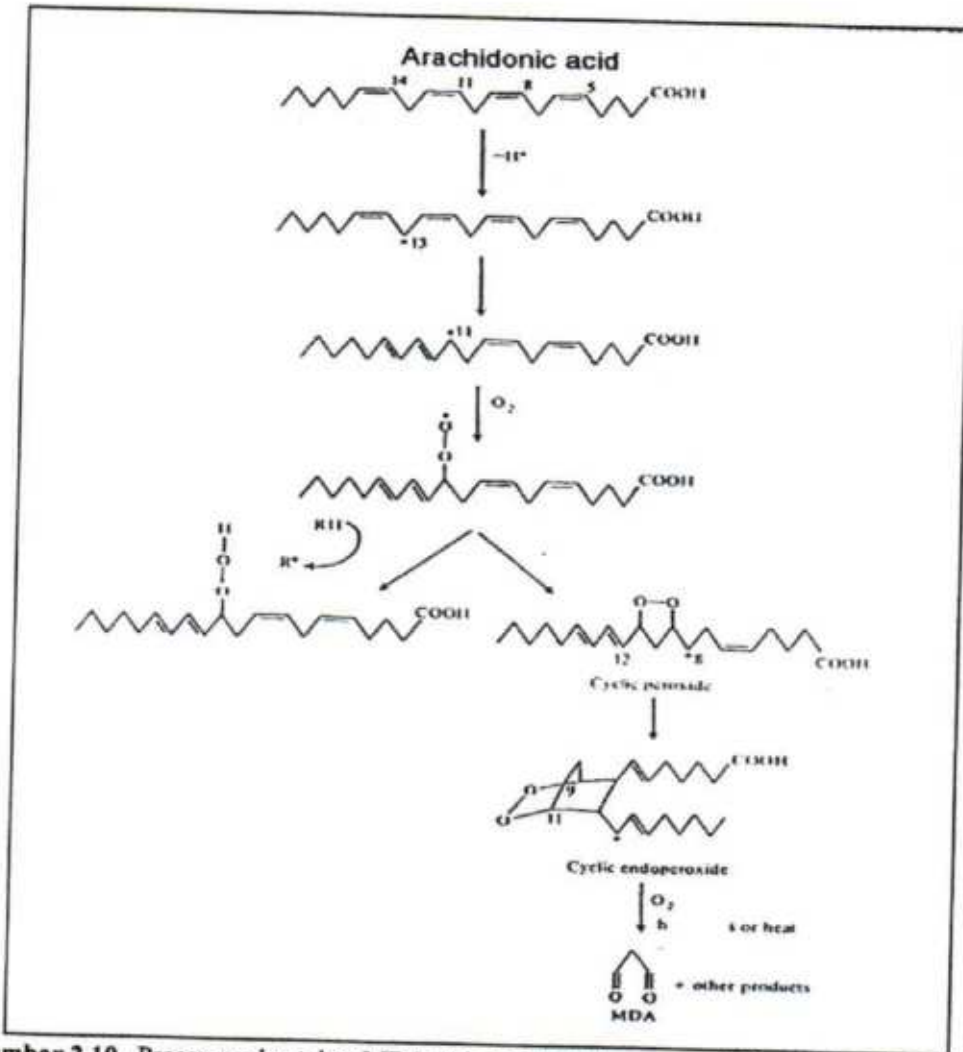
peroksidasi lipid. MDA paling banyak dihasilkan dari peroksidasi PUFAs, terutama dari jenis PUFAs yang memiliki ikatan rangkap atom carbon lebih dari dua.

Kesetabilan MDA sangat ditentukan oleh pH cairan. Pada pH normal beberapa MDA bebas (free MDA), ditemukan sebagai anion enolate, yang kurang reaktif terhadap sebagian besar asam amino. Reaktivitas MDA terhadap asam amino akan meningkat drastis, ketika pH tubuh turun. Dalam kondisi seperti ini, reaktivitas protein terhadap MDA lebih besar, dari pada dengan asam amino bebas, sehingga menyebabkan terjadinya modifikasi terhadap berbagai residu asam amino khususnya lysine. MDA juga dapat bereaksi dengan basa DNA (terutama guanine) dan mengakibatkan timbulnya reaksi mutagenik. (Halliwell and Guetteride, 1998; Bindoli, 1988).

MDA biasanya segera mengalami proses metabolisme didalam berbagai jaringan, melalui proses oksidasi oleh aldehyde dehidrogenase menjadi asam malonat. Selanjutnya, melalui proses dekarboksilasi, asam malonat dirubah menjadi acetaldehyde, yang merupakan substrat dari asetat. Asam malonat merupakan inhibitor kompetitif bagi suksinat dehidrogenase didalam mitokondria.

MDA diketahui dapat mengaktifasi endotel dan miosit, sehingga menghasilkan faktor-faktor khemotaktik seperti *chemoattractant protein-1* (MCP-1) dan *macrophage colony-stimulating factors* (M-CSF). MCP-1 bersama-sama dengan ICAM-1 dan VCAM-1 mengakibatkan aggregasi monosit dan makrofag pada dinding vaskular, sedangkan M-CSF berperan dalam transformasi monosit menjadi makrofag, serta meningkatkan ekspresi *reseptor scavenger* (Parthasarathy *et al.*, 1997).

Sedangkan F2-isoprostanes yang merupakan produk akhir dari peroksidasi asam arakhidonat, diketahui dapat menyebabkan gangguan terhadap fungsi regulasi tonus vaskular sel endotel, karena senyawa bekerja sebagai antagonis prostasiklin. Selain mengakibatkan vasokonstriktor, senyawa ini juga dapat memfasilitasi perlekatan platelet (Pratico *et al.*, 1997). Dilaporkan pula bahwa, produk-produk akhir dari peroksidasi LDL, diketahui mempunyai peranan yang penting pada proses kalsifikasi lesi sklerotik stadium lanjut, dan mungkin bersifat pro-koagulan (Rota *et al.*, 1998).



Gambar 2.10. Proses pembentukan MDA pada peroksidasi asam arachidonat (Halliwell and Guettridge, 1998).

2.8.1. Peranan LDL-Ox dalam Proses Atherogenesis

LDL yang teroksidasi (LDL-Ox) diketahui merupakan kontributor yang nyata dalam menimbulkan atherosklerosis. Terdapat banyak bukti yang konsisten dan mendukung pendapat ini, antara lain:

1. Ditemukannya kolesterol teroksidasi, lipid teroksidasi, F2-isoprotanes dan produk-produk dekomposisi dari peroksidasi lipid lainnya, seperti 4-HNE dan **malondialdehyde (MDA)** didalam lesi atherosklerotik pada manusia dan hewan.
2. LDL yang diekstraksi dari lesi sklerotik pada manusia dan kelinci menunjukkan kemiripan dengan LDL yang dioksidasi *in vitro*.

3. Ditemukannya antibodi anti LDL teroksidasi pada serum penderita penyakit jantung koroner. Dilaporkan bahwa, terdapat korelasi antara titer antibodi dengan perkembangan dari lesi atherosklerisi pada arteri carotis.
4. Banyaknya data-data epidemiologi yang menunjukkan adanya aksi perlindungan oleh bahan makanan yang mengandung antioksidan pemutus rantai (*chain-breaking antioxidant*), terutama dalam menghambat peroksidasi lipid (seperti, α -tokoferol).

Dalam atherogenesis, keterlibatan LDL-Ox terjadi sejak stadium awal hingga atherosklerosis tahap lanjut. LDL-Ox dan produk-produk dekomposisinya seperti, malodialdehyde (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) dan F2-isoprostenes, menyebabkan berbagai respon biologis pada beberapa sel yang terlibat dalam atherosklerosis seperti makrofag, endotel, monosit, miosit, dan fibroblas (Halliwell and Gueteridge, 1998).

Adapun peran LDL-Ox dalam atherosklerosis dapat terjadi melalui beberapa tahapan sebagai berikut;

1. Melalui berbagai sebab yang berbeda, stress oksidatif akhirnya menyebabkan peroksidasi LDL (LDL-Ox). LDL-Ox yang terbentuk di ruang ekstraselluler dapat menyebabkan gangguan pada endotel baik secara langsung, maupun melalui makrofag terlebih dahulu, namun secara *in vivo* diyakini proses ini terjadi bersama-sama dan sinergis. Pada makrofag LDL-Ox dikenali melalui reseptor *scavenger*-nya atau acetyl-LDL reseptor. LDL-Ox dikenali sebagai antigen oleh makrofag karena adanya perubahan struktur pada bagian aporotein-B, akibat dari aktivitas MDA terhadap residu histide dan lisin pada molekul protein dari lipoprotein tersebut. (Parthasarathy, 1992). Selain oleh makrofag, sel endotel, sel miosit dan sel monosit juga dapat memfagosit LDL-Ox (Dudman *et al.*, 1995).
2. LDL yang teroksidasi tetapi belum sempurna (*minimally modified* LDL atau MM-LDL), terutama yang terdapat pada makrofag, merupakan penyebab cedera endotel yang utama. Dilaporkan bahwa MM-LDL menimbulkan berbagai respon biologis pada makrofag, sehingga sel ini mengekspresikan berbagai mediator kimia yang dapat mempengaruhi sel-sel lainnya (Navab *et al.*, 1996). MM-LDL mengakibatkan cedera pada makrofag, yang berakibat berakibat diekspresikannya berbagai senyawa penting (*macrophage derived factors*, misalnya sitokin) yang dapat mempengaruhi aktivitas sel lain, misalnya proliferasi miosit vaskular dan aggrgasi trombosit pada endotel. (Halliwell and Guetteridge, 1998). Makrofag

yang teraktivasi oleh MM-LDL, kemudian melepaskan berbagai jenis sitokin, seperti; TNF- α , IL-1 dan IL-6, yang bekerja secara sinergis merangsang terjadinya perubahan-perubahan pada sel endotel.

3. Rangsangan TNF- α dan IL-1, menyebabkan gangguan signal pada protein membran endotel Gi-2, sehingga menurunkan sekresi EDRF-NO dan prostasiklin, serta teraktifkannya *nuclear factors kappa binding* (NF κ B), sehingga endotel akan mengekspresikan berbagai jenis molekul adhesi. Pada endotel, rangsangan oleh TNF- α diketahui menyebabkan diekspresikannya ELAM-1 (*endothelial leukocyte adhesion molecule*), yang secara selektif menyebabkan agregasi sel neutrofil. Sedangkan IL-1 menyebabkan ditingkatkannya ekspresi ICAM-1 (*intercelluler adhesion molecule-1*) dan VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), yaitu molekul-molekul adhesi untuk limfosit dan monosit.
4. Selain pada endotel, IL-1 dan TNF- α juga bekerja pada makrofag itu sendiri, merangsang diproduksinya IL-8 (yaitu sebuah faktor khemotaktik yang sangat poten), yang berperan untuk menarik neutrofil memasuki dinding vaskular. Sitokin lain yang juga berfungsi sebagai faktor khemotaktik adalah IFN- γ (gamma interferon), yang diketahui dapat menarik makrofag dan mengarahkannya pada daerah yang mengalami cedera.
5. IFN- γ dan TNF- α bersama-sama menyebabkan meningkatnya fungsi fagosit dari makrofag dan neutrofil. Peningkatan aktivitas fagosit ini, juga menyebabkan meningkatnya pelepasan enzim litik intraselluler. Akibatnya akumulasi LDL menjadi semakin besar, yang kemudian akan merubah sel-sel makrofag, monosit dan neutrofil menjadi sel busa (foam cell) (Kuby, 1998; Constantinides, 1994).
6. Selain melalui mekanisme yang melibatkan makrofag, MM-LDL juga secara langsung menyebabkan cedera pada endotel, yaitu ketika MM-LDL melintasi endotel untuk masuk kedalam jaringan sub endotel. Diketahui bahwa MM-LDL mempunyai waktu perlintasan yang lebih lama, dibandingkan dengan LDL normal, sehingga menyebabkan jejas yang lebih besar pada sel endotel. Biakan sel endotel yang terpapar oleh MM-LDL, menunjukkan adanya peningkatan aktivitas NF κ B, akibatnya sel endotel akan aktif mengekspresikan berbagai molekul adhesi, seperti ICAM-1 dan VCAM-1. Aktivasi NF κ B oleh MM-LDL juga terjadi pada sel miosit, monosit dan makrofag (Brand *et al.*, 1997).

2.9. Stress Fisik Sebagai Sumber Radikal Bebas

Sejak diketahui bahwa aktivitas fisik yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan pada otot lurik domba, oleh Godwin (1973), maka penelitian tentang dampak latihan fisik yang berlebihan terus dilaporkan (Paul *et al.*, 198).

Selama ini timbul persepsi bahwa aktivitas fisik pada manusia memberi dampak positif seperti dapat memperbaiki fungsi kardiovaskuler, hipertensi, mengurangi resiko kegemukan dan lebih tahan terhadap infeksi (walaupun kenyataannya atlet dengan latihan yang keras ternyata lebih rentan terhadap infeksi tertentu). Aktivitas fisik nyatanya harus dilakukan secara terukur, dan berbeda-beda intensitasnya pada setiap individu. Karena aktifitas fisik yang berlebihan dapat mengakibatkan stress oksidatif, yang justru berbahaya (Hellsten, 1997). Meskipun telah terdapat banyak bukti tentang manfaat dari aktivitas fisik, tetapi olah raga juga menyebabkan peningkatan konsumsi oksigen diseluruh bagian tubuh, yang akhirnya akan meningkatkan pembentukan radikal bebas yaitu, superoksida (Witt *et al.*, 1992).

Aktivitas fisik nampaknya bertanggungjawab terhadap perubahan yang terjadi pada komposisi asam lemak membran, permeabilitas dan kelangkaan enzim-enzim tertentu pada sel otot lurik. Seperti pada olah raga yang berlebihan, pada olah raga yang tidak teratur juga diketahui merangsang terjadinya kerusakan oksidatif. Olah raga yang berat juga diketahui mempunyai dampak menurunkan sistem pertahanan antioksidan (Evans *et al.*, 1999).

Latihan fisik yang berlebihan merupakan penyebab terjadinya stress oksidatif. Peningkatan kadar superoksida radikal selama aktifitas fisik yang berlebihan, diketahui mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap sel endotel dan otot polos, dibandingkan terhadap sel lainnya. Hal ini dikarenakan jumlah antioksidan internal seperti, SOD, catalase dan GSH (gluthation) dalam endotel dan sel otot polos adalah yang paling rendah dibandingkan dengan jaringan atau organ tubuh lainnya.

Selain dikarenakan oleh rendahnya kadar antioksidan internal, peningkatan jumlah superoksida radikal akan memberikan dampak negatif yang lebih besar terhadap endotel, karena dalam keadaan normal sekalipun, endotel dapat secara terus menerus menghasilkan radikal bebas NO^{\bullet} . Dimana, bila EDRF- NO bereaksi dengan superoksida radikal, maka akan menyebabkan terbentuknya peroksininitrit (ONOO^-) yang sangat berbahaya, terutama setelah peroksininitrit bereaksi lagi dengan superoksida radikal, yang pada kondisi normal dapat terbentuk dalam jumlah besar

akibat stress haemodinamik aliran darah (Halliwell and Gutteridge, 1998; Sperelakis, 1998).

Hubungan antara latihan fisik yang berlebihan dengan terjadinya cedera endotel, telah banyak terbukti. Pada organisme aerob kira-kira 1%-5% dari total O_2 yang dihirup selama respirasi normal, menyebabkan terbentuknya ROS. Selama latihan fisik kebutuhan O_2 tubuh meningkat 10-15 kali dibandingkan pada saat istirahat, dan khususnya pada sel-sel otot rangka kebutuhan oksigen bisa menjadi 100 kalinya. Jika prosentase pembentukan ROS dianggap sama, maka otot rangka yang sangat aktif (dalam olah raga) merupakan jaringan penghasil radikal bebas ROS yang sangat potensial, terlebih lagi pada latihan fisik yang berlebihan. Dengan kata lain, latihan fisik yang berlebihan merupakan penyebab terjadinya stress oksidatif yang sangat potensial. Dilaporkan bahwa, olah raga yang berlebihan dapat meningkatkan jumlah superoksida radikal ($O_2^{\cdot-}$) darah hingga 75 kali lebih tinggi dibandingkan dengan saat istirahat (Halliwell and Gutteridge, 1998).

Diketahui bahwa, selain radikal hidroksil, superoksida radikal merupakan jenis radikal bebas yang juga aktif menentukan berkembangnya atherosklerosis. Superoksida radikal terbukti ditemukan dalam jumlah yang signifikan pada sel endotel, fibroblast, miosit dan makrofag, pada plak atherosklerotik arteri carotis. Hal ini dapat diketahui dari kuatnya ekspresi antioksidan glutaredoxin pada sel-sel tersebut (Okuda *et al.*, 2001).

Stress fisik yang berat (*swimming stress*) pada tikus, terbukti dapat meningkatkan jumlah peroksidasi lipid, yang diketahui peningkatan kadar MDA plasma darahnya (Harjanto dan Santoso, 2001; Maslachah, 2000; Davies *et al.*, 1992). Bahkan stress juga diketahui dapat menyebabkan terkelupasnya endotel dari dinding arteri, yang terbukti dengan adanya endotel mati dalam sirkulasi (*circulating endothel*) (Maslachah, 2000). Aktivitas lari tanpa berhenti selama empat jam pada atlet yang sangat terlatih, diketahui dapat menyebabkan meningkatnya jumlah LDL teroksidasi. Pada saat yang bersamaan produksi ATP menurun dan produksi asam urat meningkat. Peningkatan asam urat ini merupakan hal yang menguntungkan, karena asam urat merupakan antioksidan (Hellsten, 1997). Aktivitas simpatik yang meningkat selama latihan fisik yang berlebihan, serta tidur nyenyak yang kurang dari 6 jam sehari

(yang terjadi dalam waktu yang lama), merupakan contoh-contoh stress yang **atherogenik** (Tjokroprawiro, 1997).

Tabel 2.3. Perubahan-Perubahan yang Terjadi Selama Aktifitas Fisik

<u>Meatabolisme Umum</u>	
Reaksi fase akut	↑
Rata-rata metabolisme basal	↑
Keseimbangan calsium	↑ /--
Glucosa tolerance	↑
Respon insulin	--
Kolesterol LDL	↓
Glikogen otot	↑
<u>Stress Oksidatif</u>	
Oksidasi GSH	↑
Peroksidasi lemak	↑
Kerusakan membran otot lurik	↑
Oksidasi asam nukleat	↑
Karbonilasi protein	↑

Keterangan : ↑= meningkat ↓= turun -- = tidak ada perubahan
(sumber: Antioxidant Status and function: Relationship to Aging and Exercise, Jeffry and Andrew, 1999)

Latihan yang berlebihan dan berulang-ulang pada orang biasa (bukan olahragawan), diketahui dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel-sel otot, setelah dilakukan pemeriksaan histologis. Pada individu yang mendadak melakukan latihan fisik yang berat dan lama (seperti lari marathon) diketahui adanya peningkatan jumlah *neutrophil circulating*, produk-produk respon fase akut (seperti, IL-1 dan protein C-reactive), dan munculnya respon *heat shock*. Sedangkan pada olahragawan yang terlatih diketahui mempunyai kadar caeroplasmin (antioksidan ekstraselluler) darah yang lebih tinggi dibandingkan orang normal (Sen., 1995).

Menurut Davies *et al.*, (1992) kerusakan otot rangka pada tikus yang diberi latihan berlebih disebabkan oleh, meningkatnya peroksidasi lipid, menurunnya kontrol pernafasan mitokondria, hilangnya integritas struktur retikulum endoplasmik, meningkatnya produksi protein karbonil dan *iron catalytic* dalam otot. Pada tikus

yang kekurangan vitamin-E (antioksidan) diketahui memiliki daya tahan rendah terhadap latihan. Perlindungan terhadap kerusakan akibat stress oksidasi nampaknya bisa terjadi pada latihan yang teratur, yang ditunjukkan dengan meningkatnya enzim-enzim antioksidan internal seperti glutathion peroksidasi, glutathion reduktase, catalase dan SOD pada otot jantung dan otot lurik tikus, dan menurunkan kandungan vitamin-E mitokondria sel otot lurik.

2.10. Antioksidan

Istilah antioksidan telah digunakan secara luas, tetapi hingga saat ini belum ada definisi yang tepat. Para ahli makanan menggunakan antioksidan untuk mencegah proses ketengikan, yang kemudian berpendapat bahwa antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat peroksidasi lipid. Para ahli polimer menggunakan antioksidan untuk mengontrol proses polimerisasi pada industri plastik dan karet, dan untuk mencegah kerusakan bahan-bahan tersebut dari sinar UV.

Pada organisme hidup, secara ringkas antioksidan didefinisikan sebagai semua bahan, yang dalam konsentrasi rendah (dibandingkan dengan substrat yang dapat teroksidasi/ *oxidizable substrate*), dapat secara nyata memperlambat atau mencegah proses oksidasi dari substrat tersebut. Istilah *oxidizable substrate* meliputi semua jenis molekul pada organisme hidup (Halliwell and Gueteridge, 1998).

Organisme aerobik terlindung dari stress oksidatif melalui sistem pertahanan antioksidan. Berbagai jenis antioksidan dengan fungsi yang berbeda memainkan peranan yang penting dalam sistem pertahanan tersebut. Antioksidan-antioksidan pencegahan (*preventing antioxydants*), bekerja pada garis pertahanan pertama, yang menekan pembentukan radikal bebas. *Scavenging antioxydants* bertanggungjawab dalam baris pertahanan kedua, yaitu dengan mencegah terjadinya reaksi berantai (*chain initiation*) atau dengan memutus perambatan dari reaksi berantai (*chain propagation*) dalam peristiwa peroksidasi. Sedangkan enzim-enzim antioksidan (*antioxydant enzymes*) seperti, phospholipase, protease, *DNA repair enzyme*, dan transferase, bekerja pada garis pertahanan ketiga. Melalui koordinasi sistem pertahanan tersebut, setiap antioksidan akan dihasilkan dan ditransfer dalam waktu dan konsentrasi, serta ke target yang tepat (Papas, 1999).

Komposisi sistem pertahanan antioksidan berbeda-beda antara satu jaringan dengan jaringan yang lain dan antara satu sel dengan sel lainnya, bahkan antar sel

dalam jaringan yang sama. Mekanisme perlindungan antioksidan eksternal berbeda dengan antioksidan internal (intraseluler). Aktivitas pertahanan antioksidan ini, dipicu oleh adanya jejas radikal bebas dan oleh molekul-molekul penanda seperti, sitokin (Halliwell and Gueteridge, 1998).

Dengan semakin banyaknya bukti dari berbagai penelitian, laporan klinik dan hasil studi epidemiologi, yang menunjukkan keterlibatan radikal bebas dalam berbagai penyakit, maka perhatian terhadap peran antioksidan juga semakin meningkat. Terdapat fakta bahwa, orang Perancis dengan gaya hidup yang lebih besar resikonya terhadap penyakit jantung koroner (PJK) (konsumsi kolesterol lebih banyak, dan lebih banyak merokok), dibandingkan penduduk Eropa lainnya atau Amerika, ternyata mempunyai angka PJK yang lebih kecil (*The French Paradox*). Sekarang terbukti bahwa perlindungan terhadap PJK pada penduduk Perancis disebabkan karena mereka lebih banyak mengkonsumsi anggur merah, dibandingkan dengan penduduk lain di dunia. Diketahui bahwa, anggur merah mengandung senyawa phenol yaitu flavonoid, yang dilaporkan mempunyai efek kardioprotektif. Dilaporkan pula bahwa flavonoid dapat mencegah peroksidasi LDL 20 kali lebih kuat dari vitamin E (Frenkel *et al.*, 1996).

Bahkan akhir-akhir ini timbul ketertarikan yang luarbiasa untuk menggunakan antioksidan (baik yang alami maupun sintetik) sebagai bahan pengobatan. Alasan-alasan timbulnya pemikiran tersebut antara lain didasari oleh fakta-fakta yang menunjukkan bahwa, banyaknya jenis obat yang digunakan saat ini, ternyata mempunyai mekanisme kerja yang sama dengan cara kerja antioksidan, walaupun sebenarnya tidak dirancang untuk itu. Contohnya adalah penicillamine (obat rheumatoid arthritis) dan aminosalisilat (Barnett and King, 1997)

Untuk keperluan terapi, selain harus memenuhi standart keamanan, setiap antioksidan yang akan digunakan juga harus memenuhi beberapa kreteria tertentu, yaitu antara lain;

1. Biomolekul yang dilindungi harus jelas, serta secara *invivo* antioksidan tersebut harus dapat mencapai target yang dimaksud.
2. Mekanisme kerja antioksidan harus sudah diketahui.
3. Jika antioksidan tersebut bekerja sebagai penangkap ROS/RNS, maka kemudian harus dapat memenuhi jawaban atas pertanyaan berikut ini, yaitu apakah hasil reaksi antara antioksidan dan radikal bebas, tidak menghasilkan radikal bebas

- yang baru. Suatu antioksidan akan sangat menguntungkan bila hasil reaksinya merupakan antioksidan lagi, seperti asam askorbat, dan GSH.
4. Tidak menyebabkan kerusakan pada sistem biologis lainnya.
 5. Antioksidan tersebut tidak sampai mempengaruhi radikal bebas yang penting bagi tubuh. Contohnya ROS/RNS yang terdapat pada makrofag, yang berfungsi untuk membunuh mikroorganisme)
 6. Perhitungan dosisnya harus dilakukan dengan cermat, dan bahan yang diuji harus terbukti sampai pada sasaran dalam jumlah yang telah diperhitungkan, karena sering terjadi hasil uji *in vitro* tidak sesuai dengan efek *in vivo*-nya (Halliwell and Guetteridge, 1998).

2.11. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa yang terdapat pada hampir semua jenis buah-buahan dan sayuran. Isoflavonoid merupakan isomer dari flavonoid, sehingga memiliki struktur yang hampir sama. Kedua klas senyawa tersebut juga dimetabolisme dengan cara yang sama, dan juga memiliki beberapa efek biologis yang sama, meliputi; efek antikarsinogenik (Verma *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1995); *tyrosine kinase-inhibiting* (Levy *et al.*, 1984) dan *aromatase-inhibiting* (Wanget *al.*, 1994).

Semua jenis flavonoid pada prinsipnya mempunyai kesamaan struktur yaitu, mengandung senyawa phenol, atau juga disebut phenol tanaman (*plant phenol*). Phenol merupakan senyawa yang mengandung gugus hidroksil (-OH), yang terikat pada cincin benzene. Pada tanaman, senyawa phenol ini terdapat dalam jumlah yang besar termasuk, dalam tocopherol dan tocotrienol. Selain pada vitamin E, beberapa phenol lainnya, secara *in vitro* diketahui memiliki potensi antioksidan yang sangat kuat, yang diketahui dapat menghambat perambatan reaksi peroksidasi lipid dengan cara menangkap radikal peroksil (ROO•) (*chain-breaking peroxy-radicals scavengers*). Selain itu, semua senyawa phenol juga mampu secara langsung menangkap ROS seperti OH•, ONOOH dan HOCL (Evans, 1996; Shahidi and Wanasundara, 1992). Efek antioksidan dari phenol tanaman ini pertama kali diketahui dari flavonol, yaitu *sub-family* dari flavonoid yang banyak terdapat pada anggur merah. Senyawa ini terbukti bertanggungjawab dalam menurunkan angka

kejadian penyakit kardiovaskular pada penduduk Perancis, dengan cara mencegah terjadinya peroksidasi PUFAs LDL (*the French paradox*) (Frankel *et al.*, 1996).

Tabel 2.4 Klasifikasi flavonoid

Sub-family	Contoh	Sumber
Flavones	4',5,7-trihydroxyflavone (apigenin) 3',4',5,7,-tetrahydroxyflavone 4',5-dihydroxyflavone 4',6-dihydroxyflavone	Kulit buah jeruk
Flavonols	3,4',5,7-trihydroxyflavone (kaempferol) 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone (quercetin)	teh hijau, anggur merah, teh hitam
Flavanones	4',5,7-trihydroxyflavanone (narigenin) 4',7- dihydroxyflavanone	kulit buah-buahan
Isoflavones (isoflavonoid)	4'-methoxy-5,7-dihydroxyisoflavones (biochanin) 4',5,7-trihydroxyisoflavones (genestein) 4'-methoxy-7-hydroxyisoflavones (formononetin) 4',7-dihydroxyisoflavones (daizein)	Leguminosae (kacang kedeai dan hasil olahannya), semanggi merah.
Coumestans	7,12-dihydroxycoumestan (coumestrol) 7-hydroxy-12-methoxycoumestan	buah apel
Lignans	(trans-2,3-bis (3-hydroxybenzyl)-butane-1,4-diol (matairesinol)	kulit berbagai jenis tanaman
Chalcones	2',4,4',6'-tetrahydroxyldihydrochalone (phloretin)	

(sumber: Clinical Monograph of Promensil. Kelly *et al.*, 1997)

2.11.1. Antioksidan Isoflavonoid

Isoflavonoid merupakan sub family dari flavonoid. Hingga sekarang, kurang lebih 1000 jenis isoflavonoid telah diidentifikasi, namun hanya empat diantaranya yang diketahui memiliki aktivitas biologis yang nyata yaitu, **formononetin**, **biochanin**, **daidzein** dan **genestein**. Sementara itu, dari 4000 jenis flavonoid yang telah diketahui, isoflavonoid (terutama genestein dan daizein) merupakan salah satu yang paling banyak diteliti akhir-akhir ini (Kelly *et al.*, 1997).

Seperti senyawa phenol yang lain, isoflavonoid merupakan antioksidan yang sangat potensial baik *in vitro* maupun *in vivo*. Isoflavonoid tergolong sebagai **chain-breaking peroxy-radicals scavengers**, yang bekerja menghambat perambatan reaksi

peroksidasi lipid dengan cara menangkap radikal peroksil ($\text{ROO}\cdot$). Selain itu, isoflavonoid juga bekerja secara langsung menangkap ROS seperti $\text{OH}\cdot$, ONOOH dan HOCL . Karena memiliki dua gugus hidroksil yang berdekatan, maka isoflavonoid juga diketahui sangat potensial dalam menghambat kerja radikal bebas dari golongan ion logam transisional (Evans, 1996; Shahidi and Wanasundara, 1992)..

Efek antioksidan dari isoflavonoid (khususnya genestein) jauh lebih kuat, dibandingkan dengan senyawa phenol lainnya seperti vitamin E (α -tocoferol). Seperti α -tocoferol, sebagai genestin bekerja pemutus rantai pada peroksidasi PUFAs, yaitu dengan cara menangkap peroksil radikal ($\text{ROO}\cdot$). Selain itu, genestein juga dapat mencegah terjadinya peroksidasi lipid dengan cara menangkap radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$). Oleh karena memiliki dua gugus hidroksil ($-\text{OH}$) yang berdekatan, *in vitro* diketahui bahwa genestein mampu mencegah terjadinya peroksidasi pada biomolekul lainnya oleh ion logam radikal (seperti besi dan cooper), dengan cara mengisolasi ion-ion tersebut (Halliwell and Guettidge, 1998).

Genestin juga dilaporkan dapat meningkatkan enzim-enzim antioksidan internal (seperti glutathion) pada kulit dan usus dimana potensi seperti ini sangatlah penting dimiliki senyawa-senyawa yang berkhasiat sebagai anti kanker yang disebabkan oleh ROS pada karsinogenesis. Genestein dan beberapa senyawa phenol lainnya lainnya, dapat menghambat pembentukan hidrogen peroksida pada hampir semua sel (termasuk pada manusia) (Frenkel, 1996; Record *et al.*, 1995).

Dengan demikian, dalam sistem pertahanan antioksidan, isoflavonoid (khususnya genestein) dapat bekerja pada garis pertahanan yang pertama, kedua dan ketiga, atau berdasarkan cara kerjanya maka isoflavonoid dapat digolongkan sebagai; (1) antioksidan pencegahan (*preventing antioxydants*); (2) *Scavenging antioxydants*, baik dalam mencegah terjadinya reaksi berantai (*chain initiation*), atau sebagai pemutus perambatan reaksi berantai (*chain propagation*) peroksidasi; (3). Enzim-enzim antioksidan (*antyoxydant enzymes*), terutama dalam meningkatkan meningkatkan glutathion.

Meskipun hampir terdapat pada semua jenis tanaman, namun kandungan isoflavonoid diketahui terdapat dalam jumlah yang berlimpah, terutama pada family *Leguminosae*, seperti kacang kedelai (serta berbagai produk olahannya seperti, tahu, tempe, susu kedelai) dan semanggi merah (*Trifolium pratense*). Tingginya kadar

isoflavonoid pada kacang kedelai (terutama genestein dan daedzein), membuat tanaman ini menjadi sumber makanan kesehatan yang potensial (Kelly *et al.*, 1997). Kandungan isoflavonoid dari kacang kedelai kira-kira 1-3 mg/g dan pada makanan-makanan yang berasal dari kedelai (soy food) jumlahnya kira-kira 0.025 hingga 3 mg/g (Wang and murphy, 1994).

Tabel 2.5. Kandungan daidzein dan genestein pada berbagai bahan (mg/100 g berat kering)

Jenis Makanan	Daidzein	Genestein
1. Green soybean	54,6	72,9
2. Tepung kedelai	22,6	81,0
3. Roasted soybean	56,3	86,9
4. Tofu/tahu	14,6	16,2
5. Tempeh/fermented soy	27,3	32,0
6. Tofu yoghurt	5,7	9,4
7. Soy noodle (dry)	0,9	3,7
8. Red clover (dalam mg/40 mg)	3,5	4

(Knight *et al.*, 1999. Aust. J. Nutr. Diet. 53:5-11)

2.11.2. Efek Biologis Isoflavonoid Pada Sistem Kardiovaskular

Isoflavonoid diketahui memiliki berbagai efek yang menguntungkan pada sistem kardiovaskular. Diet isoflavonoid telah terbukti dapat menekan angka kesakitan dan kematian yang diakibatkan penyakit kardiovaskular seperti, atherosklerosis dan hipertensi. Pada atherosklerosis khususnya, dan sistem kardiovaskular pada umumnya, manfaat perlindungan yang didapatkan dari diet isoflavonoid ini dapat dibagi menjadi 3, yaitu;

1. Pada tingkat pre-endotel.

Manfaat perlindungan isoflavonoid pada tingkat pre-endotel ini pada prinsipnya terkait dengan potensi isoflavonoid sebagai antioksidan, terutama dalam mencegah peroksidasi LDL.

Dilaporkan bahwa, LDL plasma darah yang diambil dari sukarelawan yang sebelumnya mendapat diet isofalvonoid asal kedelai (dengan kandungan genestein 12 mg dan daizein 7 mg) setiap hari selama 2 minggu, diketahui mengalami peningkatan resitensi terhadap peroksidasi yang diinduksi cooper. Dibandingkan dengan kontrol, waktu yang dibutuhkan untuk oksidasi LDL pada

kelompok perlakuan, diketahui rata-rata 20 menit lebih lama, atau berbeda sangat nyata dengan taraf kepercayaan ($p < 0.02$). Dugaan sementara adalah isoflavonoid berkonjugasi kedalam LDL, sehingga dapat melindungi LDL dari peroksidasi (Tikkanen, *et al.*, 1998).

Menurut Kanazawa *et al.*, (2001) terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0.05$ atau 0.01) antara jumlah VLDL, HDL dan LDL pada pasien trombosis cerebral yang diberi creme kedelai (*soycreme*), dibandingkan kontrol. Terbukti bahwa protein kedelai dapat menurunkan jumlah peroksidasi lipid pada ketiga lipoprotein tersebut. Isoflavonoid diketahui juga cenderung menurunkan kadar LDL plasma, tetapi kurang signifikan dalam meningkatkan kadar HDL (knight *et al.*, 1999). Efek antioksidan dari isoflavonoid (khususnya genestein) dilaporkan jauh lebih kuat dibandingkan dengan senyawa phenol lainnya seperti vitamin E (α -tocoferol) (Halliwell and Guettidge, 1998).

Genestin dapat meningkatkan enzim-enzim antioksidan internal (seperti glutathion) pada kulit dan usus. Genestein dan beberapa phenolic estrogen lainnya juga menghambat pembentukan hidrogen peroksida pada hampir semua sel (termasuk pada manusia) (Frenkel, 1996; Record *et al.*, 1995). Isoflavonoid yang terdapat dalam hasil ekstrak kedelai (SPE/soya phytochemical ekstrak), terbukti secara *in vitro* dapat menghambat *up-take* glukosa, dan mencegah peroksidasi lipid yang diinduksi oleh glukosa (Vedanam *et al.* 1999).

Selain melalui aktivitasnya sebagai antioksidan, pada tingkat pre-endotel ini isoflavonoid juga dapat mencegah terjadinya atherosklerosis melalui beberapa cara lainnya misalnya, isoflavonoid dapat memperbaiki tekanan darah arteri, sehingga mencegah terjadinya hipertensi sistolik, yang juga berarti dapat menurunkan resiko terjadinya stress oksidatif, yang diakibatkan oleh *shear* dan *stretch stress* (Paul *et al.*, 1999); genestein dapat menghambat pembentukan trombin dan aktivasi platelet (Wilcox and Blumenthal, 1999; Krol *et al.*, 1995).

2. Pada tingkat endotel

Genestin dilaporkan dapat meningkatkan influks Ca^{2+} kedalam sel endotel (Xiong *et al.*, 1995). Isoflavonoid dapat menghambat agregasi platelet, karena dapat bekerja sebagai antagonis reseptor tromboxane A2 pada endotel (Nakashima *et al.*, 1996); menghambat proliferasi sel endotel (fotsis *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 1998);

mengaktivasi endotel untuk menghambat proliferasi sel-sel otot polos (Shimokado *et al.*, 1995); menghambat pertukaran Na^+ dan H^+ pada endotel yang diinduksi oleh vasopresin (Aharonovits, 1992).

3. Tingkat post-endotel

Isoflavonoid mengurangi kerusakan neointima setelah dilakukan *baloon angioplasty*, dan menghambat pertumbuhan neointima, sehingga dapat meminimalisasi ukuran *plaque* pada monyet Rhesus (Honore *et al.*, 1996). Isoflavonoid juga diketahui dapat menghambat influks ion calcium ke dalam sel-sel otot polos vaskular (Ozaki, 1993; Sergeant 1993). *In vitro* isoflavonoid dapat menghambat proliferasi sel-sel otot polos (Shimokado *et al.*, 1995). Isoflavonoid diketahui dapat menyebabkan vasodilatasi melalui mekanisme relaksasi otot polos, dengan cara mengatur pertukaran ion calcium (Filipeanu, 1995). Selain itu isoflavonoid juga menghambat masuknya ion calcium yang dihasilkan oleh trombin kedalam sel-sel otot polos pembuluh darah (Ozaki, 1993; Sergeant 1993).

Selain pada sistem kardiovaskular, isoflavonoid juga diketahui memiliki berbagai potensi biologis lain yang sangat menguntungkan secara klinis. Isoflavonoid merupakan agonis dan antagonis pada reseptor estrogen. Isoflavonoid dapat terikat dan mengaktivasi reseptor estrogen mamalia, dan memicu ekspresi gen yang berhubungan dengan reseptor estrogen tersebut, dan menyebabkan efek estrogenik, dan antiestrogenik lemah. Efek estrogenik dari isoflavonoid berda-beda pada berbagai hewan. Pada dosis sedang isoflavonoid menyebabkan hipertropi uterus rodensia dan domba. Pada dosis besar, ioflavonoid dapat merangsang infertilitas pada rodensia betina dan domba (seperti anovulasi dan hiperplasi cerviks dan uterus), serta efek feminin pada hewan jantan (seperti, pertumbuhan kelenjar mammae, dan pembesaran prostat pada domba jantan). Sedangkan efek anti-estrogenik isoflavonoid pada prinsipnya akan mengakibatkan menurunnya level estrogen steroid intrasel, sebagai akibat adanya sifat kompetitif dari phenol estrogen (Collin *et al.*, 1999).

Isoflavonoid (khususnya genestein dan daedzein) mempunyai kemampuan memodulasi berbagai enzim pada sitoplasma dan inti sel yang mengatur proliferasi, terutama protein tyrosine kinase (PTK) dan DNA topoisomerase. Genestein merupakan inhibitor PTK, yaitu dengan mencegah fosforilasi dari PTK, pada

tempat relekatan PTK dengan resptornya. Genestein juga merupakan **inhibitor DNA topoisomerase I dan II**. DNA topoisomerase merupakan enzim pada inti sel yang berperan dalam prolifersi dan deferensiasi. Genestein dan quercetin dapat menghambat pertumbuhan sel-sel kanker (leukimia, melanoma, prostat, oesofagus, ewing sarcoma, neuroblastoma, colon dan kanker payudara) pada akhir fase G1 dan fase M, serta mengiduksi apoptosis secara *in vitro* pada beberapa sel-sel kanker tersebut (Constantinou *et al.*, 1998).

2.11.3. Metabolisme Isoflavonoid

Didalam tumbuh-tumbuhan senyawa isoflavonoid (khususnya daidzein dan genestein) berada dalam bentuk glukosida sebagai genestin dan daidzin. Isoflavonoid mengalami berbagai tingkat metabolisme didalam tubuh mamalia. Proses metabolisme dari *plant phenol*, pertama yang diketahui secara lengkap adalah isoflavonoid. Dalam proses metabolismenya isoflavonoid akan mengalami beberapa perubahan struktur, yang berakibat terhadap perubahan aktivitas biologisnya.

Perubahan struktur pertama terjadi melalui proses hidrolisis, yang merubah glikosida menjadi aglukon. Proses hidrolisis ini terjadi didalam lambung, tetapi yang paling utama terjadi didalam kolon proksimal oleh aktivitas flora-flora normal, dengan menghasilkan β -glycosidase (Bokkenheuser *et al.*, 1998).

Proses selanjutnya adalah demetilisasi, dimana formonentin akan mengalami demetilsasi menjadi daidzein dan biochanin menjadi genestein. Sedikit berbeda dengan proses demetilisasi isoflavonoid yang berasal dari kedelai, yang terjadi sempurna, proses demetilisasi isoflavonoid yang berasal dari red clover tidak komplit. Dari studi farmakokinetik diketahui bahwa, selain kadar genestein dan daidzein plasma darah yang tinggi, pada individu yang mendapat diet isoflavonoid asal red clover, juga mengandung formonentin dan biochanin (Barnes *et al.*, 1996).

Isoflavonoid mencapai kadar puncak pada plasma darah dalam waktu 5-6 jam setelah pemberian peroral dengan dosis akut (40mg). Genestein dan daidzein adalah menempati kadar yang paling tinggi, disusul oleh formonentin dan biochanin. Kandungan isoflavonoid plasma pada pemberian kronis, diketahui sama dengan kadar isoflavonoid plasma, yang dietmukan pada kelompok masyarakat dengan diet yang mengandung kadar isoflavonoid yang tinggi (misalnya pada masyarakat Asia pada umumnya). Waktu ekskresi yang dibutuhkan, untuk semua jenis isoflavonoid adalah

sama yaitu antara 12 sampai 24 jam setelah pemberian per oral, kecuali untuk metabolit ODMA yang tuntas dibuang dalam waktu 12 jam (Howes *et al.*, 1998).

Kira-kira 30%-70% dari total diet isoflavonoid diberikan pada manusia dirubah menjadi berbagai produk metabolit, yang kemudian diekskresikan melalui urine, saliva dan air susu (khususnya pada sapi). Selain genestein dan daidzein, pada urine juga dapat ditemukan beberapa metabolit isoflavonoid lainnya seperti; equol, dihydroequol, *O*-desmethylangolensin (ODMA), 6-OH-*O*-desmethylangolensin, 2-OH-*O*-desmethylangolensin, dihidrodaidzein dan tetrahidrodaidzein. Perubahan struktur ini menyebabkan perubahan aktivitas biologis isoflavonoid.

Pada manusia, hasil uji HPLC urine dalam waktu 24 jam setelah pemberian ekstrak *red clover* sebanyak 40 mg [dengan ratio kandungan keempat jenis isoflavonoid sebagai berikut; 20 (biochanin) : 12 (formonentin) : 1 (daidzein) : 1 (genestein)], menunjukkan adanya beberapa produk metabolit, dengan kadar paling tinggi yaitu genestein dan daidzein, yang berbeda sangat nyata dengan metabolit lainnya seperti, dihidrodaidzein dan *O*-desmethylangolensin (Joannou *et al.*, 1995; Wilcox *et al.*, 1997).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Stress oksidatif yang terjadi selama aktifitas fisik yang berlebihan, dapat menyebabkan cedera endotel melalui mekanisme-mekanisme berikut ini;

1. Mekanisme yang melibatkan radikal bebas. Pada endotel radikal bebas ROS ($O_2^{\bullet-}$ dan OH^{\bullet}) dapat menyebabkan cedera melalui dua cara yaitu, langsung dan tidak langsung. Radikal bebas dapat secara langsung menyebabkan cedera pada endotel melalui dua cara yaitu, pertama akibat kelangkaan NO, hal ini dapat terjadi karena NO yang terbentuk segera dikat oleh $O_2^{\bullet-}$ membentuk senyawa rakatif lainnya yaitu peroksinitrit ($ONOO^-$). Diketahui bahwa $O_2^{\bullet-}$ merupakan satu-satunya radikal bebas yang paling cepat berikatan dengan NO (Halliwell and Gutteridge, 1998). Kedua melalui aktivitas radikal hidroksil OH^{\bullet} , yang menyebabkan peroksidasi PUFAs membran endotel. Radikal bebas juga menyebabkan kerusakan endotel secara tidak langsung, yaitu melalui peroksidasi LDL dan berbagai produk metabolitnya seperti **MDA**. LDL-Ox dan MDA kemudian secara sinergis menyebabkan kerusakan endotel, melalui mekanisme yang melibatkan sel-sel lainnya seperti makrofag, miosit, monosit dan platelet (Navab *et al.*, 1996; Halliwell and Gutteridge, 1998).
2. Stress fisik dapat menyebabkan kerusakan endotel, melalui peningkatan stress tekanan aliran darah pada permukaan arteri. Rangsangan mekanik (seperti, *shears stress*, *stretch stress* dan turbulansi), dapat menimbulkan berbagai respon pada endotel. Akibat tekan aliran yang terlalu kuat, dalam hitungan detik atau menit, endotel melepaskan Ca^{2+} ; mengaktivasi phospholipase A dan C; pemecahan PIP_2 ; dan akhirnya menghasilkan NO dan prostasiklin. Bila rangsangan yang kuat tersebut terus berlangsung, maka dalam hitungan menit sampai beberapa jam, endotel akan memberikan respon dengan cara; (a) melepaskan endothelin (ET-1); (b) mengekspresikan berbagai faktor transkripsional (seperti, $NF-\kappa B$, *nuclear factor*) (c) diekspresikannya gen-gen regulasi (seperti, *c-myc*, *c-jun*, *c-fos*); (d) *platelet-derived growth factor* (PDGF-B) dan MCP-1, yang menyebabkan prolifearsi miosit; (e) *tissue factor* (TF), yang mengawali terjadinya proliferasi

fibroblas; dan (f) endotel akan mengekspresikan berbagai molekul adhesi (ICAM, VCAM), interleukin dan selectin (Sperelakis, 1998).

Melalui kedua mekanisme tersebut, sel endotel yang cedera dan mengalami gangguan fungsi (disfungsi) atau rusak, selanjutnya akan menjadi faktor pemicu terjadinya proses merugikan lain pada dinding pembuluh darah. Pada tahap awal, cedera endotel dapat mengakibatkan terjadinya peristiwa-peristiwa berikut,

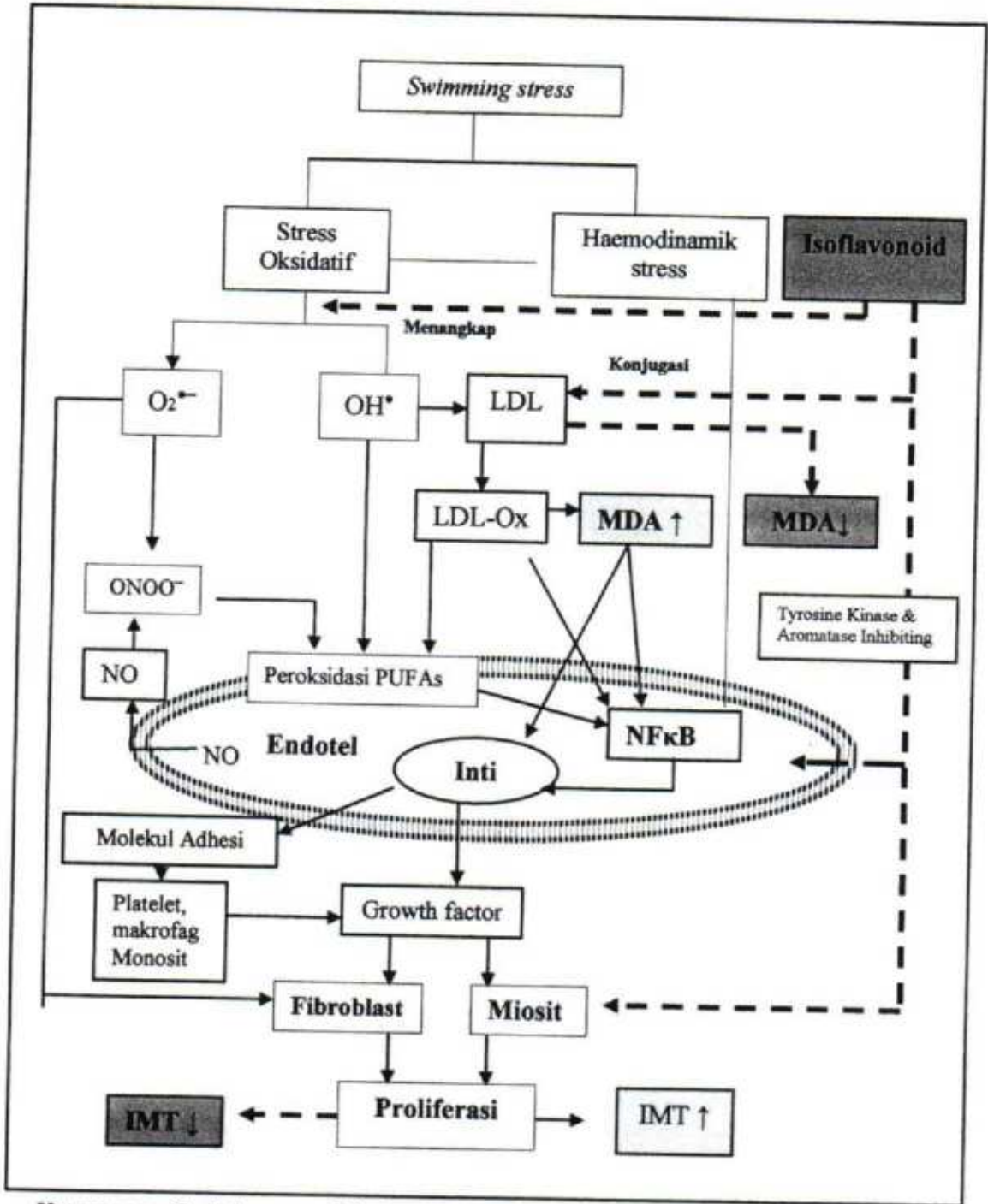
- (1) Penurunan produksi EDRF-NO dan prostasiklin oleh sel endotel, sehingga mengakibatkan; gangguan keseimbangan antara endotelin (ET-1) dan EDRF-NO (jumlah ET-1 menjadi lebih besar); gangguan vasodilatasi; agregasi platelet, monosit dan makrofag pada permukaan dinding arteri, yang berlanjut dengan infiltrasi sel-sel tersebut dan protein serta lemak plasma darah (termasuk, LDL) pada jaringan sub endotel.
- (2) Proliferasi miosit dan fibroblast pada subendotel dan tunika media arteri. Pada prinsipnya mekanisme proliferasi dari kedua sel tersebut terjadi melalui proses yang melibatkan radikal bebas, cedera endotel dan sel-sel darah seperti makrofag, monosit dan platelet.

Seluruh kejadian diatas, akhirnya akan menyebabkan perubahan pada struktur arteri, yaitu berupa penebalan pada dindingnya. Bila faktor jejas dihilangkan, sel endotel dapat pulih dan berfungsi normal kembali, namun bila terus berlanjut, maka penebalan yang terjadi pada tahap awal, akan berlanjut dan menjadi dasar bagi pembentukan plak sklerotik (Constantinides, 1994).

Isoflavonoid diketahui merupakan antioksidan yang sangat potensial karena dapat bekerja pada semua lini dari sistem pertahanan antioksidan yaitu, (1) antioksidan isoflavonoid bisa secara langsung menangkap dan menetralkan radikal bebas (*preventing antioxydants*), sehingga dapat mengurangi kadar radikal bebas dalam tubuh dan mencegah dimulainya reaksi berantai (*chain initiation*); (2) isoflavonoid dapat mencegah perambatan reaksi berantai pada peroksidasi PUFAs (*chain propagation*), dan menghentikannya (*chain breaking antioxydant*); (3) isoflavonoid dapat meningkatkan produksi enzim-enzim antioksidan (*antioxydant enzymes*), terutama dalam meningkatkan meningkatkan glutathion (Papas, 1999).

Suplementasi isoflavonoid pada tikus yang diberi stress berenang (*swimming stress*), dalam penelitian ini, diharapkan dapat mencegah terjadinya kerusakan endotel dan mencegah penebalan tunika intima-media a. carotis communis, melalui

ketiga mekanisme diatas. Ringkasan dari kerangka konseptual dalam penelitian ini secara skematis dapat dilihat pada gambar 3.1. dibawah ini;



Keterangan : Garis lurus : Jalur kerja jejas
 Garis putus : Jalur kerja isoflavonoid

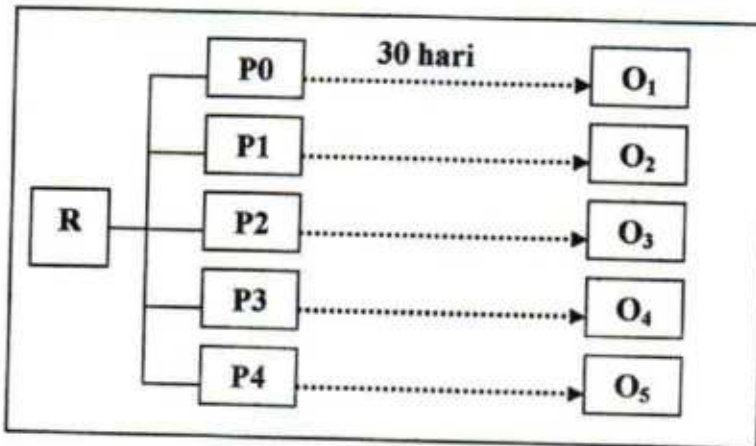
3.2. Hipotesis Penelitian

1. Pemberian isoflavonoid dapat mencegah penebalan tunika intima media arteri carotis communis tikus putih jantan yang diberi stressor.
2. Pemberian isoflavonoid dapat mencegah peningkatan kadar MDA plasma darah tikus putih jantan yang diberi stressor.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, dan model rancangannya yaitu *posttest-only control group design*. Untuk mengetahui apakah perbedaan efek yang terjadi benar-benar merupakan akibat dari pemberian isoflavonoid (untuk meningkatkan validitas internalnya), maka penelitian berikut menggunakan beberapa kelompok perlakuan, seperti pada skema dibawah ini (Zainuddin, 1988).



Keterangan :

- R : Randomisasi
- P0 : Kontrol negatif (hanya diberi placebo)
- P1 : Hanya diberi isoflavonoid 0.7 mg/ekor
- P2 : Hanya diberi stressor
- P3 : Stressor + isoflavonoid 0.7 mg/ekor
- P4 : Stressor + isoflavonoid 1.4 mg/kg ekor
- O1 : Data hasil pengukuran P0
- O2 : Data hasil pengukuran P1
- O3 : Data hasil pengukuran P2
- O4 : Data hasil pengukuran P3
- O5 : Data hasil pengukuran P4

4.2. Sampel dan Besar Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*), strain Wistar, umur 4 bulan, dengan berat antara 180-220 gram. Besar sampel yang digunakan untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah 8 ekor,

yang ditentukan berdasarkan rumus besar sampel dari Higgins dan Kleibaum (1985) (lampiran 1).

4.3. Variabel Penelitian

I. Variabel Bebas

1. Stressor
2. Pemberian antioksidan isoflavonoid

II. Variabel Kendali

1. Jenis kelamin
2. Umur
3. Berat badan
4. Jenis pakan
5. Kondisi kandang
6. Strain tikus

III. Variabel Moderator

1. Kadar LDL
2. Kadar radikal bebas

IV. Variabel tergantung

1. Ketebalan tunika intima-media arteri carotis communis.
2. Kadar MDA plasma darah.

4.3.1. Definisi Operasional Variabel

1. Stressor

Stressor yang diberikan dalam penelitian ini adalah berupa stress berenang (*swimming stress*), menurut teknik yang dilakukan oleh Harjanto dan Santoso. Adapun teknik perlakuan tersebut adalah sebagai berikut ;

Setiap tikus ditimbang untuk menentukan **berat beban** yang akan diberikan, yaitu 8% dari berat badan. Kemudian beban dipasang dengan “jepit rambut” pada ekor dengan jarak kurang lebih 2 cm dari pangkal ekor, dan mengantung kira-kira 3 cm dari tempat ikatannya. Selanjutnya tikus dipaksa berenang selama 20 menit. (Harjanto and Santoso, 2001). Stressor diberikan setiap hari selama 30 hari.

2. Pemberian isoflavonoid

Isoflavonoid diberikan secara per oral melalui sonde, dengan dosis yang telah ditentukan (lampiran 2), yaitu dosis normal 0.7 mg/kg BB/hari dan dosis ganda 1.4 mg/kg BB/hari. Volume obat yang diberikan terbagi menjadi dua yaitu 0.6 cc/ekor (untuk P0, P1, P2, dan P3) dan 1.2 cc/ekor untuk perlakuan P4. Pemberian isoflavonoid pada kelompok perlakuan P3 dan P4 dilakukan 2-3 jam sebelum pemberian stressor. Pemberian isoflavonoid juga dilakukan setiap hari selama 30 hari.

3. Ketebalan tunika intima-media (IMT) a. carotis communis.

IMT a. carotis communis diukur dari tunika intima hingga batas antara tunika media dan adventisia, dengan menggunakan mikrometer yang telah ditera terlebih dahulu. Bagian dari arteri yang diamati adalah bagian proksimal atau anterior (pada posisi anatomi tikus). Data yang didapatkan merupakan nilai rata-rata dari a. carotis kiri dan kanan, yang diukur dengan mikrometer pada mikroskop cahaya dengan pembesaran 450x.

4. Kadar MDA plasma darah.

Kadar MDA plasma darah diperiksa paling lama 2 hari setelah pengambilan darah. MDA merupakan salah satu produk metabolit dari peroksidasi asam lemak, jadi pengukuran kadar MDA secara tak langsung adalah juga mengukur tingkat peroksidasi yang terjadi.

5. Pakan dan minum

Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Pakan yang digunakan adalah pakan untuk ayam pedaging dengan merk dagang BR-1 produksi PT. Comfeed Indonesia, yang memiliki kandungan protein kasar sebesar 20.42 %. Kandungan bahan pakan yang akan digunakan untuk penelitian tidak terlalu berbeda dengan kebutuhan standart pakan rodensia (Semler *et al.*, 1992). Sedangkan air minum yang dibrikan adalah air mineral isi ulang.

6. Hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), strain Wistar, jenis kelamin jantan, dengan umur kurang lebih 4 bulan, dan berat berkisar antara 180-220 gram.

7. Kandang

Kandang terbuat dari bahan plastik dengan ukuran 40 cm x 65 cm x 20 cm, dengan penutup kawat kasa dan alas kandang dilapisi oleh sekam. Setiap kandang diisi 4 ekor tikus.

4.4. Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Bahan perlakuan

Antioksidan isoflavonoid diperoleh dari produk jadi dengan nama dagang *Red Clover*, produksi Novogen Limited Australia, yang dibuat dari ekstrak daun *Trifolium pratense* (red clover atau semanggi merah). Dalam setiap tablet (250 mg) *Red Clover* terkandung 40 mg isoflavonoid, yang terdiri dari 24.5 mg (biochanin), 8 mg (formonentin), 3.5 mg (daidzein), dan 4 mg (genestin). Pada manusia *Red Clover* diberikan dengan dosis tunggal yaitu 40 mg/orang /hari. Dosis ini disesuaikan dengan jumlah isoflavonoid yang dikonsumsi sehari-hari dari berbagai makanan tradisional seperti, tahu, tempe dan susu kedelai, yang besarnya antara 30-100 mg/hari (Kelly *et al.*, 1998).

4.4.2. Bahan pemeriksaan.

1. Plasma darah, dan Arteri carotis communis kanan dan kiri tikus.
2. Bahan pembutan sediaan histologis dengan tehnik pengecatan *Verhoff Van Gieson* (lampiran 3).

4.4.3. Alat-alat penelitian

1. Alat pemeliharaan hewan
 - Kandang
 - Botol minum dan tempat pakan.
2. Peralatan perlakuan stresor (*swimming stress*)
 - Pemberat (dibuat dari beberapa klip)
 - Benang
 - Penjepit (jepit rambut ukuran kecil)
 - Bak air (tinggi kurang lebih 1 meter dengan diameter 50 cm)
 - *Stop watch*
 -

3. Peralatan bedah
 - Peralatan bedah (gunting, pisau bedah, pinset dll).
 - Peralatan pembiusan (kapas, tabung plastik dengan penutup)
 - Meja diseksi dan kelengkapannya
4. S spuit 3 cc untuk pengambilan darah
5. Peralatan pembuatan sediaan histologis
 - Obyek dan cover glass, botol kecil berisi larutan fiksasi, *water bath*, mikrotom, timbangan elektronik dan serangkaian tabung pengecatan.
6. Peralatan pengukuran IMT a. carotis communis
 - Gratikule dan mikrometer
 - Mikroskop cahaya dan kamera
7. Peralatan pemeriksaan kadar MDA plasma darah
 - Spektrofotometer

4.5. Prosedur Penelitian

4.5.1. Adaptasi

Sebelum perlakuan hewan percobaan terlebih dahulu diadaptasikan dengan kondisi tempat penelitian, pakan dan minum selama 7 hari.

4.5.2. Pembagian kelompok perlakuan

Pembagian kelompok dilakukan secara acak (*random sampling*) dengan cara mengundi dari 50 ekor tikus yang disediakan, yang terlebih dahulu diberi nomor. Tikus kemudian dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, dan masing-masing perlakuan terdiri dari 8 ekor.

Kelompok-kelompok perlakuan tersebut adalah;

1. Kelompok kontrol negatif (P0), yang hanya diberi placebo
2. Kelompok kontrol positif (P1), hanya diberi isoflavonoid 0.7 mg/ekor
3. Kelompok perlakuan (P2), hanya diberi stressor (tanpa isoflavonoid)
4. Kelompok perlakuan (P3), diberi stressor dan isoflavonoid 0.7 mg/ekor
5. Kelompok perlakuan (P4), diberi stressor dan isoflavonoid 1.4 mg/ekor.

Sebelum diberi perlakuan, seluruh berat badan hewan coba terlebih dahulu ditimbang (timbangan Torbal, dengan ketelitian 1 angka dibelakang koma).

4.5.3. Pelaksanaan perlakuan

Stressor dan isoflavonoid diberikan setiap hari, selama 30 hari. Pada kelompok yang mendapat perlakuan stressor dan isoflavonoid, maka pemberian isoflavonoid dilakukan 2 jam sebelum stressor diberikan. Perlakuan dilakukan pada jam yang sama setiap harinya yaitu, dari pukul 09.00 WIB. hingga selasi (rata-rata membutuhkan waktu kurang lebih 4 jam/hari).

4.5.4. Pengumpulan data

1. Pemeriksaan kadar MDA Darah

- Darah diambil dari jantung (*cardiac puncture*), sebanyak 2-3 cc dan didiamkan selama 30 menit, kemudian dipusingkan selama 10 menit. Serum yang terpisah diambil dan disimpan pada suhu -20°C , sampai dilakukan pemeriksaan MDA.
- MDA diperiksa dengan menggunakan tes TBA (*thiobarbituric test*) dengan alat spektrofotometer. Bahan yang akan diuji dipanaskan bersama TBA pada suasana asam, dan rekasi antara TBA dan MDA akan menghasilkan produk berpendar (*flouresent product*) warna *pink* dengan panjang gelombang 532 nm. MDA bebas sangat tidak stabil, oleh karena itu untuk kepentingan pengukurannya, maka sampel yang diambil harus segera digunakan. Kekurangan dari tes ini adalah tidak dapat dibedakan antara MDA yang terbentuk dari peroksidasi PUFAs dengan MDA yang dihasilkan secara enzimatis selama sintesis eicosanoid (Halliwell and Guetteridge, 1998).

2. Pengukuran ketebalan tunika intima-media (intimal-media thickness/ IMT) arteri carotis communis.

Setelah dibius dengan ether dan diambil darahnya untuk pemeriksaan kadar MDA, kemudian tikus dikorbankan dengan cara memukul kepalanya. Setelah itu tikus diletakan diatas meja bedah dengan keempat kakinya difiksasi. Diseksi dimulai dengan pembukaan kulit diregio thorakalis hingga regio cervikalis. Beberapa lapis otot diregio cervikalis yang terletak superfisial disisihkan atau dipotong (termasuk vena jugularis), hingga ditemukan thrakea. Arteri carotis communis kiri dan kanan terletak tepat

mengapit *thracea* dan *oesophagus* dibagian proksimal. Setelah *a. carotis communis* teridentifikasi, maka dengan hati-hati dilakukan pengambilan pembuluh darah tersebut. Dimulai dari bagian paling proksimal atau kira-kira sejajar dengan pangkal *thracea*, *a. carotis communis* ditelusuri kearah distal, dan pemotongan arteri dilakukan dengan cara mengangkat semua otot yang terletak disebelah superiornya. Jadi selain beberapa otot diregio *cevikalis*, maka pada pemotongan *a. carotis communis*, juga turut terangkat beberapa organ dan jaringan yang lain seperti, *thracea*, *oesophagus*, dan sebagian kelenjar *tyroid* dan *paratyroid*. Sampel yang didapat, kemudian segera dimasukkan kedalam larutan fikasasi (fomalin 10%).

Proses selanjutnya adalah pembuatan sediaan histologis. Sediaan histologis dipotong secara melintang, yang dilanjutkan pemendaman (*embedding*) jaringan dalam parafin. Setelah itu dilakukan pemotongan dengan mikrotom dengan tebal irisan 5 μ m, dan setiap sampel dibuat dalam jumlah yang banyak (dalam bentuk *ribbon*), yang kemudian dipilih sediaan paling baik untuk selanjutnya dilakuana pewarnaan.

Sediaan yang terpilih kemudian diwarnai menurut tehnik pewarnaan *Verhoff von Gieson (VvG)*. (Bancroft and Cook, 1998) (lampiran 3). Sediaan histologis yang didapatkan, kemudian diperiksa dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran mula-mula 100 x. dan dilanjutkan dengan pembesaran 450 kali. Ketebalan tunika intima-media arteri, diukur dengan mikrometer yang telah ditera terlebih dahulu. Pengukuran ketebalan dimulai dari endotel (tunika intima) hingga perbatasan antara tunika media dan *adventisia*.

4.6. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 bulan yaitu dari bulan Februari 2002 hingga Juni 2002. Rincian waktu penelitian adalah sebagai berikut; (1) waktu pemeliharaan anak tikus, dari umur kurang lebih 2 minggu hingga 3 bulan; (2) waktu adaptasi 1 minggu; (3) waktu pemberian perlakuan 1 bulan; dan (4) waktu pengumpulan data 1 bulan. Penelitian, pembuatan sediaan histologis dan pengukuran IMT *a. carotis communis*, dilakukan di laboratorium Anatomi-Histologi

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Sedangkan pemeriksaan kadar MDA dilakukan di laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

4.7. Analisis Data

Berdasarkan pada skala data, jumlah variabel, distribusi data, homogenitas variansi dan rancangan percobaan yang digunakan, maka data yang didapatkan selanjutnya dianalisis dengan uji *One Way Anova* atau Anova satu arah, dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$), dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (LSD) (Steel and Torrie, 1981). Untuk mengetahui hubungan diantara variabel tergantung yang diperoleh (yaitu antara peningkatan kadar MDA dan ukuran IMT a. carotis communis), maka dilakukan dianalisis korelasi dua arah dari Pearson. Seluruh proses analisis statistik tersebut dikerjakan dengan program SPPS 7.5 *for windows*.

BAB 5 HASIL PENELITIAN

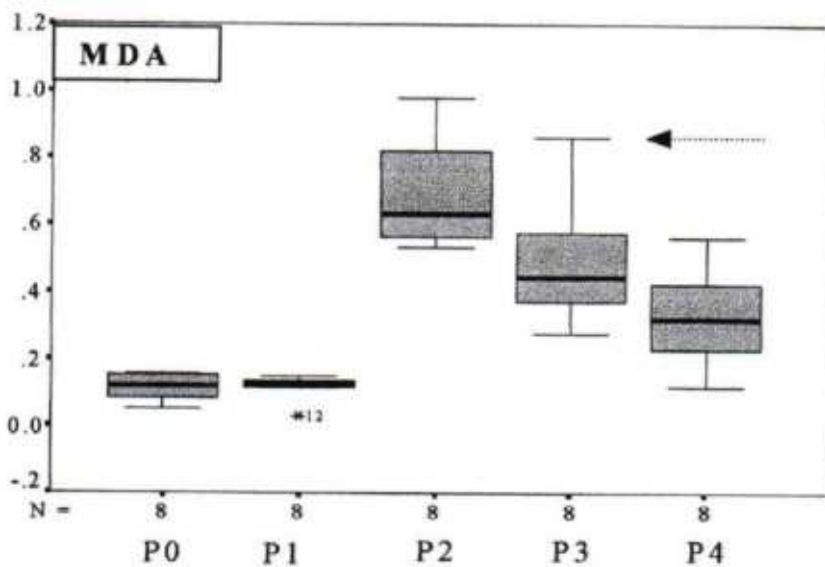
5.1. Deskripsi Data Efek Pemberian Isoflavonoid Terhadap Kadar MDA Darah

Hasil pemeriksaan kadar MDA plasma darah pada semua kelompok perlakuan disajikan dalam pada tabel (tabel 5.1.) dan grafik (grafik 5.1) berikut ini;

Tabel 5.1. Rata-rata dan SD Kadar MDA darah (nmol/ml) pada tiap kelompok perlakuan

No Ulangan	Perlakuan				
	P0	P1	P2	P3	P4
1	0.12	0.15	0.88	0.48	0.46
2	0.05	0.13	0.76	0.39	0.24
3	0.15	0.14	0.98	0.28	0.56
4	0.12	0.03	0.59	0.86	0.28
5	0.12	0.12	0.53	0.52	0.12
6	0.16	0.12	0.64	0.41	0.36
7	0.16	0.13	0.53	0.63	0.39
8	0.05	0.12	0.62	0.35	0.22
Rata-rata ± SD	0.1173 ± 0.04	0.1165 ± 0.04	0.6913 ± 0.16	0.4900 ± 0.18	0.3289 ± 0.14

Keterangan : P0 : Kontrol (tanpa stressor dan tanpa isoflavonoid)
 P1 : tanpa stressor + Isoflavonoid 0.7 mg/ekor
 P2 : Stressor
 P3 : Stressor + Isoflavonoid 0.7 mg/ekor.
 P4 : Stressor + Isoflavonoid 1.4 mg/ekor.



Grafik 5.1. Efek isoflavonoid terhadap kadar MDA darah

Dari data diatas, nampak bahwa tikus yang mendapat stressor, tetapi tidak diberi diet isoflavanoid (kelompok P2) mempunyai nilai rata-rata kadar MDA darah yang tertinggi yaitu 0.6913 ± 0.16 nmol/ml. Pada kelompok perlakuan ini pula kadar MDA tertinggi dapat ditemukan, yang mencapai 98 nMol/ml.

Sementara itu pada kelompok tikus yang diberi stressor, tetapi sebelumnya juga diberi antioksidan isoflavanoid (P3 dan P4), menunjukkan angka rata-rata kadar MDA yang lebih rendah, yaitu masing-masing 0.4900 ± 0.18 nmol/ml dan 0.3289 ± 0.14 nMol/ml.

Terdapat kecederungan bahwa kadar MDA semakin turun, dengan semakin besarnya dosis isoflavanoid yang diberikan. Pada kelompok kontrol dan P1, nampak bahwa kadar MDA rata-ratanya jauh lebih rendah, dibandingkan dengan kelompok-kelompok perlakuan yang diberi stressor.

Pada kelompok perlakuan P1, pemberian isoflavanoid, nampaknya tidak terlalu mempengaruhi kadar MDA, hal ini dapat dilihat pada nilai rata-rata MDA pada kelompok P1 yang hampir sama dengan kelompok kontrol.

Jadi rentang nilai kadar MDA yang didapatkan dari seluruh perlakuan pada penelitian ini yaitu antara 0.3 nmol/ml hingga 0.98 nmol/ml atau nilai rentangnya adalah 95. Hasil uji normalitas (*Shapiro and Wilk test*) dan uji hogenitas variansi diantara perlakuan, menunjukkan bahwa data hasil pemeriksaan MDA berdistribusi normal dengan ($p > 0.05$), dan dari uji homogenitas variansi, terbukti bahwa data homogen dengan ($p > 0.05$). Homogenitas dan normalitas sebaran data ini penting diketahui untuk kepentingan pengujian statistiknya.

5.1.1. Hasil Uji Anova Satu Arah Efek Pemberian Isoflavanoid Terhadap Kadar MDA

Hasil analisis data dengan uji anova satu arah menunjukkan bahwa, pemberian isoflavanoid terbukti sangat nyata ($p < 0.01$) dapat mencegah peningkatan kadar MDA pada tikus putih jantan yang diberi stressor. Selanjutnya untuk mengetahui lebih jauh perbedaan yang terjadi diantara kelompok perlakuan, telah dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) atau LSD (*Least Significant Difference*) (lampiran).

lebih jauh perbedaan yang terjadi diantara kelompok perlakuan, telah dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) atau LSD (*Least Significant Difference*) (lampiran).

Tabel 5.2. Hasil uji anova satu arah kadar MDA

Sumber Keragaman		Jumlah Kuadrat	Db	Rata-rata kuadrat	F	Sig
MDA	Antar Kelompok	1.961	4	0.490	28.83 7	0.000
	Dalam kelompok	0.595	35	0.017		

Dari hasil uji BNT tersebut diketahui bahwa, pada kelompok yang diberi stressor, tetapi tidak diberi antioksidan isoflavonoid (P2), mempunyai rata-rata kadar MDA yang paling tinggi yaitu 0.6913 ± 16 nmol/ml, dan berbeda secara bermakna ($p < 0.05$) terhadap kelompok perlakuan yang juga mendapat stressor tetapi diberi isoflavonoid sebelumnya yaitu kelompok perlakuan P3 dan P4.

Rata-rata kadar MDA darah pada kelompok perlakuan P4 (0.3289 ± 0.14 nmol/ml) terbukti lebih rendah dan berbeda secara bermakna ($p < 0.05$), dari rata-rata kadar MDA pada kelompok perlakuan P3 (0.4900 ± 0.18 nmol/ml). Hal ini sekaligus menunjukkan bahwa perbedaan dosis yang diberikan yaitu 0.7 mg/ekor untuk P3 (dosis normal) dan 1.4 mg/ekor untuk P4 (2x dosis normal), memberikan perbedaan yang berarti terhadap kadar MDA darah pada kedua kelompok perlakuan tersebut.

Pada kelompok-kelompok yang tidak diberi stressor yaitu P0 dan P1 kadar rata-rata MDA-nya terbukti jauh lebih rendah dan berbeda sangat nyata ($p < 0.01$) terhadap ketiga kelompok yang mendapat stressor. Sementara itu, pemberian isoflavonoid pada kelompok yang tidak diberi stressor (P1) nampaknya tidak terlalu berpengaruh terhadap kadar rata-rata MDA, bila dibandingkan P0.

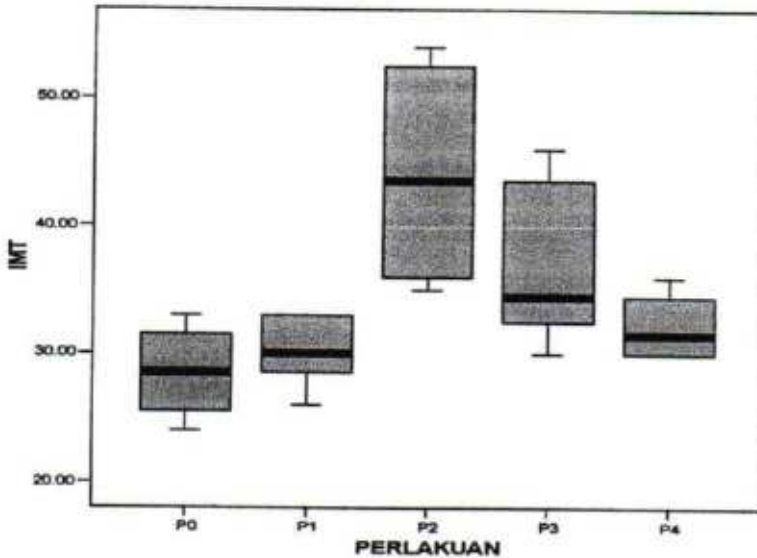
5.2. Deskripsi Data Efek Pemberian Isoflavonoid Terhadap Ketebalan Tunika Intima-Media Arteri Carotis Communis

Pengaruh pemberian isoflavonoid terhadap ketebalan tunika intima-media (selanjutnya disingkat IMT) a. carotis communis pada semua kelompok perlakuan, dapat dilihat pada tabel (tabel 5.3.) berikut ini;

Tabel 5.3. Rata-rata dan SD ukuran IMT a. carotis communis (μm) pada tiap kelompok

No Ulangan	Perlakuan				
	P0	P1	P2	P3	P4
1	24	33	54	45	30
2	24	27	35	33	30
3	27	30	36	33	36
4	30	30	51	46	36
5	27	33	42	36	33
6	33	26	36	32	30
7	33	33	54	42	30
8	30	30	45	30	33
Rata-rata \pm SD	28.5 \pm 3.5	30.2 \pm 2.7	44.1 \pm 8.1	36.6 \pm 5.6	32.2 \pm 2.6

Keterangan : P0 : Kontrol (tanpa stressor dan tanpa isoflavonoid)
 P1 : tanpa stressor + Isoflavonoid 0.7 mg/ekor
 P2 : Stressor
 P3 : Stressor + Isoflavonoid 0.7 mg/ekor.
 P4 : Stressor + Isoflavonoid 1.4 mg/ekor.

**Grafik 5.1.** Efek pemberian isoflavonoid terhadap IMT a. carotis communis

Dari grafik (5.3.) dan tabel (5.3.) diatas, nampak bahwa tikus yang mendapat stressor, tetapi tidak diberi diet isoflavanoid (P2) mempunyai rata-rata IMT yang paling tebal yaitu $44.1 \pm 8.1 \mu\text{m}$, dengan batas maksimum (paling tebal dari seluruh kelompok perlakuan) yaitu adalah $54 \mu\text{m}$.

Pada tikus yang diberi stressor, tetapi sebelumnya juga diberi antioksidan isoflavonoid (P3 dan P4), menunjukkan rata-rata tebal IMT yang lebih rendah, dan terdapat kecenderungan semakin tipis, dengan semakin besarnya dosis isoflavonoid yang diberikan ($P4 < P3$). Meskipun tebal rata-rata IMT P3 lebih rendah dibandingkan dengan P2, namun pada kelompok perlakuan ini, terdapat beberapa nilai yang ekstrem yang melebihi nilai rata-rata kelompok perlakuan P2.

Pada dua kelompok yang tidak diberi stressor yaitu P0 dan P1, mempunyai rata-rata IMT yang jauh lebih rendah, dibandingkan dengan kelompok-kelompok perlakuan lain yang diberi stressor P2, P3 dan P4. Nampak bahwa rata-rata tebal IMT pada P1 lebih tinggi dari P0, hal ini sedikit berbeda dengan data kadar rata-rata MDA diantara dua kelompok tersebut, dimana P1 lebih rendah dari P0.

Hasil uji normalitas (*Shapiro and Wilk test*) penyebaran (distribusi) data, menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dengan ($p > 0.05$), dan dari uji homogenitas variansi, juga terbukti bahwa variansi data adalah homogen dengan ($p > 0.01$), sehingga data yang diperoleh ini memenuhi syarat untuk diuji lebih lanjut dengan uji *analysis of varians* (Anova).

5.2.1. Hasil Uji Anova Satu Arah Efek Pemberian Isoflavonoid Terhadap IMT a. Carotis

Hasil analisis data dengan uji Anova menunjukkan bahwa, pemberian isoflavonoid terbukti nyata ($p < 0.05$), dapat mencegah penebalan pada tunika intima-media a. carotis communis pada tikus putih jantan yang diberi stressor. (tabel 5.4.). Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan rata-rata yang terjadi diantara kelompok perlakuan tersebut, telah dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) atau LSD (*Least Significant Difference*). Dari uji BNT tersebut diketahui bahwa,

Tabel 5.4. Hasil uji anova satu data ukuran IMT arteri

Sumber Keragaman		Jumlah Kuadrat	Db	Rata-rata kuadrat	F	Sig
IMT	Antar Kelompok	1269.15	4	317.28	11.93	0.000
	Dalam kelompok	930.75	35	26.59		

- (1) Pada kelompok yang diberi stressor, tetapi tidak diberi antioksidan isoflavonoid (P2), mempunyai rata-rata ukuran IMT yang paling tebal yaitu $44.1 \pm 8.1 \mu\text{m}$ dan berbeda sangat nyata ($p < 0.01$) terhadap semua kelompok perlakuan, termasuk dengan kelompok yang juga mendapat stressor tetapi juga diberi isoflavonoid (P3 dan P4).
- (2) Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara ukuran rata-rata IMT pada kelompok perlakuan P4 dan kelompok perlakuan P3. Hal ini sekaligus menunjukkan bahwa perbedaan dosis isoflavonoid yang diberikan yaitu 0.7 mg/kgBB untuk P3 (dosis normal) dan 1.4 mg/kgBB untuk P4 (2x dosis normal), tidak memberikan perbedaan yang berarti. Tetapi yang menarik adalah bahwa ternyata ukuran IMT pada kelompok P4 tidak berbeda nyata dengan kedua kelompok kontrol yaitu P0 dan P1. Dengan kata lain, pemberian isoflavonoid dengan dosis 1.4 mg/kgBB , mampu mencegah terjadinya penebalan pada tunika intima media a. carotis pada tikus yang disebabkan oleh stress.
- (3) Pada P0 dan P1, rata-rata ukuran IMT berbeda secara bermakna ($p < 0.01$) terhadap kelompok P2 dan P3 dan tidak berbeda nyata dengan P4.
- (4) Selain pada P4, perubahan yang menarik lainnya nampak pada kedua kelompok kontrol yang sama-sama tidak diberi stressor, yaitu dimana ukuran rata-rata IMT pada P1 (kontrol positif) $30.2 \pm 2.7 \mu\text{m}$ nampak relatif lebih tebal dibandingkan dengan P1 (kontrol negatif) yaitu $28.5 \pm 3.5 \mu\text{m}$, meskipun tidak berbeda nyata. Faktor yang menarik dari perbandingan dua kelompok perlakuan ini adalah karena P1 diberi isoflavonoid dan P0 tidak.

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1. Stress Fisik dan Peningkatan MDA Plasma Darah

Aktifitas fisik yang berlebihan telah terbukti dapat menyebabkan peningkatan kadar radikal bebas tubuh, terutama radikal superoksida, yang dibarengi dengan menurunnya status antioksidan. Dengan kata lain aktifitas fisik yang berlebihan merupakan penyebab stress oksidatif, yang diketahui dapat menyebabkan berbagai perubahan merugikan pada sistem biologis normal tubuh (Hellsten, 1997).

Aktivitas fisik yang berlebihan diketahui bertanggungjawab terhadap perubahan yang terjadi pada komposisi asam lemak membrane sel, permeabilitas dan kelangkaan enzim-enzim tertentu pada sel otot lurik (Evans *et al.*, 1999). Stress oksidatif yang terjadi selama olahraga yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan berbagai makromolekul tubuh seperti lemak, protein dan asam nukleotida (DNA) (Pattelongi, 1999; Leeuwenburgh *et al.*, 1999; Radak *et al.*, 2000).

Pada sistem kardiovaskular, stress oksidatif dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi LDL, dimana LDL yang teroksidasi (LDL-Ox) tersebut selanjutnya diketahui merupakan kontributor yang nyata dalam menimbulkan atherosklerosis baik pada manusia maupun hewan.

LDL teroksidasi (LDL-Ox) dan produk-produk dekomposisinya (metabolit) seperti, malodialdehid (**MDA**), 4-hidroksinonenal (HNE) dan F2-isoprostenes, menyebabkan berbagai respon biologis pada sel-sel yang terlibat dalam atherosklerosis seperti makrofag, endotel, monosit, miosit, dan fibroblas (Halliwell and Gueteridge, 1998).

Selama bertahun-tahun MDA telah menjadi fokus perhatian utama pada dunia kedokteran, karena diketahui sebagai senyawa yang paling sering ditemukan sebagai produk akhir dari peroksidasi lipid. MDA dihasilkan dalam jumlah yang besar terutama dari peroksidasi asam lemak tak jenuh jamak atau PUFAs, khususnya dari jenis PUFAs yang memiliki ikatan rangkap atom carbonnya yang lebih dari dua, seperti asam linolenat, asam arakhidonat dan asam docosaheksionat (Estherbauer *et al.*, 1991).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa stress fisik (*swimming stress*) yang diberikan, terbukti sangat nyata ($p < 0.01$), menyebabkan peningkatan kadar MDA

darah pada tikus. Rata-rata kadar MDA darah pada tikus yang diberi stressor (P2) adalah 0.6913 ± 0.16 nmol/ml, sedangkan pada tikus yang tidak diberi stressor P0 (kontrol), nilai rata-ratanya adalah 0.1173 ± 0.04 nmol/ml.

Dengan metode serupa, beberapa penelitian sebelumnya melaporkan hasil yang sedikit berbeda. Harjanto dan Santoso, (2001), melaporkan bahwa pada tikus putih (*rattus novergicus*) jantan umur 3 bulan, yang diberi *swimming stress* dengan durasi 20 menit dengan beban 8%, diketahui menyebabkan peningkatan kadar MDA hingga 0.7708 nmol/ml. Sementara itu, Maslachah, (2000) mencatat angka peningkatan kadar MDA yang lebih rendah yaitu 6.054 ± 0.35 mmol/ml, pada tikus yang direnangkan selama 30 menit dengan beban 2 % BB.

6.1.1. Efek Pemberian Isoflavonoid Terhadap Kadar MDA Plasma Darah Pada Tikus Putih yang diberi Strssor

Suplemen antioksidan terbukti dapat mengurangi jumlah radikal bebas yang terbentuk selama stress oksidatif yang diakibatkan oleh aktifitas fisik yang berlebihan. Pada tikus yang kekurangan vitamin-E (antioksidan), stress fisik yang berlebihan terbukti mengakibatkan peningkatan jumlah radikal bebas 2 kali lebih besar, terutama pada sel-sel hepar dan otot lurik. Defisiensi vitamin E juga mengakibatkan menurunnya kemampuan latihan yang cukup bermakna ($p < 0.01$), dibandingkan dengan tikus yang mendapat diet vitamin E cukup (Davies *et al.*, 1992).

Dilaporkan bahwa suplementasi vitamin E dapat mengurangi kerusakan peroksidasi akibat *swimming stress* pada sel hepar tikus (Paul *et al.*, 1979). Pemberian probucol (antioksidan sintetik), terbukti secara signifikan ($p < 0.05$) dapat menurunkan kadar rata-rata MDA pada tikus yang diberi stress berenang (Maslachah, 2000).

Penelitian yang dilakukan pada manusia juga membuktikan bahwa suplementasi antioksidan terbukti dapat mengurangi peroksidasi lipid yang terjadi selama latihan fisik yang berlebihan. Sumida *et al.*, (1989) melaporkan bahwa, suplementasi vitamin E pada pembalap sepeda terbukti dapat menurunkan peningkatan MDA pada plasma darah.

Penelitian ini telah menguji bahwa, suplementasi antioksidan isoflavonoid dengan dosis 1.4 mg/ekor dan dosis 0.7 mg/ekor, terbukti dapat menurunkan kadar rata-rata MDA plasma darah pada tikus yang diberi stressor fisik.

Jawaban yang tepat tentang bagaimanakah isoflavonoid dapat menekan kadar MDA darah pada tikus putih yang diberi stress, memang tidak dapat diketahui secara pasti, namun hal itu dapat terjadi melalui beberapa mekanisme yang sudah diketahui antara lain, yaitu :

- (1) Seperti senyawa phenol yang lain (misalnya, α -tocoferol atau vitamin E), gugus hidroksil (-OH) yang dimiliki oleh isoflavonoid, memungkinkan senyawa ini secara langsung menangkap ROS seperti, radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$), ONOOH dan HOCL, sehingga mencegah terjadinya peroksidasi LDL atau dengan kata lain isoflavonoid bertindak sebagai antioksidan pencegah (*preventing antioxidant*). Radikal hidroksil merupakan radikal bebas yang memiliki reaktivitas paling tinggi terhadap biomolekul tubuh, dan merupakan senyawa radikal utama yang menyebabkan peroksidasi lipid PUFAs (Shahidi and Wanasundara, 1992).
- (2) Isoflavonoid mencegah terjadinya perambatan reaksi peroksidasi (*chain-breaking peroxy-radicals scavengers* atau *chain-breaking antioxidant*), dengan cara menangkap radikal peroksil ($\text{ROO}\cdot$), sehingga dapat menghentikan reaksi peroksidasi lebih lanjut (Evans, 1996). Secara *in vitro* diketahui bahwa isoflavonoid (terutama genestein) dapat berkojugasi kedalam molekul LDL, meskipun hanya dalam jumlah yang amat sedikit. Selanjutnya pada LDL yang telah berkonjugasi dengan isoflavonoid, diketahui mempunyai kemampuan untuk mencegah terjadinya peroksidasi yang diinduksi oleh copper, 20 menit lebih lama dari perlakuan bandingnya, atau berbeda sangat nyata dengan ($p < 0.020$). Diyakini bahwa banyaknya partikel-partikel LDL yang mengalami modifikasi pada individu yang mendapat suplementasi isoflavonoid, merupakan LDL-LDL yang tahan terhadap reaksi peroksidasi (Tikkanen *et al.*, 1998). Melalui kedua mekanisme ini, peroksidasi dapat dicegah atau dihentikan, sehingga produk metabolitnya (MDA) juga turun.
- (3) Isoflavonoid yang terdapat dalam hasil ekstrak kedelai, terbukti secara *in vitro* dapat menghambat *up-take* glukosa, dan mencegah peroksidasi lipid yang diinduksi oleh glukosa (Vedanam *et al.* 1999).

6.2. Alasan Penggunaan Ukuran IMT Arteri Carotis Communis Sebagai Sampel Penelitian

Atherosklerosis merupakan penyakit asimtomatik, yang biasanya baru diketahui setelah berada pada tahap lanjut. Namun kira-kira selama satu dekade terakhir, upaya deteksi dini terhadap adanya atherosklerosis menjadi lebih muda dilakukan, terutama sejak ditemukannya suatu metode pemeriksaan secara non invasive, yaitu menggunakan ultrasonografi resolusi tinggi atau sering disebut sebagai *quantative carotid B mode ultrasonography* (Lonn, 1999).

Dengan metode ini berbagai studi epidemiologi tentang penyakit kardiovaskular menjadi lebih mudah dilakukan. Salah satu hasil temuan itu adalah adanya korelasi antara penebalan dinding arteri (terutama a. carotis communis dan percabangannya) dengan kecenderungan terjadinya atheroskeloris.

Saat ini metode *quantative carotid B mode ultrasonography* ini telah secara meyakinkan dapat digunakan sebagai cara untuk memprediksi timbulnya atherosklerosis pada seseorang (Lonn, 1999; Raitakari *et al.*, 1998).

Berdasarkan pada sumber diatas, maka penelitian ini juga menggunakan arteri carotis communis, sebagai indikator yang diharapkan dapat digunakan untuk mengetahui potensi atheroprotektif dari isoflavonoid.

6.3. Stress Fisik dan Proses Penebalan Tunika Intima-Media Arteri Carotis

Pada penelitian ini diketahui bahwa stress fisik (*swimming stress*) terbukti secara bermakna ($p < 0.01$), menyebabkan penebalan pada dinding pembuluh darah, khususnya pada tunika intima-media a. carotis communis.

Mekanisme penebalan dinding arteri merupakan proses yang sangat rumit, yang sama kompleksnya dengan proses atherogenesis, karena pada prinsipnya penebalan dinding arteri merupakan salah satu perubahan struktur yang selalu terjadi dalam tahapan proses pembentukan lesi sklerotik (Raitakari *et al.*, 1998).

Kompleksitas dari proses penebalan dinding arteri tersebut, antara lain disebabkan oleh banyaknya sel yang terlibat seperti, sel endotel, sel miosit dan sel-sel darah, seperti sel makrofag, sel monosit dan platelet. Kompleksitas proses penebalan dinding arteri ini, juga diakibatkan oleh banyaknya faktor penyebab dan proses biologis yang terlibat (Constantinides, 1994).

Dalam penelitian ini, pembahasan tentang mekanisme tersebut, dipersempit dengan menjadikan LDL-Ox sebagai fokus utama penyebabnya, karena variabel ini telah jelas diketahui melalui pemeriksaan kadar MDA sebelumnya..

Stress fisik yang diberikan terbukti secara bermakna ($p < 0.01$) telah menyebabkan peningkatan rata-rata kadar MDA plasma darah dan penebalan ukuran IMT a. carotis communis pada tikus putih. Melalui uji korelasi Pearsons, terbukti dengan nilai $r = 0.711$; dan $0.50 \leq \rho \leq 0.84$ pada tingkat kepercayaan 95% ($p < 0.05$), bahwa terdapat hubungan antara peningkatan kadar MDA plasma darah dengan ukuran IMT a. carotis communis.

Fakta tersebut memungkinkan ditariknya suatu kesimpulan bahwa stress fisik mengakibatkan penebalan tunika intima media a. carotis communis melalui mekanisme yang melibatkan peran LDL-Ox.

LDL yang teroksidasi (LDL-Ox) serta produk-produk metabolitnya seperti, malodialdehide (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) dan F₂-isoprostenes, diketahui merupakan penyebab cedera endotel yang utama (Navab *et al.*, 1996; Halliwell dan Guetteridge, 1998). Dilaporkan bahwa, tikus putih jantan yang diberi stressor (*swimming stress*) terbukti sangat signifikan ($p < 0.05$) mengalami disfungsi dan kerusakan endotel, yang diukur berdasarkan jumlah circulating endotelnya (sel endotel yang terkelupas dan terbawah dalam darah sirkulasi (Maslachah, 2000).

Cedera endotel merupakan peristiwa pertama yang sangat penting dalam atherosklerosis, karena keadaan ini dapat memicu serangkaian proses selanjutnya seperti, berkurangnya produksi EDRF-NO, infiltrasi sel-sel radang, **proliferasi miosit**, dan pembentukan jaringan ikat serta sel-sel busa. Keseluruhan proses tersebut menyebabkan dinding arteri menjadi **menebal**, kaku, dan rapuh.

Pada atherosklerosis stadium awal, penebalan dinding arteri merupakan bentuk perubahan struktur, yang paling dini untuk dapat diamati. Penebalan ini terutama diakibatkan oleh proliferasi sel miosit dan jaringan ikat, yang terdapat pada lapisan (tunika) intima-media dinding arteri (Constantinides, 1994).

Mekanisme proliferasi miosit dinding vaskular dapat dibagi mejadi dua yaitu; (1) mekanisme yang melibatkan cedera endotel dan (2) mekanisme proliferasi melalui rangsangan mekanik pada permukaan pembuluh darah (Constantinides, 1994; Sperelakis, 1998).

Karena letaknya yang berdekatan dengan jantung, a. carotis communis menderita tekanan aliran darah yang relatif lebih besar. Semua jenis stress mekanik yang ditimbulkan oleh aliran darah (*shears stress, stretch stress dan turbulansi*) merupakan sumber penghasil radikal bebas (superoksida radikal) yang hebat pada skala mikro dipermukaan endotel. (Halliwell and Guetteridge, 1998).

Rangsangan mekanik aliran darah yang sangat kuat dan terjadi terus menerus dalam waktu yang lama, seperti pada stress fisik yang dilakukan dalam penelitian ini, dapat mengakibatkan (1) peroksidasi asam lemak membran endotel, yang terjadi akibat reaksi antara radikal superoksida dengan NO (radikal superoksida); (2) Rangsangan mekanik dapat mengakibatkan berbagai respon pada endotel. Akibat tekan aliran yang terlalu kuat, dalam hitungan detik atau menit, endotel melepaskan Ca^{2+} ; mengaktifasi phospholipase A dan C; pemecahan PIP_2 ; dan akhirnya menghasilkan NO dan prostasiklin. Bila rangsangan yang kuat tersebut terus berlangsung, maka dalam hitungan menit sampai beberapa jam, endotel akan memberikan respon dengan cara; (a) melepaskan endothelin (ET-1); (b) mengekspresikan berbagai faktor transkripsional (seperti, $NF-\kappa B$, *nuclear factor*) (c) diekspresikannya gen-gen regulasi (seperti, *c-myc, c-jun, c-fos*); (d) *platelet-derived growth factor* (PDGF-B) dan MCP-1, yang menyebabkan prolifearsi miosit; (e) *tissue factor* (TF), yang mengawali terjadinya proliferasi fibroblas; dan (f) endotel akan mengekspresikan berbagai molekul adhesi (ICAM, VCAM), interleukin dan selectin (Sperelakis, 1998).

Baik melalui mekanisme yang melibatkan cedera pada endotel atau tidak, pada akhirnya respon proliferasi juga sangat tergantung pada sel miosit.

6.4. Efek Pemberian Isoflavonoid Terhadap Ukuran IMT Arteri Carotis Communis Pada Tikus yang Diberi Stressor

Penelitian ini membuktikan bahwa, suplementasi isoflavonoid dapat mencegah terjadinya penebalan ukuran ketebalan tunika intima media a. carotia communis pada tikus yang diberi stressor. Pada tikus yang diberi isoflavonoid dengan dosis 0.7 mg/ekor (P3) perbedaan tersebut bermakna pada taraf kepercayaan 95% ($p < 0.05$), sedangkan pada kelompok perlakuan yang diberi dosis 1.4 mg/ekor perbedaan itu bermakna pada taraf kepercayaan 99% ($p < 0.01$).

Suplementasi isoflavonoid terbukti mampu memberikan perlindungan yang maksimal, sehingga stressor fisik yang diberikan, tidak mempengaruhi ukuran IMT. Pada tikus dalam kelompok P1 nampak bahwa pemberian isoflavonoid tidak memberikan perbedaan yang berarti baik terhadap ukuran IMT maupun terhadap kadar MDA plasma darahnya, bila dibandingkan dengan kontrol.

Bila diasumsikan bahwa, mekanisme penebalan yang terjadi pada tunika intima-media a.carotis communis benar terjadi melalui dua mekanisme seperti diuraikan diatas, maka proses pencegahan penebalan oleh isoflavonoid yang diberikan pada penelitian ini, sangat didukung oleh penelitian-penelitian sebelumnya.

Secara *in vitro* telah terbukti bahwa isoflavonoid dapat mencegah peroksidasi LDL, sehingga dapat mencegah terjadinya cedera endotel. Fungsi perlindungan isoflavonoid terhadap cedera endotel oleh LDL-Ox barangkali merupakan potensi *in vivo*-nya yang terpenting, yang pada akhirnya dapat mencegah terjadinya penebalan tunika intima a. carotis communis pada tikus.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Dari penelitian tentang efek pemberian antioksidan isoflavonoid terhadap kadar MDA darah dan ketebalan tunika intima-media a. carotis communis pada tikus putih jantan yang diberi stressor, dapat disimpulkan beberapa hal berikut ini:

1. Stress (*Swimming stress*) dapat menyebabkan peningkatan kadar MDA plasma dan ukuran ketebalan IMT a. carotis communis pada tikus putih jantan
2. Pemberian antioksidan isoflavonoid dengan dosis 0.7 mg/ekor dan 1.4 mg/ekor dapat menghambat peningkatan kadar MDA plasma darah tikus putih jantan yang diberi stressor.
3. Pemberian antioksidan isoflavonoid dengan dosis 0.7 mg/ekor dan 1.4 mg/ekor dapat menghambat peningkatan ukuran IMT a. carotis communis tikus putih jantan yang diberi stressor.
4. Antioksidan isoflavonoid merupakan senyawa atheroprotektif yang potensial secara *in vivo* pada tikus putih jantan.

7.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian antioksidan isoflavonoid terhadap peningkatan kadar radikal bebas.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian antioksidan isoflavonoid terhadap kadar LDL teroksidasi.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian antioksidan isoflavonoid terhadap status antioksidan
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek samping pemberian antioksidan isoflavonoid, khususnya terhadap sistem reproduksi hewan jantan, karena isoflavonoid juga mempunyai efek estrogenik lemah.
5. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis optimal pemberian isoflavonoid.
6. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian isoflavonoid terhadap perkembangan plak sklerotik.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Aharonovis O, Zik M, Livne AA, Granot Y, 1992. Vasopresion elevation of Na⁺ / H⁺ exchange is inhibited by genestein in human blood platelets. *J Biochim Biophys Acta*, 1112: 181-186.
2. Aminbakhsh A, and Mancini GBJ, 1999. Carotid intima-media thickness measurement: What defines an abnormalities? A systemic review. *J Clin Invest Med*, 22 (4):149-157.
3. Bancroft JD and Cook HC, 1998. *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application*. Logman Singapore Pub. Singapore. 35-38.
4. Barnes S, Sfakianos J, Coward L, Kirk M, 1996. Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. *J Exp Med and Biology*, 401: 87-100.
5. Barnet YA and King CM, 1997. An investigations of antioxidant status, DNA, repair capacity, mutation as a function of age in human. *J Mutat Res*, 338:115.
6. Becker WM, Reece JB, Poenei M, 1996. *The world of the cell*. 3rd edition. California: The Benjamin/Cummings Pub Com, pp 250-253; 751-773.
7. Bidoli A, 1988. Lipi peroxidation in mitochondria. *J Free Radical Biology Med*, 5: 247
8. Bokkenheuser VD, Shackleton CHL, Winter J, 1998. Hydrolysis of dietary isoflavonoid glycosides by strain of intestinal bacteriocides from human. *J Biochemistry*, 248:933-943.
9. Brand K, Mander M, Fusell R, 1997. Role of NF-kB in atherogenesis. *J Exp. Physiol.* 82, 297.
10. Busse R, Mulsch A, Fleming I, Hecker M, 1993. Mechanism of nitric oxide release from the vascular endothelium. *J Circulation* 87 (5):V, 18-25.
11. Campbell NA, 1998. *General Biology*. 4th ed. California: Academic press, pp 236.
12. Calara F, Dimayuga P, *et al.*, 1998. An animal model to study local oxidation of LDL and it's biological effects in atherial wall. *Atherosclerosis Trom. Vasc. Biol.* 18 (5): 884-93.
13. Constantinides P, 1994. *General Pathobiology*. Appelton & Lange. USA. 59-105.
14. Coveli V, 1992. What is Stress. How does It Correlate with the Immun System. In *Stress and The Immune System*, *J Sciences*, 309: 212-215.
15. Davies KJA, *et al*, 1982. Free radical and tissue damage produced by exercise.

Byochm. Byophysy. Res. Comm. 107, 1198.

16. Devaraj S, Farris MW, Del Zoopo GJ, 1997. The effects of α -tocopherol supplementation on monocyte functions. *J Clin Invest* 98: 756.
17. Ding Z, Biggs T, Seeds WA, Friedman MH, 1996. Influences of the Geometry of left main coronary artery bifurcation on the distribution of sudanophilia in the daughter vessels. *J Atheroscle Thromb and vasc Biol*, 17: 1356-1360.
18. Dudman NPB, Egan TM, Gower JD, 1995. Circulating lipid hydroperoxide levels in human hyperhomocysteinemia. *J Theroscler Thromb*, 13: 512.
19. Endres M, Laufs U, Mertz H, Kaps M, 1999. Focal Expression of intercellular adhesion molecule-1 in human carotid bifurcation. *J Stroke*, vol 28 no 1.
20. Estherbauer H, Greenly TL, Gutteridge JMC, 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, MDA and related aldehydes. *Free Rad. Biol Med.* 11, 81.
21. Filipeanu CM, Brailoiu E, Huruez G, 1995. Multiple of tyrosine kinase-inhibitors on vascular smooth muscle contraction. *E J of Pharmacology* 281: 29-35.
22. Flavahan NA, and Vanhoutten PM, 1995. Endothelium cell signaling and endothelial dysfunction. *A. J. H. Feb. 8. Part 2 (5).* 28s-41s.
23. Fotsis T, Pepper M, Adlercreuz H, 1999. A Dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *J Science* 44: 2690-2694.
24. Frenkel EN, Kondo K, Mander M, Fusell R, 1996. Principal phenolics phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human LDL. *J. Agric. Food Chem.* 43, 890.
25. Ganong WF, 1995. *Fisiologi Kedokteran*. Edisi 14. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran, hlm 452-561.
26. Halliwell B, Gutteridge JMC, 1998. *Free Radicals in Biology and Medecine*. 3rd Edition. Oxford University Press. New York.
27. Hellsten Y, 1997. Oxydation of uric acid in human skeletal muscle during exercise. *Free. Rad. Bio. Med.* 22, 169.
28. Hodgson JM, Puddey IB, Beilin LJ, Mori TA, Croft KD. 1998. Supplementation with isoflavonoid phytoestrogen does not alter serum lipid concentrations: a randomized controlled trial in humans. *J. Nutr.* 128, 728-732.
29. Honore EK, William JK, Antony MS, Clarkson TB, 1996. Effects of dietary soy isoflavonoid on coronary vasodilatation and neointimal formation after iliac balloon injury in atherosclerotic monkeys. *Third International Conference on phytoestrogen*, Abstract. . USA.

30. Howes JB, Waring M, Huang L, Howes LG, 1988. Acute and chronic pharmacokinetic of an extract of isoflavonoid from red clover. *J Clinical Pharmacology*, 236: 199-207.
31. Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, Nelson C, 1995. A urinary profile study of dietary phytoestrogen. *J Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 54: 167-180.
32. Joewono BS, 1999. Lipid lowering: identify and treating high risk of coronary artery disease patients. *Symphosium: Innovation in the Management of Hyperlipidemia: the Role of Novel Statin*, hlm 8-9.
33. Kanazawa T, Osanai T, Tsugumichi U, Xueze Y, 1995. Protective Effects of Soy Protein on the Peroxidizability of Lipoproteins in Cerebrovascular Diseases. *J. Nutr.* 125: 639S-646S.
34. Kelly G, Husband A, Waring M, 1997. Phenolic phytoestrogen; *Clinical Monograph*. Australia, Novogen Limited pp 3-11; 20.
35. Knight DC, Wall PL, Eden JA, 1999. A review of phytoestrogen and their effect in relations to menopausal symptoms. *Centre for Management of the Menopause*. Royal Hospital for Women. Sidney.
36. Koppenol WH, Butler J, 1990. Energetics of incoversion reactions of oxyradicals *J Free Rad Biol*, 11: 91-98
37. Krol W, Czuba ZP, Threadgill MD, Cunningham BDM, Pietz G, 1995. Inhibition of nitric oxide (NO) production on murine macrophage by flavones. *Biochemistry and Pharmacology* 50, 1031-1035 7.
38. Kuby J, 1992. *Immunology*. 1st edition, New York: WH Freeman and Company, pp 266; 465-466. 22.
39. Lesson CR, Lesson TS, Paparo AA, 1995. *Buku Ajar Histologi*. Cetakan V. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran, hlm 253-276.
40. Leuwenburg C, Nosawa W, 1997. RNS promote LDL oxydation in human atherosclerotic intima. *J. Bio. Chem.* 272, 1433.
41. Lou Y, Yozsisawa T, Katayama T, 1990. Comparative study on the natural occurrence of fusarium mycotoxin in corn and wheay from high-and-low risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied. Envir. Microbiol.* 56, 3723-3726. 9. 23.
42. Luscher F, and Tanner FC, 1993. Endothelial regulation of vascular tone and growth. *A J Biol*, 7:283s-293s
43. Martin, D. W. Jr., P. A. Meyes, and V. W. Rodwell. 1987. *Biokimia* Harper. Edisi 20, Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran, hlm 625- 628. 24.

44. Maslachah L, Soejarwo SA, Sugihartuti R, 1999. Efek perlindungan disfungsi sel endotel pembuluh darah oleh antioksidan probucol pada tikus putih yang menerima stressor. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga hlm 21-25.
- 43 Mia RQ, Murakami H, Song Q, Chao L, Chao J, 2000. Kallistatin stimulates vascular smooth muscle proliferation and migration *in vitro* and neointima formation in balloon-injured rat artery.
44. Miksicek RK, 1995. Estrogenics Flavonoid: structure requirements for biological activity. Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine 208, 44-50.
45. Nakashima S, Koike T, Nosawa W, 1991. Genestein, a protein tyrosin kinase inhibitors, inhibits tromboxane A-2-mediated human platelets respons. J Molecular Pharmacology 39: 475-480.
46. Napoli C, Monnier VM, Patch ER, 1997. Fatty streaks formations occur in human foetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercolesterolimia. J Clin Invest, 100: 2680.
47. Okamura K, Newsome DA, Peeker R, 1997. Effect of endurance exercise on tissue 8-OhdG in dogs. Free. Rad. Res. 26, 523. 30.
48. Okuda M, Nobutaka I, Hiroshi A, Tadashi S, Yoshihiko S, Ken-ichi H, Seinosuke K; Yoshitake H, Hiroshi I, Junji Y, Mitsuhiro Y, 2001. Expression of glutaredoxin in human coronary arteries: Its potential role in antioxidant protection against atherosclerosis. J Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 21:1483
49. Ozaki Y, Yatomi Y, Jinani Y, Kume S, 1993. Effect of genestein attenuates thrombin-induce Ca²⁺ mobilization on human platelets by affecting polyphosphoinosite turnover. Biochemistry Pharmacology 46, 395-403.
50. Papas AM, 1999. Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. CRC Press LCL. New York.
51. Pattelogi I, 1998. Pengaruh Intensitas Latihan Fisik terhadap Kerusakan Jaringan. Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
52. Parthasarathy S, *et al.*, 1992. The role of oxidized LDL in pathogenesis inatherosclerosis. Ann. Rev. Med. 43, 219.
53. Paul S, Brandy, Linda J, Duane E, Ullrey 1979. Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat. J Nutr. 109:1103-1109
54. Paul JN, Sylvia P, Silly K, Paul K, Julie B, James D, 1999. Isoflavonoid from clover improve sistemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal women. Novogen Limited. Australia. 8-12

55. Pratanu S, 1999. Relevansi stabilisasi plaque pada atherosklerosis. Symposium Innovation in the Management of Hyperlipedemia: the Role of Novel Statin. GRAHA BIK-IPTEKDOK Surabaya. 33-35
56. Pratico S, Gilbert D, Wiltrow W, 1997. Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerosis lesions. *J. Clin. Invest.* 100, 2028.
57. Radak Z, Pucsek J, Bors S, Josphai L, 2000. Changes in urine GSH levels of super-marathon runners during four day race period *Life Sci* 66(18): 1763-7.
58. Raitakari OT, Adams MR, Celermajer DS, 1999. Effect of Lp (a) on early functional and structural changes of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 19: 990-995.
59. Riley, 1981. Psyconeuroendocrinology on Immuno Compehence and Neoplasm. *Science* 212: 1100-1109.
60. Record IR, Dreosti IE, Mcierny JK. 1995. The antioxidant activity of genestin *in vivo*. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 6, 481-485. 36.
61. Robbins SL, Kumae V, 1996. Patologi I. Edisi 4. Jakarta: EGC Penerbit buku Kedokteran, hlm 66-82.
62. Rota S, Anthony MS, Clarson TB, Hughes CL, Morgan TM, 1998. Atherogenic lipoprotein support assembly of protrombinase complex and thrombin generation: modulation by oxidation and vitamin E. *J Blood* 91: 508.
63. Sies H, 1991. oxydatif Stress II. Oxydant and Antioxidants. Academic Press, London.
64. Semler DE, Gad SC, Chengelis CP, 1992. Animal Model in Toxicology : The Rat, Toxicology, Pathology, Metabolism. Series edition. Ohio: Marcel Dekker Inc., pp 80-82.
65. Sen CK, 1995. Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl.* 79, 675.
66. Sergeant P, Farandle RW, Sage SO, 1993. The tyrosine-inhibitors methyl 2, 5-dihydrocinnamate and genestein reduce thrombin-evoked tyrosine phosphorylation Ca^{2+} entry into human platelets. *FEBS Letters* 315, 242-246.
67. Shahidi F, and Wanansundara PKJPD, 1993. Phenolic antioxidants. *J Crit. Rev. Food Sci. Nutr* 32: 67-77.
68. Shimokado K, Yokota T, Umezawa K, Sasaguri T, Ogata J, 1995. Protein tyrosine kinase inhibitors inhibit chemotaxis of vascular smooth muscle cell. *J Atherosclerosis and Thrombosis* 14: 973-981.
69. Smith A, and Bruton J, 1978. A color atlas of histological staining techniques. 2nd

- edition. London: Wolfe Medical Publication, pp 176-181.
70. Sperelakis N, 1998. Cell physiology. 2nd edition. London: Academic press, pp 236-453; 791-805.
 71. Stell, RGD and Torrie JH, 1981. Principle and Procedures Statistics. 2nd edition. Japan : Print Mc Grow Hill Kegokhusa Ltd, hlm 77-80.
 72. Suryohudoyo P, 1997. Toksisitas ozon. Folia Medica Indonesiana. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Hal 22-23.
 73. Thomas C, 1998. Histopatologi. Edisi 10. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran, hlm 57-88.
 74. Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma P, Adlecruz H, 1998. Isoflavonoid phytoestrogen contained in human LDL after soy feeding protect from Cu²⁺ -induced oxidation of LDL in vitro. Proceeding National Academy Science USA (6), 3106-3110.
 75. Tjokroprawiro A, 1999. Syndrome-32 Focus: Pandangan Baru dalam Terapi Kolesterol). Symposium: Innovation in the Management of hyperlipedemia Hyperlipedemia: the Role of Novel Statin. Surabaya: IPTEKDOK, hml 1-23.
 76. Unger T, 1999. Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. J. Clin Invest. 100:2028-34.
 77. Vedanam K, Sriyayanta S, O'relly J, Raman A, Wiseman H, 1999. Antioxidant action and potensial antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soybean phytochemical extract (SPE). J. Phytother Res, 13(7):601.
 78. Veid C, Soto U, Heidemarie IKB, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J, 2000. Defferensial Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase in smooth muscle cells by Angiotensin II. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* (20): 940-948
 79. Vargas R, Wrobleska B, Rego A, Hatch J, Ramwell PW, 1998. Oestradiol inhibit smooth muscle proliferation of pig coronary artery. J. of Pharmacology 109: 612-617.
 80. Wilcox JN and Blumenthal JF. 1999. Thrombotic mechanisms in athresclerosis: Potential impact of soy proteins. J. Nutr. 125 (3 suppl): 631-638.
 81. Wijaya A, 1996. Radikal bebas dan parameter status antioksidan. Forum Diagnosticum. No1
 82. Wilcox BJ, Fuchigami K, Wilcox DC, 1995. Isoflavonoid intake in Japanese and Japanese-Canadias. J Clin Nutr, 61: 901-902.
 83. Witt EH, Reznick AZ, Vigue CA, 1992. Exercise oxydative damage nad effects of antioxydant maipulation. J. Nutr. 122, 766.

84. Xiong ZG, Burnnete E, Cheung DW, 1995. Modulation of ion calsium activeted kalium ions channel activity by tyrosine kinase inhibitors in vascular smooth muscle cell. *European Journal of Pharmacology Molecular Pharmacology* 290, 117-123
85. Zainuddin M, 1988. *Metodologi Peneltian* hal. 73-74.
85. Ziats NP and Robertson AL, 1990. Effects of periperal monocytes on human vascular cell proliferation *J. atherosclerosis*, 62:401-410

LAMPIRAN 1.**PERHINTUNGAN JUMLAH SAMPEL**

Jumlah sampel dalam penelitian ini ditentukan menurut rumus penentuan jumlah sampel minimal dari Higgins dan Kleibaum (1985), yaitu sebagai berikut ;

$$n = 1 / 1-f \times \frac{2 (Za + Zb)^2 \cdot Sc^2}{(\bar{X}_c - \bar{X}_t)^2}$$

- \bar{n} = besar sampel
 \bar{X}_c = rata-rata kelompok kontrol
 \bar{X}_t = rata-rata kelompok perlakuan
 Sc = simpangan baku kelompok kontrol
 f = proporsi kegagalan
 Za = harga α 0.05 = 1.96
 Zb = harga β 0.05 = 1.28

Dari penelitian serupa tentang pengaruh stimulus kallistatin terhadap proliferasi otot polos vaskuler tunika media pada a. femoralis pada tikus diperoleh data sebagai berikut; nilai rata-rata kelompok kontrol adalah 46.667 μ m, nilai simpangan baku kelompok kontrol (Sc) 2.500 μ m, nilai rata-rata kelompok perlakuan 66.667 μ m (Miao *et al.*, 2000). Dengan memasukkan nilai-nilai tersebut kedalam rumus, dan menetapkan proporsi kegagalan(f) sebesar 0.3, maka diperoleh nilai n minimal adalah 3.899.

Pada penelitian ini banyaknya ulangan (jumlah sampel) untuk setiap perlakuan adalah 8 ekor, atau seluruh jumlah sampel dalam 5 kelompok perlakuan adalah 40 ekor. Dengan demikian besarnya sampel yang digunakan dalam penelitian ini telah memenuhi syarat minimal jumlah sampel yaitu 4 ekor dalam

LAMPIRAN 2

PERHITUNGAN DOSIS ISOFLAVONOID

Pada manusia isoflavonoid (nama dagang *Red Clover*) diberikan dengan dosis tunggal yaitu 40 mg/orang /hari. Dosis ini disesuaikan dengan jumlah isoflavonoid yang dikonsumsi sehari-hari dari berbagai makanan tradisional seperti, tahu, tempe dan susu kedelai, yang besarnya antara 30-100 mg/hari (Kelly *et al.*, 1998).

Dosis untuk tikus berat 200 gram, didapatkan melalui konversi perhitungan dosis isoflavonoid yang diberikan pada manusia berdasarkan tabel konversi dosis obat dari Laurence dan Bacharach (Donatus and Nurlaila, 1986). Adapun tabel konversi dosis obat tersebut adalah sebagai berikut :

Tabel konversi perhitungan dosis untuk berbagai jenis hewan dan manusia

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmot 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	0,22	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

(Sumber: Farmakometriks, Donatus dan Nurlaila, 1986)

Jika diketahui :

1. Dosis isoflavonoid per oral pada manusia adalah 40 mg .
2. Faktor konversi manusia-tikus adalah 0,018

Maka : Dosis isoflavonoid untuk tikus dengan berat 200 gram adalah $0.018 \times 40 = 0.72$ mg/ekor. Jika berat badan rata-rata tikus adalah 200 gram, maka dosis isoflavonoid per ekor tikus adalah $200/200 \times 0.72 = 0.72$ mg/ekor. Pada penelitian ini besarnya dosis yang digunakan dibulatkan menjadi 0.7 mg/ekor dan 1.4 mg/ekor, masing-masing untuk P1 dan P3 serta P4. Setiap tabel (40

mg isoflavonoid) dilarutkan dalam 40 cc pelarut (CMC 2%), maka jumlah volume yang diberikan adalah 0.7 cc/ekor (P1 dan (P3) dan 1.4 cc/ekor (P4).

Tabel 2. Volume maksimum larutan obat yang diberikan pada hewan

Hewan	i.v	Volume i.m	Maksimum i.p	Sesuai s.c	Jalur pemberian ml p.o
Mencit (20-30 gram)	0,5	0,05	0,1	0,5-1,0	1,0
Tikus (100 gram)	1,0	0.1	2,0-5,0	2,0-5,0	5.0
Hamster (50 gram)	-	0,1	1,0-2,0	2,5	2,5
Marmot (250 gram)	-	0,25	2,0-5,0	5,0	10,0
Merpati (300 gram)	2,0	0,5	2,0	2,0	10,0
Kelinci (2500 gram)	5,0-10,0	0,5	10,0-20,0	5,0-10,0	20,0
Kucing (3000 gram)	5,0-10,0	1,0	10,0-20,0	5,0-10,0	50,0
Anjing (5000 gram)	10,0-20,0	5,0	20,0-50,0	10,0	100,0

LAMPIRAN 3**PEMBUATAN SEDIAAN HISTOLOGIS DENGAN TEKNIK PEWARNAAN VERHOEFF'S (VvG)**

Jaringan (a. carotis communis) yang telah didapatkan melalui diseksi kemudian diperlakukan menurut tahapan sebagai berikut ;

1. Fiksasi : - dengan larutan Buffer Formalin
2. Dehidrasi :
 - dengan larutan alkohol 80% selama 2 jam
 - dengan larutan alkohol 90% selama 2 jam
 - dengan larutan alkohol 95% selama 2 jam
 - dengan larutan alkohol absolut I selama 1 jam
 - dengan larutan alkohol absolut II selama 1 jam
3. Clearing : - dengan larutan Xylol I selama 2 jam
 - dengan larutan Xylol II selama 2 jam
4. Infiltrasi : - dengan parafin cair I selama 3 jam
 - dengan parafin cair selama 3 jam
5. Embeddin : - dicetak dalam bentuk blok dan kemudian didinginkan selama 24 jam
6. Sectioning : - dilakukan penyayatan/pemotongan dengan mikrotom dengan tebal sayatan antara 5-7 mikron

Tahap Pewarnaan dengan VvG :

1. Deparfifinisasi : - teteskan larutan Xylol I selama 2 menit
 - : - teteskan larutan Xylol II selama 2 menit
 - teteskan larutan Alkohol absolut I selama 1 menit
 - teteskan larutan Alkohol absolut II selama 1 menit
 - teteskan larutan Alkohol 95% I selama 1 menit
 - teteskan larutan Alkohol 95% II selama 1 menit
 - teteskan aquadestilata selama 10 menit
2. Staining : - larutan Verhoeff s selama 15 menit
 - cuci dengan air mengalir (air kran)

- larutan deferensiasi (larutan pembeda) ferric chloride 2 % sampai inti sel dan jaringan ikat elastis nampak berwarna hitam
- cuci dengan air, kemudian dengan alkohol selama kurang lebih 5 menit untuk menghilangkan kelebihan warna (*over stain*) iodine pada *background*.
- cuci lagi dengan air
- memberikan warna kontras (*counterstain*) pada *background* dengan larutan von Gieson atau neutral red selama 5 menit.

3. Dehidrasi : - alkohol 95% selama beberapa celupan

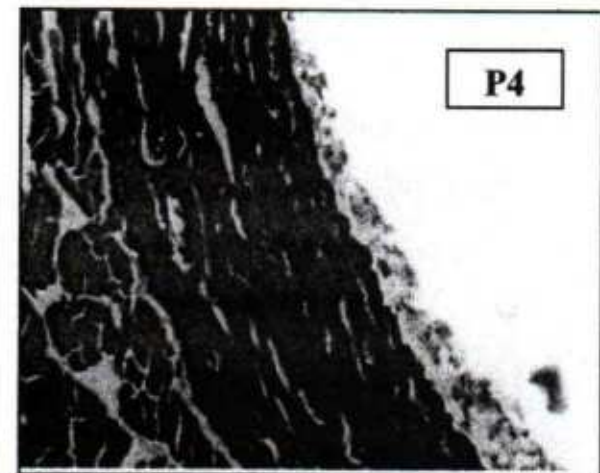
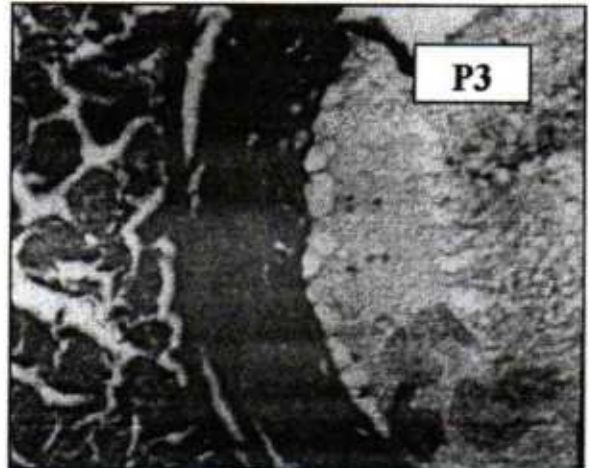
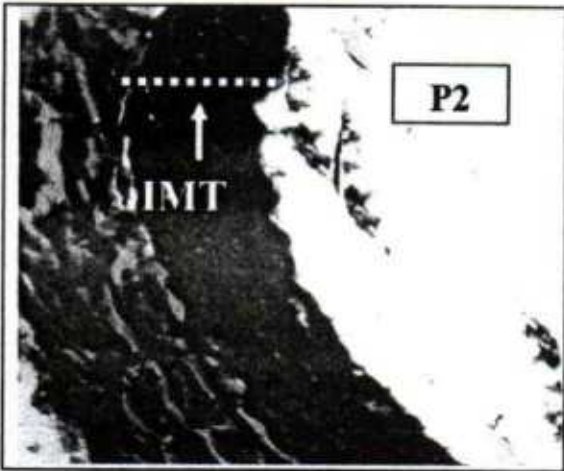
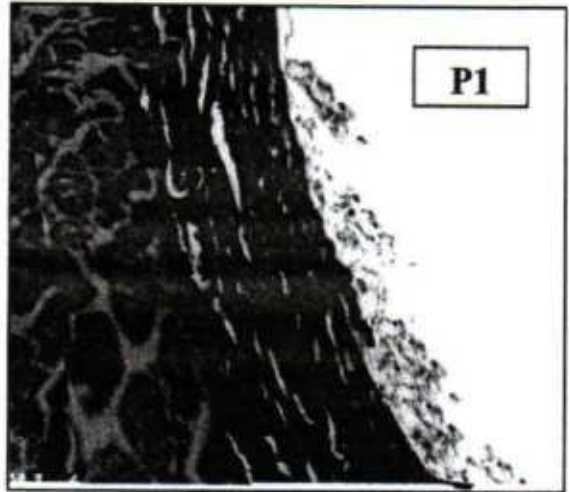
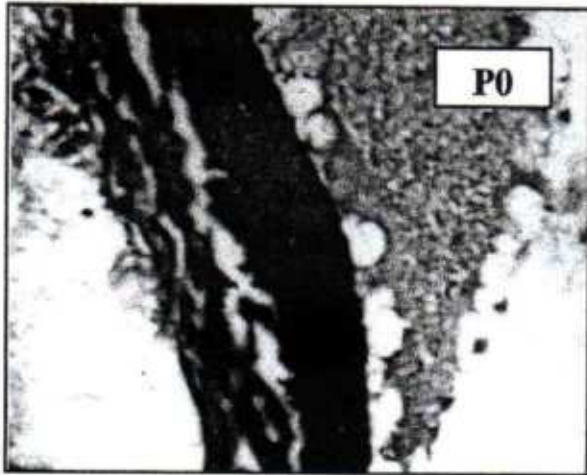
- alkohol 95% selama beberapa celupan
- alkohol absolut I selama 2 menit
- alkohol absolut II selama 2 menit

4. Clearing : - Larutan Xylol I selama 2 menit

- Larutan Xylol II selama 2 menit
- Larutan Xylol III selama 2 menit

5. Mounting : - dengan satu tetes balsam Canada lalu ditutup dengan gelas penutup (*cover glass*), dan dibiarkan kering dalam suhu kamar.

LAMPIRAN 4. Gambar a. carotis communis Tikus Setelah Perlakuan



Keterangan : Gambar histologis dinding a. carotis communis tikus putih jantan setelah perlakuan. Pada kelompok perlakuan (P2), yaitu kelompok yang hanya diberi stressor, nampak ukuran tunika intima-mediaanya (IMT) paling tebal. (Pembesaran 200x; Pewarnaan VvG).

LAMPIRAN 5.

**DATA HASIL PENELITIAN
HASIL UJI STATISTIK ANOVA SATU ARAH
HASIL UJI KORELASI PEARSON'S**

1. Data Hasil Penelitian

Efek pemberian isoflavonoid terhadap kadar MDA darah (nMol/ml)

No Ulangan	Perlakuan				
	P0	P1	P2	P3	P4
1	0.12	.15	.88	.48	.46
2	0.05	.13	.76	.39	.24
3	0.15	.14	.98	.28	.56
4	0.12	.03	.59	.86	.28
5	0.12	.12	.53	.52	.12
6	0.16	.12	.64	.41	.36
7	0.16	.13	.53	.63	.39
8	0.05	.12	.62	.35	.22
Rata-rata ± SD	0.1173 ± 0.04	0.1165 ± 0.04	0.6913 ± 0.16	0.4900 ± 0.18	0.3289 ± 0.14

Hasil pengukuran IMT a. carotis communis (µm)

No Ulangan	Perlakuan				
	P0	P1	P2	P3	P4
1	24	33	54	45	30
2	24	27	35	33	30
3	27	30	36	33	36
4	30	30	51	46	36
5	27	33	42	36	33
6	33	26	36	32	30
7	33	33	54	42	30
8	30	30	45	30	33
Rata-rata ± SD	28.5 ± 3.5	30.2 ± 2.7	44.1 ± 8.1	36.6 ± 5.6	32.2 ± 2.6

2. Hasil uji anova satu arah untuk variabel MDA

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
MDA	4.783	4	35	.003

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MDA	Between Groups	1.962	4	.490	28.811	.000
	Within Groups	.596	35	1.702E-02		
	Total	2.557	39			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MDA
LSD

(I) PERLAKUA	(J) PERLAKUA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P0	P1	-1.25E-03	.065	.985	-.1337	.1312
	P2	-.5750*	.065	.000	-.7074	-.4426
	P3	-.3737*	.065	.000	-.5062	-.2413
	P4	-.2125*	.065	.003	-.3449	-8.01E-02
P1	P0	1.250E-03	.065	.985	-.1312	.1337
	P2	-.5738*	.065	.000	-.7062	-.4413
	P3	-.3725*	.065	.000	-.5049	-.2401
	P4	-.2113*	.065	.003	-.3437	-7.88E-02
P2	P0	.5750*	.065	.000	.4426	.7074
	P1	.5738*	.065	.000	.4413	.7062
	P3	.2013*	.065	.004	6.882E-02	.3337
	P4	.3625*	.065	.000	.2301	.4949
P3	P0	.3737*	.065	.000	.2413	.5062
	P1	.3725*	.065	.000	.2401	.5049
	P2	-.2013*	.065	.004	-.3337	-6.88E-02
	P4	.1612*	.065	.018	2.882E-02	.2937
P4	P0	.2125*	.065	.003	8.007E-02	.3449
	P1	.2113*	.065	.003	7.882E-02	.3437
	P2	-.3625*	.065	.000	-.4949	-.2301
	P3	-.1612*	.065	.018	-.2937	-2.88E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

3. Hasil uji anova satu arah untuk variabel IMT

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
IMT	6.940	4	35	.025

ANOVA

IMT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1269.150	4	317.287	11.931	.000
Within Groups	930.750	35	26.593		
Total	2199.900	39			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IMT

LSD

(I) PERLAKUA	(J) PERLAKUA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P0	P1	-1.75E-02	.026	.502	-6.98E-02	3.484E-02
	P2	-.1563*	.026	.000	-.2086	-.1039
	P3	-8.62E-02*	.026	.002	-.1386	-3.39E-02
	P4	-3.75E-02	.026	.155	-8.98E-02	1.484E-02
P1	P0	1.750E-02	.026	.502	-3.48E-02	6.984E-02
	P2	-.1388*	.026	.000	-.1911	-8.64E-02
	P3	-6.87E-02*	.026	.012	-.1211	-1.64E-02
	P4	-2.00E-02	.026	.443	-7.23E-02	3.234E-02
P2	P0	.1563*	.026	.000	.1039	.2086
	P1	.1388*	.026	.000	8.641E-02	.1911
	P3	7.000E-02*	.026	.010	1.766E-02	.1223
	P4	.1188*	.026	.000	6.641E-02	.1711
P3	P0	8.625E-02*	.026	.002	3.391E-02	.1386
	P1	6.875E-02*	.026	.012	1.641E-02	.1211
	P2	-7.00E-02*	.026	.010	-.1223	-1.77E-02
	P4	4.875E-02	.026	.067	-3.59E-03	.1011
P4	P0	3.750E-02	.026	.155	-1.48E-02	8.984E-02
	P1	2.000E-02	.026	.443	-3.23E-02	7.234E-02
	P2	-.1188*	.026	.000	-.1711	-6.64E-02
	P3	-4.87E-02	.026	.067	-.1011	3.595E-03

*. The mean difference is significant at the .05 level.

4. Hasil uji koefisien korelasi Pearson dua arah antara IMT dan MDA

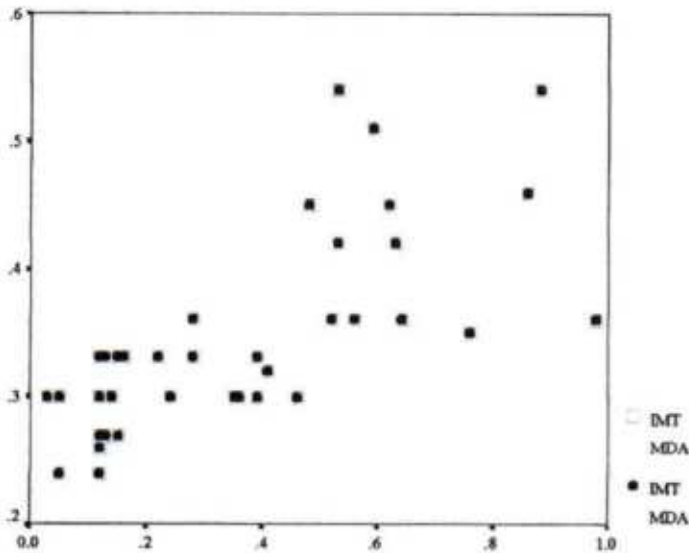
Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
IMT	.3445	7.511E-02	40
MDA	.3488	.2561	40

Correlations

		IMT	MDA
Pearson Correlation	IMT	1.000	.711**
	MDA	.711**	1.000
Sig. (2-tailed)	IMT	.	.000
	MDA	.000	.
Sum of Squares and Cross-products	IMT	.220	.533
	MDA	.533	2.557
Covariance	IMT	5.641E-03	1.367E-02
	MDA	1.367E-02	6.557E-02
N	IMT	40	40
	MDA	40	40

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Grafik Overlay scatter plot antara IMT dan MDA

5. Menaksir Nilai ρ dari koefisien korelasi tingkat sampel

Dari uji korelasi diatas diketahui nilai koefisien korelasi (r) adalah 0.711. Selanjutnya dilakukan penaksiran nilai ρ dengan tahap-tahap sebagai berikut

1. Mentransformasi r ke Z (dengan tabel nilai transformasi r -ke- Z), dan didapatkan nilai Z adalah **0.887**

2. Menghitung galat baku Z (S_z) dengan rumus sebagai berikut;

$$S_z = 1/\sqrt{n-3} = 1/\sqrt{37} = \mathbf{0.164}$$

3. Menaksir nilai ρ dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0.05$) dengan rumus;

$$Z \pm 1/\sqrt{n-3} \times (t_{0.05}).$$

Nilai t untuk uji dua-arah dengan derajat kebebasan 37 adalah **2.042**

4. Dengan demikian ρ terletak diantara harga $Z \pm (0.164)(2.042)$ atau sama dengan 0.552 dan 1.221. Kedua nilai Z tersebut kemudian ditransformasikan kembali kedalam nilai r , dan hasilnya diketahui bahwa $0.50 \leq \rho \leq 0.84$.

5. Jadi dengan taraf kepercayaan 95% koefisien korelasi antara peningkatan kadar MDA darah dengan peningkatan ukuran IMT pada populasi tikus jantan adalah terletak diantara selang 0.50 dengan 0.84.

LAMPIRAN 6.

JADUAL KEGIATAN PENELITIAN
DARI BULAN FEBRUARI 2002 – JULI 2002

Kegiatan	Bulan					
	2	3	4	5	6	7
Pendewasaan Tikus						
Pelaksanaan Peneltian						
Pengambilan Data						
Penyusunan Laporan						

Keterangan : 2 = bulan Februari
 7 = bulan Juli

LAMPIRAN 7.

BIAYA PENELITIAN

Jenis Alat dan Bahan	Jumlah Satuan	Harga Satuan (Rp)	Jumlah (Rp)
1. Kandang Tikus	10	50.000	500.000
2. Tempat pakan dan minum	5 set	4000	20.000
3. Obyek gelas	1 box	---	55.000
4. Sduit disposable 3 cc	50 buah	3000	150000
5. Tabung reaksi	50 buah	2500	125.000
6. Tikus putih	50 ekor	15.000	750.000
7. Pakan tikus (BR-1)	1 sak (50 kg)	100.000	100.000
8. Promensil-tablet (isi 30 buah)	2 pak	650.000	1.300.000
9. Na sitrat	100 gram	--	30.000
10. Alkohol 70%, kapas, betadin, Nacl fisiologis			50.000
11. Tes sampel darah untuk MDA dan pembuatan preparat histologi	40 sampel	60.0000	2.220.000
13. Honorarium			750.000
Jumlah total			Rp. 6.300.000