



**LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2004**

POTENSI PROBUCOL SEBAGAI ANTIATEROGENIK PADA TIKUS PUTIH YANG MENERIMA STRESSOR

Peneliti:

Drh. Lilik Maslachah, M.Kes.
Drh. Rahmi Sugihartati, M.Kes.
Drh. M. Sukmanadi, M.Kes.
Drh. Thomas V. Widiyanto

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi
DIP Nomor : 004/XXIII/1--/2004 Tanggal 3 Januari 2004
Kontrak Nomor : 108/P2IPT/DPPM/DM, SKW/III/2004
Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 30.

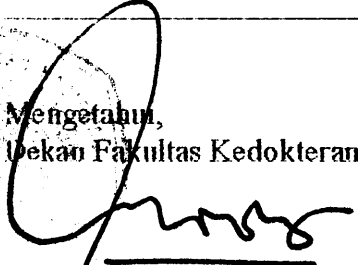
**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2004

IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

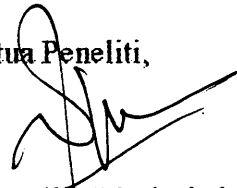
1. a. Judul Penelitian : Potensi Probuocol Sebagai Antiaterogenik Pada Tikus Putih Yang Menerima Stressor
b. Bidang Ilmu : Kesehatan
c. Kategori Penelitian : Kesehatan
2. Ketua Peneliti
a. Nama Lengkap & Gelar : Lilik Maslachah, M. Kes., drh.
b. Jenis Kelamin : Wanita
c. Golongan Pangkat & Nip. : III/c Nip. 132 061 818
d. Jabatan Fungsional : Lektor
e. Jabatan Struktural :
f. Fakultas/Jurusan : Fakultas Kedokteran Hewan Unair
g. Pusat Penelitian : Unair
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 Orang
a. Nama Anggota Peneliti : Rahmi Sugihartuti, M. Kes., drh.
M. Sukmanadi, M. Kes., drh.
5. Kerjasama dengan instansi lain :
a. Nama Instansi : -
b. Alamat : -
6. Lama Penelitian : 3 Bulan
7. Biaya Yang Diperlukan :
a. Sumber Dari Depdikbud : Rp. 6.000.000,-
b. Sumber lain : -
Jumlah : Rp. 6.000.000,- (Enam Juta Rupiah)
-

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan



Prof. Dr. Ismudiono, M.S. Drh.
NIP. 130-687 297

Surabaya, 15 September 2004

Ketua Peneliti,


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

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian


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

RINGKASAN PENELITIAN

Judul Penelitian	: Potensi Probucol Sebagai Antiaterogenik Pada Tikus Putih Yang Menerima Stressor
Ketua Peneliti	: Drh. Lilik Maslachah, M. Kes.
Anggota Peneliti	: Rahmi Sugihartuti, M. Kes., drh. M. Sukmanadi, M. Kes., drh.
Tahun Penulisan dan Jumlah Halaman	: 2003 / Halaman
Fakultas/Jurusan	: Fakultas Kedokteran Hewan Unair
Universitas	: Unair
Sumber Biaya	: Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi
DIP Nomor	: 004/XXIII/I/2004 Tanggal 3 Januari 2004
Kontrak No.	: 108/P4T/DM/III/2004 Dirjen Dikti. Depdiknas

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk membuktikan bahwa Probucol mempunyai kemampuan mencegah terjadinya aterosklerosis (sebagai anti aterogenik) pada tikus putih yang menerima stressor. Tujuan khusus untuk membuktikan bahwa Probucol dapat mencegah penebalan tunika media, pelebaran diameter pembuluh darah aorta dan penyempitan lumen pembuluh darah aorta, sebagai salah satu proses aterosgenesis yang disebabkan stressor. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan memakai Rancangan Acak Lengkap. Pada penelitian ini digunakan binatang percobaan tikus albino wistar jantan dengan berat badan sekitar 200 gram, sehat dengan umur sekitar 3 bulan sebanyak 30 ekor.

Prosedur Penelitian : Tahap persiapan seluruh hewan percobaan yang berumur 3 bulan dikondisikan dengan lingkungan, pakan, selama 7 hari, sambil diamati kondisi kesehatannya. Pemberian stressor pada tikus dilakukan dengan memberikan beban kerja aktivitas fisik renang "Behavioral Despair" (Willner P, 1990). Satu hari sebelum direnangkan tikus ditimbang berat badannya untuk menentukan beban pada ekor, dengan beban 2% dari berat badan tikus. Dilakukan setiap hari selama 3 minggu tiap pukul 07.00 WIB.

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

Kelompok Kontrol :

Kelompok P01 : 7 ekor tikus hanya diberi pelarut Probucol peroral selama 3 minggu.

Kelompok P02 : 7 ekor tikus diberi pelarut Probucol dan perlakuan stress selama 3 minggu.

Kelompok Perlakuan :

Kelompok P1 : 7 ekor tikus diberi Probucol dosis 1 (5 mg/ekor) dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu.

Kelompok P2 : 7 ekor tikus diberi Probucol dosis 2 (10 mg/ekor) dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu.

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

Pada hari terakhir setelah mendapat perlakuan seluruh hewan percobaan dari semua kelompok dianestesi dengan eter dan dimatikan aortanya diambil sepanjang 5 mm yang dipotong dari "*proksimal desending aorta*" sampai 2 cm arcus aorta. Kemudian cuci dengan NaCl fisiologis dan kemudian diangkat dan direndam dalam larutan formalin 10% dan dipersiapkan untuk pembuatan preparat histopatologis dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE).

Pemeriksaan histopatologi dilakukan dengan memakai metode standard. Segera setelah binatang dibunuh, pembuluh darah diangkat dan selanjutnya difiksasi dengan proses dehidrasi secara otomatis dalam larutan alkohol 70% dan 96% serta larutan xylol secara bertingkat. Selanjutnya direndam dalam parafin cair selama 4,5 jam. Pemblokkan dilakukan sehari setelah dehidrasi dan dilanjutkan dengan pembuatan preparat histopatologis dengan pengecatan dengan HE.

Pemeriksaan histopatologi aorta dilakukan dengan mengukur ketebalan tunika media dilakukan dengan menggunakan mikroskop Leits Monokuler yang dilengkapi dengan micrometer dan dikerjakan pada pembesaran 400 X. Ketebalan tunika media yang diukur adalah jarak yang dibuat oleh lapisan sabut elastis tunika media yang terdalam dan lapisan sabut elastis tunika media yang terluar. Pada setiap bagian, ketebalan tunika media yang diukur adalah tunika media yang terkecil. Hal ini bertujuan untuk memperkecil kesalahan pengukuran yang terjadi akibat pemotongan mikrotom yang terjadi akibat pemotongan mikrotom yang tidak tegak lurus pada sumbu potong.

Pengukuran diameter pembuluh darah aorta diukur dari sumbu lebar dari titik kanan dan kiri luar pembuluh darah dan diameter lumen pembuluh darah diukur dari sumbu lebar dari titik kanan dan kiri dalam pembuluh darah. Analisis data yang diperoleh dari hasil pengukuran ketebalan tunika media, diameter pembuluh darah dan diameter lumen pembuluh darah dianalisis dengan menggunakan analisis varian dan bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji LSD.

Berdasarkan data hasil dari pengukuran ketebalan tunika media yang diperoleh, kemudian dianalisis dengan menggunakan Analisis Varian didapatkan F hitung lebih besar dari F tabel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara beberapa perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji LSD dengan taraf signifikansi 5% didapatkan kesimpulan bahwa Perlakuan II (Po2, stressor) memiliki ketebalan tunika media terbesar yang berbeda nyata dengan semua kelompok perlakuan (Po1, P1, P2, P3) $p < 0,05$. Kelompok PI (Po1, Kontrol) tidak berbeda nyata dengan perlakuan (P1 dan P2) $p > 0,05$ sedangkan Kelompok III (P3) memiliki ketebalan tunika media yang terkecil yang berbeda nyata dengan semua kelompok perlakuan (Po1, Po2, P1 dan P2) $p < 0,05$. Data hasil pengukuran diameter pembuluh darah dan lumen pembuluh darah yang diperoleh, kemudian dianalisis dengan menggunakan Analisis Varian dengan signifikansi 5% didapatkan F hitung lebih kecil dari F tabel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan (Po1, Po2, P1, P2, P3) $p > 0,05$, tetapi ada kecenderungan terjadi pelebaran diameter pembuluh darah aorta dan penyempitan lumen pembuluh darah aorta pada tikus yang menerima stressor (Po2) jika dibandingkan dengan kelompok (Po1, P1, P2, P3).

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian antioksidan Probucol dapat melindungi dan mencegah terjadinya proses aterogenesis penebalan tunika media pembuluh darah aorta pada tikus putih yang menerima stressor. dan belum berpengaruh terhadap pelebaran diameter pembuluh darah dan penyempitan diameter lumen pembuluh darah. aorta pada tikus putih yang menerima stressor.

Summary

The study was generally aimed to prove that probucol have an ability to prevent atherosclerosis (as antiatherogenic) in rats exposed to stressor. Despite, the special objective was to prove that probucol can prevent thickening on tunica media, widening on aorta artery and narrowing its lumen, as the one of atherosclerosis processes caused by stressor. The study was an laboratory experiment using Completed Randomized Design. In the study, the sample were 30 albino wistar rats, weighed 200 grams, in healthy condition, and 3 months age.

Experimental procedure: preparation step. All samples were conditioned to the environment and feed for 7 days. In this period, the health of samples was observed. The stressor was given to the rats by ordering him to do a physical activity: swimming (Willner P, 1990). One day before doing the activity, the rats were weighed to determine the load which attached to their tails, i.e. 2% of their weight. The treatment was conducted everyday for 3 weeks on 07.00 AM. **Treatment step.** All samples were divided into 5 groups, each group consist of 7 rats. Probucol was orally injected using sonde once a day for 3 weeks until 30 minutes and than rats were given stressor for 3 weeks. Details of treatment to each group were as follows :

Control groups consisted of Po1 : 7 rats that were given per oral Probucol solution for 3 weeks, Po2 : 7 rats that were given per oral Probucol solution and stressor for 3 weeks. Treatment groups consisted P1 : 7 rats that were given per oral Probucol dose I (5 mg /rat) and stressor for 3 weeks, P2 : 7 rats that were given per oral Probucol dose II (10 mg /rat) and stressor for 3 weeks, P3: 7 rats that were given per oral Probucol dose III (20 mg /rat) and stressor for 3 weeks.

On the last day of treatment, all rats of any groups were anaesthetised using ether and then killed, their aortas were taken as long as 5 mm, cut from "proximal descending aorta" to 2 cm arcus aorta. The aortas were then washed by NaCl, rinsed in 10% formalin and prepared to make histopathology preparatory using Hematoxylin Eosin (HE).

The histopathology observation of aorta was conducted by measuring the thickness of tunica media and diameter of artery and its lumen, using Leits Monocular microscope equipped with micrometer and 400-times enlargement. The data resulted from measuring the thickness of tunica media and diameter of artery and its lumen was analysed using ANOVA (analysis of variance). If differences were found, the analysis was then continued by using LSD.

Data collected from measuring thickness of tunica media was analysed using variance analysis when the difference between treatment groups was found, the analysis was continued using LSD with level of significantly 5 %. Results and statistical analysis showed in treatment II (Po2 : stessor group) had biggest thickness of tunica media significant difference with all of treatment (Po1, P1, P2, P3) $p < 0,05$. In Group P1 (Po1. Control group) not significantly with P1 and P2 $p = 0,05$. Than in group III (P3) had smallest thickness of tunica media significant difference with all of treatment (po1, Po2, P1 and P2) $p < 0,05$. Data collected from measuring diameter of artery and its lumen was analysed using analysis of variance with level of significantly 5 % .. The results showed not significant difference between treatment groups (Po1, P02, P1, P2, P3) $p = 0,05$.

From the experiment, it had been concluded that applying the probucol antioxidant could prevent the process of atherosgenesis, thickening of tunica aorta artery, in rats exposed to stressor. In other hand, it had not given contribution to reduce the widening on artery diameter and narrowing on diameter of its lumen in the same rats.

KATA PENGANTAR

Puji syukur yang tak terhingga penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan KaruniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan penelitian dengan tepat waktu. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan penghargaan dan ucapan terimakasih yang setulus-tulusnya kepada:

1. Bapak Rektor Universitas Airlangga melalui Kepala Lembaga Penelitian Universitas Airlangga yang telah mengizinkan dan membiayai penelitian ini melalui sumber dana Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional.
2. Bapak Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah mengizinkan penulis untuk melaksanakan penelitian.
3. Kepala Bagian Ilmu Farmasi Kedokteran Universitas Airlangga dan semua staf pengajar yang telah mengizinkan pemanfaatan fasilitas yang ada untuk terlaksananya penelitian ini.
4. Kepala Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah mengizinkan pemanfaatan fasilitas kandang hewan coba.
5. Kepala Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah mengizinkan pemanfaatan mikroskop Leits Monokuler dengan mikrometer untuk pemeriksaan histopatologis pembuluh darah aorta.
6. Semua pihak yang telah membantu baik langsung maupun tidak langsung dalam kelancaran penelitian.

Akhirnya dengan tulus penulis sangat mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan laporan penelitian ini. Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua, khususnya perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, 27 Agustus 2004

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN DAN SUMMARY	ii
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Hipotesis	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Hubungan Stress Dengan Penyakit	4
2.2. Stress Oksidatif	4
2.3. Implikasi Radikal Bebas Terhadap Berbagai Penyakit	5
2.4. Mekanisme Kerusakan Jaringan Akibat Radikal Bebas	6
2.5. Endothel	6
2.5.1. Fungsi Endothel Pada Sistem Biologis	6
2.5.2. Disfungsi Sel Endothel	9
2.6. Aterosklerosis	11
2.6.1. Patogenesis Aterosklerosis	11
2.7. Antioksidan Probucol	13
2.7.1. Struktur Kimia	13
2.7.2. Sifat Kimia Fisik	14

2.7.3. Mekanisme Kerja.....	14
2.7.4. Probucol Sebagai Antioksidan	15
2.7.5. Farmakokinetika	16
2.7.6. Penggunaan terapi	16
IV. METODE PENELITIAN	19
4.1. Rancangan Penelitian	19
4.2. Sampel dan Besar Sampel	19
4.3. Variabel Penelitian	19
4.4. Definisi Operasional Variabel	20
4.5. Bahan dan Instrumen Penelitian	20
4.5.1. Hewan Percobaan	20
4.5.2. Bahan Pakan Dan Minum	20
4.5.3. Bahan Kimia	20
4.5.4. Instrumen	20
4.6. Prosedur Penelitian	21
4.7. Pemeriksaan Pembuluh Darah Aorta	22
4.8. Analisis data	23
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	24
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	37

DAFTAR TABEL

Tabel No.	Halaman
1. Hasil Rata-rata Tunika Media Aorta (μm) Tikus Putih Jantan pada berbagai Perlakuan	24
2. Hasil Rata-rata Pengukuran Diameter Pembuluh Darah Aorta (μm) Tikus Putih Jantan pada berbagai Perlakuan	30
3. Hasil Rata-rata Pengukuran Diameter Lumen Pembuluh Darah Aorta (μm) Tikus Putih Jantan pada berbagai Perlakuan	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar No.	Halaman
1. Potongan Melintang Pembuluh Darah Arteri Sedang	9
2. Proses dan Faktor yang Berperan pada aterosklerosis	13
3. Struktur Kimia Probucol	14
4. Potongan Membujur Aorta Tikus Putih Jantan Kelompok Kontrol (Po1) dengan Pewarnaan HE dan Pembesaran 40 X	40
5. Potongan Membujur Aorta Tikus Putih Jantan Kelompok Kontrol Stressor (Po2) dengan Pewarnaan HE dan Pembesaran 40 X	40
6. Potongan Membujur Aorta Tikus Putih Jantan Kelompok Perlakuan I (P1) 5 mg/ekor dengan Pewarnaan HE dan Pembesaran 40 X	41
7. Potongan Membujur Aorta Tikus Putih Jantan Kelompok Perlakuan II (P2) 10 mg/ekor dengan pewarnaan HE dan Pembesaran 40 X	41
8. Potongan Membujur Aorta Tikus Putih Jantan Kelompok Perlakuan III (P3) 20 mg/ekor dengan pewarnaan HE dan Pembesaran 40 X	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran No.	Halaman
1. Hasil Pengukuran Ketebalan Tunika Media Aorta (μm) Tikus Putih Jantan pada berbagai Perlakuan dan Pengolahan Data.....	37
2. Hasil Pengukuran Diameter Pembuluh Darah Aorta (μm) Tikus Putih Jantan pada berbagai Perlakuan dan Pengolahan Data	40
3. Hasil Pengukuran Diameter Lumen Pembuluh Darah Aorta (μm) Tikus Putih Jantan pada berbagai Perlakuan dan Pengolahan Data	43
4. Hasil Penelitian	46

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Dalam keadaan yang semakin kompleks menjelang era globalisasi dan adanya tekanan kesulitan hidup yang semakin berat saat ini membuat banyak orang tidak bisa beradaptasi, yang akhirnya akan mempengaruhi keseimbangan (homoestasis) di dalam tubuhnya, yang pada keadaan kronik dapat menimbulkan gangguan terhadap sistem organ dengan tingkatan yang berbeda-beda (Covelli, V. 1992). Bila beban yang diberikan melebihi batas ambang, maka akan menimbulkan respon stress, yaitu respon yang terjadi pada saat individu tidak mampu mengatasi beban fisik atau psikologik (Riley, 1981). Latihan fisik berat bisa merupakan stressor yang dapat menyebabkan seseorang berada dalam kondisi yang patologik (Chandrasoma, Taylor, 1991).

Studi yang terbaru menunjukkan bahwa kejadian depresi, hipertensi dan penyakit jantung, adalah penyakit yang diperkirakan ada hubungannya dengan respon stress yang memegang peranan penting dalam masalah kesehatan (Atkinson RL, *et al.*, 1993). Penyakit jantung koroner merupakan penyebab kematian utama di negara maju. Hasil survei kesehatan rumah tangga tahun 1992 melaporkan penyakit sistem sirkulasi sudah merupakan penyebab kematian yang semakin banyak di Indonesia. Dalam upaya menurunkan morbiditas dan mortalitas penyakit jantung koroner, pengendalian faktor risiko merupakan prioritas utama baik pada pencegahan primer maupun skunder, oleh karena itu diperlukan pemahaman yang baik mengenai faktor risiko serta mekanisme yang berperan pada penyakit jantung koroner (Alwi I, 1996).

Endotel mempunyai peran yang sangat penting dalam menjaga integritas pembuluh darah. Pada keadaan normal mediator vasodilatasi pada pembuluh darah adalah EDRF (*endothelium derived relaxing factor*) dan prostasiklin. EDRF tidak hanya bekerja untuk dilatasi otot polos pembuluh darah, tetapi juga berperan menghambat proliferasi otot polos, agregasi platelet, merangsang disagregasi pletelet dan menghambat adhesi platelet pada permukaan endotel. Selain itu juga EDRF bekerja sebagai agen antiinflasi dengan menghambat adhesi dari monosit dan neutrofil pada

permukaan endotel dan bekerja sebagai antioksidan (Flavahan NA, and Vanhoutte PM, 1995). Adanya platelet, monosit, netrofil pada permukaan endotel ini merupakan suatu proses awal atherogenesis.

Endothel merupakan target organ salah satu penyakit yaitu hipertensi, hal ini terjadi karena adanya atherosklerotik pada pembuluh darah. Untuk mencegah proses atherosgenesis ini dapat dilakukan dengan cara menurunkan kadar kolesterol darah, bahkan penelitian terbaru menunjukkan bahwa preparat antioksidan dapat mencegah proses ini (Luscher TF, and Tanner FC, 1993, Inone 1998).

Perbaikan fungsi endothel dengan pemberian terapi antioksidan belum banyak diketahui. Probucol sebagai agen hipolipidemi mempunyai efek antioksidan yang dapat menghambat proses atherogenik karena adanya oksidasi LDL pada dinding pembuluh darah arteri, sehingga dapat menghambat ateroma yang tidak tergantung efeknya pada lemak darah (Opie HL 1991). Radikal bebas mempunyai kemampuan untuk inaktivasi EDRF atau berinteraksi dengan transduksinya yang dapat dicegah atau dihambat oleh antioksidan Probucol serta dapat menurunkan hambatan kerja LDL pada pelepasan EDRF (Evans CR, and Bruckdorfer KR, 1992).

Probucol dapat menurunkan kadar basal VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), MCSF (*Macrophage Colony Stimulating factor*) yang sangat nyata, hasil ini mendukung bahwa VCAM-1, MCSF memainkan peran penting dalam proses atherogenesis dan diyakini bahwa antiatherogenik dari Probucol mempunyai peran penting (J. Fruebis, et al., 1997). Dengan merujuk pada fakta di atas karena Probucol mempunyai efek sebagai antihiperlipidemik dan sekaligus antioksidan maka perlu dilakukan penelitian mengenai efek antiaterogeniknya dengan melihat struktur histopatologi pembuluh darah aorta yang meliputi ketebalan tunika media, diameter pembuluh darah aorta dan diameter lumen pembuluh darah aorta, yang disebabkan oleh adanya stressor.

1.2. Rumusan Masalah

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

1. Apakah pemberian antioksidan Probucol dapat menghambat dan mencegah terjadinya proses aterogenesis penebalan tunika media pada tikus putih yang menerima stressor ?
2. Apakah pemberian antioksidan Probucol dapat menghambat dan mencegah terjadinya proses aterogenesis pelebaran diameter pembuluh darah aorta pada tikus putih yang menerima stressor ?
3. Apakah pemberian antioksidan Probucol dapat menghambat dan mencegah terjadinya proses aterogenesis penyempitan diameter lumen pembuluh darah aorta pada tikus putih yang menerima stressor ?

1.3. Hipotesis

Sehubungan dengan permasalahan diatas dan tinjauan teori diajukan hipotesis sebagai berikut :

1. Probucol dapat menghambat dan mencegah penebalan tunika media pembuluh darah aorta pada tikus putih yang menerima stressor.
2. Probucol dapat menghambat dan mencegah pelebaran diameter pembuluh darah aorta pada tikus putih yang menerima stressor.
3. Probucol dapat menghambat dan mencegah penyempitan diameter lumen pembuluh darah aorta pada tikus putih yang menerima stressor.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hubungan Stress Dengan Penyakit

Radikal bebas dihasilkan oleh kerusakan dalam sistem metabolik akibat "*stress oksidatif*", dan pembentukan radikal ini kemudian dapat menimbulkan proses traumatik didalam jaringan yang diawali dengan reaksi kimia berantai seperti peroksidasi lipid (Sjodin B., *et al.*, 1990).

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

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

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

2.2. Stress Oksidatif

Apabila pertahanan antioksidan tidak betul-betul efektif, maka dapat menyebabkan peningkatan pembentukan radikal bebas. Hal ini akan mengakibatkan

penyerangan radikal bebas pada jaringan yang sering dinyatakan sebagai “*stress oksidatif*”. Stress oksidatif dapat ditimbulkan oleh panas, trauma, sinar ultraviolet, ultrasound, infeksi, radiasi, racun, olah raga berlebihan, iskemia yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan selanjutnya dapat menimbulkan :

1. Fagositosis dan aktivasi yang dapat menghasilkan $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , NO^{\bullet} , $HOCl$.
2. Pelepasan asam arakhidonat, pembentukan enzim peroksidase oleh aktivasi enzim lipoksigenase, sklooksigenase.
3. Pelepasan ion metal dari protein penyimpanan dan transport (Fe, Cu) akan merangsang pembentukan OH^{\bullet} .
4. Pelepasan protein heme, yang akan bereaksi dengan peroksidase dan melepaskan ion Fe^{2+} .
5. Gangguan pada pertahanan antioksidan (misalnya kehilangan GSH (glutation) dari sel).

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

2.3. Implikasi Radikal Bebas Terhadap Berbagai Penyakit

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

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

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

2.4. Mekanisme Kerusakan Jaringan Akibat Radikal Bebas

(Jarasch ED, *et al.*, 1981 ; Bruder G, *et al.*, 1982) didalam (Ward PA, 1988) mengatakan bahwa xanthine oxida terdapat dalam sel endothel dan sebagai sumber radikal superoksida anion (O_2^-). Kemudian O_2^- memerlukan besi dan bersama-sama dengan H_2O_2 menyebabkan kematian sel endothel melalui reaksi fenton menghasilkan pembentukan radikal hidroksil ($H_2\cdot$) yang dapat mengaktifkan netrofil sehingga dapat meningkatkan kemampuan netrofil untuk membunuh sel endotel.

Produk oksigen reaktif yang dihasilkan menyebabkan pelepasan epitel dan sel endothel dari membran dasar yang menimbulkan kerusakan atau gangguan permeabilitas (Harlan JM, *et al.*, 1981). Kemampuan makrofag untuk menghasilkan radikal oksigen dengan melepaskan sitokin interleukin (IL-1) dan tumor nekrosis faktor (TNF). IL-1 dan TNF dapat secara langsung mengawali produksi oxidan. Sitokin ini akan meningkatkan radikal oksigen sebagai perantara kerusakan. Kontak sel endotel dengan IL-1 dan TNF menyebabkan perubahan dalam sel endothel seperti peningkatan kepekaan terhadap radikal oksigen sebagai perantara kerusakan jaringan dengan aktivasi netrofil. Kerusakan sel endothel terjadi dengan adanya H_2O_2 dan besi. Kemampuan sitokin untuk mempengaruhi kepekaan sel endothel terhadap kerusakan karena makrofag mempunyai efek positif terhadap netrofil yang secara bersamaan menyebabkan kerusakan jaringan (Ward PA, *et al.*, 1988).

2.5. Endothel

2.5.1. Fungsi Endothel Pada Sistem Biologis.

Sel endothel mempunyai peranan sangat penting dalam menjaga fungsi fisiologis normal dari dinding pembuluh darah. Jika sel ini menjadi disfungsi maka akan

terjadi perubahan patofisiologi dalam pembuluh darah. Endothel sebagai sistem signal mempunyai peranan penting dalam mengatur fungsi pembuluh darah dan organ.

Dalam keadaan normal endothel memainkan peranan penting dalam melindungi dan menjaga fungsi fisiologis dari dinding pembuluh darah, menghambat kontraksi dan juga migrasi dan pertumbuhan dari sel otot polos pembuluh darah. Juga aktif menghambat proses koagulasi dan merangsang pelarutan gumpalan yang telah dibentuk dalam lumen (Fibrinolisis). Endothel juga mempunyai peran penting sebagai anti inflamasi dan mengatur adhesi dan migrasi sel inflamasi kedalam dan menembus dinding pembuluh darah juga aktif dalam mengatur fungsi organ (Flavahan N A, and Vanhoutte P M., 1995).

Sel endothel dapat melepaskan bermacam-macam mediator vasoaktif yang diaktivasi oleh perbedaan rangsangan. Pada kondisi normal mediator vasodilator yang dilepaskan adalah "*endothelium derived relaxing factor*" (EDRF, NO atau NO donor) dan prostasiklin. Prostrasiklin menyebabkan relaksasi dari otot polos pembuluh darah dengan merangsang adenyl siklase dan meningkatkan kadar siklik AMP otot polos. EDRF merangsang guanylate siklase dan meningkatkan kadar siklik GMP. Endothel juga melepaskan substansi yang dapat meningkatkan hiperpolarisasi dari otot polos pembuluh darah dan relaksasi (Flavahan N A, 1992 ; Busse R., *et al.*, 1993 ; Flavahan N A, and Vanhoutte PM, 1995).

Mediator "*endothelium derived vasodilator*" mempunyai efek penting yang lain pada dinding pembuluh darah yang memberi konstribusi untuk berperan menjaga endothel. Agen ini bekerja tidak hanya untuk dilatasi pembuluh darah, ia juga dapat menghambat proliferasi otot polos, agregrasi platelet, menghambat adhesi platelet pada permukaan endothel. EDRF juga bekerja sebagai antiinflamasi dengan menghambat adhesi monosit dan netrofil pada permukaan endothel, dan bekerja sebagai antioksidan. EDRF dapat mencegah oksidasi LDL sebagai mediator atherogenik. Kemampuan kerja EDRF untuk menghambat peningkatan pertumbuhan lesi atherosklerosis ditunjukkan dengan kemampuan dari L arginine sebagai prekursor EDRF untuk menghambat pertumbuhan lesi (Flavahan NA, and Vanhoutte PM, 1995).

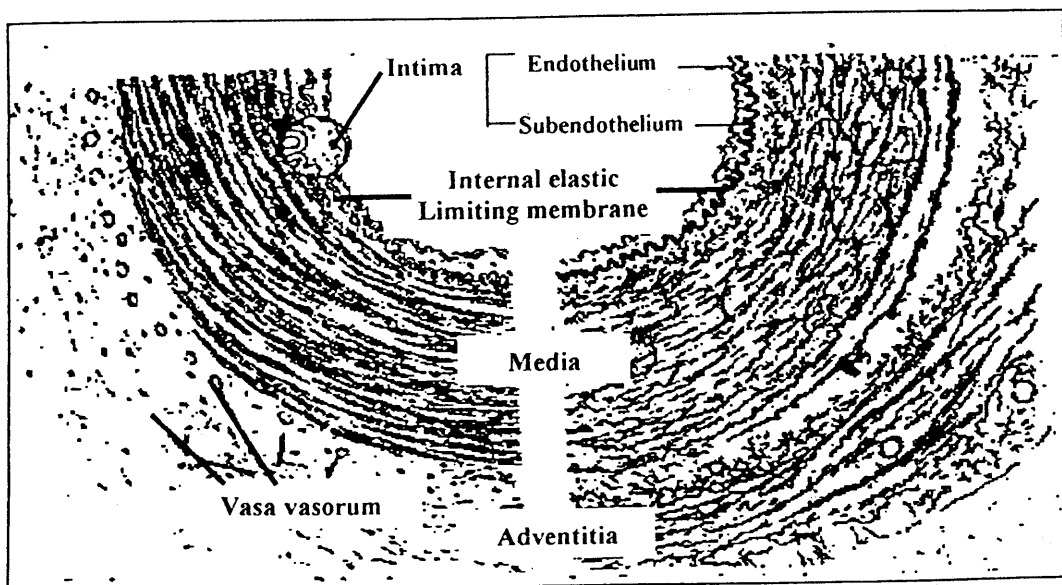
"*Endothelium derived vasodilator*" yang lain yang juga memberi kontribusi untuk berperan menjaga endothel adalah prostasiklin, seperti juga EDRF ia juga dapat menghambat pertumbuhan otot polos dan aktivasi platelet. Endothel juga melepaskan mediator kontraktile yang disebut "*endothelium derived kontraktile factor*" EDCFs yang disebut juga endothelin. Endothelin ini menyebabkan kontraksi dengan mengaktifasi reseptor spesifik pada otot polos. EDCFs juga dapat dihasilkan dari metabolisme siklooksigenase dari asam arakhidonik, tromboxane dan prostaglandin H_2 yang mengaktifasi reseptor yang sama dan superoksida yang dapat menyebabkan kontraksi secara langsung atau tidak langsung dengan inaktivasi NO (Vanhoutte PM, 1993).

EDRF dibentuk oleh membran terikat enzim nitric oxide sintetase (NOS) yang berada dalam sel endothel. NOS membentuk NO dan sitrulin dari oksidasi guanidin dari asam amino L-arginine. NOS terikat kalmodulin dan diaktivasi oleh rangsangan peningkatan konsentrasi dari kalsium intraseluler bebas. Prostrasiklin adalah metabolit asam arakhidonik yang disintesa oleh prostasiklin sintase yaitu suatu kofaktor yang tidak spesifik yang tidak tergantung pada kalsium intraseluler, akan tetapi asam arakhidonik dihasilkan dari aktivasi kalsium dependent dari fosfolipase A₂. Sedangkan identifikasi EDHF dan mekanisme pengontrolan dan pelepasannya belum diketahui yang mungkin berasal dari metabolit sitokrom P₄₅₀ dari asam arakhidonik yang juga ditentukan oleh perubahan kadar kalsium bebas intraseluler (Basse R, *et al.*, 1993 ; Luscher TF, and Tanner FC, 1993 ; Flavahan NA, and Vanhoutte PM, 1995).

Jadi rangsangan dari pelepasan mediator "*endothelium derived vasodilator*", EDRF, prostasiklin, EDHF menjadi meningkat tergantung konsentrasi kalsium bebas dalam intraseluler. Permukaan sel endothel mempunyai bermacam-macam reseptor terikat membran dan dapat diaktivasi oleh sirkulasi hormon (epineprin, vasopresin, angiotensin, insulin), autakoid yang dibentuk dalam dinding pembuluh darah (bradikinin, histamin, serotonin), pelepasan neurotransmitter dari saraf otonomik (norepinephrine, asetilkholine) atau saraf sensorik (Subtansi P., Kalsitonin) atau oleh pelepasan mediator dari sel sirkulasi (serotonin, ADP) atau dari endothel (endothelin, ATP/ADP, bradikinin). Sel endothel juga mempunyai bermacam-macam proses signal transduksi yang dapat menterjemahkan signal yang dihasilkan oleh pendudukan agonist pada

permukaan reseptor untuk meningkatkan konsentrasi ion kalsium intraseluler. (Flavahan N A, and Vanhoutte PM, 1995).

Secara prinsip penggunaan membran endothel terikat reseptor seperti protein G tergantung dari aktivasi fosfolipase C. Fosfolipase C dihidrolisis menjadi perukusor lipid fosfatidilinositol 4,5- bisfosfat untuk menghasilkan diasilgliserol (DAG) dan inositol tri fosfate (IP_3), sesudah itu mengalami fosforilasi menjadi IP_4 . IP_3 merangsang pelepasan kalsium dari simpanan intraseluler, sedangkan IP_4 mengaktifkan permeabilitas kalsium channel pada sel membran yang menimbulkan influk kalsium intrasel. Pembentukan IP_3 dan IP_4 meningkatkan kadar dari kalsium dalam sel endothel menyebabkan aktivasi sel dan pelepasan mediator relaksasi (Busse R, *et al.*, 1993).



Gambar 1 : Potongan melintang pembuluh darah arteri sedang (Junqueria,1998)

2.5.2. Disfungsi Sel Endothel

Modulasi sel endothel untuk melepaskan EDRF dalam jumlah sedikit akan menghilangkan peranan molekul ini. Sel juga akan aktif meningkatkan proses atherogenik dengan mengekspresikan molekul adhesi dari monosit sirkulasi (VCAM, ICAM-1) dan dengan melepaskan molekul khemotaktik sebagai target pengambilan monosit (*MCPI = monosit khemotaktik molekul*), factor deferensiasi monosit (*M-CSF*,

macropage colony stimulating factor) yang mengatur migrasi, proliferasi, diferensiasi dan metabolisme monosit, makrofag dan signal khemotatik dan mitogenik untuk otot polos vascular (PDGF, bFGF) yang menstimulasi infiltrasi dan divisi sel otot kedalam ruang subendotel (Flavahan NA, and Vanhoutte PM., 1995 ; Wijaya A, 1998).

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

Gangguan signal dari endothel protein G_{i2} akan menurunkan peranan protektif dari endothel dengan menurunkan pelepasan EDRF sebagai respon aktivasi fisiologik dari sel. Gangguan signal protein G_{i2} juga menyebabkan endothel aktif mengembangkan proses penyakit. Endothel protein G_{i2} menghambat adenyl siklase yang menyebabkan penurunan kadar siklik AMP dalam endothel. Hambatan fungsi protein G_{i2} akan menyebabkan peningkatan siklik AMP dalam endothel yang merupakan "*dependent activation*" dari faktor transkripsi nuklear NF κ B yang menyebabkan peningkatan adhesi monosit, pelepasan Monosit Chemotatik Protein (MCP-1), Faktor jaringan, pelepasan Makrofag Kolony Stimulating Faktor (M-CSF) dan faktor pertumbuhan sitokin (Flavahan N A, and Vanhoutte P M, 1995 ; Wijaya A, 1998).

Reaktif oksigen spesies dapat secara langsung mempengaruhi proses signal transduksi protein G (Pioper GM, and Gross GJ, 1989). Peningkatan stress oksidatif dapat terjadi sebagai penyebab dari disfungsi dalam protein G_{i2} . Aktivasi NF κ B selalu dihubungkan dengan stress oksidatif dan dapat meningkat oleh peningkatan spesies oksigen reaktif. Oleh karena siklik AMP merupakan perantara aktivasi NF κ B disebabkan oleh gangguan protein G_{i2} atau oleh MM LDL juga peningkatan stress oksidatif (Collins T, 1993).

2.6. Aterosklerosis

2.6.1. Patogenesis aterosklerosis

Aterosklerosis menurut WHO adalah berbagai perubahan pada tunika intima arteri, termasuk penumpukan lipid, kompleks karbohidrat dengan darah dan isi yang terkandung didalamnya, diikuti pembentukan jaringan ikat, klasifikasi dan perubahan didalam tunika media (Assman, 1982).

Hingga kini patogenesis aterosklerosis masih merupakan teori. Ada sebuah teori yang kini dianut yaitu *respon-to injury hypothesis*. Asal mula teori ini dari dua hipotesis yaitu *hipotesis incrustation* dan *hipotesis lipid*. (Fuster et al., 1992 ; Badimon et al 1993). Hipotesis incrustation menjelaskan bahwa penebalan tunika intima berasal dari penumpukan fibrin dan diikuti pembentukan (organisasi) oleh fibroblas dan penumpukan lipid sekunder. Sedangkan hipotesis lipid menjelaskan bahwa penumpukan lipid pada dinding pembuluh darah arteri akibat peningkatan transudasi lipid plasma (Badimon et al., 1993) yang diikuti pembentukan kompleks dengan polisakarida asam (Fuster et al., 1992). Penumpukan lipid ini disebabkan karena mekanisme deposisi lipid melebihi pengangkutannya (Badimon et al.; O' Brien dan chait, 1994).

Dalam *respon-to injury hypothesis* peranan endotel dianggap yang terpenting, yaitu sebagai barier dan pelindung dinding arteri. Bila terjadi injury terhadap endothel maka kerusakan fungsi endothel menyebabkan terpacunya aterogenesis.

Penumpukan lipoprotein dalam tunika intima berasal dari kelebihan lipoprotein seperti LDL dalam sirkulasi. Keadaan ini terutama pada tempat yang mengalami kerusakan pada endothel maka kerusakan fungsi endothel menyebabkan terpacunya aterogenesis.

Penumpukan lipoprotein dalam tunika intima berasal dari kelebihan lipoprotein seperti LDL dalam sirkulasi. Keadaan ini terutama pada tempat yang mengalami kerusakan endothel. Lipoprotein ini kemudian akan mengalami modifikasi oksidasi ringan pada ruang subendotel, yang akan merangsang sel endothel membentuk :

- a. MCP (*Monocyte chemotactic protein-1*) adalah faktor kemotaktis yang dapat menarik monosit pada dinding arteri.

- b. Molekul adhesi sel mononuklear sehingga monosit dan limfosit T masuk ruang sub endothel.
- c. CSFs (Colony Stimulating Factor) yang dapat memacu perubahan monosit menjadi makrofag.

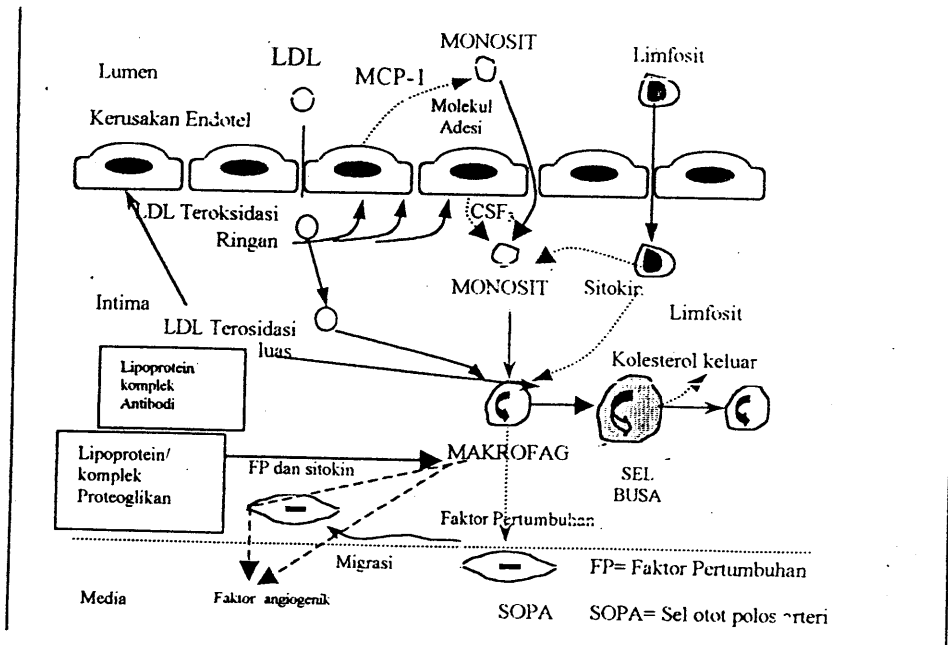
Sitokin yang dilepas limfosit T mengakibatkan makrofag melepas beberapa faktor pertumbuhan serta sitokin lain yang bekerja pada tunika intima dan tunika media sel otot polos arteri sehingga akan merangsang proliferasi, migrasi dan sintesis matrik protein. Makrofag dan sel otot polos mengeluarkan faktor angiogenik yang merangsang *neovaskularisasi vasa vasorum*. *Neovascularisasi* ini kemudian menjadi lain karena deposisi lipoprotein dan infiltrasi sel mononuklear berikutnya.

Proses selanjutnya adalah pengambilan sejumlah besar lipid dalam bentuk teroksidasi penuh, kompleks antibodi lipoprotein dan atau kompleks proteoglikan yang disekresi sel otot polos arteri dan LDL. Pada sel busa (*Foam Cell*) yang telah terbentuk akan terjadi pengeluaran kelebihan kolesterol dari sel busa melalui HDL dan sekresi vesikel lipid apo E.

Ada dua hal yang perlu ditekankan pada Patogenesis Aterosklerosis yaitu Modifikasi LDL dan pembentukan sel busa. Pada dasarnya setelah terperangkap dalam tunika intima, LDL akan mengalami modifikasi paling sedikit dengan dua cara oksidasi dan derivatisasi Apo B 100. Cara oksidasi terjadi jika superoksid, yang berasal dari makrofag dan diperlukan pada proses fagositosis dapat menyerang Apo B 100 sehingga mengalami degradasi. LDL yang mengandung Apo B akan kehilangan integritasnya dan akan mudah ditangkap oleh makrofag. Derivatisasi Apo B 100 antara lain dengan terjadinya penempelan Malondialdehyde pada molekul Apo B 100 atau dengan cara glikolisasi Apo B 100. Derivatisasi ini akan menyebabkan LDL menjadi lebih mudah ditangkap oleh makrofag (Suyono, 1992).

Pembentukan sel busa, dalam keadaan normal, hampir semua sel akan menangkap kolesterol LDL melalui reseptor LDL. Peningkatan isi kolesterol dalam sel akan menghambat produksi reseptor LDL yang baru dengan mekanisme umpan balik (*Down Regulation*), sehingga LDL tidak terus menerus ditangkap oleh reseptor LDL dan melindungi sel dari akumulasi kolesterol yang berlebihan (Badimon *et al.*, 1993).

O'brain dan chait (1994) menunjukkan bahwa LDL yang mengalami modifikasi (LDL M) melalui asetilasi akan terus meningkat pengambilannya melalui reseptor dipermukaan sel yang lain yang disebut *scavenger reseptor* (reseptor pemberantas) yang terdapat pada makrofag dan sel endotel. Produksi reseptor ini tidak tergantung pada jumlah kolesterol dalam sel. Jadi tidak terdapat mekanisme umpan balik seperti pada produksi reseptor LDL, sehingga produksi reseptor pemberantas ini tetap berlangsung meskipun jumlah LDL M sudah banyak (Scwart *et al.*, 1993). Akibatnya LDL M akan menumpuk didalam makrofag hingga sel ini akan menggelembung menjadi besar yang disebut sebagai sel busa. Akhirnya penumpukan sel aster kolesterol dalam sel busa ini mengakibatkan kematian sel dan berkembang menjadi pusat jaringan nekrotik (Assman, 1982).



Gambar 2 : Proses dan faktor yang berperan pada aterosklerosis (Alwi, 1996)

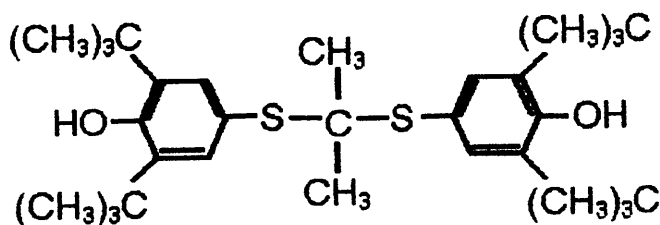
2.7. Antioksidan Probucool

2.7.1. Struktur Kimia

Probucool mengandung dua molekul tertiary butylatedhydroxytoluene yang dihubungkan dengan jembatan sulfur – carbon – sulfur. Struktur dianalogkan dengan

t-butylhydroxytoluene yang merupakan antioksidan BHT, umumnya digunakan sebagai food additive (Godmen G, 1995).

Struktur Probucol sebagai berikut :



Gambar 3 : Struktur Kimia Probucol (Sumber ; Evan CR, *et al.*, 1992 ; Godmen G, 1995).

2.7.2. Sifat Kimia Fisik

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

2.7.3. Mekanisme Kerja

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

yang memperantara pengangkutan kholesterol dari lipoprotein pada sel independen untuk uptake partikel lipoprotein (Godmen G, 1995).

Mekanisme dari Probucol menurunkan kadar HDL dan efeknya pada *Cholesteryl Ester Protein (CETP)* menunjukkan bahwa terapi dengan Probucol dapat meningkatkan kadar CETP mRNA dan aktivitas CET spesifik pada "*h CETP-CHO cel line*", dan juga Probucol dapat meningkatkan pengeluaran kholesterol dari cCETP-CHO yang dapat menyebabkan penurunan kadar kholesterol intarseluler (Ou J, Saku K, *et al.*, 1998).

2.7.4. Probucol Sebagai Antioksidan

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

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

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

tetapi ekspresi dari oksidasi LDL-spesifik epitope mengalami penurunan dalam waktu 24 jam (Calara F, Dimayuga P., *et al.*, 1998).

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

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

2.7.5. Farmakokinetika

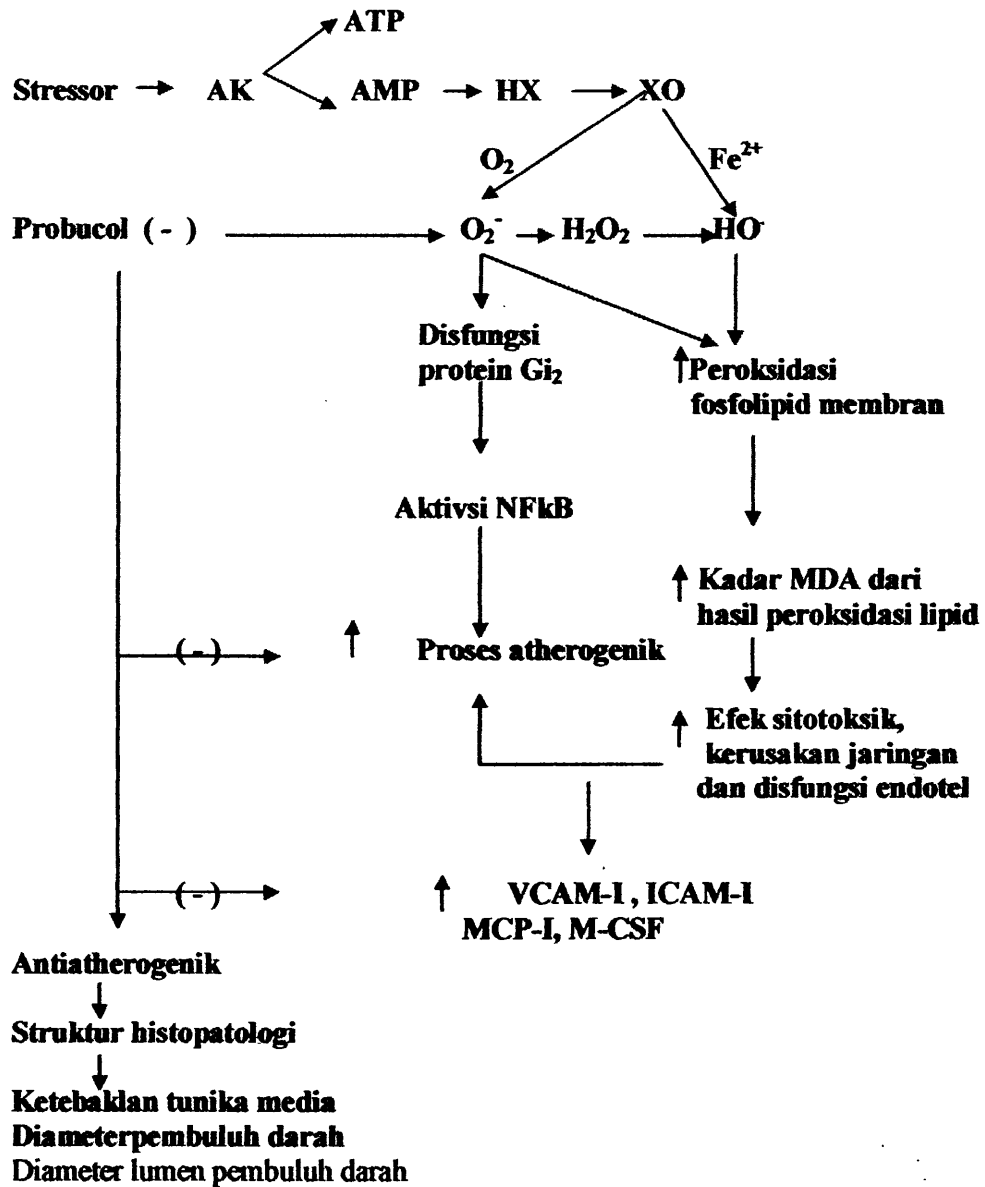
Absorpsi Probucol dipengaruhi oleh kandungan lemak dalam diet. Konsentrasi puncak dalam darah meningkat jika obat diberikan bersamaan makanan. Probucol ditransport ke dalam celah hydrophobik partikel lipoprotein yang kaya partikel LDL. Dalam jaringan lemak Probucol sebagai partisi. Pemakaian selama 4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

2.7.6. Penggunaan Terapi

Probucol digunakan dalam pengobatan hypercholesteloraemia dengan mekanisme kerjanya meningkatkan klirens HDL dan LDL kholesterol dari sirkulasi tanpa mempengaruhi triglycerida dengan meningkatkan ekskresi kolesterol dari empedu. Probucol mempunyai efek antioksidan pada proses atherogenik karena oksidasi LDL yang dalam jumlah tinggi akan mudah masuk ke dalam dinding arteri sehingga Probucol dapat menghambat atreoma dengan tidak tergantung efeknya pada lipid darah (Opie HL, 1991 ; Reynolds JE F, 1993 ; Godmen G, 1995).

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

Bagan Kerangka Konseptual



BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk membuktikan bahwa Probucol mempunyai kemampuan mencegah terjadinya aterosklerosis (sebagai anti aterogenik) pada tikus putih yang menerima stressor.

3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan bahwa Probucol dapat menghambat dan mencegah penebalan tunika media.
2. Untuk membuktikan bahwa Probucol dapat menghambat dan mencegah pelebaran diameter pembuluh darah aorta.
3. Untuk membuktikan bahwa Probucol dapat menghambat dan mencegah penyempitan diameter lumen pembuluh darah aorta.

Sebagai salah satu proses aterosgenesis yang disebabkan stressor.

3.3. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bahwa pemberian antioksidan khususnya Probucol dapat menghambat dan mencegah kerusakan biologis pada pembuluh darah aorta (aterosklerosis) akibat pelepasan radikal bebas yang berhubungan dengan stressor.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

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

4.2. Sampel dan Besar Sampel

Dalam penelitian ini digunakan binatang percobaan tikus albino wistar jantan dengan berat badan sekitar 200 gram, sehat dengan umur sekitar 3 bulan. Besar sampel untuk setiap perlakuan ditentukan dengan rumus $(n-1)(r-1) > 15$.

4.3. Variabel Penelitian

A. Variabel Bebas

Dalam penelitian ini digunakan kombinasi 2 variabel bebas, yaitu :

1. Variabel pemberian stressor.
2. Variabel penambahan antioksidan Probucol.

B. Variabel Kendali

Dalam penelitian ini digunakan beberapa variabel kendali, yaitu :

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

C. Variabel Akibat (Tergantung)

Gambaran struktur histopatologi pembuluh darah aorta yang meliputi ketebalan lapisan tunika media, pelebaran diameter pembuluh darah aorta dan penyempitan diameter lumen pembuluh darah aorta.

4.4. Definisi Operasional Variabel

- a. Stressor adalah pemberian beban kerja aktivitas fisik dengan memasukkan hewan coba tikus dengan diberi beban pada ekor 2% BB (Brady PS., *et al.*, 1979) kedalam air supaya berenang hingga lelah, dengan menggunakan stop watch tiap hari dimulai pukul 07.00 pagi sampai 3 minggu.
- b. Gambaran histopatologis pembuluh darah aorta adalah gambaran aorta di bawah mikroskop dengan pembesaran 10x40.

4.5. Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1. Hewan Percobaan

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

4.5.2. Bahan Pakan dan Minum

Pakan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pakan anak ayam buatan PT. Charoen Phokpand Indonesia, animal Feedmill Co. Ltd. Air minum yang digunakan adalah air bersih dari PDAM Surabaya. Pemberian pakan dan minum dilakukan secara *adlibitum*.

4.5.3. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah reagensia dengan derajat kemurnian p.a (pro analisis) yang meliputi : serbuk Probucol, eter anestesi, larutan formalin 10%.

4.5.4. Instrumen

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah : kandang tikus, bak air, sonde lambung, alat-alat bedah, stop watch, alat suntik 5 ml sekali pakai, pot plastik, neraca analitis.

4.6. Prosedur Penelitian

I. Tahap Persiapan

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

II. Tahap Pemberian Stressor Pada Tikus

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

III. Tahap Perlakuan

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

Kelompok Kontrol :

Kelompok P01 : 7 ekor tikus hanya diberi pelarut Probucol peroral selama 3 minggu.

Kelompok P02 : 7 ekor tikus diberi pelarut Probucol dan perlakuan stress selama 3 minggu.

Kelompok Perlakuan :

Kelompok P1 : 7 ekor tikus diberi Probucol dosis 1 (5 mg/ekor) dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu

Kelompok P2 : 7 ekor tikus diberi Probucol dosis 2 (10 mg/ekor) dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu.

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

Pada hari terakhir setelah mendapat perlakuan seluruh hewan percobaan dari semua kelompok dianastesi dengan eter atau dimatikan aortanya diambil sepanjang 5 mm yang dipotong dari "*proksimal desending aorta*" sampai 2 cm arcus aorta, kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis dan kemudian diangkat dan direndam dalam larutan formalin 10% dan dipersiapkan untuk pewarnaan hematoxylin eosin (HE).

4.7. Pemeriksaan Pembuluh Darah Aorta

Pemeriksaan histopatologi dilakukan dengan memakai metode standard. Segera setelah binatang dibunuh, pembuluh darah diangkat dan selanjutnya difiksasi dengan proses dehidrasi secara otomatis dalam larutan alkohol 70% dan 96% serta larutan xylol secara bertingkat. Selanjutnya direndam dalam parafin cair selama 4,5 jam. Pemblokkan dilakukan sehari setelah dehidrasi dan dilanjutkan dengan pembuatan preparat mikroskopik serta pengecatan dengan HE.

Pemeriksaan histopatologi aorta dilakukan dengan mengukur ketebalan tunika media dilakukan dengan menggunakan mikroskop Leits Monokuler yang dilengkapi dengan micrometer dan dikerjakan pada pembesaran 400 X. Ketebalan tunika media yang diukur adalah jarak yang dibuat oleh lapisan sabut elastis tunika media yang terdalam dan lapisan sabut elastis tunika media yang terluar. Pada setiap bagian, ketebalan tunika media yang diukur adalah tunika media yang terkecil. Hal ini bertujuan untuk memperkecil kesalahan pengukuran yang terjadi akibat pemotongan mikrotom yang tidak tegak lurus pada sumbu potong.

Pengukuran diameter pembuluh darah aorta diukur dari sumbu lebar dari titik kanan dan kiri terluar sedangkan diameter lumen pembuluh darah diukur dari sumbu lebar dari titik kanan dan kiri terdalam pembuluh darah.

4.8. Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil pengukuran ketebalan tunika media, diameter pembuluh darah dan diameter lumen pembuluh darah dianalisis dengan menggunakan Analisis Variasi dan bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji LSD

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan 35 ekor tikus jantan yang terbagi dalam lima kelompok perlakuan, didapatkan hasil dari pemeriksaan histopatologis pembuluh darah aorta sebagai berikut :

Tabel I : Hasil Rata-rata Ketebalan Tunika Media (μm) Aorta tikus Putih Jantan pada Berbagai Perlakuan.

Perlakuan	Rata-rata Ketebalan Tunika Media (μm)
Po1	40,53 ^b \pm 1,9046
Po2	47,10 ^a \pm 5,2239
P1	40,97 ^b \pm 4,1434
P2	40,08 ^b \pm 5,0598
P3	34,62 ^c \pm 1,8566

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Po1 : Kontrol

Po2 : Kontrol stressor

P1 : Stressor + antioksidan Probucol dosis I (5 mg/ekor)

P2 : Stressor + antioksidan Probucol dosis II (10 mg/ekor)

P3 : Stressor + antioksidan Probucol dosis III (20 mg/ekor)

Berdasarkan data hasil penelitian pengukuran ketebalan tunika media yang diperoleh, kemudian dianalisis dengan menggunakan analisis varian didapatkan F-hitung lebih besar dari F-tabel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara beberapa perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji LSD dengan taraf signifikansi 5% didapatkan kesimpulan bahwa Perlakuan II (Po2, Kontrol stressor)

memiliki ketebalan tunika media terbesar yang berbeda nyata dengan semua kelompok perlakuan (Po1, P1, P2, P3) $p < 0,05$.

Kelompok I (Po1, Kontrol) tidak berbeda nyata dengan perlakuan (P1 dan P2) $p > 0,05$ sedangkan kelompok III (P3, Stressor dengan penambahan antioksidan Probuocol dosis III (20 mg/ekor)) memiliki ketebalan tunika media yang terkecil yang berbeda nyata dengan semua kelompok perlakuan (Po1, Po2, P1 dan P2) $p < 0,05$

Pada kelompok Po2 (Kontrol Stressor) menunjukkan perubahan pada gambaran histopatologis pada tunika media terjadi hipertropi dan proliferasi sel-sel otot polos yang membentuk penonjolan kearah lumen sehingga batas tunika intima dngan media tidak jelas (penebalan). Selain itu juga terdapat jarak yang semakin lebar antara sabut elastis satu dengan sabut elastis yang lainnya dan sabut elastis tampak sedikit membesar. Menurut Sinodimedjo (1977), sel-sel otot polos yang mengalami hipertropi akan menyebabkan jarak sabut elastis satu dengan yang lainnya pada tunika media aorta akan menjadi semakin jauh dan akhirnya akan menyebabkan tunika media menjadi lebih besar.

Adanya penebalan pada dinding pembuluh darah sangat berkaitan erat dengan kejadian penyakit atherosklerosis. Stary (1994) mengatakan bahwa ada hubungan antara ketebalan tunika intima dengan aterosklerosis. Lipoprotein aterogenik yang berlebihan dalam plasma, cenderung mengumpul pada suatu tempat sehingga tunika intima mengalami penebalan. Pada intima yang menebal cenderung lebih banyak lipid dari bahan-bahan lainnya. Ini menunjukkan bahwa penebalan tunika intima merupakan suatu proses awal dari aterosklerosis.

Tahap paling awal dalam perkembangan lesi atherosklerosis adalah kerusakan endothel dan intima dibawahnya. Bila terjadi kerusakan, sel endotel membengkok dan mengalami proliferasi, sel otot polos dibawahnya berproliferasi dan bermigrasi dari tunika media kedalam lesi sehingga terjadi penebalan (Guyton,1994). Linder (1992) dan Soeharto (2002) juga mengatakan lesi awal atherosklerosis ditandai oleh adanya garis-garis lemak yang terdiri dari proliferasi sel-sel otot polos bersama dengan berbagai bentuk lipid intra dan ekstraseluler.

Pada kelompok Po2 (kontrol stressor) menyebabkan penebalan lapisan tunika media yang paling tebal jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (Po1) dan kelompok yang menerima stressor dan pemberian Probucol pada berbagai tingkat dosis (P1,P2, P3), dan menunjukkan perbedaan yang nyata pada semua kelompok. Hal ini dikarenakan pada keadaan stress terjadi peningkatan produksi radikal bebas sehingga menyebabkan peningkatan kadar MDA dalam darah dari hasil peroksidasi lipid, hal ini dapat menyebabkan efek sitotoksik, kerusakan jaringan dan disfungsi sel endothel. Pemberian stressor pada tikus putih dengan memberikan beban kerja aktivitas fisik yang berlebihan menyebabkan peningkatan kadar malondialdehide (MDA) dalam darah dan jumlah "*Circulating Endothel*" jika dibandingkan dengan tikus putih yang tidak menerima perlakuan/kontrol. Brady DS, *et al.*,1979 telah melaporkan bahwa ada peningkatan lipid peroksida pada jaringan hati dan otot segera setelah aktivitas fisik yang diukur dengan menggunakan tes TBARS. Hal ini karena pada keadaan stress akibat latihan fisik yang berlebihan dan stress emosional dapat menyebabkan sympatoadrenal discharge, yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan kadar noradrenalin dan adrenalin yang sangat tinggi (Kestin AS, Ellis PA, *et al.*, 1993). Sozmen B., *et al.*,1998 juga melaporkan bahwa katekolamine (noradrenalin dan adrenalin) sebagai sumber yang sangat penting dalam pembentukan radikal bebas oksigen, yaitu dengan cara autooksidasi dalam reaksi yang kompleks.

Seperti hasil penelitian (Maslachah L , 2000) pemberian stressor pada tikus putih dapat meningkatkan kadar MDA dan "*Circulating Endothel*". Dari hasil penelitian ini dapat dijelaskan bahwa pada endothel yang rusak atau mengalami disfungsi akan terjadi peningkatan aktivitas prokoagulan, terutama yang disebabkan oleh interaksi antara factor jaringan (TF) dan factor VIIa. TF merupakan kofaktor untuk VIIa untuk mengaktivasi factor IX dan X yang menghasilkan trombin, dan dapat merangsang migrasi sel otot polos melalui adhesi platelet dan pelepasan factor pertumbuhan seperti PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) dan FGF (*Fibroblass Growth Factor*) (Wijaya, A, 1998).

Pada endothel yang mengalami disfungsi sel akan aktif meningkatkan proses atherogenik dengan mengekspresikan molekul adhesi dari monosit sirkulasi (VCAM I: *Vascular*

Cell adhesion Molekul 1, ICAM-1 : *Interstitial Cell adhesion Molekul 1*) dan dengan melepaskan molekul khemotaktik sebagai target pengambilan monosit (MCP1 = *Monosit Chemotaktik Molekul*) Faktor deferensiasi monosit (M-CSF, *Macrophage Colony Stimulating factor*) yang mengatur migrasi, proliferasi, deferensiasi dan metaolisme monosit, macrophage dan signal khemotaktik dan mitogenik untuk otot polos vaskuler yang menstimulasi infiltrasi dan proliferasi sel otot ke dalam ruang subendothel (Flavahan NA and Vanhoutte PM, 1995).

Reaktif oksigen yang dihasilkan akibat stressor dapat juga secara langsung mempengaruhi proses signal transduksi protein G (Pieper GM and Gross GJ., 1989). Peningkatan stress oksidatif dapat terjadi sebagai penyebab dari disfungsi dalam protein G₁₂. Gaugguan signal protein G₁₂ menyebabkan endothel aktif mengembangkan proses penyakit. Hambatan fungsi protein G₁₂ akan menyebabkan peningkatan siklik AMP dalam endothel yang merupakan "dependent activation" dari factor transkripsi nuclear NFκB yang menyebabkan peningkatan adhesi monosit, pelepasan monosit chemotaktik Protein (MCP-1), factor jaringan, pelepasan macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) dan factor pertumbuhan, produksi sitokin. Hal ini sesuai dengan teori *respon to injury hypothesis*, dalam teori ini peranan endothel dianggap yang terpenting yaitu sebagai barier dan pelindung dinding arteri, bila terjadi injury terhadap endothel maka kerusakan fungsi endothel menyebabkan terpacunya aterogenesis.

Pada kelompok stressor dengan pemberian Probuocol dosis I, II (P1 dan P2) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (P01) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok stressor dengan pemberian probuocol menunjukkan penurunan penebalan lapisan tunika media seperti kontrol yang tidak menerima stressor. Hal ini seperti penelitian yang dilakukan oleh Maslachah L, (2000) pada tikus yang menerima stressor dengan pemberian Probuocol pada berbagai tingkat dosis menunjukkan penurunan kadar MDA dan "*Circulating endothel*" seperti juga pada hasil penelitian Simon BC, *et al*, 1993 yang hasilnya menunjukkan bahwa pemberian antioksidan Probuocol dapat menurunkan peroksidasi lipid plasma pada hewan yang menerima kholesterol dan mempunyai efek perlindungan terhadap sel endothel. Hal ini menunjukkan bahwa efek perlindungan Probuocol pada fungsi sel endothel mungkin

berhubungan dengan efek Probuocol sebagai antioksidan yang mempunyai kemampuan dalam menurunkan peroksidasi lipid yang mengganggu fungsi relaksasi yang tergantung endothel pada atherosklerosis. Pada penelitian ini radikal bebas yang dihasilkan akibat stressor dapat dihambat atau dicegah oleh antioksidan probucol.

Hal ini menunjukkan bahwa efek perlindungan Probuocol pada fungsi sel endotel mungkin berhubungan dengan efek Probuocol sebagai antioksidan yang mempunyai kemampuan dalam menurunkan peroksidasi lipid yang mengganggu fungsi relaksasi yang tergantung endothel pada atherosklerosis.

Probuocol bekerja sebagai antioksidan pemutus reaksi berantai dan mempunyai kemampuan menghambat peroksidasi lipid dan modifikasi oksidasi partikel LDL. Pemberian antioksidan Probuocol pada kelinci dengan diet tinggi kolesterol menunjukkan bahwa efek antioksidan Probuocol dapat meningkatkan respon relaksasi yang tergantung endothel. Diketahui bahwa pada keadaan hiperkholesterolemia dapat merangsang peningkatan pembentukan superoksida oleh endothel, superoksida ini secara langsung dapat menginaktivasi nitric oxide dan juga dapat meningkatkan oksidasi LDL dengan membentuk peroksininitrit. Studi terbaru menunjukkan bahwa Probuocol dapat meningkatkan respon endothel dependent vasodilator, tidak hanya mencegah oksidasi LDL tetapi juga memberantas radikal bebas oksigen dalam dinding pembuluh darah (Anderson *et al.*, 1995).

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

Studi terbaru menunjukkan bahwa Probuocol dapat menurunkan pembentukan O_2^- endothel pada pembuluh darah dari kelinci hiperkholesterolemia, yang ditunjukkan dengan penurunan TBARS plasma dan peningkatan endothel dependent relaksasi pada pembuluh darah hiperkholesterolemia. Mekanisme Probuocol menurunkan kecepatan produksi O_2^- masih belum jelas, mungkin Probuocol menghambat pembentukan O_2^- dan/atau meningkatkan pemberantasan O_2^- dalam dinding pembuluh darah. Peningkatan

produksi $O_2^{\cdot-}$ dalam pembuluh darah dapat menyebabkan inaktivasi nitric oxide dan pembentukan peroksinitrit yang sangat kuat efeknya pada sel endotel. Probucol tidak hanya menurunkan inaktivasi dari nitric oxide tetapi juga mempunyai efek perlindungan terhadap oksigen reaktif melalui penurunan produksi $O_2^{\cdot-}$ endotel. Induksi nitroglicerine pada relaksasi pembuluh darah dengan pemberian antioksidan Probucol tidak mempunyai efek, ini menunjukkan bahwa efek perlindungan Probucol pada disfungsi dan relaksasi pembuluh darah melalui fungsi endotel, tidak langsung mempengaruhi pada sel otot polosnya (Inoue N *et al.*, 1998).

Pada pemberian antioksidan Probucol pada berbagai tingkat dosis menunjukkan bahwa pada dosis 5 mg/ekor (P1) dan dosis 10 mg/ekor tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol.

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

Pada pemberian antioksidan Probucol dosis 20 mg /ekor menunjukkan hasil lapisan tunika media yang paling kecil dan hasilnya menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan semua kelompok perlakuan (Po1, Po2, P1, P2). Hasil penelitian ini dapat dijelaskan bahwa pada dosis 20 mg/ekor efek perlindungan oleh antioksidan Probucol masih efektif, jika dibandingkan dengan pemberian antioksidan Probucol dosis 5 mg/ekor dan Probucol dosis 10 mg/ ekor. Dikatakan oleh (Dujovne CA, 1994) bahwa pemberian antioksidan Probucol dosis 1.000 mg/hari cepat mencapai efek antioksidan yang sempurna tetapi waktu bersihan obat juga terjadi lebih cepat dari pada pasien yang menerima dosis 500 mg/hari, sehingga dapat dikatakan pemberian antioksidan Probucol

pada dosis 20 mg/ekor pada tikus putih yang menerima stressor mempunyai efek perlindungan yang sempurna terhadap endotel pembuluh darah.

Tabel II : Hasil Rata-rata Pengukuran Diameter Pembuluh Darah Aorta (μm) Tikus Putih Jantan pada Berbagai Perlakuan

Perlakuan	Rata-rata Diameter pembuluh Darah Aorta (μm)
Po1	1659,81 ^a \pm 138,5814
Po2	1826,06 ^a \pm 167,9038
P1	1767,75 ^a \pm 278,4775
P2	1747,60 ^a \pm 280,0271
P3	1776,91 ^a \pm 183,6044

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Po1 : Kontrol

Po2 : Kontrol stressor

P1 : Stressor + antioksidan Probucol dosis I (5 mg/ekor)

P2 : Stressor + antioksidan Probucol dosis II (10 mg/ekor)

P3 : Stressor + antioksidan Probucol dosis III (20 mg/ekor)

Berdasarkan hasil pengukuran diameter pembuluh darah yang diperoleh, kemudian dianalisis dengan menggunakan analisis Varian dengan signifikansi 5% didapatkan F hitung lebih kecil dari F tabel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan (Po1, Po2, P1, P2, P3) $p > 0,05$

Tabel III : Hasil Rata-rata Pengukuran Diameter Lumen Pembuluh Darah Aorta (μm) Tikus Putih Jantan pada Berbagai Perlakuan.

Perlakuan	Rata-rata Diameter Lumen (μm)
Po1	983,5714 ^a \pm 155,0144
Po2	948,3029 ^a \pm 133,5927
P1	944,1514 ^a \pm 212,6185
P2	1053,9229 ^a \pm 190,0708
P3	1141,1471 ^a \pm 266,1936

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Po1 : Kontrol

Po2 : Kontrol stressor

P1 : Stressor + antioksidan Probuocol dosis I (5 mg/ekor)

P2 : Stressor + antioksidan Probuocol dosis II (10 mg/ekor)

P3 : Stressor + antioksidan Probuocol dosis III (20 mg/ekor)

Berdasarkan hasil pengukuran diameter lumen pembuluh darah aorta yang diperoleh, kemudian dianalisis dengan menggunakan analisis Varian dengan signifikansi 5% didapatkan F hitung lebih kecil dari F tabel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan (Po1, Po2, P1, P2, P3) $p > 0,05$.

Tidak adanya pengaruh secara statistik pada diameter pembuluh darah aorta dan diameter lumen pembuluh darah aorta menunjukkan bahwa fungsi kontraktilitas dan pulsatil pembuluh darah aorta masih dapat dipertahankan walaupun sudah nampak adanya perubahan-perubahan pada dinding pembuluh darah secara umum, tetapi berdasarkan hasil pengukuran diameter pembuluh darah aorta pada kelompok stressor (P02) mempunyai diameter pembuluh darah yang lebih besar dan diameter lumen yang lebih kecil jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang menerima stressor dan penambahan antioksidan Probuocol (Po1, P1, P2, P3). Hal ini

menunjukkan adanya kecenderungan pelebaran diameter pembuluh darah akibat pemberian stressor. Tidak adanya perbedaan mungkin disebabkan karena perlu waktu yang lebih lama untuk terjadinya perubahan pada pembuluh darah karena penelitian ini dilakukan dalam waktu pendek (3 minggu).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian Antioksidan Probucol dapat menghambat dan mencegah terjadinya proses aterogenesis penebalan tunika media pada tikus putih yang menerima stressor.
2. Pemberian Antioksidan Probucol tidak berpengaruh terhadap proses aterogenesis pelebaran diameter pembuluh darah aorta pada tikus putih yang menerima stressor.
3. Pemberian Antioksidan Probucol tidak berpengaruh terhadap proses aterogenesis penyempitan diameter lumen pembuluh darah pada tikus putih yang menerima stressor.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh antioksidan Probucol pada tikus yang menerima stressor terhadap proses aterogenesis dengan mengamati perubahan morfofungsional dari sel maupun metrik ekstraseluler penyusun pembuluh darah arterial dengan teknik biomolekuler
2. Perlu dilakukan penelitian yang lebih lama untuk sampai terjadi perubahan pada diameter pembuluh darah dan diameter lumen pembuluh darah aorta akibat stressor
3. Perlu dilakukan penelitian pengaruh pemberian antioksidan Probucol terhadap hewan kontrol yang tidak diberi stressor.

DAFTAR PUSTAKA

- Alwi J : 1996 . Peran Triad lipid Pada Penyakit Jantung Koroner. *Medika* . Desember No 12 Thn XXII. Hal 963 –973
- Assman G. 1982. *Lipid Metabolism and Atherosclerosis*. FK. Schattaver Verlus Stuttgart.
- Atkinson RL, et al. 1993. *Introduction To Psychology*. 8th Ed. Harcourt Brace Jovanovich, Inc. pp. 222-237.
- Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC. 1995. The effect of cholesterol Lowering And antioxidant Therapy On Endothelium dependent Coronary Vasomotion . *N Engl . j. Med* 332 ; 488 –493
- Badimon JJ, V. Fuster, J.H. Chesebro and C. Badiman 1993. Coronary Atherosclerosis A. Multifactorial Disease *Circulation* : 87 (Suppl II) : 11-3 – 11-16.
- Baumann R, Ziprian H, Godicke W, 1973. The Influence Acute Psychic Stress Situations On Essential Hypertensive At The Early Stage Of The Disease, *Psychother, Psychosom* 22 : 131-140.
- Brady PS, Bady LJ, Ulliey DE. 1979. Selenium , Vitamin E And The Response to Swimming Stress in The Rat . *J. Nutr* 109 . 1103 – 1109
- Busse R, Mulsch A, Fleming I, Hecker M 1993. Mechanisms of Nitric Oxide Release from The Vascular Endothelium. *Circulation*. May, 87. May 87 (5) : V. 18-25
- Chandrasoma, Taylor, 1991. *Concise Pathologi*. London : Prentise-Hall International Inc. Pp. 48-70.
- Chen TH, Tseng HP, Yang JY. 1998. Effect of Antioxidant In Endothelial Cells Exposed for Oxidized Low Density Lipoprotein *life Sciences* (62) 19 : 277-282
- Coveli V, 1992. What Is Stress. How Does It Correlate With The Immune System. In *Stress And The Immune System*. *Annals New York Academy Of Sciences*. Pp. 212-215.
- Dujovne CA, Harris WS, Collegerrond LL 1994. Comparison Of Effects Of Probucol Versus Vitamin E On Ex Vivo Oxidation Susceptibility Of Lipoprotein In Hyperlipoproteinemia. *The American Journal Of Cardiology*. July 1 (74) : 38-42.

- Evans CR and Bruckdorfer KR. 1992. Free Radical , Lipoprotein And Cardiovascular Dysfunction. A.J.H February .8 Part 2 (5) : 28s – 41s.
- Flavahan Na and Vanhoutte PM. 1995. Endothel Cell Signaling And Endothelial Dysfunction. AJH. February 8 part 2 (5) 28S-41s.
- Fuster, V.L. Badimun, J.H. Cheselro 1992 The Patogenesis Of Coronary Artery Disease and The Acute Coronary Cyndroms (First of two parts N. Engl). Med 326 : 242-256).
- Guyton A.C. 1981. Guyton Textbook of Medical Physiology 6th Ed. WB. Saunders. Company Philadelphia, London, Toronto P. 259-269.
- J. Truebis, V Gonzalez, et al .1997. Effect Probuocol Treatment on Gen Expression of VCAM-I, MCP-1 and M-CSF in the Aortic Wall of LDL receptor Deficient Rabbits During Early atherogenesis . Arteripscler- tromb- Vasc- Biol. July 17 (7) : 1289 – 1303.
- Iuoue N, Ohara Y, et al. 1998. Probuocol Improves Endothelial-dependent Relaxation and Decreases vascular Superoxide Production in Cholesterol -fed Rabbits. Am j Med sci. Apr. 8(8):4-6.
- Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, 1993. Effect Of Strenuous Exercise On Platelet Activation State And Reactivity Circulation 88 (1) : 1502-1511.
- Li LX, Chen JX. et al. 1998. Probuocol Inhibits Oxidized LDL- induced adhesion of Monocytes to Endothelial Cells by reducing P- selectin synthesis in vitro. Endothelium. 6 (1):1-8.
- Lusher TF, Tanner FC, 1993. Endothelial Regulation of Vascular Tone and Growth. A.J.H. July. Part 2. 6 (7): 283S-293S.
- Maslachah L. 2000 Pengaruh antioksidan Probuocol Terhadap Kadar Malondialdehide (MDA) Dalam Darah Dan Jumlah Circulating Endothel Pada Tikus Yang Menerima stressor. Thesis Program PascaSarjana Unair
- Massey V, et al. 1970 . On Mechanism of Inactivation of Xanthine Oxidase by allopurinol. journal of Biological chemistry. 245:2837-2844.
- O' Brien KD, A Chant. 1994. The Biology OfThe Artery Wall in atherogenesis . Medical Clinic North Am : 41 – 67.
- Opie LH, 1991. Lipid Lowering and Anti Atherosclrotic Drug. In. Drug For The Heart. 3th. Ed . Sanders Company philadelphia. pp. 247-261.

- Reynolds JEE. 1993. Martindale The Extra Pharmacopeia 30 th Ed. London. The Pharmaceutical Press Pp 993
- Riley 1981. Psychoneuroendocrinologi on Immono Comepence and Neoplasia science 212 ; 1100-1109
- Singodimedjo, P 1977. Perubahan dinding Arteri Pada tikus Betina Setelah Pemberian Injeksi Obat Kontrasepsi Depo Provera. Laporan Penelitian Lembaga penelitian Universitas Gajah mada . Jogyakarta hal 15 -19.
- Sluy H.C. 1994 Changes In Component and Structure Of Atherosclerotic Lesions Developing From Childhood to Middle Age In Coronary Arteries. Steinkopff Verlag Darmstad H. Germany.
- Sozmen B, Kazaz L, Taskiran D, Tuzun S, and Sozmen EY, 1998. Effect of N Dicycloprorylmethyl-amino-2-oxazoline (s-3341) on Antioxidant Status and Nitric Oxide in Hypertensive patients, Current Medical Research and Opinion. 14(2): 89-96
- Suryohudoyo P. 1997. Oksidan dan antioksidan Pada diabetes Mellitus . diabetes update iii. Surabaya 14- 15 November 1997. Hal 27 -39.
- Vanhotte PM. 1993. Other Endothelium Derived Vasoactive Factors. Circulation . May 87 (5) V9 -V17
- Ward PA. Warren JS and Johnson K.I. 1988. Oxigen Radical , Inflammation and Tissue Injury. Free Radical Biology & Medicine 5 : 403 - 408.
- Wijaya a 1996. Radikal Bebas dan Parameter status antioksidan . Forum Diagnosticum Prodia. Diagnostics Educational Cervices . hal 1-12
- Wilner P, 1990. Animal Models Of Depression : an Overview Prarmac. Ther. 45 : 423-455

lampiran 1 : Hasil Pengukuran Ketebalan Tunika Media (μm) Aorta Tikus Putih Jantan Pada Berbagai Perlakuan dan Pengolahan Data

Ulangan	Perlakuan				
	Po1	Po2	P1	P2	P3
1	36.71	45.26	41.58	39.71	37.56
2	42.30	41.53	47.86	37.54	32.59
3	42.01	57.17	44.22	42.44	34.66
4	40.34	45.21	39.54	43.86	34.75
5	41.83	50.46	40.59	44.75	35.60
6	40.25	46.54	35.35	30.05	35.15
7	40.32	43.53	37.68	42.26	32.04
$\bar{X} \pm SD$	40.53 \pm 1.9046	47.10 \pm 5.2239	40.97 \pm 4.1434	40.09 \pm 5.0598	34.62 \pm 1.8566

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		DATA
N		35
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	40.6640
	Std. Deviation	5.4542
Most Extreme Differences	Absolute	.087
	Positive	.087
	Negative	-.076
Kolmogorov-Smirnov Z		.513
Asymp. Sig. (2-tailed)		.955

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

DATA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	7	40.5371	1.9046	.7199	38.7757	42.2986	36.71	42.30
2.00	7	47.1000	5.2239	1.9745	42.2687	51.9313	41.53	57.17
3.00	7	40.9743	4.1434	1.5660	37.1423	44.8063	35.35	47.86
4.00	7	40.0871	5.0598	1.9124	35.1076	44.7667	30.05	44.75
5.00	7	34.6214	1.8566	.7017	32.9044	36.3385	32.04	37.56
Total	35	40.6640	5.4542	.9219	38.7904	42.5376	30.05	57.17

Test of Homogeneity of Variances

DATA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.903	4	30	.136

ANOVA

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	548.659	4	137.165	8.892	.000
Within Groups	462.793	30	15.426		
Total	1011.452	34			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DATA
LSD

(I) FAKTOR	(J) FAKTOR	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-6.5629*	2.0994	.004	-10.8504	-2.2753
	3.00	-.4371	2.0994	.836	-4.7247	3.8504
	4.00	.4500	2.0994	.832	-3.8376	4.7376
	5.00	5.9157*	2.0994	.008	1.6281	10.2033
2.00	1.00	6.5629*	2.0994	.004	2.2753	10.8504
	3.00	6.1257*	2.0994	.007	1.8381	10.4133
	4.00	7.0129*	2.0994	.002	2.7253	11.3004
	5.00	12.4786*	2.0994	.000	8.1910	16.7662
3.00	1.00	.4371	2.0994	.836	-3.8504	4.7247
	2.00	-6.1257*	2.0994	.007	-10.4133	-1.8381
	4.00	.8871	2.0994	.676	-3.4004	5.1747
	5.00	6.3529*	2.0994	.005	2.0653	10.6404
4.00	1.00	-.4500	2.0994	.832	-4.7376	3.8376
	2.00	-7.0129*	2.0994	.002	-11.3004	-2.7253
	3.00	-.8871	2.0994	.676	-5.1747	3.4004
	5.00	5.4657*	2.0994	.014	1.1781	9.7533
5.00	1.00	-5.9157*	2.0994	.008	-10.2033	-1.6281
	2.00	-12.4786*	2.0994	.000	-16.7662	-8.1910
	3.00	-6.3529*	2.0994	.005	-10.6404	-2.0653
	4.00	-5.4657*	2.0994	.014	-9.7533	-1.1781

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

Lampiran 2 : Hasil Pengukuran Diameter pembuluh Darah Aorta (μm) Tikus Putih Jantan P Pada Berbagai Perlakuan

Ulangan	Perlakuan				
	Po1	Po2	P1	P2	P3
1	1592,14	1711,27	1515,87	2190,10	2118,01
2	1415,90	1974,37	1910,19	1342,04	1632,69
3	1690,36	1928,77	2303,32	2010,45	1600,03
4	1726,06	1979,54	1573,02	1663,49	1674,71
5	1873,90	1547,00	1704,99	1756,09	1831,08
6	1660,63	1925,48	1544,42	1702,01	1891,07
7	1659,72	1716,00	1822,48	1569,02	1690,79
$\bar{X} \pm \text{SD}$	1659,81 \pm 138,5814	1826,06 \pm 167,9038	1767,7557 \pm 278,4775	1747,60 \pm 280,0271	1776,91 \pm 183,6044

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean	Std. Deviation	Variance
P01	7	1415.90	1873.90	11618.71	1659.8157	138.5814	19204.815
P02	7	1547.00	1979.54	12782.43	1826.0614	167.9038	28191.580
P1	7	1515.87	2303.32	12374.29	1767.7557	278.4775	77549.694
P2	7	1342.04	2190.10	12233.20	1747.6000	280.0271	78415.187
P3	7	1600.03	2118.01	12438.38	1776.9114	183.6044	33710.590
Valid N (listwise)	7						

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		DATA
N		35
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1755.6289
	Std. Deviation	211.8594
Most Extreme Differences	Absolute	.155
	Positive	.155
	Negative	-.074
Kolmogorov-Smirnov Z		.920
Asymp. Sig. (2-tailed)		.366

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

DATA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.088	4	30	.380

ANOVA

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	103637.6	4	25909.409	.546	.703
Within Groups	1422432	30	47414.393		
Total	1526069	34			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DATA

LSD

(I) FAKTOR	(J) FAKTOR	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-166.2457	116.3914	.164	-403.9488	71.4573
	3.00	-107.9400	116.3914	.361	-345.6431	129.7631
	4.00	-87.7843	116.3914	.457	-325.4873	149.9188
	5.00	-117.0957	116.3914	.322	-354.7988	120.6073
2.00	1.00	166.2457	116.3914	.164	-71.4573	403.9488
	3.00	58.3057	116.3914	.620	-179.3973	296.0088
	4.00	78.4614	116.3914	.505	-159.2416	316.1645
	5.00	49.1500	116.3914	.676	-188.5531	286.8531
3.00	1.00	107.9400	116.3914	.361	-129.7631	345.6431
	2.00	-58.3057	116.3914	.620	-296.0088	179.3973
	4.00	20.1557	116.3914	.864	-217.5473	257.8588
	5.00	-9.1557	116.3914	.938	-246.8588	228.5473
4.00	1.00	87.7843	116.3914	.457	-149.9188	325.4873
	2.00	-78.4614	116.3914	.505	-316.1645	159.2416
	3.00	-20.1557	116.3914	.864	-257.8588	217.5473
	5.00	-29.3114	116.3914	.803	-267.0145	208.3916
5.00	1.00	117.0957	116.3914	.322	-120.6073	354.7988
	2.00	-49.1500	116.3914	.676	-266.8531	188.5531
	3.00	9.1557	116.3914	.938	-228.5473	246.8588
	4.00	29.3114	116.3914	.803	-208.3916	267.0145

Lampiran 3 : Hasil Pengukuran Diameter Lumen Pembuluh Darah Aorta (μm) Tikus Putih Jantan Pada berbagai Perlakuan Dan Pengolahan data.

Ulangan	Perlakuan				
	Po1	Po2	P1	P2	P3
1	127,27	960,14	777,66	744,11	635,41
2	749,15	930,63	1140,67	1175,59	1480,36
3	960,99	823,80	800,06	999,38	1338,64
4	919,73	850,21	1093,08	1206,12	1239,08
5	1009,18	867,26	1133,11	1160,65	1104,82
6	982,47	1219,34	607,29	860,99	1087,12
7	990,19	986,74	1057,19	1230,62	1102,60
$\bar{X} \pm SD$	983,5714 \pm 155,0144	948,3029 \pm 133,5927	944,1514 \pm 212,6185	1053,9229 \pm 190,0708	1141,1471 \pm 266,1936

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean	Std. Deviation	Variance
P01	7	749.15	1273.29	6885.00	983.5714	155.0144	24029.454
P02	7	823.80	1219.34	6638.12	948.3029	133.5927	17847.018
P1	7	607.29	1140.67	6609.06	944.1514	212.6185	45206.614
P2	7	744.11	1230.62	7377.46	1053.9229	190.0708	36126.907
P3	7	635.41	1480.36	7988.03	1141.1471	266.1936	70859.028
Valid N (listwise)	7						

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		VAR00002
N		35
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1014.2191
	Std. Deviation	199.9691
Most Extreme Differences	Absolute	.071
	Positive	.055
	Negative	-.071
Kolmogorov-Smirnov Z		.419
Asymp. Sig. (2-tailed)		.995

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

VAR00002

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.146	4	30	.354

ANOVA

VAR00002

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	195165.8	4	48791.445	1.257	.309
Within Groups	1164414	30	38813.804		
Total	1359580	34			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00002

LSD

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	35.2686	105.3074	.740	-179.7979	250.3351
	3.00	39.4200	105.3074	.711	-175.6465	254.4865
	4.00	-70.3514	105.3074	.509	-285.4179	144.7151
	5.00	-157.5757	105.3074	.145	-372.6422	57.4908
2.00	1.00	-35.2686	105.3074	.740	-250.3351	179.7979
	3.00	4.1514	105.3074	.969	-210.9151	219.2179
	4.00	-105.6200	105.3074	.324	-320.6865	109.4465
	5.00	-192.8443	105.3074	.077	-407.9108	22.2222
3.00	1.00	-39.4200	105.3074	.711	-254.4865	175.6465
	2.00	-4.1514	105.3074	.969	-219.2179	210.9151
	4.00	-109.7714	105.3074	.306	-324.8379	105.2951
	5.00	-196.9957	105.3074	.071	-412.0622	18.0708
4.00	1.00	70.3514	105.3074	.509	-144.7151	285.4179
	2.00	105.6200	105.3074	.324	-109.4465	320.6865
	3.00	109.7714	105.3074	.306	-105.2951	324.8379
	5.00	-87.2243	105.3074	.414	-302.2908	127.8422
5.00	1.00	157.5757	105.3074	.145	-57.4908	372.6422
	2.00	192.8443	105.3074	.077	-22.2222	407.9108
	3.00	196.9957	105.3074	.071	-18.0708	412.0622
	4.00	87.2243	105.3074	.414	-127.8422	302.2908

Lampiran 4 : Hasil Penelitian.



Gambar 4 . Potongan membujur aorta tikus putih jantan kelompok Kontrol Po1 dengan menggunakan pewarnaan HE dan pembesaran 40 X.
i = inti sel otot polos, e = sabut elastis, tm = tunika media,
ta = tunika adventisia.



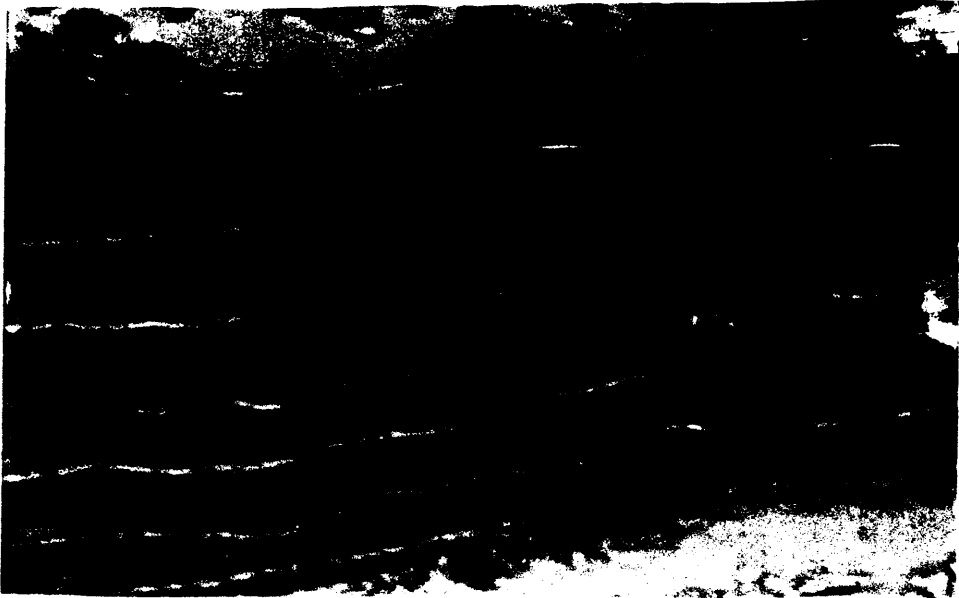
Gambar 5 . Potongan membujur aorta tikus putih jantan kelompok Kontrol stressor Po2 dengan menggunakan pewarnaan HE dan pembesaran 40 X.
i = inti sel otot polos, e = sabut elastis, tm = tunika media,
ta = tunika adventisia.



**Gambar 6 . Potongan membujur aorta tikus putih jantan kelompok P1 (Stressor dengan penambahan antioksidan Probucol dosis I (5 mg / ekor) dengan menggunakan pewarnaan HE dan pembesaran 40 X
i = inti sel otot polos, e = sabut elastis, tm = tunika media,
ta = tunika adventisia.**



**Gambar 7 . Potongan membujur aorta tikus putih jantan kelompok Kontrol P2 (Stressor dengan penambahan antioksidan Probucol dosis II (10 mg / ekor) dengan menggunakan pewarnaan HE dan pembesaran 40 X.
i = inti sel otot polos, e = sabut elastis, tm = tunika media,
ta = tunika adventisia.**



Gambar 8 . Potongan membujur aorta tikus putih jantan kelompok Kontrol P3 (Stressor dengan penambahan antioksidan Probuocol dosis III (20 mg / ekor) dengan menggunakan pewarnaan HE dan pembesaran 40 X. i = inti sel otot polos, e = sabut elastis, tm = tunika media, ta = tunika adventisia.