

1512
TKD 08/02
Niz
P

TESIS

**PENGARUH STRESOR EPINEFRIN TERHADAP PROLIFERASI
OTOT POLOS PEMBULUH DARAH TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*) STRAIN WISTAR**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



IHYA RIDLO NIZOMY

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2002

**PENGARUH STRESOR EPINEFRIN TERHADAP PROLIFERASI
OTOT POLOS PEMBULUH DARAH TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*) STRAIN WISTAR**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

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

Oleh :

IHYA RIDLO NIZOMY

NIM. 099913293/M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

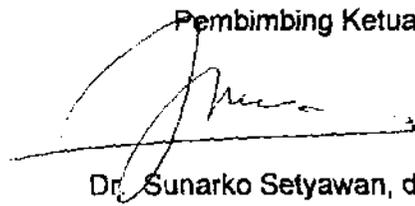
2002

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 12 FEBRUARI 2002

Oleh :

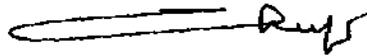
Pembimbing Ketua



Dr. Sunarko Setyawan, dr., MS.

NIP 131 949 832

Pembimbing

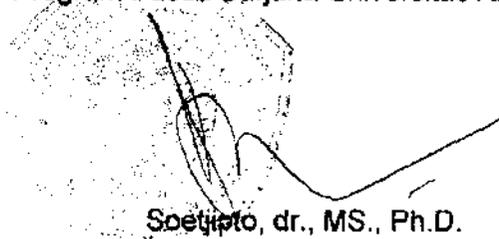


Choesnan Effendi, dr., AIF.

NIP 130 422 850

Mengetahui :

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga



Soetipito, dr., MS., Ph.D.

NIP 130 687 606

Telah diuji pada
Tanggal 7 Februari 2002

PANITIA PENGUJI TESIS

- Ketua** : Prof. Martin Setiabudi, dr., Ph.D.
- Anggota** : 1. Dr. Sunarko Setyawan, dr., MS
2. Choesnan Effendi, dr., AIF.
3. Dr. Paulus Liben, dr., MS.
4. Muhammad Cholil Munif, dr., AIF.
5. Tjitra Wardhani, dr., MS.

**THE EFFECT OF EPINEPHRINE-STRESSOR ON VASCULAR SMOOTH
MUSCLE CELLS PROLIFERATION IN VIVO ON
Rattus norvegicus STRAIN WISTAR**

Ihya Ridlo Nizomy

ABSTRACT

The research was conducted to investigate the effect of epinephrine (E) in vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferations in vivo using histomorphological femoral artery induced by artificial stressor (epinephrine-stressor). This posttest only control group design consists of 24 males Wistar rat weight 150 – 200 grams, divided into 2 groups for treatment and 1 control group for separate pretest. The 1st treatment group were injected i.m with 0,125 ml E containing 0,05 mg.ml⁻¹ Epinephrine bitartras (ETHICA) per 200 grams (300 times dilution with Saline), and 2nd treatment group with Saline (OTSUKA Indonesia) for the same doses, twice a day at 7 AM and 7 PM. After 14 days treatment, the samples euthanized with aether aenestheticus and femoral artery removed for histological cross luminal section preparation with Hematoksiline-Eosin dyes. The histomorphometry analysis i.e luminal area, medial thickness and VSMCs number (nuclei) counting were determined to established VSMCs proliferation. This analysis used *Adobe Photoshop 5,0* (Adobe Inc. USA) computerized programme from scanned preparation's pictures calibrated with micrometer's objective glass (OB- μ -1/100 Olympus Japan) in the camera-light-microscope (Olympus-C-35AD-4 -Olympus BH-2; Japan).

The experimental showed that there were increased of medial thickness and cell number between 2 groups of treatment $33,61 \pm 5,12 \mu\text{m}$ and 157 ± 41 versus $63,33 \pm 13,8 \mu\text{m}$ and 223 ± 45 respectively, but not for the luminal area. There were decreased of luminal area from Epinephrine group ($8,548.10^4 \pm 1,110 \mu\text{m}^2$) to Saline group ($8,466.10^4 \pm 3,262 \mu\text{m}^2$). Statistical multivariate analysis showed that there were significant difference in Hotelling's Trace value ($p < 0,01$) of three dependent variables for each treatment group. Continous analysis with univariate results significant difference ($p < 0,01$) for all dependent variables between and within group of treatment. Further analysis with discriminant analysis resulted 2 discriminant variables i.e luminal area and medial thickness ($p < 0,05$). After all, without ignoring any disturbing factors such as preparation technical false, these data suggest that we successfully proved the VSMCs proliferation stimulated by epinephrine-stressor.

Key words : VSMCs proliferation, epinephrine, histomorphometry, femoral artery

**PENGARUH STRESOR EPINEFRIN TERHADAP PROLIFERASI
OTOT POLOS PEMBULUH DARAH TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*) STRAIN WISTAR**

Ihya Ridlo Nizomy

RINGKASAN

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab pertanyaan apakah stresor epinefrin menyebabkan proliferasi otot polos pembuluh darah. Regulasi tonus pembuluh darah (tonus vaskular) merupakan salah satu faktor penting dalam sistem sirkulasi. Tonus vaskular yang diperankan oleh mekanisme kontraksi dan relaksasi otot polos pembuluh darah, dikendalikan secara neurohumoral oleh rangsangan saraf dan secara lokal oleh endotel. Proliferasi otot polos (*myoproliferation*) vaskuler menyebabkan penebalan tunika media dinding pembuluh darah dan penyempitan lumen pembuluh darah, pada gilirannya akan mengganggu fungsi regulasi tonus vaskular. Keadaan ini ternyata dapat diakibatkan oleh peningkatan kadar epinefrin plasma yang tinggi melalui peningkatan sekresi ET-1 pada kondisi stres.

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk membuktikan mekanisme terjadinya proliferasi otot polos pembuluh darah yang disebabkan oleh stresor epinefrin. Secara khusus tujuannya adalah (1) membuktikan bahwa stresor epinefrin menyebabkan peningkatan jumlah inti otot polos pembuluh darah, (2) membuktikan bahwa stresor epinefrin menyebabkan proliferasi tunika media pembuluh darah, dan (3) membuktikan bahwa stresor epinefrin menyebabkan penurunan luas area lumen dinding pembuluh darah.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *Separate Pretest-Randomized Posttest Control Group Design*, menggunakan 24 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar, umur 3-4 bulan (dewasa) dengan berat 150-200 gram, dan sehat. Besar sampel kelompok perlakuan 1 (kelompok Epinefrin) dan 2 (kelompok Salin) serta kelompok *pretest* masing-masing 8 ekor. Kelompok 1 dan 2 berturut-turut diberikan injeksi intramuskular (i.m) epinefrin bitartras (PT.ETHICA 1 mg/ml), dan kelompok perlakuan 2 (kelompok Salin) diberikan injeksi i.m larutan NaCl 0,9% (PT.Otsuka Indonesia). Sedangkan kelompok 3 adalah kelompok kontrol *pretest* (kelompok *Pretest*) yang tidak diberikan perlakuan apapun sebagai kelompok *pretest* yang terpisah (*separate pretest*). Perlakuan berupa pemberian epinefrin injeksi i.m larutan epinefrin bitartras 0,125 ml/200 gram yang mengandung 0,05 mg/200 gram BB (pengenceran 300x) (Ingle, 1962) pada kelompok Epinefrin dan 0,125 ml/200 gram larutan NaCl 0,9% pada kelompok Salin, 2 kali sehari pada pukul 07.00 dan 19.00 WIB, terus menerus selama 14 hari.

Pada akhir perlakuan tiap tikus dikorbankan dan diambil arteri femoralis beserta jaringan disekitarnya untuk diproses menjadi preparat histologis dengan pewarnaan Hematoksilin & Eosin. Variabel-variabel proliferasi otot polos pembuluh darah berupa luas area lumen (LAL), tebal tunika media (TTM) dan jumlah inti otot polos (JIOP) diukur berdasarkan pengamatan histomorfologis sediaan a. femoralis yang telah difoto dengan *camera light-microscope* yang dikalibrasi dengan *micrometer's objective glass*. Hasil scan foto tersebut kemudian dilakukan analisis histomorfometri (3 x pengulangan) dengan bantuan program komputer *Adobe Photoshop 5.0*.

Hasil analisis histomorfometri menunjukkan nilai LAL, TTM dan JIOP (rerata \pm simpang baku) berturut-turut untuk kelompok Epinefrin adalah $85.480 \pm$

11.100 μm^2 ; $63,33 \pm 13,8 \mu\text{m}$; 223 ± 45 per tunika media, kelompok Salin $84.660 \pm 32.620 \mu\text{m}^2$; $33,61 \pm 5,12 \mu\text{m}$; 157 ± 41 per tunika media, dan kelompok *Pretest* adalah $45.660 \pm 12.460 \mu\text{m}^2$; $27,25 \pm 2,68 \mu\text{m}$; 110 ± 12 per tunika media. Perhitungan dengan metode statistik MANOVA, menunjukkan bahwa stresor epinefrin menyebabkan proliferasi otot polos pembuluh darah, karena terdapat perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$) antara kelompok Epinefrin dibanding kelompok salin dan atau kelompok *Pretest*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmaanirrahim.

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur atas rakhmat Allah Yang Maha Kuasa dengan segala karunia-Nya, sehingga penelitian ini dapat selesai pada waktunya.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Dr. Sunarko Setyawan, dr., MS., selaku pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian, kesabaran dan welas asih selalu memberikan bimbingan, kritik-saran serta dorongan dan motivasi sejak penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian sampai selesainya thesis ini.

Terima kasih yang tak ternilai dan penghargaan serta penghormatan setingginya saya sampaikan kepada dr. Choesnan Effendi, AIF., selaku pembimbing dan Ketua Minat Ilmu Faal Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, yang selalu bersedia meluangkan waktu, tenaga, perasaan dan fikiran untuk membantu dengan berbagai cara baik sebelum, selama dan pada akhir penyusunan thesis ini.

Kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan Nasional, saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya karena telah memberikan kesempatan kepada saya menimba ilmu sebagai penerima Beasiswa BPPS di Program Pasca Sarjana UNAIR.

Dalam kesempatan ini pula, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah bersedia membantu saya, yakni :

1. Rektor Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin, Prof. H. Alfian Noor, dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru, dr. H. Hasni Hasan Basri, Sp.A, karena telah mengizinkan saya mengikuti pendidikan S2 di Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.
2. Rektor Universitas Airlangga, yaitu Prof. Dr.Med.Puruhito, dr.,Sp.BP, dan mantan rektor Prof.H. Soedarto, dr., DTMH, Ph.D, Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr.,Sp.P., mantan Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Prof. Soedijono, dr. dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof. Dr. HMS Wiyadi, dr, Sp.THT. yang telah memberikan kesempatan menjadi mahasiswa di Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.

3. Kepala Laboratorium Ilmu Faal, dr. Harjanto, dan mantan Kepala Laboratorium Ilmu Faal Prof. Martin Setiabudi, dr., Ph.D, yang dengan penuh kekeluargaan disertai hati dan tangan terbuka telah memfasilitasi saya sehingga dapat belajar dan menimba ilmu serta pengalaman di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
4. Kepala Laboratorium Anatomi dan Histologi, dr. H. Abdul Kamid, MS, dan mantan Kepala Laboratorium Ilmu Biokimia Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., serta dr. Soetjipto, MS., Ph.D sebagai Kepala Laboratorium Ilmu Biokimia sekaligus Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar yang telah banyak membantu dalam perizinan dan penggunaan fasilitas di laboratorium masing-masing dalam rangka pelaksanaan penelitian saya.
5. Panitia penguji proposal dan thesis : Prof. Martin Setiabudi, dr., Ph.D, Dr. Sunarko Setyawan, dr., MS., Dr. Paulus Liben, dr. MS., dr. Choesnan Effendi, AIF., dr. Muhammad Cholil Munif, AIF, dan dr. Tjitra Wardhani, MS., yang telah memberikan saran perbaikan dan kritik membangun terhadap thesis saya.
6. Seluruh staf pengajar dan karyawan Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran UNAIR yang telah membantu dengan tulus dan ikhlas memberikan ilmu dan pengalamannya selama berinteraksi dan bergaul dengan saya.
7. Kepada Bapak Herry Soemantoro, Mawardid dan Soejitno yang telah banyak membantu dalam penyediaan dan pemeliharaan hewan coba, pengambilan dan preparasi unit analisis penelitian di Laboratorium Ilmu Biokimia dan ilmu Anatomi Fakultas Kedokteran Unair
8. Semua pihak yang telah membantu penyelesaian penelitian ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Kepada yang tercinta dr. Moriko Pratiningrum, terima kasih atas dukungan moril, pengertian, kesabaran dan pengorbanan lahir batin yang telah diberikan selama saya melalui proses pendidikan ini.

Akhirnya, kepada mama (Hj. Nurhayati) dan abah (H. Djohanis Anang), terima kasih tak terhingga atas jerih payah, pengorbanan dan kucuran do'a yang telah ananda terima mulai lahir sampai saat ini, yang tidak mungkin akan dapat terbalaskan. Untuk itu ananda persembahkan thesis dan gelar kesarjanaan ini untuk ibunda dan ayahanda tercinta.

Tak ada gading yang tak retak. Oleh karena keterbatasan kemampuan dalam menyusun thesis ini, kami sangat mengharapkan kritik dan saran membangun demi kesempurnaannya, walaupun telah diupayakan sedemikian rupa. Kami berharap semoga thesis ini memberikan manfaat bagi para pemerhati.

Billahit taufik wal hidayah, wassalamu'alaium wr. wb.

Surabaya, Februari 2002

Penulis

DAFTAR ISI

Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	ix
Abstract	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Anatomi Pembuluh Darah.....	4
2.2 Endotel.....	12
2.3 Pengaturan Aliran Darah	13
2.4 Mekanisme Kontrol Tonus Vaskuler	15
2.5 Hubungan Endotel dengan Struktur Vaskuler.....	23
2.6 Hubungan Endotel dengan Tonus Vaskuler	24
2.7 Endotel dan Potensial Membran Otot Polos Vaskuler.....	26
2.8 Interaksi antara Norepinefrin dan Endotel	27

2.9 Pengaruh Pelepasan Neurotransmitter oleh Endotel	28
2.10 Sistem Simpatoadrenal	28
2.11 Mekanisme Proliferasi Otot Polos	36
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	40
3.2 Hipotesis Penelitian	42
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian	44
4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel	45
4.3 Variabel Penelitian	45
4.4 Definisi Operasional Penelitian	46
4.5 Bahan Penelitian	48
4.6 Instrumen Penelitian	49
4.7 Prosedur Penelitian	50
4.8 Lokasi dan Waktu Penelitian	52
4.9 Tahapan Analisis Data	52
BAB 5 HASIL PENELITIAN	
5.1 Hasil Uji Normalitas Distribusi Data	53
5.2 Hasil Uji Statistika Deskriptif	53
5.3 Hasil Uji Manova	55
5.4 Hasil Analisis Diskriminan	55
5.5 Penentuan Pola	56
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Pembahasan Metode Penelitian	58
6.2 Pembahasan Pemilihan Uji Statistik	61
6.3 Pembahasan Hasil penelitian	62
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	69
7.2 Saran	69
DAFTAR PUSTAKA	70
LAMPIRAN	75

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Hasil Uji Kolmogorof-Smirnov Data Variabel Proliferasi Otot Otot Polos Pembuluh Darah Berdasarkan Kelompok Perlakuan	53
Tabel 5.2 Data Rerata dan Simpangan baku Variabel Proliferasi Otot Polos Pembuluh darah	54
Tabel 5.3 Hasil Analisis Nilai Hotelling Trace antara perlakuan	55
Tabel 5.4 Hasil Analisis Univariat (<i>test between subject effect</i>) untuk Kelompok Perlakuan	55
Tabel 5.5 Hasil Analisis Diskriminan dari Variabel Tergantung	56
Tabel 5.6 Klasifikasi Koefisien Fungsi Diskriminan Linear Fisher	56
Tabel 5.7 Kontribusi Variabel Pembeda Menurut Kelompok Perlakuan	56

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Gambar arteri ukuran sedang.....	5
Gambar 2.2 Penampang arteri ukuran sedang	6
Gambar 2.3 Fotomikrograf potongan arteri ukuran sedang	6
Gambar 2.4 Fotomikrograf potongan arteriol dan venula	7
Gambar 2.5 Fotomikrograf 2 arteri kecil dan vena kecil	9
Gambar 2.6 Perbandingan struktur arteri dan vena ukuran sedang	11
Gambar 2.7 Fotomikrograf potongan vena besar	11
Gambar 2.8 Skema sistem regulator tonus vaskuler perifer	16
Gambar 2.9 Struktur Endothelin-1 (ET-1)	18
Gambar 2.10 Struktur reseptor Endothelin (RET _A)	22
Gambar 2.11 Hubungan endotel dengan kontrol tonus dan proliferasi otot polos vaskuler	25
Gambar 2.12 Sistem Simpatoadrenal	29
Gambar 2.13 Jalur sinyal intraselluler proliferasi Otot polos oleh aktivasi faktor pertumbuhan	38
Gambar 2.14 Jalur sinyal intraselluler proliferasi Otot polos Oleh aktivasi pada reseptor adrenergik.....	39
Gambar 2.15 Jalur sinyal intraselluler proliferasi otot polos oleh aktivasi ET-1	39
Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual Penelitian	43
Gambar 5.1 Grafik Rata-rata Variabel Tergantung	54
Gambar 5.2 Pola Respon Variabel Pembeda Menurut Kelompok Perlakuan	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Perhitungan Jumlah Sampel Minimal	75
Lampiran 2.	Pembuatan Preparat Histologis	76
Lampiran 3.	Pewarnaan Hematoksin-Eosin	77
Lampiran 4.	Bagan langkah-langkah Penelitian	78
Lampiran 5.	Data Hasil Pengukuran Variabel Tergantung Penelitian	79
Lampiran 6.	Biaya Penelitian	80
Lampiran 7.	Jadwal Penelitian	81
Lampiran 8.	Perhitungan Statistika	82
Lampiran 9.	Foto Hasil Penelitian	95

DAFTAR SINGKATAN

ADMA	: Asymmetrical dimethylarginine
E	: Epinefrin (<i>Epinephrine</i>)
ECE	: <i>Endothelin converting enzyme</i>
EDCF	: Endothelin-derived Contraction Factors
EDRF	: Endothelin-derived Relaxing Factors
ET-1	: Endothelin-1
JIOP	: Jumlah Inti Otot Polos
LAL	: Luas Area Lumen
NE	: Norepinefrin (<i>Norepinephrine</i>)
NO	: Nitrit Oksida (<i>Nitric Oxide</i>)
NOS	: NO synthase (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)
NS	: Normal Saline
PGI ₂	: Prostaglandin
RET	: Reseptor Endothelin-1
TGF- β	: <i>ransforming Growth Factors- β</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factors- α</i>
TTM	: Tebal Tunika Media
VSMCs	: Vascular Smooth Muscle Cells

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Proliferasi otot polos (*myoproliferation*) yang terjadi pada dinding pembuluh darah dapat menyebabkan gangguan pada fungsi tonus pembuluh darah (tonus vaskuler) (Miller, 1991). Stres diketahui dapat meningkatkan kadar epinefrin di dalam sirkulasi (Alanko dkk., 1992). Peningkatan epinefrin ini, selain menyebabkan vasokonstriksi langsung pada pembuluh darah, secara lokal juga dapat merangsang proliferasi otot polos pembuluh darah melalui peran endotel (Miller, 1991). Namun, mekanisme peningkatan epinefrin akibat stres terhadap proliferasi otot polos pembuluh darah belum diketahui dengan jelas.

Kondisi stres dapat meningkatkan kadar epinefrin di dalam sirkulasi sampai 50 kali lipat dibanding keadaan istirahat (Alanko dkk., 1992). Peningkatan epinefrin ini dapat merangsang proliferasi otot polos yang mengakibatkan terjadinya proses remodeling vaskuler (Soemanti, 2001). Pada proses ini terjadi penebalan tunika media dan penyempitan lumen pembuluh darah yang akan mengganggu fungsi regulasi tonus vaskular, yang sering dijumpai pada penyakit hipertensi (Constantinides, 1994; Soemanti, 2001).

Proliferasi otot polos pembuluh darah dapat terjadi didahului oleh kerusakan endotel pada tunika intima (*vascular injury*) yang menyebabkan disfungsi endotel (Luscher dan Noll, 1993). Proliferasi otot polos pembuluh darah juga dapat terjadi tanpa didahului oleh kerusakan endotel. Pada keadaan ini proliferasi otot polos pembuluh darah terjadi karena ketidakseimbangan antara faktor konstriksi dan faktor relaksasi yang disekresi oleh endotel (Luscher dan Noll, 1993; Constantinides, 1994). Endothelin-1 (ET-1) yang termasuk

endothelium-derived contraction factors (EDCF), diketahui berperan dalam proliferasi otot polos pembuluh darah. Keadaan ini ternyata dapat diakibatkan oleh peningkatan kadar epinefrin plasma yang tinggi pada kondisi stres (Luscher dan Noll, 1993).

Penelitian tentang proliferasi otot polos pembuluh darah melalui mekanisme *vascular injury* pada disfungsi endotel dan akibat peningkatan ET-1 telah dilakukan, sedangkan akibat peningkatan epinefrin plasma langsung yang menyebabkan penebalan tunika media dan penyempitan lumen, sampai saat ini belum banyak diungkap. Berkaitan dengan hal-hal tersebut di atas, maka proliferasi otot polos pembuluh darah yang menimbulkan penebalan tunika media akibat peningkatan kadar epinefrin dalam sirkulasi pada kondisi stres perlu perlu dibuktikan. Untuk itu dilakukan penelitian yang menguji respon otot polos pembuluh darah terhadap pemberian epinefrin langsung ke dalam sirkulasi untuk mengkondisikan keadaan stres (stresor epinefrin).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah stresor epinefrin menyebabkan proliferasi otot polos pembuluh darah ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk membuktikan terjadinya proliferasi otot polos pembuluh darah yang disebabkan oleh stresor epinefrin.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah :

1. Membuktikan bahwa stresor epinefrin menyebabkan peningkatan jumlah inti otot polos pembuluh darah.
2. Membuktikan bahwa stresor epinefrin menyebabkan penebalan tunika media pembuluh darah.
3. Membuktikan bahwa stresor epinefrin menyebabkan penurunan luas area lumen dinding pembuluh darah.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan dan memperjelas teori tentang mekanisme proliferasi otot polos pembuluh darah akibat stresor epinefrin.

1.4.2 Manfaat Terapan

Dari segi praktisi, hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dalam :

1. Membantu untuk menguatkan patogenesis hipertensi.
2. Upaya pencegahan hipertensi.
3. Membantu perkembangan penatalaksanaan penderita hipertensi.

BAB 2

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

2.1 Anatomi Pembuluh Darah

Sistem sirkulasi adalah suatu sistem pengangkut yang menyediakan oksigen dan bahan-bahan yang diabsorpsi dari saluran cerna ke jaringan, mengeluarkan karbondioksida kembali ke paru dan hasil metabolisme melalui ginjal, mengatur suhu tubuh, serta mendistribusikan hormon dan bahan-bahan lain untuk pengaturan fungsi sel (Ganong, 1999).

Sistem sirkulasi terdiri atas sistem vaskuler darah dan limfe. Sistem sirkulasi vaskuler darah secara struktural terdiri atas jantung yang berfungsi memompa darah, serangkaian pembuluh darah eferen yaitu arteri, kapiler serta serangkaian pembuluh aferen yaitu vena (Junquiera dan Caneiro, 1992).

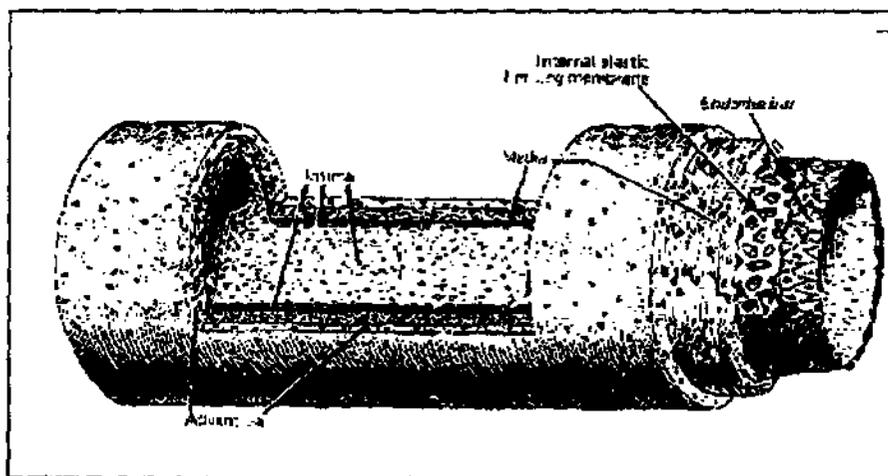
Secara umum dinding pembuluh darah dari dalam ke luar terdiri atas lapisan-lapisan sebagai berikut (Gambar 2.1 dan 3.2) (Junquiera dan Caneiro, 1992; Lesson dan Lesson, 1996) :

1) Tunika intima (tunika interna).

Lapisan ini terdiri atas selapis sel yang disebut endotel yang membatasi permukaan dalam pembuluh. Di bawah endotel adalah lapisan subendotel, terdiri atas jaringan ikat fibroelastis yang halus dan kadang-kadang mengandung sel otot polos. Tunika intima dan sebagian besar bagian dalam tunika media bersifat avaskuler, sehingga keperluan nutrisi lapisan ini dilaksanakan melalui proses difusi dari darah. Oleh karena itu perubahan organisasi dan susunan komponen penyusun lapisan ini akan sangat berpengaruh pada proses nutrisi.

2) Tunika media

Terutama terdiri dari beberapa lapis sel-sel otot polos yang tersusun melingkar. Di antara sel-sel otot polos tersebut terdapat sejumlah jaringan kolagen tipe I dan III, elastin dan proteoglikan. Sel otot polos yang merupakan tempat utama metabolisme vaskuler adalah sumber sel dari matriks ekstrasel ini. Pada arteri, tunika media dipisahkan dari tunika intima oleh suatu lapisan yang disebut membrana elastika interna. Membran ini terdiri atas jaringan elastin yang biasanya berlubang-lubang sehingga zat-zat dapat berdifusi melalui lubang-lubang tersebut sehingga dapat memberikan makan pada sel-sel yang terletak jauh di dalam dinding pembuluh. Pada pembuluh besar, sering ditemukan membrana elastika eksterna yang lebih tipis yang memisahkan tunika media dan tunika adventisia yang terletak di luar.

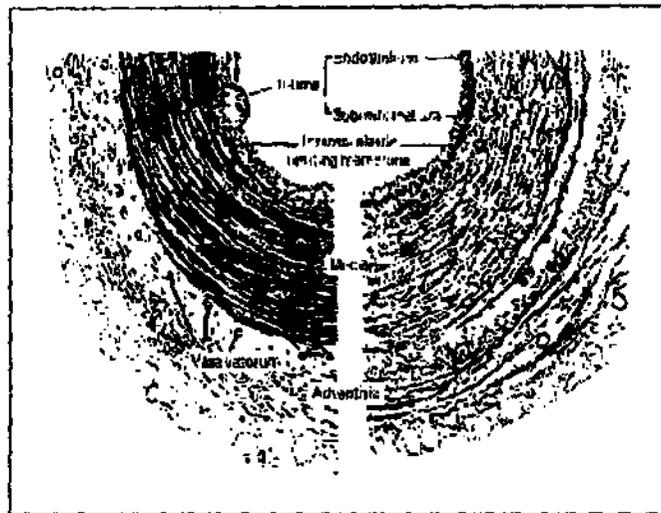


Gambar 2.1. Gambar arteri ukuran sedang (arteri muskuler)
(Junquiera dan Carneiro, 1992)

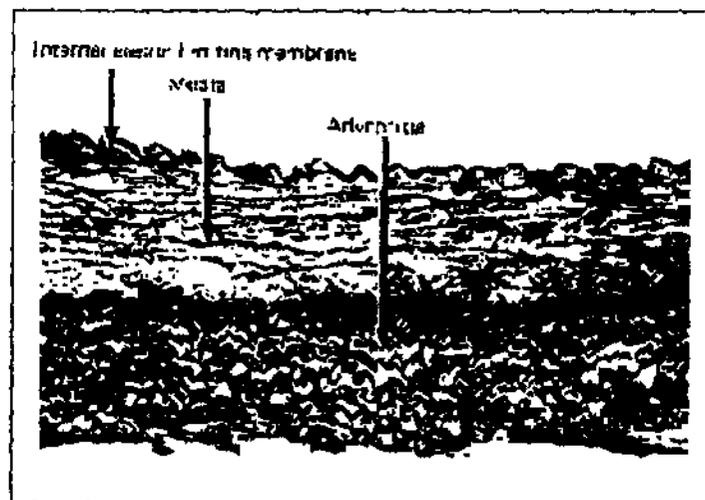
3) Tunika adventisia

Lapisan ini terdiri atas jaringan penyambung berupa kolagen tipe I dengan serabut-serabut elastin. Lapisan ini lambat laun bergabung dengan jaringan

penyambung yang meliputi organ melalui mana pembuluh darah berjalan. Pada pembuluh yang besar, lapisan ini dilalui oleh vasa vasorum yang bercabang-cabang untuk memberikan makanan pada tunika media dan adventisia (Gambar 2.3). Dibandingkan vena, vasa vasorum ini pada arteri lebih jarang dan hanya mencapai tunika adventisia.



Gambar 2.2 Penampang arteri ukuran sedang (pewamaan H&E)
(Junquiera dan Caneiro, 1992)



Gambar 2.3. Fotomikrograf potongan arteri ukuran sedang
(Junquiera dan Caneiro, 1992)

2.1.1 Struktur arteri.

Menurut ukurannya arteri diklasifikasikan menjadi (Junquiera dan Caneiro, 1992; Guyton dan Hall, 1996) :

(1) Arteriol,

Arteriol berukuran kecil, umumnya berdiameter kurang dari 50-100 μm dan relatif mempunyai lumen yang sempit. Tunika intima pada arteriol tidak mempunyai lapisan subendotel dan umumnya hanya mempunyai endotel dan membrana elastika interna. Tunika media terdiri atas 1-5 lapisan sel-sel otot polos yang tersusun melingkar dengan serat-serat elastin tersebar diantaranya. Tunika adventisia tipis, berupa selapis jaringan ikat yang mengandung serat kolagen dan elastin yang tersusun memanjang. Lapisan ini tidak berkembang dengan baik dan tidak menunjukkan adanya membrana elastika eksterna. Lihat Gambar 2.4 berikut :



Gambar 2.4. Fotomikrograf potongan suatu arteriol (kiri) dan venula (kanan). Pada arteriol elastin tidak tampak (pewarnaan H&E) (Junquiera dan Caneiro, 1992)

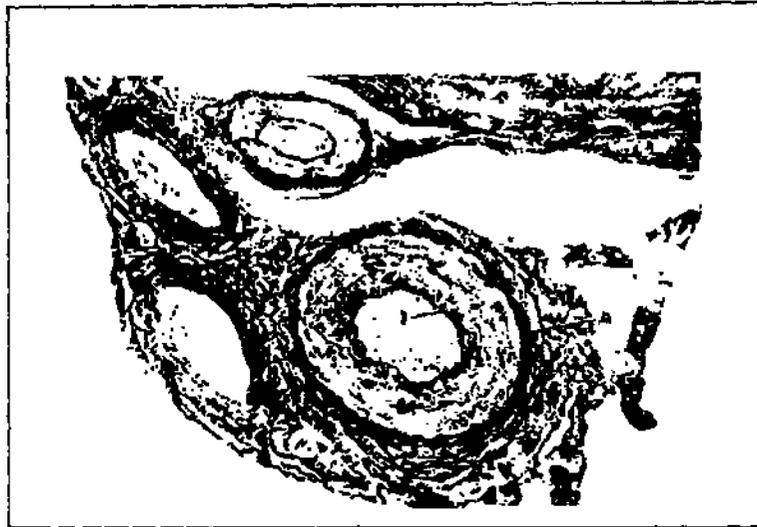
(2) Arteri ukuran kecil dan sedang (arteri muskuler),

Golongan ini meliputi semua arteri termasuk tipe muskular dan mencakup hampir seluruh arteri yang bernama dan semua arteri kecil yang tidak bernama. Arteri jenis ini mempunyai struktur umum pembuluh darah seperti telah disebutkan di atas. Arteri ini ditandai oleh adanya lapisan muskuler yang tebal dengan 40 lapis sel otot polos, yang bercampur dengan sejumlah serabut elastin, kolagen, retkulin, sedikit fibroblas dan proteoglikan, tergantung pada ukuran pembuluh (lihat Gambar 2.1 s/d Gambar 2.5).

(3) Arteri besar (arteri elastin),

Jenis ini termasuk aorta dan cabang-cabang besarnya, seperti trunkus brakhiosefalik, karotis komunis, subklavia dan iliaka komunis. Dindingnya relatif lebih tipis dibandingkan ukuran pembuluh ini. Karena mengandung banyak serabut elastin pada tunika media, maka terlihat berwarna kekuningan. Tunika intima lebih tebal daripada tunika intima arteri muskuler, dan dibatasi oleh sel-sel endotel berbentuk poligonal tidak memanjang seperti pada arteri yang lebih kecil. Pada arteri yang besar, kadang-kadang membrana basalis subendotel tidak terlihat, tetapi hubungan fibriler antara membran plasma dasar dan berbagai komponen tunika interna terlihat. Pada arteri yang sedang dan besar sering ditemukan suatu lipatan endotel yang sel-selnya menonjol ke lumen pembuluh. Lapisan subendotel tebal, dengan serabut-serabut jaringan penyambung menunjukkan arah longitudinal dan memegang peranan penting dalam keeluasaan lapisan endotel saat terjadi kontraksi ritmis dan dilatasi pembuluh darah. Membran elastika interna tidak selalu ada. Tunika media terdiri atas serangkaian membran elastin yang tersusun konsentris (40-60 lapis), dan sel-sel otot polos. Diantara membran

elastin dan lapisan otot polos terdapat fibril-fibril kolagen dan suatu zat amorf yang terutama terdiri atas kondroitin sulfat. Tunika adventisia mengandung serabut-serabut elastin dan kolagen, namun tidak memiliki membrana elastika eksterna, karena tidak berkembang.



Gambar 2.5. Fotomikrograf 2 arteri kecil (kanan) dan vena kecil (kin). Arteri mempunyai dinding lebih tebal daripada vena. Pada arteri, serabut elastin terdapat sebagai membrana elastika intima (I) dan sebagai serabut-serabut elastin yang tersebar dalam adventisia. Antara struktur yang mengandung elastin adalah lapisan muskuler media (M) yang tebal, yang tidak terdapat pada vena. (Junquiera dan Caneiro, 1992).

2.1.2 Struktur vena

Seperti arteri berdasarkan ukurannya, vena digolongkan menjadi (Junquiera dan Caneiro, 1992; Lesson dan Lesson, 1996) :

(1) Venula,

Venula berdiameter 0,2-1 mm. Venula yang paling kecil mempunyai tunika intima yang terdiri atas endotel saja dengan selubung serat kolagen di luarnya. Pada vena berdiameter 50 μm mulai terdapat sel otot polos diantara endotel dan jaringan ikat. Pada venula yang 200 μm atau lebih telah terbentuk tunika media, terdiri atas beberapa (1-3) sel otot polos yang

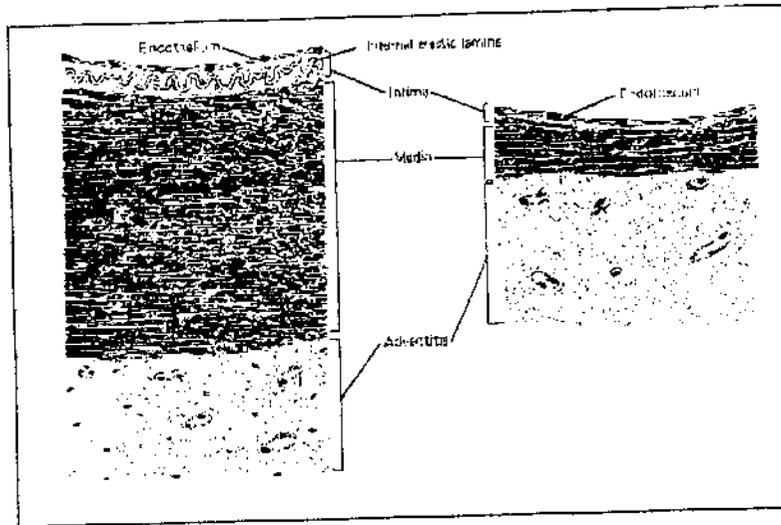
dipisahkan oleh berkas serat kolagen dan elastin. Tunika adventisia merupakan lapisan yang paling tebal terdiri atas jaringan penyambung yang kaya akan serabut-serabut kolagen (Gambar 2.4). Venula yang mempunyai diameter sampai 50 μm (kapiler venula) mempunyai fungsi seperti kapiler yang berperan dalam proses pertukaran metabolit-metabolit antara darah dan jaringan.

(2) Vena kecil dan sedang,

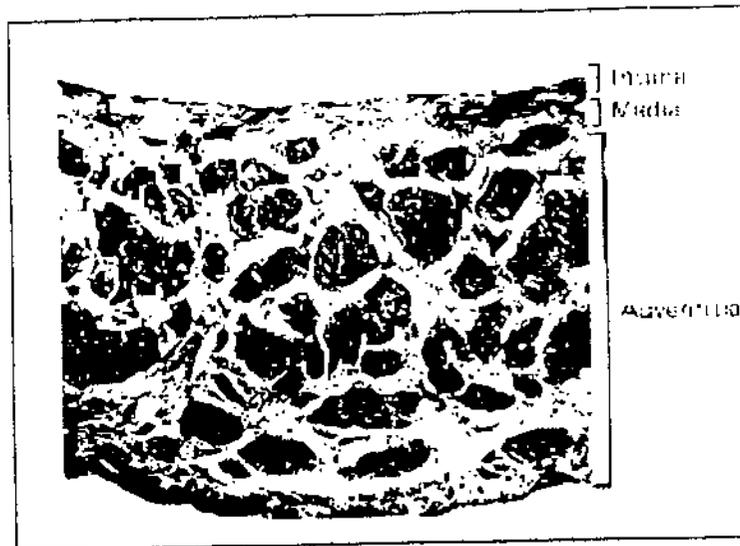
Bagian terbesar dari rangkaian vena adalah jenis vena ini, berukuran 1–9 mm. Tunika intima biasanya mempunyai lapisan subendotel yang tipis berbentuk poligonal, Tunika media terdiri atas berkas-berkas kecil otot polos yang bercampur dengan serabut-serabut kolagen dan jala-jala halus serabut elastin. Sedangkan pada tunika adventisia lapisan kolagennya berkembang dengan baik (Gambar 2.6). Pada vena jenis ini yang terletak pada anggota badan (lengan dan tungkai) banyak mempunyai katup yang terdiri atas 2 lipatan semilunaris dari lapisan dalam pembuluh darah yang menonjol ke dalam lumen. Lapisan ini disusun oleh lapisan serabut elastin yang dibatasi oleh kedua sisinya oleh endotel.

(3) Vena besar,

Vena jenis ini mempunyai tunika intima yang berkembang dengan baik. Tunika media jauh lebih kecil, dengan sedikit berkas sel-sel otot polos dan banyak jaringan penyambung. Pada vena yang mempunyai tunika adventisia tebal, dapat terdapat berkas-berkas longitudinal otot polos (Gambar 2.7).



Gambar 2.6. Perbandingan struktur arteri dan vena ukuran sedang (kiri). Perhatikan bahwa tunika intima dan tunika mediasangat berkembang pada arteri tetapi tidak pada vena (Junquiera dan Caneiro, 1992).



Gambar 2.7. Fotomikrograf potongan vena besar. Perhatikan adanya tunika adventisia yang berkembang dengan baik yang ditandai adanya berkas longitudinal otot polos. Pewarnaan H&E (Junquiera dan Caneiro, 1992).

2.2 Endotel

Endotel pertama kali dikemukakan oleh Malphigi beberapa ratus tahun yang lalu sebagai suatu "wallpaper" yang melapisi dinding dalam pembuluh

darah tanpa fungsi biologis yang jelas. Pada tahun 1970-an, diketahui bahwa endotel juga berperan sebagai pengendali permeabilitas mikrosirkulasi sejak ditemukannya prostasiklin (PGI_2) yang dihasilkan oleh endotel oleh Moncada dan Vane, dan bahan vasodilator yang dikenal dengan nitrit oksida (NO) oleh Robert Furchgott pada tahun 1980. Sejak saat itu ditemukan peran dan fungsi serta hal-hal lain yang berhubungan dengan endotel terus ditemukan (Harjanto, 1999).

2.2.1 Struktur endotel

Endotel vaskuler tersusun atas selapis sel yang pipih, memanjang, poligonal dengan ukuran panjang 20-50 μm dan lebar 10-15 μm . Secara umum struktur sel endotel vaskuler serupa dengan sel lain, yaitu mengandung inti serta organella lain seperti endoplasmik retikulum, ribosom, mitokondria, aparatus golgi, sentriol, lisosom, filamen aktin dan miosin serta granula-granula seperti granula glikogen. Namun yang khas dari endotel adalah adanya (1) "*Weibel-Palade body*", dengan diameter sekitar 0,1 μm dan panjang 3 μm , dan (2) Vesikel "plasmalemma" yang terutama terdapat pada kapiler (Boogaerts, 1983 *cit* Harjanto, 1999).

Hubungan antara sel endotel vaskuler bervariasi pada berbagai tempat. Secara umum terdapat 2 jenis hubungan antara sel yakni "*tight*" dan "*gap junction*". Pada arteri sifat hubungan antara sel adalah seperti yang pertama, sedang pada vena seperti yang kedua. Sifat hubungan yang demikian sangat penting untuk fungsi pengendalian transpor transendotel serta ketuhanan partisi fisik antara darah dan daerah subendotel (Boogaerts, 1983 *cit* Harjanto, 1999).

Sel endotel dapat bertumpang-tindih satu sama lain, bisa secara sederhana pada sisi lateral, secara "*mortice*" dengan jalan menyusupkan masing-masing tonjolan ke sebelahnya atau bertumpang-tindih dengan membentuk banyak lipatan (*multiple folded junction*). Sesuai dengan perannya, maka endotel

juga memiliki reseptor tertentu pada permukaan selnya seperti reseptor E, norepinefrin, asetilkolin, serotonin, fenilefrin, propanolol, fentolamin, angiotensin, histamin serta reseptor untuk sitokin yang lain (Boogaerts, 1983 *cit* Harjanto, 1999).

Sel-sel endotel yang melapisi bagian dalam pembuluh darah. Karena letaknya yang strategis di antara sirkulasi darah serta sel darah dan otot polos pembuluh darah, maka endotel memegang peranan penting dalam mengatur proses pertukaran zat, sebagai antitombotik terhadap elemen di dalam darah serta memodulasi tonus pembuluh darah (Chilian dkk., 1993). Pada individu dengan berat badan (BB) 70 kg, endotel meliputi hampir 700 m² dengan berat kira-kira 1 – 1,5 kg. (Luscher dan Barton, 1997).

2.3 Pengaturan Aliran Darah

Menurut Guyton dan Hall (1996), pengaturan aliran darah dibagi menjadi 2 yakni kontrol lokal oleh pembuluh darah dan jaringan sendiri, dan secara humoral. Ada 2 teori dasar dalam mekanisme regulasi aliran darah secara lokal, yakni (Guyton dan Hall, 1996) :

1. *The vasodilator theory* (teori vasodilator),

Menurut teori vasodilator, semakin besar kecepatan metabolisme atau semakin sedikit jumlah oksigen dan nutrisi lain di jaringan, akan semakin banyak terbentuk bahan-bahan vasodilator. Bahan-bahan vasodilator inilah yang kemudian akan berdifusi kembali ke *sphincter prekapiler*, *metarteriol* dan *arteriol* yang menyebabkan dilatasi pembuluh darah. Bahan-bahan vasodilator tersebut antara lain adalah adenosin fosfat, karbondioksida, asam laktat, histamin, ion kalium dan hidrogen (Guyton dan Hall, 1996).

2. *The oxygen demand theory* (teori kebutuhan oksigen).

Sedangkan menurut teori kebutuhan oksigen, kontraksi otot polos yang memelihara tonus otot pembuluh darah akan menurun jika kadar oksigen jaringan menurun. Jadi semakin sedikit asupan oksigen ke jaringan akan menyebabkan relaksasi otot pembuluh darah sehingga terjadi dilatasi (Guyton dan Hall, 1996).

Mekanisme kontrol aliran darah yang lain adalah secara humoral. Regulasi aliran darah melalui cara ini diperankan oleh bahan-bahan yang disekresi atau diabsorpsi oleh cairan tubuh, seperti hormon dan ion-ion. Beberapa bahan tersebut dihasilkan oleh kelenjar-kelenjar tertentu dan ditranspor melalui darah ke seluruh tubuh. Ada juga yang dihasilkan oleh jaringan secara lokal dan berefek pada sirkulasi lokal. Bahan-bahan tersebut adalah bahan vasokonstriktor (*vasoconstrictor agents*) dan vasodilator (*vasodilator agents*). Epinefrin, norepinefrin, angiotensin, dan vasopressin termasuk bahan vasokonstriktor, sedangkan bradikinin, serotonin, histamin dan prostaglandin adalah bahan vasodilator (Guyton dan Hall, 1996; Ganong, 1999).

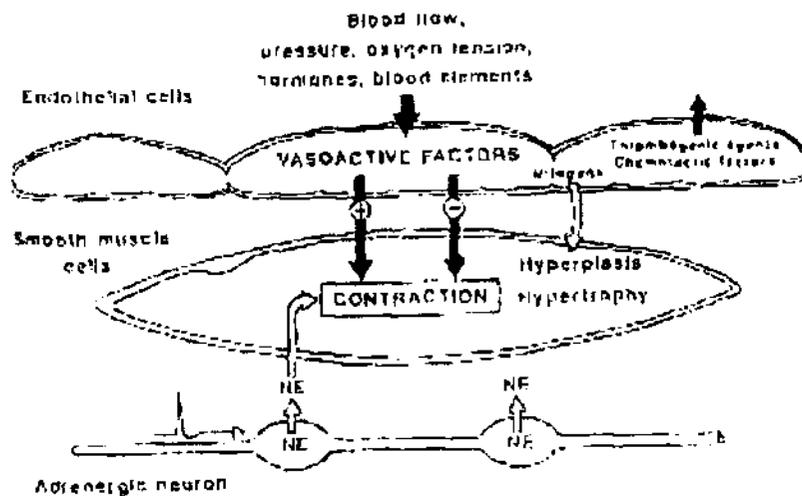
Berdasarkan pengamatan Furchgott dan Zawadzki (1988), sel endotel ternyata melepaskan banyak bahan yang berperan dalam regulasi tonus vaskuler dan dapat menyebabkan kontraksi dan relaksasi otot polos vaskuler. Bahan vasokonstriktor dan vasodilator lokal atau faktor-faktor vasoaktif ini dilepaskan dari sel endotel sebagai respon terhadap rangsangan fisik dan fisiologis yang bermacam-macam, termasuk perubahan tekanan parsial oksigen, *stretch* (regangan), *shear stress* dari arus darah yang melewati permukaan sel, hormon-hormon yang bersirkulasi, dan bahan-bahan yang dilepaskan dari elemen darah seperti agregasi *platelet* yang mengaktifkan makrofag (Amuchastegui dkk., 1994; Miller, 1991). Bahan ini dinamakan EDCF (*endothelium-derived contraction factors*) dan EDRF (*endothelial-derived relaxing factors*).

2.4 Mekanisme Kontrol Tonus Vaskuler

Aliran darah yang sampai ke jaringan ditentukan oleh tegangan pembuluh darah dengan cara membuka dan menutupnya *sphincter precapiller* dan *metarteriole* dalam suatu siklus tertentu (*vasomotion*). Regulasi tonus vaskuler merupakan salah satu faktor penting dalam sistem sirkulasi, karena perubahan pada tonus vaskuler akan mempengaruhi arus serta tekanan darah (Guyton dan Hall, 1996). Tonus vaskuler ini berdasarkan mekanismenya, dapat dibedakan atas 2 macam sistem regulasi yaitu (Miller, 1991):

1. Sistem saraf simpatis, yang merupakan sinyal pengatur tonus vaskuler relatif tergantung dari masukan dari kardiopulmoner, baroreseptor dan kemoreseptor, serta refleksi perfusi intrasel organisme.
2. Sel endotel, yang sinyal pengaturnya dipengaruhi secara relatif oleh perubahan lingkungan kimiawi dan fisika lokal disekitar pembuluh darah yang spesifik.

Distribusi dan kontribusi relatif komponen-komponen pengatur ini bervariasi luas tergantung pada asal daerah anatomis pembuluh darah. Interaksi antara kedua sistem pengatur ini terbagi pada 3 area masalah yaitu : pertama; mekanisme faktor endotel dalam memodulasi potensial membran sel otot polos, kedua; mekanisme pelepasan neurotransmitter dari ujung saraf simpatis yang memicu pelepasan faktor-faktor endotel dan ketiga; mekanisme faktor endotel mempengaruhi pelepasan neurotransmitter (Miller, 1991).



Gambar 2.8. Skema sistem regulator tonus vaskuler perifer (Miller, 1991)

Jadi, kontrol tonus vaskuler merupakan fungsi dari 2 sistem regulator yaitu sistem saraf simpatis dan endotel. Norepinefrin dapat mempengaruhi respon endotel, dan faktor endotel dapat mengubah pelepasan neurotransmitter, sehingga tonus vaskuler merupakan efek kombinasi dari 2 sistem pengatur ini, dan kondisi lokal dapat memodulasi masing-masing sistem ini secara terpisah (Miller, 1991).

2.4.1 Fungsi regulasi endotel

Endotel yang semula dianggap sebagai sel yang secara biologis tidak aktif, ternyata mempunyai peran penting dalam pengendalian tonus vaskuler. Fungsi pengendalian tonus vaskuler endotel ini meliputi pemeliharaan mekanisme kontraksi dan relaksasi. Fungsi ini dilaksanakan melalui dihasilkannya beberapa faktor yang dapat mempengaruhi mekanisme kontraksi dan relaksasi tersebut yakni EDCF dan EDRF (Boulanger dan Vanhoutte, 1994; Domae dkk., 1997).

Endotel melepaskan faktor-faktor yang berfungsi mengontrol relaksasi dan kontraksi pembuluh darah, trombogenesis dan fibrinolisis serta aktivasi dan

inhibisi *plattelet* (Luscher dan Barton, 1997). Sejak penemuan yang dirintis pertama kali oleh Furchgott dan Zawadzki, endotel telah dikenal sebagai regulator homeostasis vaskuler utama. Fungsi integritas endotel merupakan faktor penting dalam pemeliharaan aliran darah dan kapasitas antitrombotik, karena endotel melepaskan faktor-faktor humoral yang mengatur relaksasi dan kontraksi, trombogenesis dan fibrinolisis serta aktivasi dan inhibisi *plattelet*. Oleh karena itu, endotel berperan sebagai kelenjar autokrin dan parakrin dalam mekanisme kontrol tekanan darah, aliran darah dan keutuhan pembuluh darah (Luscher dan Barton, 1997; Liao, 1998).

2.4.2 Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF)

Faktor relaksasi yang berasal dari endotel (EDRF) merupakan substansi yang larut dengan waktu paruh beberapa detik, telah diidentifikasi sebagai suatu radikal bebas yaitu *nitric oxide* (NO). NO dibentuk dari *L*-arginin oleh proses oksidasi guanidine pada terminal nitrogen (Rizzoni dkk., 1997). Enzim yang mensintesis NO yang dinamakan NOS (*NO synthase*) mempunyai beberapa *isoform* pada sel endotel, *plattelet*, makrofag, sel otot polos vaskuler, saraf dan otak (Nathan, 1994 *cit.* Luscher dan Barton, 1997; Schinit dan Vanhoutte, 1993). Pada sel endotel, ekspresi gen NOS yang diaktivasi secara konstitutif, dapat ditingkatkan oleh *shear stress* dan estrogen. Aktivasi NOS ini dapat diinhibisi oleh asam amino di dalam sirkulasi, ADMA (*asymmetrical dimethylarginine*) yang banyak dijumpai pada penderita gagal ginjal (Vallance dkk., 1992 *cit.* Luscher dan Barton, 1997), hiperkolesterolemia dan penyakit arterosklerosis perifer oklusif (Bode-Boger dkk., 1997 *cit.* Luscher dan Barton, 1997).

Pada sel otot polos vaskuler dan makrofag, *isoform* NOS yang merupakan suatu enzim yang tergantung ion kalsium, dapat diaktivasi oleh sitokins seperti endotoxin, interleukin-1 β , dan TNF- α (*tumor necrosis factor- α*),

Endothelin merupakan bagian dari famili peptida berstruktur tiga (*a three structurally very closely related peptides*). Pada seluruh spesies mamalia diekspresikan oleh 3 macam gen yang menghasilkan ET-1, ET-2 dan ET-3. Pada non mamalia, endothelin berhubungan erat dengan sarafotoxins yang terdapat pada racun *Atractapis engaddensis*. Endothelin dan sarafotoxins mempunyai struktur yang terdiri dari 21 asam amino dengan 4 residu sistein pada posisi 1, 3, 11 dan 15 yang membentuk ikatan rangkap disulfida antara residu 1 dan 15, serta 3 dan 11. Beda keduanya terletak di bagian ekor pada residu 16-21, pada sarafotoxins bagian ini mempunyai residu yang lebih bervariasi bentuknya (Warner, 1993; Hisaki dkk., 1994; Inui dkk., 1994)).

Ada 3 macam *isoform* peptida ET-1 yakni *endothelin-1*(ET-1), *endothelin-2* (ET-2) dan *endothelin-3* (ET-3). Sel endotel menghasilkan ET-1 secara eksklusif. Translasi mRNA meningkatkan *preproendothelin* yang nantinya akan diubah oleh ECE (*endothelin converting enzyme*) menjadi ET-1. Melalui teknik kloning ECE mempunyai 4 *isoform* yaitu ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c dan ECE-2. Proses ekspresi mRNA dan pelepasan ET-1 dirangsang oleh trombin, *transforming growth factor β* (TGF- β), interleukin-1 (IL-1), E, angiotensin II, arginine vasopressin, calcium ionophore dan phorbol ester (Hisaki dkk., 1994; Furchgott dan Zawadzki, 1980 *cit.* Luscher dan Barton, 1997).

Pada konsentrasi rendah ET-1 dapat menyebabkan vasodilatasi, namun pada konsentrasi lebih tinggi dapat mengembalikan kontraksi secara nyata. Pada jantung hal tersebut dapat menimbulkan iskemia, aritmia dan kematian. (Kiowski dkk, 1992 *cit.* Luscher dan Barton, 1997). Pembuluh darah intramiokardial lebih sensitif terhadap efek vasokonstriksi ET-1 daripada arteri koroner epikardial. Ini membuktikan peran penting endotel dalam pengaturan aliran darah. Kadar endotelin sirkulasi yang sangat rendah menunjukkan bahwa sebagian besar

peptida ini dibentuk secara lokal di dinding pembuluh darah. Ini terjadi mungkin akibat tidak adanya rangsangan produksi endothelin, adanya mekanisme inhibisi yang kuat, atau akibat adanya sekresi endothelin secara abluminal ke arah sel otot polos (Wagner dkk., 1992 *cit.* Luscher dan Barton, 1997; Yashimoto dkk., 1991 *cit.* Webb dan Haynes, 1997).

2.4.4 Sintesis dan reseptor ET-1

ET-1 dihasilkan dari *preproendothelin* (203 residu AA) yang diputuskan rantai AA-nya oleh endopeptidase pada residu 51-52 dan 92-93 membentuk suatu 39 residu AA intermediet yang disebut *big ET-1*. Oleh ECE yang ada di dalam sirkulasi *big ET-1* diubah menjadi ET-1 dengan memutus rantai residu antara *Trp* (triptofan) dan *Val* (valin). *Big ET-1* mempunyai efek 100 kali kurang dari ET-1. Konversi *big ET-1* menjadi ET-1 terjadi pada pH \leq 3 yang dihambat oleh phosphoramidon, pepstatin A dan cathepsin E pada sel otot polos vaskuler, saluran nafas, epitel ginjal, vas deferens tikus, dan sel otak tikus dan manusia yang tidak intak, serta oleh elastase (dihasilkan neutrophil) dan chymase (oleh sel mast) di dalam sirkulasi. ECE terdapat dalam 2 bentuk yaitu dengan BM 540 kD di sitoplasma dan 100 kD yang terikat pada membran sel (Warner, 1993).

Menurut Luscher (1993), terdapat 2 macam reseptor endothelin yaitu reseptor ET_A (RET_A) dan reseptor ET_B (RET_B). Kedua macam reseptor ini merupakan reseptor yang berhubungan dengan protein G dengan 7 domain transmembran yang terikat dengan phospholipase C dan protein kinase C. Ekspresi RET_B oleh sel endotel berhubungan dengan pembentukan NO dan prostasiklin yang dapat menjelaskan efek vasodilator sementara endothelin saat diinfuskan ke organ atau organisme yang intak. RET_A, dan beberapa pengecualian RET_B memperantarai kontraksi dan proliferasi otot polos vaskuler. Beberapa antagonis reseptor endothelin yang lain telah diteliti dan sekarang ini

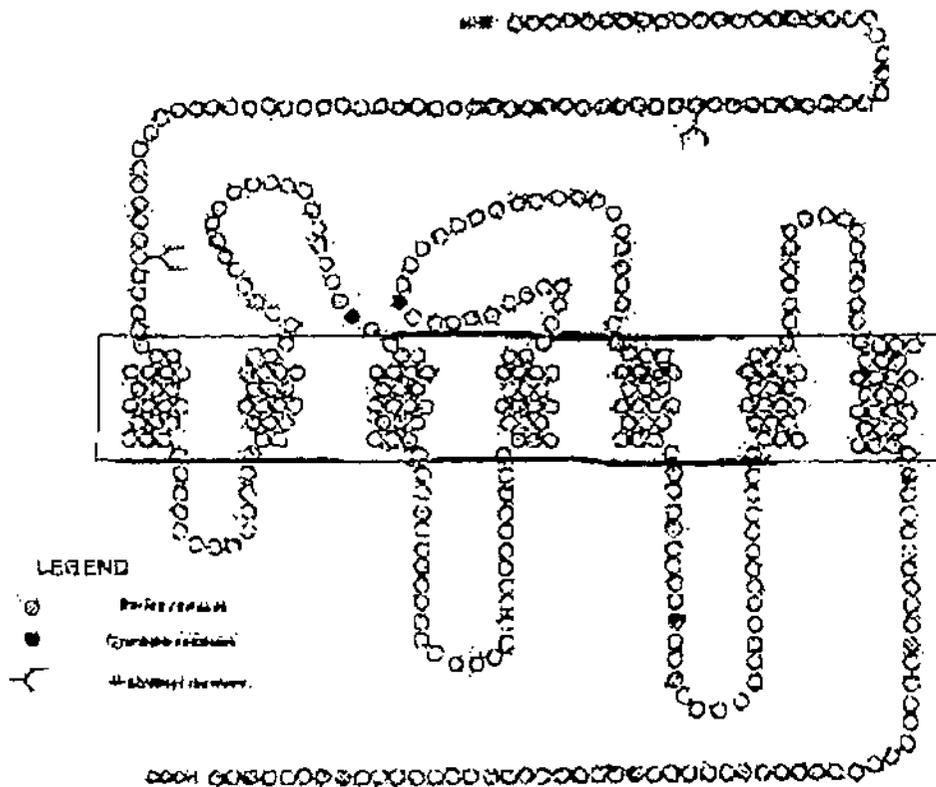
masih dalam tahap evaluasi klinis pada subyek normal dan penderita (Domae dkk., 1994; Davenport, 1997; Hiley, 1997; Luscher dan Barton, 1997).

Endothelin yang berasal dari kultur sel endotel merupakan vasokonstriktor peptida dengan 21 AA yang kuat. Dalam famili endothelin dapat dibedakan 3 macam yakni ET-1, ET-2 dan ET-3 melalui teknik kloning. Efek endothelin pada organ dan sel mamalia ditentukan oleh ikatannya dengan jenis reseptor yang ada pada membran sel yang memicu jalur sinyal intraselluler yang bervariasi, termasuk hidrolisis phosphatidylinositol dan pelepasan asam arakidonat. Reseptor spesifik endothelin dengan afinitas tinggi ditemukan pada banyak jaringan dan sel. Reseptor ET_A (RET_A) dengan BM 69 kD, selektif terhadap ET-1 dan ET-2, sedangkan reseptor ET_B (RET_B) dengan BM 42 kD, dapat berikatan dengan ET-1, ET-2 dan ET-3 dengan potensi yang sama. Antagonis selektif RET_A adalah BQ-123 dan FR-139317, dan antagonis RET_A dan RET_B adalah Ro-46-2005 dan PD-142893 dengan potensi yang sama. Pada sel otot polos pericardium manusia ditemukan RET_A dan RET_B (Wu-Wong dkk., 1994; Davenport, 1997; Hiley, 1997).

Ada 4 mekanisme inhibisi yang mengatur produksi ET-1 yaitu :

- 1) Inhibisi yang tergantung cGMP (*cGMP-dependent inhibition*) (Boulanger, dkk. 1990 *cit.* Luscher dan Barton, 1997),
- 2) Inhibisi yang tergantung cAMP (*cAMP-dependent inhibition*) (Yokokawa dkk., 1991 *cit.* Luscher dan Barton, 1997),
- 3) Faktor inhibisi yang dihasilkan oleh sel otot polos vaskuler (Stewart dkk., 1990 *cit.* Luscher dan Barton, 1997), dan

- 4) Inhibisi oleh estrogen melalui reseptor estrogen (*estrogen-receptor-dependent mechanism*) (Barton dkk., 1996 cit. Luscher dan Barton, 1997).



Gambar 2.10. Struktur Reseptor Endothelin (RET_B)

Inhibisi melalui jalur endothelial *L*-arginine memperkuat mekanisme perangsangan produksi ET-1 oleh trombin dan angiotensin. Sebaliknya nitrat dan peptida natriuretic atrial yang mengaktivasi lewat *guanylate cyclase* tertentu mencegah sekresi ET-1 oleh trombin melalui proses yang tergantung cGMP. ET-1 dapat juga meningkatkan pelepasan NO dan prostasiklin dari sel endotel melalui RET_B , yang merupakan mekanisme umpan balik negatif yang dapat menurunkan produksi ET-1 pada sel endotel (Boulanger, 1990 cit. Luscher dan Barton, 1997), dan aksi vasokonstriksi dari otot polos. Endothelin juga

menghambat fungsi dan ekspresi dari NOS (Ikeda dkk., 1997 cit. Luscher dan Barton, 1997).

2.5 Hubungan Endotel dengan Struktur Vaskuler

Struktur vaskuler ditentukan terutama oleh proliferasi (pertumbuhan) sel otot polos vaskuler. Sel endotel dapat mempengaruhi struktur vaskuler baik secara langsung maupun tidak langsung. (Radomski dkk., 1987 cit. Luscher dan Barton, 1997). Disfungsi endotel dan atau penggundulan dapat menyebabkan perlekatan *plattelet* pada dinding pembuluh darah, yang dapat menimbulkan kontraksi melalui pelepasan thromxan A₂ dan serotonin, dan dapat merangsang proliferasi dan migrasi sel otot polos vaskuler melalui pelepasan *plattelet-derived growth factors* (PDGF) (Ross, 1990 cit. Luscher dan Barton, 1997).

Pengangkatan sel endotel seperti yang terjadi pada *vascular injury* menyebabkan deposisi *plattelet* dan sel darah putih dengan segera pada tempat terjadinya kerusakan, yang disusul terjadinya hiperplasia dalam beberapa hari sampai minggu. Pengamatan ini menunjukkan bahwa endotel berperan dalam regulasi struktur vaskuler dan melindungi dinding pembuluh darah dari aktivasi otot polos vaskuler. Oleh karena itu, disfungsi endotel merupakan faktor penting pada arterosklerosis, restenosis, dan penyakit hipertensif pembuluh darah (Radomski dkk., 1987 cit. Luscher dan Barton, 1997).

Tekanan di dalam pembuluh (tekanan intraluminal) yang tinggi dapat mengaktivasi sistem endothelin di dinding pembuluh darah, melalui peningkatan perangsangan ekspresi mRNA untuk *preproendothelin-1* dan RET_B (Lauth dkk., 2000).

Mediator yang terjadi pada *vascular injury* seperti interleukin-1 β , dan TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) mengaktivasi sel otot polos vaskuler untuk menghasilkan NO atau zat yang berhubungan dengan NO. Sitokins

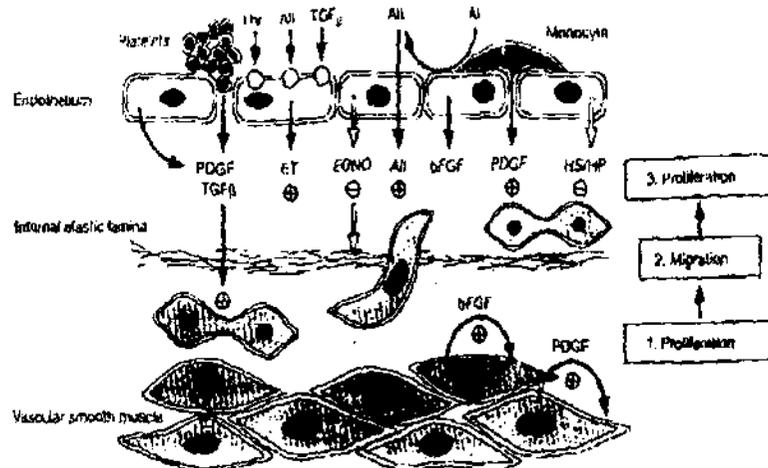
menyebabkan sintesis NOS. Produksi NO dimodulasi oleh faktor-faktor yang dihasilkan oleh sel-sel vaskuler dan elemen yang dibentuk oleh darah (PDGF, TGF β), juga oleh faktor lokal pada tempat terjadinya kerusakan dari prekursor inaktif yang bersirkulasi di dalam darah (seperti trombin, plasmin). Produksi NO berperan dalam homeostasis pembuluh darah pada tempat terjadinya kerusakan. Secara khusus, NO mencegah timbulnya vasospasme lokal, proliferasi otot polos vaskuler yang tidak diinginkan dan juga membantu mengontrol koagulasi dan pembentukan trombus (Schinit dan Vanhoutte, 1993).

Sel endotel menghasilkan promotor pertumbuhan (*growth promoters*) dan inhibitor pertumbuhan (*growth inhibitor*). Dalam kondisi fisiologis, efek inhibitor pertumbuhan lebih dominan daripada promotor pertumbuhan, sehingga pada pembuluh darah normal yang tidak bergerak tidak terjadi proliferasi sel otot polosnya. Heparan, NO dan TGF β , adalah inhibitor migrasi dan proliferasi sel otot polos yang kuat (Castelott dkk., 1984; Garg dkk, 1989; Battegay dkk., 1990 *cit.* Luscher dan Barton, 1997). Sebaliknya, pada kondisi tertentu sel endotel dapat menghasilkan berbagai faktor pertumbuhan khususnya PDGF, *epidermal growth factor* (EGF) dan angiotensin II. Faktor-faktor ini dapat berperan penting dalam kondisi penyakit dengan proliferasi sel otot polos vaskuler akibat disfungsi endotel, walaupun secara morfologis endotelnya masih utuh (Luscher dan Barton, 1997).

2.6 Hubungan Endotel dengan Tonus Vaskuler

Tonus vaskuler dikendalikan melalui beberapa mekanisme seperti pengendalian oleh saraf, humoral, sistemik serta lokal. Endotel yang semula dianggap sebagai sel yang secara biologis tidak aktif, ternyata mempunyai peran penting dalam pengendalian tonus vaskuler. Fungsi pengendalian tonus vaskuler

dari endotel ini meliputi pemeliharaan mekanisme kontraksi dan relaksasi. Fungsi ini dilaksanakan melalui produksi beberapa faktor yang dapat mempengaruhi mekanisme kontraksi dan relaksasi yakni EDCF dan EDRF. Diantara sekian banyak faktor konstriktor yang paling berperan adalah ET-1, dan dari faktor relaksan adalah NO dan prostasiklin. Dalam keadaan normal terdapat keseimbangan antara EDCF dan EDRF. Namun jika terjadi kelainan karena suatu faktor pada endotel, maka keseimbangan tersebut akan terganggu dan seterusnya akan mendorong berkembangnya proses patologis (Boulanger dan Vanhoutte, 1994).



Gambar 2.11. Hubungan endotel dengan kontrol tonus dan proliferasi otot polos vaskuler (Luscher dan Barton, 1997)

Endotel merupakan elemen regulator kunci pada dinding pembuluh darah, yang secara langsung tidak hanya menentukan tonus vaskuler, namun juga mengatur proliferasi otot polos dan koagulasi darah. EDVF (*endothelium derived vasoactive factors*) terdiri dari 2, yaitu faktor vasodilatasi seperti NO dan prostasiklin (EDRF), serta faktor vasokonstriksi (EDCF) seperti ET-1. ET-1 dapat berfungsi sebagai parakrin karena berefek lokal pada sel endotel dan otot polos

vaskuler sekitar dan berfungsi neurohumoral karena dapat berefek jauh pada endotel dan otot polos pembuluh darah yang jauh letaknya (Stewart, 1993)

Peran endotel terhadap respon kontraksi otot polos vaskuler dapat terjadi secara neurohormonal dan miogenik. EDRF dapat memodulasi kontriksi pembuluh darah melalui reseptor α -adrenergik melalui banyak mekanisme. Pertama, pada arteri coroner epicardial dimana relaksasi yang disebabkan NE melalui reseptor α_2 -adrenergik, dapat dihalangi oleh pemberian senyawa arginin. Sedangkan pada vena, pelepasan EDRF disebabkan oleh perangsangan reseptor α_1 -adrenergik pada endotel. Kedua, modulasi EDRF terhadap kontriksi pembuluh darah melalui reseptor α_1 -adrenergik akibat pelepasan NO sebagai respon terhadap peningkatan *shear stress* pada kontriksi mikrosirkulasi (Chilian dkk., 1993).

2.7 Endotel dan Potensial Membran Otot Polos Vaskuler

Bahan-bahan yang dilepaskan oleh endotel dapat mempengaruhi potensial membran sel otot polos vaskuler. Sebagai respon terhadap asetilkolin, bradikinin dan ADP, endotel akan melepaskan faktor-faktor difus yang dapat menimbulkan hiperpolarisasi otot polos arteri. Secara kimiawi faktor ini belum dapat diidentifikasi, namun dapat dibedakan dari faktor NO. Pelepasan faktor endotel ini dapat memodulasi potensial membran istirahat otot polos vaskuler baik mendekati atau menjauhi nilai ambang yang diperlukan oleh gerbang voltase saluran kalsium, yang diaktivasi oleh E. Dengan demikian endotel menurunkan kontraksi yang disebabkan oleh rangsangan saraf adrenergik, dan endothelin memperkuat efek konsentrasi nilai ambang E (Miller, 1991).

Norepinefrine (NE) meningkatkan Cl^- effluks dari sel otot polos pembuluh darah yang menyebabkan peningkatan konduktan Cl^- yang akhirnya

menimbulkan terjadinya depolarisasi membran sel otot polos pembuluh darah tersebut (Lamb dan Bana, 1998)

Produksi faktor endotel tersebut dapat dimodulasi secara kronis. Contohnya adalah : 1) peningkatan kronis aliran darah merangsang peningkatan EDRF, 2) trombin dan TGF- β jaringan meningkatkan sintesis endothelin. Oleh karena itu, rangsangan fisik dan kimiawi pada lingkungan setempat dapat memodulasi secara tidak langsung potensial membran otot polos vaskuler melalui aktivasi akut dan kronis dari pelepasan faktor-faktor endotel (Miller, 1991).

2.8 Interaksi antara Norepinefrin dan Endotel

Kepekaan sel otot polos arteri dan vena terhadap efek kontraksi norepinefrin akan menurun oleh adanya endotel. Penurunan kepekaan ini berhubungan dengan suatu faktor tertentu dan bukan oleh karena pengaruh metabolisme neurotransmitter oleh sel endotel. Faktor ini merupakan faktor penghambat yang dilepaskan oleh endotel sebagai respon terhadap rangsangan pada reseptor α_2 -adrenergik pada permukaan endotel yang menyebabkan relaksasi. Efek relaksasi faktor ini dapat dihambat oleh toksin pertussis yang menunjukkan bahwa pelepasan faktor ini melibatkan suatu protein G pengatur (cGMP) dalam mekanisme transduksi sinyalnya. Kebanyakan faktor endotel yang dilepaskan sebagai respon terhadap rangsangan reseptor α_2 -adrenergik adalah NO. Hal ini diperkuat oleh adanya bukti bahwa relaksasi yang disebabkan oleh α_2 -adrenergik selektif agonist pada arteri koroner dapat dihambat oleh L-NMMA (*N^G-monomethyl -L-arginine*), yang merupakan suatu bahan analog dengan L-arginine yang diperlukan untuk sintesis NO (Miller, 1991; Goto dkk., 2000).

Faktor relaksasi endotel yang timbul akibat rangsangan pada reseptor α_2 -adrenergik menjadi penting karena (Miller, 1991; Goto dkk., 2000) :

1. Merupakan salah satu respon endotel yang dapat dimodulasi kronis oleh perubahan lingkungan kimia dan fisik dari pembuluh darah.
2. Keberadaannya mewakili respon dimana efek aktivitas saraf simpatis dapat diturunkan secara tidak langsung melalui aktivasi sel sejenis lainnya.

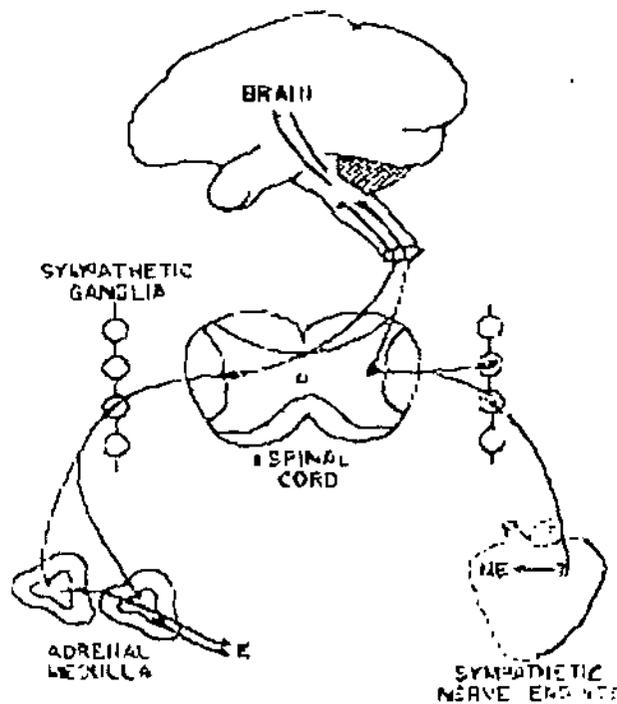
2.9 Pengaruh Pelepasan Neurotransmitter oleh Faktor Endotel

Beberapa bukti menunjukkan bahwa faktor endotel dapat mencegah transmisi saraf. Angiotensin menghambat uptake norepinefrin oleh ujung terminal saraf dan memperkuat rangsangan pelepasannya. Endothelins yang dilepaskan oleh endotel mempunyai potensi memodulasi transmisi saraf pada proses di presinaptik. Faktor yang dilepaskan endotel menghambat pelepasan norepinefrin melalui perangsangan saluran kalsium di ujung terminal saraf. Efek endothelin pada bagian presinaptik untuk melepaskan norepinefrin berbeda antara pembuluh vena dan arteri (Miller, 1991; Goto dkk., 2000).

2.10 Sistem Simpatoadrenal

Sistem saraf simpatis dan medulla kelenjar adrenal (suprarenal) membentuk suatu unit anatomis dan fisiologis yang disebut sebagai sistem simpatoadrenal. Secara anatomis sistem ini dimulai dari serabut preganglionik traktus descendens simpatis yang berasal dari medulla, pons dan hipotalamus. Serabut ini bersinaps pada ganglion simpatis di medulla spinalis, kemudian menuju ke kelenjar adrenal secara langsung atau bersinaps di ganglia paravertebralia dengan serabut saraf postganglionik simpatis. Serabut postganglionik simpatis inilah yang membentuk serabut saraf simpatis pada banyak viscera dan pembuluh darah (Young dan Landsberg, 1998).

Rangsangan dari saraf simpatis ke medulla adrenal menyebabkan banyak epinefrin (E) dan norepinefrin (NE) dilepaskan ke dalam sirkulasi darah dari granula-granula yang terdapat pada sel-sel cromaffin medulla adrenal. Sekresi E dan NE tidak sama besar, sekitar 80% adalah E dan 20% norepinefrin (Guyton dan Hall, 1996). Segera setelah dilepaskan E dan NE akan berefek pada organ atau jaringan. Efek E dan NE hampir sama seperti efek pacuan saraf simpatis, seperti menyebabkan vasokonstriksi hampir seluruh pembuluh darah, meningkatkan kontraktilitas, mengurangi motilitas saluran cerna, dilatasi pupil dan sebagainya. Yang berbeda hanya lamanya berefek. E dan NE di dalam sirkulasi berefek 5-10 kali lebih lama dari pada efek NE yang dilepaskan ujung saraf (Guyton dan Hall, 1996).



Gambar 2.12. Sistem simpatoadrenal (Young dan Landsberg, 1998)

Efek E dan NE pada pembuluh darah ternyata sedikit berbeda. Perbedaan itu adalah (1) efek E dalam merangsang reseptor beta pada jantung lebih kuat dari NE, (2) efek vasokonstriksi pembuluh darah otot E lebih lemah dari NE, dan (3) efek E terhadap metabolisme 5-10 kali lebih besar dari NE. Dengan perbedaan ini maka NE lebih cenderung bersifat meningkatkan tekanan arterial akibat peningkatan tahanan perifer, sedangkan E lebih menyebabkan peningkatan curah jantung (Guyton dan Hall, 1996).

2.10.1 Epinefrin dan norepinefrin

Epinefrin pertama kali ditemukan oleh Oliver dan Schafer sekitar 100 tahun yang lalu di dalam ekstrak kelenjar adrenal. Senyawa ini dapat diidentifikasi oleh Takamin sebagai suatu senyawa katekolamin dengan nama *N-methyl-3,4-dihydroxyphenylethanolamine*. Senyawa ini kemudian lebih dikenal dengan nama adrenalin atau epinefrin (Young dan Landsberg, 1998).

Epinefrin adalah katekolamin mamalia yang utama. Senyawa ini disintesis dan disimpan di dalam kelenjar adrenal dan dilepaskan ke aliran darah untuk berefek ke seluruh jaringan tubuh. Pada saraf pusat E adalah suatu neurotransmitter yang disintesis dan disimpan di ujung-ujung serabut saraf yang bila dilepaskan akan berefek lokal. Epinefrin disintesis dari asam amino tirosin yang dibentuk dari reaksi hidoksilasi dan dekarboksilasi. Tirosin diperoleh dari makanan, atau konversi dari asam amino fenilalanin di hepar. Pada kelenjar adrenal beberapa neuron, E berasal dari konversi NE oleh enzim PNMT (*phenylethanolamine-N-methyltransferase*) yang terdapat di dalam sitoplasma. Oleh karena itu sejumlah besar (80%) sekresi kelenjar medulla adrenal adalah E (Guyton dan Hall, 1996; Young dan Landsberg, 1998; Ganong, 1999).

Norepinefrin adalah neurotransmitter utama yang dilepaskan oleh ujung saraf adrenergik (simpatis). Biosintesis NE sama seperti E, namun terjadi di

ujung saraf dan sebelum dilepaskan disimpan dahulu di dalam vesikel sinaptik. Bila terjadi rangsangan pada saraf simpatis maka NE akan dilepaskan dari dalam vesikel ke jaringan (Guyton dan Hall, 1996; Ganong, 1999).

Berbeda dengan NE yang berefek 1-2 detik, E mempunyai efek yang relatif lebih lama yakni sekitar 10-30 detik dengan efek maksimal, kemudian menurun 1 sampai beberapa menit. Perbedaan efek E dari NE pada jaringan adalah (Guyton dan Hall, 1996) :

1. E menstimulasi reseptor beta lebih kuat dari NE,
2. E menyebabkan vasokonstriksi pada otot lebih lemah dari NE,
3. E meningkatkan tahanan perifer lebih lemah dari NE,
4. E meningkatkan *cardiac output* lebih besar dari NE,
5. E merangsang peningkatan metabolisme lebih dari NE,

Stimulasi organ oleh saraf simpatis dilakukan baik secara langsung oleh aktivasi saraf simpatis, dan secara tidak langsung oleh hormon yang dihasilkan oleh medulla kelenjar adrenal. Dalam melaksanakan fungsinya kedua hal tersebut saling menunjang dan menggantikan satu sama lain. Nilai basal sekresi sistem saraf simpatis untuk melaksanakan fungsi minimalnya disebut sebagai *sympathic tone*, misalnya menjaga keadaan vasokonstriksi pembuluh darah arteri $\frac{1}{2}$ efek vasokonstriksi maksimalnya. Pada penelitian yang menghilangkan seluruh sarabut saraf simpatis yang menuju pembuluh darah diketahui bahwa tekanan arteri dan tekanan darah tidak menurun dari nilai normal. Ini membuktikan bahwa *sympathic tone* lebih banyak diperankan oleh sekresi E dan NE oleh medulla adrenal berturut-turut sebesar 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{menit}$ dan 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{menit}$ (Guyton dan Hall, 1996).

2.10.2 Epinefrin dan norepinefrin di dalam plasma

Pada keadaan fisiologis katekolamin di dalam plasma terikat secara longgar dengan albumin, globulin dan lipoprotein. Tidak ditemukan protein pengikat khusus untuk katekolamin, karena senyawa ini tidak larut di dalam air (Young dan Landsberg, 1998).

Kadar E di dalam plasma adalah 100-275 pmol/L atau 20-50 pg/mL. Kadar ini hampir sama di seluruh tubuh pada vena maupun arteri, kecuali pada vena lengan nilainya lebih rendah dari arteri. Ini terjadi akibat *uptake* jaringan dan karena jaringan lengan tidak mensekresi E ke dalam darah. Epinefrin plasma akan meningkat secara minimal sebagai respon terhadap perubahan posisi ke posisi tegak/berdiri. Kadar E plasma bervariasi menurut jenis kelamin (wanita lebih rendah daripada pria), ras (kulit hitam lebih rendah daripada kulit putih) dan menggambarkan bentuk sirkadian. Namun, sekresi E ini tidak menurun sejalan dengan bertambahnya umur (Young dan Landsberg, 1998).

Sedangkan kadar basal plasma NE adalah sebesar 0,6-2,0 nmol/L atau 100-350 pg/mL. NE yang dilepaskan oleh ujung presinaptik saraf simpatis akan ditangkap kembali oleh ujung postsinaptik atau dimetabolisme secara lokal pada jaringan efektor. Pada lengan kadar plasma vena NE lebih besar daripada kadar plasma arterinya kira-kira sebesar 30%. Perbedaan ini terjadi karena kadar plasma NE dari medulla adrenal meningkat saat mencapai lengan akibat absorpsi jaringan terhadap sekresi NE oleh sistem saraf simpatis (Young dan Landsberg, 1998).

2.10.3 Efek fisiologis katekolamin

Katekolamin berfungsi dan mempengaruhi hampir seluruh jaringan. Contoh yang paling umum adalah partisipasinya dengan hormon lain dan sistem

saraf dalam melaksanakan fungsi regulasi fisiologis. Efek fisiologis katekolamin dapat dibagi berdasarkan 3 bagian, yaitu (Young dan Landsberg, 1998) :

1. Efek pada sistem kardiovaskuler,
2. Efek pada viscera (organ-organ dalam), dan
3. Efek pada metabolisme.

Efek pada sistem kardiovaskuler adalah untuk mempertahankan integritas sirkulasi untuk menyediakan perfusi yang cukup pada organ-organ vital sebagai respon terhadap perubahan lingkungan. Efek ini sangat berkaitan dengan jalur afferen dan efferen, hubungan dengan pusat, sistem baroreseptor dan kemoreseptor (Guyton dan Hall, 1996; dan Young dan Landsberg, 1998). Pada sistem vaskuler, efek katekolamin dipengaruhi oleh jenis reseptor yang dimiliki. Reseptor katekolamin ada 2 macam yakni reseptor α dan β (Ganong, 1999). Pada jantung, katekolamin menyebabkan aktivasi reseptor β_1 berupa peningkatan denyut jantung, kekuatan kontraksi, kecepatan konduksi impuls dan sebagainya (Guyton dan Hall, 1996; Young dan Landsberg, 1998; Ganong, 1999).

Efek pada organ visceral terbagi (Young dan Landsberg, 1998) :

1. Otot polos : efek relaksasi lewat stimulasi reseptor β , kontraksi lewat stimulasi reseptor α .
2. Transpor elektrolit dan cairan : katekolamin berefek pada transpor air dan ion melewati membran organ seperti usus, kandung kemih, trakea, kornea dan epitel ginjal.
3. Sekresi protein: katekolamin merangsang sekresi peptida ke dalam air mata, saliva, getah pankreas, dan cairan prostat, serta meningkatkan pelepasan mukus dari mukosa gastrik dan epitel bronkial.

4. Pertumbuhan dan pembelahan sel : katekolamin meningkatkan proses pertumbuhan dan pembelahan sel.
5. Hemostasis : E meningkatkan jumlah trombosit dan proses perlekatannya melalui reseptor α_2 , faktor VII, faktor von Willebrand, faktor plasminogen jaringan, sintesis fibrinogen di hepar. Menurunkan kadar inhibitor aktivator plasminogen.
6. Fungsi imun : katekolamin mungkin berpengaruh pada aktivitas simpatoadrenal terhadap keadaan seperti emosional, status nutrisi dan aktivitas fisik.

Sedangkan efek metabolik katekolamin adalah (Young dan Landsberg, 1998) :

1. Metabolisme energi : katekolamin merangsang pemecahan sumber energi yang tersimpan menjadi energi yang siap digunakan. Efek utamanya adalah mobilisasi bahan-bahan energi dari hepar, jaringan lemak dan otot rangka.

Pada hepar, katekolamin meningkatkan keluaran glukosa hepar dengan jalan glikogenolisis, mempercepat proses glukoneogenesis dan penghambatan sintesis glikogen, melalui aktivasi reseptor α_1 dan β_2 . Selain itu katekolamin juga berperan dalam penekanan sekresi insulin dan merangsang sekresi glukagon pankreas.

Pada jaringan lemak, E dan NE berperan dalam meningkatkan proses lipolisis pada jaringan lemak putih melalui aktivasi hormon yang sensitif terhadap lipase oleh aktivasi reseptor α_1 dan β_2 .

Pada otot, melalui reseptor β_2 menstimulasi glikogenolisis, tanpa aktivasi reseptor α_1 . Selain itu terjadi peningkatan aktivitas otot yang memacu penggunaan glikogen menjadi glukosa.

Pada ginjal, terjadi produksi glukosa oleh sel-sel tubulus proksimal sehingga terjadi peningkatan reabsorpsi glukosa ke sirkulasi sebesar 30% melalui aktivasi reseptor melalui aktivasi reseptor α_1 .

Pada transport glukosa, E menyebabkan gangguan pada perpindahan glukosa dari cairan ekstraselluler. Efek ini merupakan efek yang berlawanan dengan fungsi insulin, sehingga secara tidak langsung menghambat fungsi insulin.

2. Metabolisme lipoprotein.

Peningkatan kadar katekolamin dapat meningkatkan kadar total plasma kolesterol melalui aktivasi reseptor α . Katekolamin juga meningkatkan kecepatan kerja enzim hepar yang mensintesis kolesterol, meningkatkan konversi kolesterol menjadi asam empedu, meningkatkan perombakan LDL melalui penurunan reseptor LD, meningkatkan kadar trigliserida plasma, VLDL plasma dan LDL plasma.

3. Metabolisme energi, karena aktivasi simpatis menimbulkan peningkatan metabolisme tubuh maka akan terjadi peningkatan perombakan energi menjadi panas.

4. Metabolisme air dan elektrolit, peningkatan kadar katekolamin sudah tentu akan meningkatkan metabolisme air dan elektrolit baik melalui efek terhadap metabolisme energi maupun perubahan-perubahan pada kerja hormon.

Air dan ion natrium, katekolamin merubah reabsorpsi ion natrium pada tubulus proksimal dan reabsorpsi air pada duktus kolektivus. Katekolamin juga mempengaruhi distribusi ion kalium pada cairan intra dan ekstraselluler. Melalui aktivasi reseptor α , katekolamin meningkatkan *effluks* ion kalium, dan melalui aktivasi reseptor β_2 , meningkatkan *uptake* ion kalium ke dalam hepar dan otot skelet. Katekolamin juga mempengaruhi

metabolisme ion kalsium, magnesium dan fosfat secara langsung melalui mekanisme transpor dan metabolisme tulang. Secara tidak langsung melalui sekresi hormon kalsitonin dan paratiroid. E menyebabkan penurunan kadar ion Mg plasma, serum fosfat serta meningkatkan fosfat di dalam urin melalui inhibisi proses Na-fosfat Ko-transpor .

5. Metabolisme purin, katekolamin meningkatkan kadar plasma asam urat melalui peningkatan pelepasan asam urat dan penurunan *clearance* asam urat.

2.11 Mekanisme proliferasi otot polos

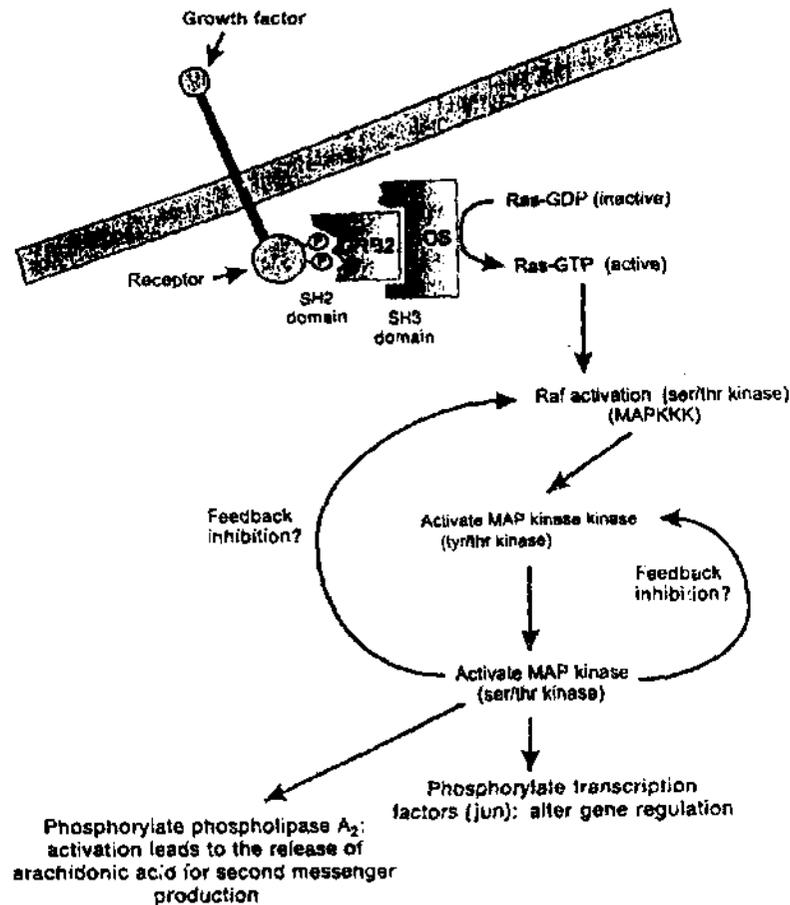
Proliferasi otot polos pembuluh darah terjadi melalui beberapa jalan, yaitu :

- (1) Jalur rangsangan oleh faktor pertumbuhan (*Growth Factors*) (Viedt dkk., 2000; Xu dkk., 2000)
- (2) Jalur rangsangan reseptor adrenergik (LiQian dkk., 1999)
- (3) Jalur rangsangan ET-1 (Lauth dkk., 2000).

Otot polos pembuluh darah dapat berproliferasi akibat rangsangan faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan ini dihasilkan oleh bermacam sel (*platelet*, fibroblast, endotel dsb) sebagai respon terhadap banyak faktor. Pada pembuluh darah yang terpenting adalah akibat *shear stress*. Peningkatan arus darah yang melewati dinding pembuluh darah merangsang dilepaskannya faktor pertumbuhan seperti PDGF, bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), EGF dan sebagainya yang bila berinteraksi dengan suatu protein membran sel otot polos akan memicu proses proliferasi. Pada sitoplasma sel otot polos terdapat suatu protein kinase tertentu yang disebut MAPK-1,2 (*Mitogen activated Protein Kinase-1,2*). MAPK merupakan protein golongan serin/treonin kinase, berperan

dalam menyalurkan sinyal ekstraselular ke inti sel untuk memacu mitogenesis dan diferensiasi sel (Viedt dkk., 2000). Aktivasi MAPK oleh faktor pertumbuhan dimulai dengan ikatan antara faktor pertumbuhan dengan reseptor tirosin kinase melalui beberapa protein perantara tertentu seperti GDRB2 (*growth factor receptor binding protein 2*), dan GNRF (*guanine nucleotide releasing factor*) yaitu SOS, yang menimbulkan fosforilasi Ras. Fosforilasi Ras mengaktifasi Raf sehingga terjadi stimulasi pada MEKs (MAPK efektor Kinases) atau disebut juga MAPKK (MAPK Kinase). Aktivasi MEK menyebabkan fosforilasi MAPK yang dilanjutkan dengan aktivasi banyak target intraselular seperti c-JNK (c-Jun amino terminal Kinase) (Sleight dan Lieberman, 1998; Greene dkk., 2000; Viedt dkk., 2000) (Lihat Gambar 2.13). Hasil akhir berupa pembentukan kompleks faktor transkripsi seperti AP-1 (*activator protein-1*) dan peningkatan ekspresi proto-oncogen *c-fos* dan *c-jun* mRNA yang berhubungan dengan proliferasi dan diferensiasi sel. Pada sel otot polos, keadaan ini menyebabkan pertambahan jumlah sel otot polos atau hiperplasia (Greene dkk., 2000).

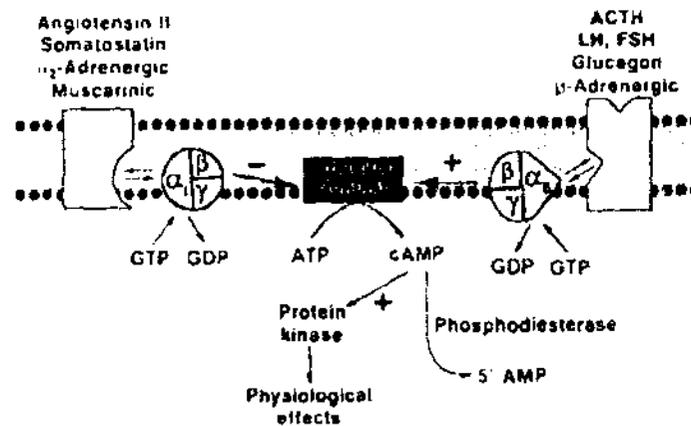
Aktivasi jalur rangsangan adrenergik, terjadi melalui ikatan antara katekolamin pada reseptor α_1 -adrenergik pada membran sel otot polos pembuluh darah. Ikatan tersebut menstimulasi peningkatan sintesis RNA, total protein sel dan α_1 aktin mRNA, hasil akhir berupa hipertrofi sel otot polos pembuluh darah (LiQian dkk., 1995). Jalur sinyal intraseluler dari ikatan reseptor dengan katekolamin adalah melalui jalur yang melibatkan protein G. Rangsangan proliferasi disebabkan oleh kompleks $G\beta\gamma$ yang terlepas dari subunit α akibat ikatan reseptor dan katekolamin, selanjutnya kompleks $G\beta\gamma$ ini akan memfosforilasi protein Raf dan seterusnya sampai aktivasi MAPK (lihat gambar 2.14) (Horseman dan Pike, 1998; Holness dkk, 2000)



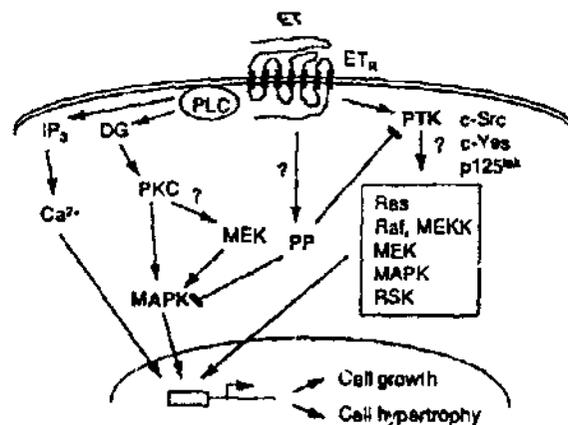
Gambar 2.13. Jalur Sinyal intraseluler proliferasi otot polos oleh aktivasi faktor pertumbuhan (Sleight dan Lieberman, 1998).

Penghantaran sinyal intraseluler untuk rangsangan proliferasi sel otot polos oleh jalur ET-1 terjadi melalui 2 jalur utama yaitu (1) jalur PLC (*phospholipase C*), dan (2) jalur PTK (*protein tyrosine kinase*). Aktivasi PLC maupun PTK diawali oleh ikatan ET-1 dengan RET yang memicu proliferasi melalui aktivasi MAPK. Pada jalur PLC rangsangan proliferasi terjadi lewat jalur terbentuknya DG (*diacylglycerol*), PKC (*protein kinase C*), kemudian MEK, dan MAPK, atau langsung dari PLC ke IP₃ yang menyebabkan pelepasan ion kalsium yang kemudian langsung ke inti sel (lihat gambar 2.15). Sedangkan pada jalur

PTK, aktivasi protein kinase ini oleh ikatan ET-1 dan RET akan memicu serangkaian reaksi fosforilasi protein-protein perantara, yaitu Ras Raf, MEKK, MEK, dan MAPK (lihat gambar 2.15). Proses selanjutnya yang terjadi di dalam inti sel adalah setelah MAPK teraktivasi, adalah terjadinya peningkatan ekspresi faktor-faktor transkripsi AP-1 atau protein nuklear seperti *c-fos* dan *c-jun* yang dapat meningkatkan aktivitas AP-1 cis elemen untuk menstimulasi pertumbuhan (Schramek dan Dunn, 1997).



Gambar 2.14 Jalur Sinyal intraseluler proliferasi otot polos oleh aktivasi pada reseptor adrenergik (LiQian dkk., 1995).



Gambar 2.15 Jalur Sinyal intraseluler proliferasi otot polos oleh aktivasi ET-1 (Schramek dan Dunn, 1997).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Stres baik secara fisik atau mental dapat menyebabkan eksitasi sistem simpatoadrenal (Young dan Landsberg, 1998; Spencer dan Huchison, 1999). Respon saraf simpatis ini meningkatkan pelepasan NE oleh ujung-ujung saraf simpatis dan E serta NE oleh kelenjar adrenal (Guyton dan Hall, 1996; Young dan Landsberg, 1998; Ganong, 1999). Pada sistem kardiovaskuler, efek peningkatan respon saraf simpatis tersebut menyebabkan peningkatan arus darah yang melewati pembuluh akibat peningkatan tekanan darah oleh peningkatan kekuatan pompa jantung karena aktivasi reseptor β -adrenergik, serta efek lokal pada pembuluh darah melalui aktivasi reseptor α -adrenergik (Guyton dan Hall, 1996; Young dan Landsberg, 1998).

Pada pembuluh darah, stres dapat menyebabkan proliferasi otot polos pembuluh darah melalui 2 macam mekanisme. Pertama, melalui mekanisme *vascular injury* akibat terjadinya kerusakan pembuluh darah karena peningkatan arus darah yang merusak tunika intima. Mekanisme ini memicu serangkaian proses pada pembuluh darah dengan hasil akhir terjadinya proliferasi otot polos pembuluh darah dengan atau tanpa perubahan bagian lain struktur pembuluh darah lainnya (Constantinides, 1994). Kedua, melalui mekanisme rangsangan E pada endotel secara langsung. Pada mekanisme ini, proliferasi otot polos pembuluh darah terjadi melalui peningkatan kadar ET-1 yang disekresi oleh endotel akibat rangsangan E di dalam darah yang meningkat (Luscher dan Noll, 1993).

ET-1 merupakan salah satu faktor yang berperan dalam regulasi tonus vaskuler. Bersama EDRF terutama NO dan PGI₂, ET-1 berperan dalam menjaga keseimbangan tonus vaskuler. Pada keadaan normal terdapat keseimbangan antara kedua faktor tersebut dalam melaksanakan fungsinya. Jika terjadi kelainan karena suatu faktor pada endotel (disfungsi endotel), maka keseimbangan tersebut akan terganggu dan seterusnya akan mendorong berkembangnya proses patologis (Boulanger dan VanHoutte, 1994).

Peningkatan tekanan darah dapat mengaktivasi sistem endotel untuk mensekresi ET-1, akibat peningkatan tekanan intraluminal pada dinding pembuluh darah (*shear stress*). Aktivasi sistem endotel ini berupa peningkatan sekresi ET-1 dan sintesis *preproendothelin-1* oleh endotel melalui peningkatan ekspresi mRNA-nya. Sedangkan pada sel otot polos pembuluh darah, *shear stress* menimbulkan peningkatan pembentukan RET yang juga terjadi melalui peningkatan ekspresi mRNA-nya (Lauth dkk., 2000). *Shear stress* dan ET-1 ternyata dapat memicu pelepasan faktor-faktor pertumbuhan seperti PDGF, bFGF, EGF, dan IL-1 yang dapat menyebabkan proliferasi otot polos pembuluh darah (Luscher dan Barton, 1997; Viedt dkk., 2000).

Pada membran otot polos pembuluh darah, diketahui ada 3 jalur proses proliferasi yakni yang melalui jalur perangsangan pada : (1) reseptor Tirosin kinase oleh faktor pertumbuhan (Sleight dan Lieberman, 1998; Greene dkk., 2000; Viedt dkk., 2000), (2) reseptor ET-1 yakni RET_B oleh ET-1 (Schramek dan Dunn, 1997), dan (3) reseptor α_1 -adrenergik oleh katekolamin yang melibatkan protein G (LiQian dkk., 1995). Ketiga jalur ini bersama-sama mengaktifkan jalur jalur mitogenik yang melibatkan *mitogen activated protein kinase* (MAPK) yang dapat mengaktivasi proses differensiasi di dalam inti sel (Miao dkk., 2000; Viedt dkk., 2000).

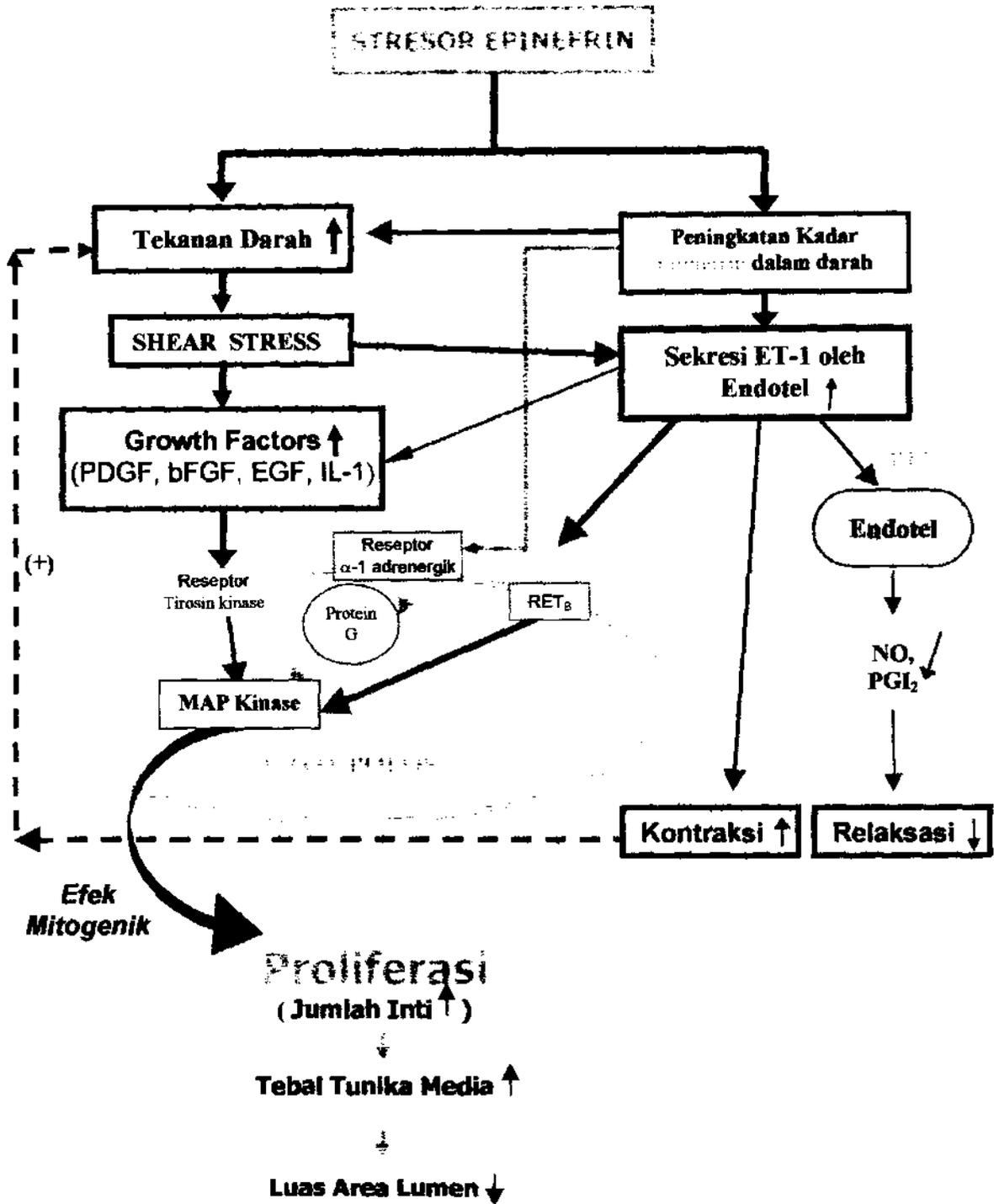
Dengan demikian akumulasi efek diatas menyebabkan proliferasi otot polos pembuluh darah. Proliferasi otot polos pembuluh darah yang terjadi karena *vascular injury* dan oleh karena peningkatan ET-1 berbeda sifatnya. Pada mekanisme *vascular injury*, proliferasi otot polos diikuti dengan migrasi ke tunika intima (*neointimal/myointimal formation*) disertai dengan peningkatan jaringan kolagen di sekitar hiperplasia sel-sel otot polos tersebut (Constantinides, 1994). Sedangkan melalui mekanisme peningkatan kadar ET-1, hal tersebut tidak terjadi (Luscher dan Noll, 1993). Terjadinya proliferasi otot polos pembuluh darah melalui mekanisme *vascular injury* telah banyak diungkap, sedangkan melalui mekanisme peningkatan kadar ET-1 akibat rangsangan epinefrin belum banyak diungkap sampai saat ini.

Kerangka konseptual pemikiran di atas, secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 3.1 pada halaman berikut :

3.2 Hipotesis penelitian

Melalui deduksi dari berbagai teori dan fakta empirik yang kemudian dituangkan dalam kerangka konseptual penelitian maka disusun hipotesis penelitian sebagai berikut :

Hipotesis : Stresor epinefrin menyebabkan proliferasi otot polos pembuluh darah



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual penelitian

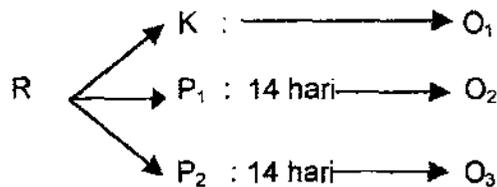
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan penelitian *Randomized Posttest Control-Group Design with separate pretest* (Campbell dan Stanley, 1966; Zainuddin, 1999).

Rancangan penelitian ini disusun sebagai langkah untuk menjawab permasalahan mengenai pengaruh stresor epinefrin terhadap proliferasi otot polos vaskuler yang diberikan pada kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol. Secara skematis rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut (Zainuddin, 1999) :



Keterangan : R = Randomisasi

P₁ = Perlakuan dengan pemberian injeksi intramuskular epinefrin.

P₂ = Perlakuan dengan pemberian injeksi intramuskular NaCl 0,9% (Salin).

K = Kelompok kontrol *Pretest* tanpa perlakuan

O₁ = Data kelompok kontrol *Pretest* tanpa perlakuan.

O₂ = Data kelompok perlakuan dengan injeksi Epinefrin setelah 14 hari

O₃ = Data kelompok perlakuan dengan injeksi NaCl 0,9 % (Salin) setelah 14 hari

4.2 Populasi, Sample, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

Populasi dan subyek penelitian adalah kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar, diperoleh dari tempat penangkarannya (Pusat Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gajahmada Yogyakarta). Sampel diambil dari populasi yang tidak terbatas (*infinite*), terdiri dari 3 kelompok yaitu 2 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol yang diambil secara random (*simple random sampling*) dengan cara mengundi dari setiap tikus yang terlebih dahulu diberi nomor (Zainuddin, 1999).

Besar sampel minimal untuk masing-masing kelompok adalah 8 ekor, ditentukan berdasarkan rumus besar sampel dari Higgins dan Kleinbaum (1985) dengan formulasi sebagai berikut (lihat lampiran 1) :

$$n = \frac{1}{1-f} \times \frac{2(Za + Zb)^2 \cdot Sc^2}{(\bar{Xc} - \bar{Xt})^2}$$

Keterangan :

- n = besar sampel
- \bar{Xc} = rerata kelompok kontrol
- \bar{Xt} = rerata kelompok perlakuan
- Sc = simpangan baku kelompok kontrol
- f = proporsi kegagalan
- Za = harga standar $\alpha_{0,05} = 1,96$
- Zb = harga standar $\beta_{0,05} = 1,28$

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (perlakuan)

Variabel perlakuan pada penelitian ini adalah pemberian stresor epinefrin pada hewan coba.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah proliferasi otot polos pembuluh darah, yang dibagi atas 3 yakni :

- 1) Tebal tunika media (TTM)
- 2) Luas area lumen (LAL)
- 3) Jumlah inti sel otot polos (JIOP) pada tunika media.

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah :

1. Umur dan jenis kelamin hewan coba.
2. Jenis dan tempat pembuluh darah yang dijadikan bahan penelitian.
3. Waktu perlakuan.
4. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba
5. Berat badan hewan coba.

4.4 Definisi Operasional Variabel

4.4.1 Stresor epinefrin

Stresor epinefrin adalah pemberian suntikan epinefrin bitartras (PT.ETHICA) secara intramuskular 0,05 mg per 200 gram tikus per kali, 2 kali sehari (Ingle, 1962). Pemberian suntikan epinefrin ini bertujuan untuk membuat kondisi stres pada hewan coba, terutama stres fisik yang dihasilkan oleh tindakan penyuntikan.

4.4.2 Proliferasi otot polos pembuluh darah

Proliferasi otot polos pembuluh darah adalah terjadinya hiperplasia otot polos. Hiperplasia otot polos dibuktikan dengan bertambahnya TTM

pembuluh darah (Nagler dkk., 1997; Song dkk., 2000) dan menyempitnya ukuran LAL pembuluh darah (Nagler dkk., 1997; Song dkk., 2000), serta peningkatan JiOP tersebut (Liaw dkk., 1997; Nagler dkk., 1997). TTM dan LAL diukur dengan menggunakan mikrometer (OB- μ -1/100 Olympus-Japan).

TTM diukur dari membrana elastika eksterna yang merupakan batas dengan tunika adventisia, sampai ke membrana elastika interna yang merupakan batas dengan tunika intima (Junqueira dan Caneiro, 1992; Liaw dkk., 1997; Nagler dkk., 1997; Song dkk., 2000).

LAL pembuluh darah didapat dari hasil pengukuran rata-rata diameter lumen terpanjang (D_1) dan terpendek (D_2) ($\frac{1}{2} \times D_1 \cdot D_2$) pembuluh darah dalam satuan mikron (Nagler dkk., 1997; Song dkk., 2000)

4.4.3 Umur dan jenis kelamin hewan coba.

Umur hewan coba adalah antara 3-4 bulan (dewasa) (Griffith dkk, 1962).

Jenis kelamin hewan coba adalah jantan.

4.4.4 Berat badan hewan coba

Berat badan hewan coba terletak di antara 125-250 gram, yang ditimbang dengan timbangan Torbal (Torsion Balance-Fisher Scientific) dengan ketelitian satu angka di belakang koma.

4.4.5 Jenis pembuluh darah yang dipakai sebagai bahan penelitian

Pembuluh darah yang dipakai adalah arteri femoralis (arteri sedang/arteri muskuler) yang mempunyai struktur dinding pembuluh yang lengkap, serta cukup mudah untuk dilakukan preparasi dan diamati (Junquiera dan Caneiro, 1992; Contantinides, 1994).

4.4.6 Waktu perlakuan

Perlakuan dilaksanakan saat hewan coba tersebut tenang, sudah diberi makan, 2 kali/hari pada pukul 07.00 dan 19.00 WIB, selama 14 hari (Contantinides, 1994; Liaw dkk., 1997; Nagler dkk., 1997; Song dkk., 2000).

4.4.7 Pemeliharaan dan perawatan hewan coba

Pemeliharaan dan perawatan hewan coba dilakukan di sebuah kandang dimana setiap kandang diisi 1 ekor hewan coba. Makanan menggunakan makanan hewan jenis Par G dari PT. Comfeed 20 gram/hari dan minum Aqua. Kandang terbuat dari bak plastik yang ditutup dengan anyaman kawat serta beralaskan sekam. Sebelum digunakan kandang dicuci bersih, kemudian alas kandang diberi sekam kering. Setiap 2 hari sekam diganti sehingga kebersihan tetap terjaga (Farris, 1962).

4.5 Bahan Penelitian.

4.5.1 Bahan perlakuan

Bahan perlakuan adalah epinefrin dalam bentuk larutan epinefrin bitartras (PT. ETHICA) dalam vial 1 cc dan larutan Salin (PT.OTSUKA Indonesia) dalam plabot 500 cc steril.

4.5.2 Bahan pemeriksaan

Bahan yang diperiksa dalam penelitian ini adalah pembuluh darah. Pembuluh darah yang dipilih adalah arteri femoralis yang diambil dari hewan coba yang kemudian dilakukan preparasi histologis dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (lihat lampiran 3).

4.5.3. Bahan pembiusan, pembuatan sediaan dan pewarnaan

Adapun larutan yang diperlukan untuk pembiusan, pembuatan sediaan dan pewarnaan H & E tersebut adalah :

1. Ether Anaestheticus untuk pembiusan,
2. Larutan buffer formalin untuk fiksasi jaringan,
3. Parafin cair,
4. Larutan alkohol 80%, 90% dan 95%,
5. Larutan Xyloi,
6. Canada balsam atau Entelan untuk proses *mounting*,
7. Kapas, dan
8. Kertas label.

4.6 Instrumen Penelitian

Alat untuk pemeliharaan hewan coba :

1. Kandang ukuran 30 x 40 cm,
2. Botol minum, dan
3. Tempat makanan (pellet).

Alat untuk pembedahan dan persiapan serta pelaksanaan preparasi pembuluh darah adalah :

1. Meja atau alas fiksasi dan diseksi hewan coba,
2. Stoples kecil berisi kapas dengan penutupnya untuk pembiusan,
3. Alat pengukur dalam cm (mistar),
4. Instrumentasi bedah minor (gunting, pisau bedah, pinset dsb),
5. Botol kecil dengan tutup untuk fiksasi jaringan,
6. Mikrotom putar (Erma Optical Work 422 – Japan) untuk memotong jaringan,
7. Gelas obyek dan gelas penutupnya, dan

8. Tabung pengecatan (*staining jar*),

Sedangkan alat yang diperlukan untuk tahap perlakuan, pengukuran dan pengamatan sediaan pembuluh darah adalah :

1. Sduit injeksi steril 1 cc (sduit insulin 40 Unit/cc),
2. Mikroskop cahaya binokuler + kamera (Olympus BH-2; Olympus C 35AD-4 : Japan),
3. Gratikulae dan mikrometer (OB- μ -1/100 Olympus-Japan).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Aklimatisasi

Sebelum diberikan perlakuan, direncanakan aklimatisasi terlebih dahulu pada hewan coba selama 7 (tujuh) hari dalam kondisi laboratorium, di laboratorium Biokimia FK UNAIR.

4.7.2 Pembagian kelompok hewan coba

Dilakukan randomisasi dari jumlah sampel penelitian, dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing dengan jumlah yang sama, yaitu kelompok 1 dan 2 adalah kelompok perlakuan yang diberi stresor epinefrin dan Salin secara injeksi intramuskular. Sedangkan kelompok 3 adalah kelompok kontrol tanpa diberikan perlakuan apapun.

Sebelum diberikan perlakuan, masing-masing tikus ditimbang BB-nya dengan timbangan Torbal dengan ketelitian 1 angka dibelakang koma.

4.7.3 Pelaksanaan perlakuan

Pemberian stresor epinefrin bitartras dan suntikan Salin intramuskular 2 kali sehari, selama 14 hari pada hewan coba kelompok 1 dan 2, dengan ukuran dan dosis yang sama. Perlakuan dilakukan setiap hari pada jam yang sama (07.00 dan 19.00 WIB).

4.7.4 Pembiusan

Pembiusan dilakukan dengan menggunakan Ether di dalam stoples pembiusan sampai tikus tampak tanda-tanda kematian seperti pupil midriasis, anggota badan tidak bergerak lagi dan sebagainya.

4.7.5 Persiapan jaringan arteri femoralis (pembedahan)

Setelah dibius, tikus diletakkan di atas meja pembedahan terlentang, dengan keempat anggota gerak difiksasi. Tungkai dibuka seluasnya, lalu ditentukan regio femoralis. Arteri femoralis dicari yang terletak kira-kira pada pertengahan permukaan sebelah dalam regio femoralis. Daerah yang akan didiseksi dieksplorasi, letak arteri femoralis ditentukan dengan cara merabanya tepat di bawah kulit (Greene, 1962). Incisi longitudinal dilakukan sejajar sumbu panjang femur pada kulit dan jaringan subkutan sampai otot, setelah lapangan operasi dicukur dan dilakukan tindakan antisepsi. Otot-otot tungkai disisihkan satu persatu sampai terlihat arteri femoralis. Arteri ini ditelusuri ke atas seproksimal mungkin sampai terlihat ligamentum inguinale, pangkal arteri femoralis adalah tepat disebelah inferior ligamentum ini (Greene, 1962). Arteri femoralis dipotong mulai dari titik tersebut sampai kurang lebih 2 cm ke arah caudal bersama dengan otot-otot dan jaringan disekitarnya. Jaringan arteri femoralis tadi kemudian dimasukkan ke dalam botol kecil yang berisi larutan buffer formalin 10%, ditutup rapat dan diberi label identitas sampel.

4.7.6 Pembuatan sediaan histologis dan pewarnaan

Segara setelah terkumpul, bahan penelitian dikirim ke Laboratorium Anatomi-Histologi FK UNAIR untuk dilakukan pembuatan preparat histologis dan dilakukan pewarnaan (teknik pembuatan sediaan dan

pewarnaan (lihat lampiran 2 dan 3). Masing-masing sampel dibuat 2 sediaan. Sediaan yang baik kemudian difoto.

4.7.7 Pengukuran

Sediaan arteri femoralis difoto dengan menggunakan mikroskop kamera (Olympus BH-2-Olympus C 35AD-4:Japan). Foto tersebut kemudian *discanning* (Canon-Scan 300NP), lalu dilakukan analisa histomorfometri dengan program *Software* Komputer (Adobe Photoshop 5.5; Adobe Inc.) untuk mendapatkan ukuran TTM dan LAL. Sedangkan jumlah inti otot polos dihitung dari foto sediaan tersebut. Data yang diperoleh kemudian dianalisis.

4.8 Lokasi dan Waktu Peneitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia FK UNAIR (pemeliharaan dan perlakuan). Pembuatan sediaan histologis pembuluh darah dilakukan di Laboratorium Histologi FK UNAIR. Waktu pelaksanaan dimulai bulan April 2001.

4.9 Tahapan Analisis Data

Data hasil penelitian ini ditabulasi dan dianalisis dengan program komputer statistika SPSS 10,0 *for windows* (SPSS Inc. 1999) dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). melalui beberapa tahap yaitu :

1. Statistika Deskriptif
2. Uji Normalitas
3. Uji MANOVA
4. Analisis Diskriminan

BAB 5

HASIL PENELITIAN

Data yang didapat dari penelitian ini adalah hasil pengukuran variabel proliferasi otot polos pembuluh darah yaitu LAL (μm^2), TTM (μm), serta JIOP per tunika media. Data tersebut terlebih dahulu diuji normalitas dengan uji Kolmogorov-Smirnov, kemudian dianalisis untuk mendapatkan nilai deskriptif rata-rata dan simpangan baku untuk masing-masing kelompok dan perlakuan. Selanjutnya ketiga variabel proliferasi otot polos dianalisis dengan uji Manova dan analisis diskriminan.

5.1 Hasil Uji Normalitas Distribusi Data

Uji Kolmogorof-Smirnov menunjukkan bahwa variabel proliferasi otot polos pembuluh darah adalah berdistribusi normal, seperti terlihat pada tabel berikut :

Tabel 5.1 Hasil Uji Kolmogorof-Smirnov Data Variabel proliferasi otot polos pembuluh darah berdasarkan kelompok perlakuan

No.	Kelompok	Nilai p Variabel Tergantung		
		LAL	TTM	JIOP
1.	Epinefrin	0,774*	0,825*	0,899*
2.	Salin	0,705*	0,784*	0,948*
3.	Pretest	0,969*	0,823*	0,986*

Ket : * : data berdistribusi normal ($p > 0,05$)

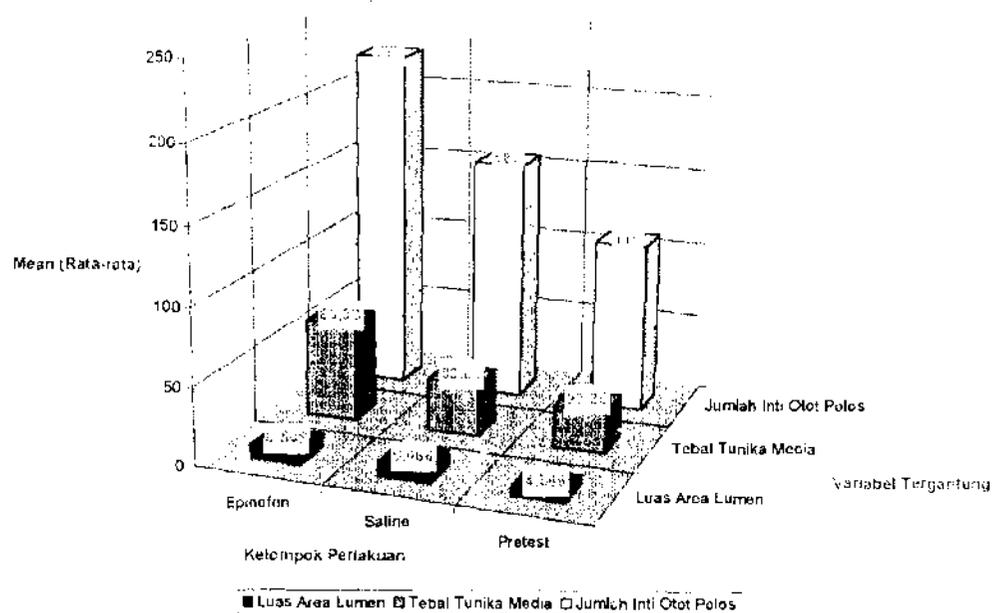
5.2 Hasil Uji Statistik Deskriptif

Dari hasil uji statistik deskriptif diketahui bahwa data kelompok Epinefrin berturut-turut untuk variabel LAL dalam μm^2 , TTM dalam μm dan JIOP per tunika media pembuluh darah (rerata \pm simpangan baku) adalah 85.480 ± 11.100 ,

63,33 ± 13,80, dan 223 ± 45. Untuk kelompok Salin adalah 84.660 ± 32.620 33,61 ± 5,12, dan 157 ± 41. Sedangkan untuk kelompok *pretest* adalah 45.660 ± 12.460, 27,25 ± 2,68, dan 110 ± 12. Hasil deskriptif data tersebut adalah sebagai berikut :

Tabel 5.2. Data rata-rata & simpangan baku variabel proliferasi otot polos pembuluh darah.

No.	Variabel Tergantung	Kelompok	Mean ± SD
1.	Luas Area Lumen (μm ²)	Epinefrin	85.480 ± 11.100
		Salin	84.660 ± 32.620
		Pretest	45.660 ± 12.460
2.	Tebal Tunika Media (μm)	Epinefrin	63,33 ± 13.80
		Salin	33,61 ± 5,12
		Pretest	27,25 ± 2.68
3.	Jumlah Inti otot Polos (per tunika media)	Epinefrin	223 ± 45
		Salin	157 ± 41
		Pretest	110 ± 12



Gambar 5.1. Grafik rata-rata variabel proliferasi otot polos pembuluh darah

5.3 Hasil Uji Manova

Hasil analisis multivariat menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna dari ketiga perlakuan untuk menyebabkan proliferasi otot polos pembuluh darah ($p < 0,01$), seperti terlihat pada tabel 5.3 dan 5.4 berikut :

Tabel 5.3 Tabel Hasil Nilai Koefisien T^2 Hotelling's Trace antar perlakuan

Effek	Nilai F	Nilai p
Perlakuan	15,416	0,000*

Ket : * : Signifikan /bermakna ($p < 0,01$)

Sedangkan hasil analisis univariat menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara ketiga kelompok perlakuan dan dalam masing-masing kelompok perlakuan berdasarkan LAL, TTM dan JIOP ($p < 0,01$), sebagai berikut :

Tabel 5.4 Hasil Analisis univariat (*test between subject Effect*) untuk Kelompok perlakuan

Sumber	Variabel Tergantung	Nilai F	Nilai p
Perlakuan	LAL	9,258	0,001*
	TTM	39,760	0,000*
	JIOP	20,416	0,000*

Ket : * : Signifikan ($p < 0,01$)

5.4 Hasil Analisis Diskriminan

Hasil Analisis Diskriminan menunjukkan bahwa terdapat 2 variabel atau faktor pembeda (*discriminant factors*) yang dapat membedakan proliferasi otot polos pembuluh darah berdasarkan kelompok perlakuan, yaitu LAL dan TTM. Hasil tersebut dapat terlihat pada tabel 5.5 dan tabel 5.6 berikut :

Tabel 5.5. Analisis Diskriminan dari Variabel Tergantung

Variabel/faktor Pembeda	Wilk's Lambda	Exact F Sig.	Wilk's Lambda Sig.	Eigen Value	Cannonical Correlatiom
LAL	0,531	7,238 x 10 ⁸	0,000	4,308	0,901
TTM	0,209	1,914 x 10 ⁸	0,006	0,448	0,556

Tabel 5.6. Klasifikasi Koefisien Fungsi Diskriminan linear Fisher

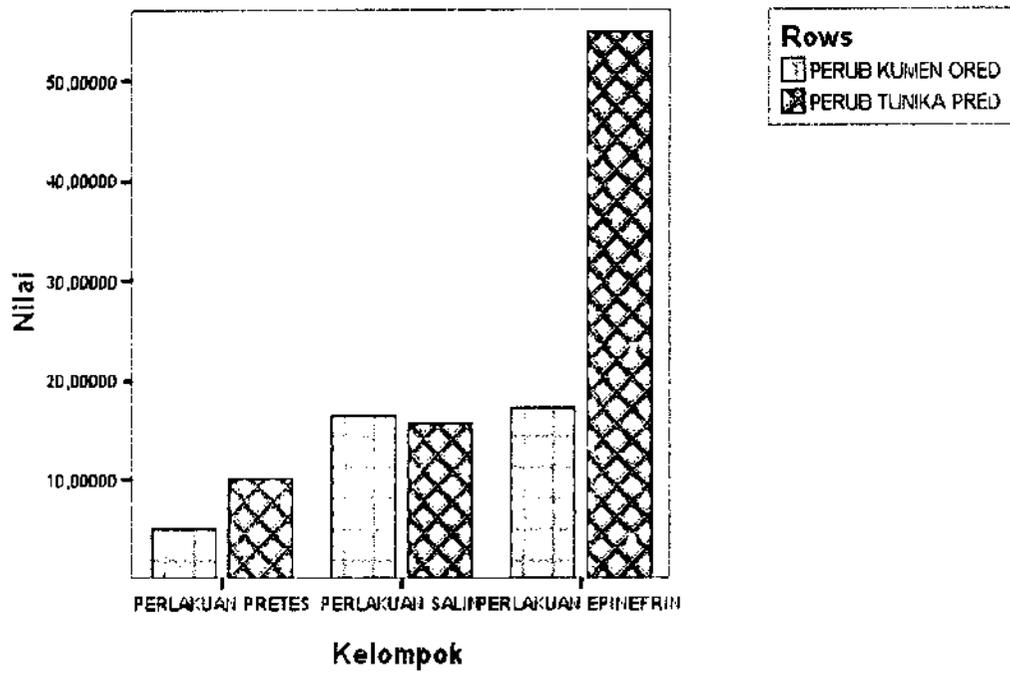
Variabel/Faktor Pembeda	Perlakuan		
	Epinefrin	Salin	Pretest
LAL	2,032	1,958	1,073
TTM	0,866	0,467	0,374
(Constant)	-37,205	-17,234	-8,649

5.5 Penentuan Pola

Pola respon proliferasi otot polos vaskular pada kelompok *Pretest*, Salin dan Epinefrin didasarkan pada harga kontribusi diskriminan setiap faktor pembeda, yang diperoleh dari perkalian antara koefisien diskriminan (tabel 5.6) dengan rerata setiap faktor pembeda (tabel 5.2). Adapun pola respon dan polanya dapat dilihat pada tabel dan grafik berikut :

Tabel 5.7. Kontribusi diskriminan pola respon variabel pembeda menurut kelompok perlakuan

Variabel Pembeda	Kelompok Perlakuan		
	Epinefrin	Salin	Pretest
LAL	17,36903	16,57545	4,89878
TTM	54,84595	15,69762	10,19290



Gambar 5.2. Pola Respon Variabel Pembeda Menurut Kelompok Perlakuan

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Metode Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan respon pembuluh darah berupa proliferasi otot polosnya terhadap stresor epinefrin, dengan melihat variabel-variabel proliferasi otot polos pembuluh darah yakni peningkatan JIOP, bertambahnya TTM serta penurunan LAL pembuluh darah. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris yang memenuhi kriteria sebagai penelitian eksperimen murni (*true eksperimental*) yaitu adanya kriteria perlakuan kelompok perlakuan, kelompok kontrol, replikasi dan randomisasi (Zainuddin, 1999).

Rancangan penelitian yang digunakan pada dasarnya adalah *The Post-test Control Group Design*, yang dimodifikasi dengan menambahkan kelompok *Pretest* yang terpisah (*separate pretest*). Rancangan ini dipergunakan karena :

- (1) Sampel penelitian yang digunakan harus dikorbankan untuk mendapatkan arteri femoralis sebagai unit analisis tempat pengukuran variabel tergantung (*The Post-test Only*) (Zainuddin, 1999).
- (2) Menggunakan kelompok perlakuan dan kelompok kontrol (*Control Group*) (Zainuddin, 1999).
- (3) Menggunakan kelompok kontrol tambahan sebagai kelompok kontrol *pretest* yang terpisah (*separate*) dari kelompok perlakuan (Epinefrin) dan kelompok kontrol perlakuan (Salin). Kelompok ini digunakan sebagai kontrol perlakuan sebenarnya untuk membedakan apakah ada perbedaan pengaruh antara perlakuan suntikan (stresor) dengan tanpa suntikan (*instrumentation effect*) (Campbell dan Stanley, 1966; Zainuddin, 1999).

Hewan coba yang dipilih untuk digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar. Tikus (*rat*) sebagai mamalia dapat dipakai sebagai model hewan coba untuk mempelajari mekanisme fisiologis dan patologis yang terjadi pada manusia. Pada penelitian ini, tikus dipakai karena tergolong hewan yang resisten terhadap timbulnya aterosklerosis akibat hiperkolesterolemia, jadi dalam hal ini proses proliferasi otot polos pada arteri melalui mekanisme *vascular injury* yang sering terjadi pada keadaan hiperlipidemia dapat dikurangi pengaruhnya (Constantinides, 1994).

Perlakuan yang diberikan pada hewan coba di dalam penelitian ini pada dasarnya untuk menciptakan kondisi stres dengan cara suntikan intramuskular pada otot *gastrocnemius* tungkai bawah. Suntikan yang digolongkan sebagai stresor fisik ini menimbulkan rasa nyeri pada hewan coba sehingga dihasilkan efek yang diharapkan, yakni timbulnya *stress respon* berupa respon biologis dengan teraktivasinya sistem simpatoadrenal akibat rangsangan saraf otonom. Nyeri suntikan yang dihantarkan lewat serabut saraf tipe A δ dan tipe C ke medulla spinalis, traktus neo/paleo-spinothalamicus, kemudian ke talamus dan area korteks sensoris (Guyton dan Hall, 1996) dapat direspon sebagai stresor yang akhirnya dapat mengaktivasi sistem simpatoadrenal yang menyebabkan peningkatan kadar epinefrin darah dan tekanan darah (Young dan Landsberg, 1998; Ganong, 1999). Selain stres fisik yang timbul dari nyeri suntikan, perlakuan pada hewan coba sendiri dapat menimbulkan stres psikologis akibat suasana ketidaktenangan, keadaan yang mengancam dsb, yang juga dapat menimbulkan respon biologis terhadap stresor terutama lewat jalur HPA-axis (*Hypothalamus Pituitary Anterior Axis*) (Spencer dan Huchison, 1999).

Pemberian senyawa epinefrin bitartras dalam larutan (PT.ETHICA) disini bertujuan untuk mengkondisikan adanya kadar epinefrin plasma yang tinggi.

Diharapkan keadaan ini dapat merangsang proliferasi otot polos pembuluh darah secara langsung melalui peningkatan sekresi ET-1 oleh endotel dan secara tidak langsung oleh efek terjadinya *shear stress* akibat peningkatan tekanan darah lewat pelepasan faktor pertumbuhan. Sedangkan pemilihan larutan Salin sebagai kontrol perlakuan adalah untuk mendapatkan larutan yang fisiologis yang tidak berefek tambahan apapun dan diabsorpsi sempurna. Pemilihan ini juga bertujuan untuk mengeliminir efek nyeri tambahan yang dapat mengganggu jika diberikan larutan yang lain seperti larutan aquabidest misalnya.

Perlakuan pada hewan coba yang diberikan selama 14 hari berturut-turut, dimaksudkan agar respon otot polos pembuluh darah yang akan diamati terjadi pada tahap awal (*early stage : 7-14 hari*) proses aterosklerosis (Huttner dan Gabbiani, 1983). Pada tahap ini proliferasi yang terjadi tanpa disertai oleh kerusakan endotel pada tunika intima dinding pembuluh darah. Rangsangan proliferasi terjadi akibat melebarnya celah diantara lapisan susunan endotel karena tekanan arus darah yang tinggi, yang memungkinkan bahan-bahan proliferasi yang ada di dalam plasma khususnya epinefrin, ET-1 dan faktor pertumbuhan dapat berinteraksi dengan reseptor spesifiknya di membran luar sel otot polos pada tunika media pembuluh darah (Constantinides, 1994).

Pemilihan arteri femoralis sebagai unit eksperimen adalah karena alasan struktur dan letak. Arteri femoralis termasuk jenis arteri sedang (arteri muskular) dengan struktur yang sudah lengkap yakni terdiri dari tunika intima, media dan serosa. Letaknya yang lebih jauh dari jantung dibanding aorta, memungkinkan terjadinya proliferasi otot polos oleh efek *shear stress* dapat dikurangi. Faktor ini juga dikendalikan dengan hanya mengambil bagian distal (1/2 cm distal) dari potongan arteri femoralis untuk dibuat sediaan histologis arteri femoralis, karena menurut Davies dan Barbee (1994) efek *shear stress* terhadap kerusakan endotel pada tunika intima cenderung terjadi pada bagian proksimal tempat

percabangan arteri-arteri akibat aliran arus darah laminer yang kuat maupun aliran turbulen.

6.2 Pembahasan Pemilihan Uji Statistik

6.2.1. Uji normalitas

Uji normalitas ini dilakukan terhadap variabel tergantung (LAL, TTM dan JIOP). Uji normalitas ini bertujuan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh dari sampel yang berdistribusi normal atau tidak (Zainuddin, 1999). Melalui uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap variabel tergantung, didapatkan bahwa variabel-variabel tersebut berdistribusi normal ($p > 0,05$) (lihat lampiran 8).

6.2.2 Uji Manova

Analisis multivariat digunakan untuk mengetahui adanya beda respon penebalan otot polos pembuluh darah yaitu variabel LAL, TTM dan JIOP pada masing-masing kelompok perlakuan (Epinefrin, Salin dan *Pretest*) secara terpisah (*univariate*) maupun secara bersama-sama (*multivariate*). Uji ini dipilih karena ketiga variabel tergantung tersebut saling berhubungan satu sama lain.

6.2.3 Analisis Diskriminan

Analisis ini merupakan lanjutan dari uji Manova, karena jika pada uji Manova didapatkan perbedaan respon penebalan otot polos pembuluh darah antara kelompok perlakuan yang dilihat pada LAL, TTM dan JIOP, maka perlu diketahui dan ditentukan variabel tergantung mana yang berperan sebagai variabel pembeda. Analisis ini juga dipakai untuk menggambarkan pola respon proliferasi otot polos pembuluh darah pada masing-masing kelompok perlakuan.

6.3 Pembahasan Hasil Penelitian

Pada hipertensi, pembuluh darah cenderung untuk vasokonstriksi dan otot polosnya cenderung berproliferasi, yang merupakan awal terjadinya kerusakan sistem kardiovaskuler. Perubahan struktur pembuluh darah atau *remodeling* vaskuler pada hipertensi ditandai salah satunya adalah dengan adanya peningkatan TTM, pengurangan LAL, dan peningkatan matriks ekstraselluler (Soemantri, 2001), dengan atau tanpa terjadinya kerusakan endotel (Constantinides, 1994).

ET-1 yang merupakan EDCF ternyata mempunyai efek proliferaatif terhadap otot polos vaskuler secara langsung. Di sisi lain peningkatan kadar ET-1 di dalam darah dapat dipicu oleh peningkatan kadar E di dalam darah, dan secara tidak langsung akibat efek *shear stress*. Sebagai *stress hormone* (Axelrod dan Reisine, 1984), ternyata peningkatan E yang terjadi dalam kondisi stres (Spencer dan Huchison, 1999), dapat langsung memicu proliferasi otot polos pembuluh darah (Horseman dan Pike, 1998; Holness dkk, 2000). Dengan demikian, peningkatan kadar E dalam hal ini dengan pemberian suntikan i.m epinefrin (stresor epinefrin), dapat meningkatkan proliferasi otot polos pembuluh darah baik melalui peningkatan sekresi ET-1, maupun melalui efek *shear stress*.

Penelitian yang bertujuan mengetahui respon pembuluh darah berupa proliferasi otot polosnya terhadap stresor epinefrin, dengan melihat variabel-variabel penebalan otot polos pembuluh darah yakni peningkatan JIOP, TTM serta penurunan LAL pembuluh darah ini, ternyata memang menunjukkan proliferasi otot polos pembuluh darah tanpa didahului atau disertai oleh kerusakan endotel (lihat foto hasil penelitian pada lampiran 9 : semua endotel pembuluh darah sampel masih utuh). Ini terlihat pada hasil penelitian dimana terjadi peningkatan JIOP pada kelompok Epinefrin (220 ± 45) dibanding

kelompok *Pretest* (110 ± 12), dan peningkatan TTM pada kelompok Epinefrin ($63,33 \pm 13,8 \mu\text{m}$) dibanding kelompok *Pretest* ($27,25 \pm 2,66 \mu\text{m}$).

Peningkatan lebih kurang 2 kali lipat JIOP dan TTM pada kelompok Epinefrin dibanding kelompok *Pretest* ini membuktikan bahwa pada endotel yang utuh perubahan struktur pembuluh darah (proses remodeling vaskuler) sudah terjadi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Constantinides (1994), bahwa proses remodeling vaskuler pada tahap dini arterosklerosis tidak ditemukan kerusakan endotel. Pada tahap ini respon otot polos yang terdapat di bawah lapisan endotel sudah terjadi terhadap bahan-bahan proliferasif yang ada di dalam darah, melalui pelebaran celah antara susunan endotel (*tight junction*) yang disebabkan salah satunya oleh efek mekanis dari tekanan arus darah ke dinding pembuluh darah akibat peningkatan tekanan darah. Dengan demikian bahan-bahan vasokonstriktor khususnya dalam hal ini ET-1, E dan faktor pertumbuhan dapat berinteraksi dengan reseptor spesifiknya pada membran luar sel otot polos pembuluh darah, yang selanjutnya memicu proses penyaluran sinyal intraselluler ke inti sel untuk proliferasi atau hiperplasia (Fredriksson dkk., 2000)

Pada tabel 5.2 dapat dilihat juga adanya peningkatan JIOP dan TTM pada kelompok Salin dibanding kelompok *Pretest* (157 ± 41 dan $33,61 \pm 5,12$ vs 110 ± 12 dan $27,25 \pm 2,68$). Hal ini menunjukkan bahwa nyeri yang dihasilkan oleh suntikan i.m pada kelompok Salin yang berfungsi sebagai kelompok kontrol perlakuan juga merupakan stresor yang dapat merangsang proliferasi otot polos pembuluh darah, meskipun tidak sebesar pengaruh yang dihasilkan oleh penyuntikan Epinefrin. Nyeri suntikan yang dihantarkan lewat serabut saraf tipe A δ dan tipe C ke medulla spinalis, traktus neo/paleo-spinothalamicus, kemudian ke talamus dan area korteks sensoris (Guyton dan Hall, 1996) dapat direspon sebagai stresor yang akhirnya dapat mengaktifasi sistem simpatoadrenai yang

menyebabkan peningkatan kadar epinefrin darah dan tekanan darah (Young dan Landsberg, 1998; Ganong, 1999).

Seperti telah disebutkan di atas, pacuan proliferasi otot polos pembuluh darah dapat terjadi karena efek mitogenik dari (lihat skema kerangka konseptual pemikiran halaman 43) :

1. Pacuan epinefrin langsung pada reseptornya di otot polos,
2. Lewat perangsangan RET oleh ET-1 pada otot polos akibat peningkatan sekresi ET-1 oleh epinefrin,
3. Peningkatan faktor pertumbuhan, akibat rangsangan *shear stress* dan ET-1 sendiri.

Dalam penelitian ini, sulit menentukan faktor mana yang paling berperan dalam proliferasi otot polos pembuluh darah, karena proliferasi otot polos yang terjadi hanya hasil akhir yang timbul akibat pemberian stresor epinefrin. Faktor-faktor penghubung yang berperan dalam masing-masing jalur tersebut seperti kadar ET-1, kadar faktor pertumbuhan, serta kadar epinefrin plasma sendiri tidak diukur. Namun yang jelas dapat dikatakan bahwa :

1. Proliferasi otot polos yang terjadi pada keadaan ini tidak didahului atau disertai oleh kerusakan endotel, paling tidak endotelnya terlihat masih utuh (lihat foto hasil penelitian pada lampiran 9).
2. Proliferasi otot polos yang terjadi disebabkan oleh efek gabungan dari efek langsung yang dihasilkan oleh peningkatan kadar epinefrin plasma, maupun efek tidak langsung melalui efek *shear stress* yang timbul akibat peningkatan tekanan darah. Kedua efek ini saling berinteraksi untuk menimbulkan rangsangan mitogenik proliferasi otot polos, karena tanpa adanya peningkatan kadar Epinefrin, efek *shear stress* tidak terjadi. Sebaliknya tanpa bantuan efek *shear stress*, kadar Epinefrin dan ET-1 plasma yang tinggi mungkin tidak akan berpengaruh pada otot polos pembuluh darah,

karena bahan-bahan tersebut tidak dapat berinteraksi dengan reseptornya masing-masing dipermukaan sel otot polos pembuluh darah.

Pada tabel 5.2 dapat dilihat juga adanya peningkatan JIOP dan TTM pada kelompok Salin dibanding kelompok *Pretest* (157 ± 41 dan $33,61 \pm 5,12$ vs 110 ± 12 dan $27,25 \pm 2,68$). Hal ini menunjukkan bahwa nyeri yang dihasilkan oleh suntikan i.m pada kelompok Salin yang berfungsi sebagai kelompok kontrol perlakuan mungkin juga merupakan stresor yang dapat merangsang proliferasi otot polos pembuluh darah, meskipun tidak sebesar pengaruh yang dihasilkan oleh penyuntikan Epinefrin. Nyeri suntikan yang dihantarkan lewat serabut saraf tipe A δ dan tipe C ke medulla spinalis, traktus neo/paleo-spinothalamicus, kemudian ke talamus dan area korteks sensoris (Guyton dan Hall, 1996) dapat direpson sebagai stresor yang akhirnya dapat mengaktivasi sistem simpatoadrenal yang menyebabkan peningkatan kadar epinefrin darah dan tekanan darah (Young dan Landsberg, 1998; Ganong, 1999). Jadi dalam hal ini peningkatan JIOP dan TTM yang lebih besar pada kelompok Epinefrin dibanding kelompok Salin menunjukkan bahwa perbedaan kuantitas stresor yang diberikan. Pada kelompok Salin proliferasi otot polos yang terjadi mungkin hanya akibat stresor yang disebabkan oleh suntikan, sedangkan pada kelompok Epinefrin merupakan gabungan antara stresor suntikan dan efek yang ditimbulkan oleh epinefrin plasma yang tinggi..

Gambaran proliferasi otot polos pembuluh darah dimulai dengan terjadinya hiperplasia sel otot polos (Constantinides, 1994; Liaw dkk., 1997; Fredriksson, 2000) yang dapat dilihat dengan terjadinya peningkatan JIOP dan TTM. Keadaan ini akhirnya akan menyebabkan penyempitan lumen pembuluh darah yang terlihat dengan penurunan LAL. Jadi dalam hal ini terdapat hubungan antara ketiga variabel proliferasi otot polos tersebut. Pada tabel 5.2, seperti telah

disebutkan di atas, terdapat peningkatan JIOP dan TTM lebih dari 2 kali lipat antara kelompok Epinefrin atau kelompok Salin dibanding kelompok *Pretest*. Semestinya terjadi menyebabkan penurunan LAL pada kelompok Epinefrin/Salin dibanding kelompok *Pretest*, namun yang terlihat justru sebaliknya yaitu terjadi peningkatan LAL 2 kali lipat. Hal ini terjadi mungkin karena terabaikannya pengaruh faktor pertumbuhan dan perkembangan pembuluh darah (*maturity effect*) pada penelitian ini. Kemungkinan terjadinya peningkatan LAL baik pada kelompok Epinefrin maupun Salin ini akibat bertambah besarnya pembuluh darah secara keseluruhan mengikuti pertumbuhan hewan coba dalam masa perlakuan 2 minggu. Semestinya faktor ini dikontrol dengan menambah kelompok kontrol *Posttest* yang terpisah (*separate posttest*) setelah 2 minggu perlakuan.

Selanjutnya, nilai LAL untuk kelompok Epinefrin dibanding kelompok Salin tidak terlihat berbeda ($85.480 \pm 32.620 \mu\text{m}^2$ vs $84.660 \pm 11.100 \mu\text{m}^2$). Dengan uji statistik terbukti berbeda tidak nyata ($p = 0,939$; $p > 0,05$), tidak seperti perubahan yang terjadi pada TTM dan JIOP yang secara statistik berbeda sangat nyata ($p = 0,000$ dan $p = 0,001$; $p < 0,01$) seperti terlihat pada tabel *pairwise comparison* MANOVA di lampiran 8. Menurut peneliti, hal ini terjadi mungkin karena proses proliferasi otot polos pembuluh darah dalam penelitian ini terjadi ke arah luar menjauhi lumen (abluminal). Hal ini terjadi karena lapisan endotel pada tunika intima pembuluh darah masih utuh, sehingga tidak terjadi pertumbuhan tunika media (otot polos) baru atau *neointimal/myointimal formation* ke arah lumen seperti yang sering terjadi pada proses arterosklerosis dengan lapisan endotel yang sudah rusak yang terjadi pada keadaan *vascular injury* (Soemantri, 2001). Dengan demikian dapat dipahami bahwa LAL pada kelompok Epinefrin dan kelompok Salin hampir sama atau tidak terdapat perbedaan yang nyata.

Berdasarkan Uji statistik MANOVA ternyata secara keseluruhan terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) dari ketiga variabel tergantung terhadap kelompok perlakuan (lihat tabel 5.2 dan tabel analisis multivariat pada lampiran 8). Ini menunjukkan bahwa perlakuan stresor epinefrin memang menyebabkan penebalan otot polos pembuluh darah yang berbeda nyata dibanding kontrol perlakuan (kelompok Salin) ataupun kontrol *prefest*. Hal ini dikukuhkan kembali dengan hasil analisis univariat terhadap variabel tergantung yang menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) baik untuk nilai pada masing-masing sampel di antara kelompok perlakuan (lihat tabel 5.3 halaman 56 dan tabel analisis univariat pada lampiran 8), walaupun pada *pairwise comparison* variabel LAL tidak berbeda secara nyata (lihat pembahasan di atas).

Pada analisis statistik lebih lanjut dengan menggunakan analisis diskriminan didapatkan ada 2 faktor pembeda yakni LAL dan TTM (lihat tabel 5.5 dan tabel 5.6 halaman 57). Pada pola respon juga terlihat bahwa yang paling menentukan perbedaan efek setiap perlakuan pada proliferasi otot pembuluh darah di antara variabel tergantung adalah pengukuran TTM dan LAL (lihat gambar 5.2 grafik pola respon proliferasi otot polos pembuluh darah). Secara statistik ini terjadi karena pada prosedur *stepwise* variabel JIOP disingkirkan karena memiliki nilai Wilk's Lambda yang paling kecil dibanding variabel yang lain yaitu 0,106. Selain itu juga karena pada prosedur statistik *Multiple Group Discriminant Analysis*, dengan 3 variabel tergantung dan 3 variabel bebas, fungsi diskriminan dan variabel pembeda yang dihasilkan hanya 2 macam yaitu 2 variabel yang paling membedakan diantara variabel tergantungnya (Sharma, 1996).

Namun dalam hal ini, menurut hemat peneliti variabel JIOP tidak dapat diabaikan sama sekali sebagai pembeda proliferasi otot polos dan perlu dicermati

lebih jauh, karena walaupun bagaimanapun proses proliferasi sel otot polos sendiri harus didahului oleh hiperplasia otot polos tersebut.

Seperti diketahui, tunika media tersusun oleh lapisan sel otot polos yang konsekrtris dan jaringan ikat disekelilingnya (Junquiera dan Caneiro, 1992), dalam hal ini ketebalan tunika media ditentukan oleh kedua faktor ini. Hiperplasia yang terjadi, pada batas tertentu mungkin hanya menyebabkan peningkatan kerapatan sel-selnya, tanpa disertai peningkatan ketebalan tunika media. Jika hiperplasia diikuti dengan peningkatan jaringan ikat yang menyusun matriks tunika media, maka kerapatan sel tadi diikuti juga dengan peningkatan ketebalan tunika media. Hal ini dapat dilihat pada proses *myointimal proliferation* yang terjadi pada keadaan *vascular injury*, dimana proliferasi otot polos yang terjadi diikuti oleh bertambahnya jaringan ikat yang menyusun matriksnya (Soemantri, 2001). Jadi dalam penelitian ini, pengamatan bertambah atau tidaknya jaringan ikat pada tunika media sepatutnya perlu dilakukan sebagai variabel tambahan proliferasi otot polos pembuluh darah.

Akhirnya, dari gambaran pola respon proliferasi otot polos pembuluh darah berdasarkan variabel pembeda pada kelompok perlakuan terlihat bahwa pada kelompok Epinefrin respon proliferasi otot polos berdasarkan penebalan tunika media sangat besar, dibanding kelompok lain maupun respon terhadap variabel LAL. Ini menunjukkan bahwa bertambah tebalnya tunika media tidak selalu diikuti oleh menyempitnya lumen pembuluh darah, karena pertumbuhan otot polos bisa terjadi 2 arah yaitu abluminal (menjauhi lumen) dan adluminal (mendekati lumen) (Luscher dan Barton, 1997; Webb dan Haynes, 1997). Pertumbuhan adluminal sering dijumpai pada keadaan *vascular injury* dengan endotel yang sudah rusak (Luscher dan Barton, 1997). Dari hasil penelitian ini, menurut analisa peneliti pertumbuhan yang terjadi adalah abluminal karena endotel pembuluh darah masih utuh.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan penelitian ini adalah :

1. Proliferasi otot polos pembuluh darah lebih besar terjadi pada kelompok Epinefrin dibanding kelompok Salin, maupun kelompok kontrol *Pretest*.
2. Stresor epinefrin menyebabkan peningkatan jumlah inti otot polos dan penebalan tunika media, namun tidak menyebabkan penurunan luas area lumen pembuluh darah.
3. Respon proliferasi otot polos pembuluh darah diperankan oleh tebal tunika media dan luas area lumen arteri femoralis.
4. Stresor epinefrin mengakibatkan respon proliferasi otot polos terbesar dibanding salin dan kontrol.

7.2 Saran

Saran yang diajukan adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan pengukuran kadar Epinefrin, dan kadar Endothelin-1 di dalam darah.
2. Perlu dilakukan penelitian lain dengan menggunakan jenis stresor yang berbeda.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan rancangan penelitian yang dapat mengendalikan pengaruh efek maturitas, dengan variabel proliferasi otot polos yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Alanko J, Riutta A and Vapaatalo H, 1992. Effect of Cathecolamines on Eiocosanoid Synthesis With Special Refference To Prostanoid/Leukotriene Ratio (Review Article). *Free Radical Biology and Medicine* (13) : 677-688.
- Amuchastegui CS, Giuseppe R and Norbeto P, 1994. Calcitonin Generelated Peptide Reduces Renal Resistance and Modulates ET-1 Induced Vasoconstriction. *Am J Physiol* 267(*Renal Fluid Electrolyte Physiol* 36) : F839-F844.
- Axelrod J, and Reisine TD, 1984. Stress Hormones: Their interaction and Regulation. *Science*, 224, pp. 452-459.
- Boulanger CM, and Vanhoutte PM, 1994. *The Endothelium: Apivotal Role in Health and Cardiovascular Disease*.
- Campbell DT, and Stanley CJ, 1966. *Experimental and Quasi Experimental Design for Research*. Rand McNally College Publishing Company, Chicago, Pp. 25, 55.
- Chilian WM, Kuo DL, DeFily V, Jones CJH and Davis MJ. 1993. Endothelial regulation of coronary microvascular tone under physiological and patophysiological conditions, *European Heart Journal* 14 (*Supplement*) : 55-59.
- Constantinides P, 1994. The common causes of anoxic necrosis. In : (Paris Constantinides ed.), *General Pathobiology*. Appleton and Lange. Connecticut, pp. 57-116.
- Davenport AP, 1997. Distribution of endothelin receptors. In : (John P. Huggins and John T. Pelton, eds), *Endothelins in Biology and Medicine*, Tokyo: CRC Press pp. 45-68.
- Davies PF and Barbee KA, 1994. Endothelial Cell Surface Imaging : Insight Into Hemodynamic Force Transduction. *NIPS* (9) pp.15-19.
- Domae M, Katsushi Y, Tsutomu I, Motoko S, and Tatsuo F, 1994. Endothelins stimulate cyclic AMP accumulation in isolated rat anterior pituitary gland: Possible involvement of ET_A receptor activation and prostaglandin E₂ production. *The Journal of Pharmacology and Experimental. Therapeutic*, (270) : 55-60.
- Farris EJ, 1962. Breeding of The Rat, In : (Edmond J. Farris and John Q. Griffith Jr. eds). *The Rat in Laboratory Investigation*, 2nd Edition, Hafner Publising Company, New York, pp.1-17.
- Frandsone RD, 1986. *Anatomi dan Fisiologi Temak*. Edisi 4, Gadjah Mada University Press pp. 396, 851-54.

- Fredriksson JM, Johanna ML, Gennady EB, and Jan Nedergaard, 2000. Norepinephrine Induces Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Brown Adipocytes through a β -adrenoreceptor /cAMP/ Protein Kinase A Pathway Involving Src but Independently of Erk1/2. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (18) : 13802-13811.
- Ganong WF. 1999 Local control of blood flow by the tissue and humoral regulation. In Review of Medical Physiology 17th edition, New Jersey : Prentice Hall International, pp. 80-112.
- Griffith JQ, Jeffers WA, and Robert E. 1962. The circulatory. In : (Edmond J. Farris and John Q. Griffith Jr. eds). *The Rat in Laboratory Investigation*, 2nd Edition, Hafner Publishing Company, New York, pp. 278-294.
- Greene EL, Velarde V, and Jaffa AA, 2000. Role of Reactive Oxygen Species in Bradykinin-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase and c-fos Induction in Vascular Cells. *Hypertension* (35) : 942-947.
- Greene EC. 1962. *Gross Anatomy : Circulatory system*. In : (Edmond J. Farris and John Q. Griffith Jr. eds). *The Rat in Laboratory Investigation*, 2nd Edition, Hafner Publishing Company, New York, pp. 41-49.
- Goto K, Fujii K, Abe I, Fujishima M, 2000. Sympathetic Control of Arterial Membrane Potential by ATP-sensitive K⁺-Channels. *Hypertension*, 35, pp. 378-384.
- Guyton AC and Hall JE, 1996. Local control of blood flow by the tissue and humoral regulation. In : *Textbook of Medical Physiology*, 9th edition, WB. Saunders Company, Tokyo, pp. 199-208.
- Harjanto, 1999. Fungsi Faali Endotel Vaskuler. Karya Tulis Ilmiah. Laboratorium Ilmu Faal Universitas Airlangga. Surabaya.
- Haynes WG and Webb JD, 1997. Clinical pharmacology and pathophysiology of endothelins. In : (John P. Huggins and John T. Pelton, eds), *Endothelins in Biology and Medicine*, Tokyo, CRC Press, pp. 349-380.
- Higgins JE dan Kleinbaum AP, 1985. *Introduction To Randomized Clinical Trial*. Part I of series : The Basic of Randomized Clinical Trials With Emphasis on Contraceptive Research. Family Health International, p.30
- Hiley RC, 1997. Endothelin Receptors : Pharmacological Subtyping, Agonist, and Antagonist. In : (John P. Huggins and John T. Pelton, eds). *Endothelins in Biology and Medicine*, Tokyo : CRC Press, pp. 3-26.
- Hisaki K, Yasuo M, Hitoshi M, Katsuya F, Masanori T, and Shiro M, 1994. Conversion of big ET-1 in the rat lung:role of phosphoramidons-sensitive endothelin-1 converting enzyme. *Am J Physiol* 266 (Heart Circ.Physiol (35) : H422-H428.
- Hollock HGO, and Donald RM, 1962. Dossage of Drugs for rays. In : (Edmond J. Farris and John Q. Griffith Jr. eds.). *The Rat in Laboratory Investigation*, 2nd Edition, Hafner, Publishing Company, New York, pp. 302-389.

- Holness W, Tara AS, George PB, John TF, Mark BT, and Ravi I, 2001. Expression of Q227L-G α_s inhibits intimal vessel wall hyperplasia after balloon injury. *PNAS* (98) 3 : 1288-1293.
- Horseman ND, and Pike JW, 1998. Cellular Responses to Hormones In: *Cell Physiology Source Book*, 2nd Ed, (Nicholas Sperelakis Ed.) Academic Press, Tokyo pp. 119-131.
- Huttner I, and Gabbiani G, 1983. Vascular Endothelium in Hypertension. in : (Jaquest Genest, Otto Kuchel, Pavel Hamet and Marc Cantin eds). *Hypertension Phisiology and Treatment* 2nd edition, Mc Graw Hill Book Company, Singapore pp.473-487
- Ingle DJ, 1962. The Use of The Rat in The Biologic Assay of Hormones. In : (Edmond J. Farris and John Q. Griffith Jr. eds). *The Rat in Laboratory Investigation*, 2nd Edition, Hafner Publising Company, New York, pp. 295-389.
- Inui T, Andrew PJ, Yasushi F, Misato T, Toshikazu O, Takaki Y, and Yoshihiro U, 1994. ET_A and ET_B receptors on single smooth muscle cells cooperate in mediating guinea pig tracheal contraction. *Am J Physiol* 266 (Lung Cell.Mol.Physiol) (10) : L113-L124.
- Junquiera LC and Caneiro J, 1992. Histologi Dasar. Terjemahan oleh Aji Dharma, Edisi 3, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. hal 239-250.
- Katusic ZS and Cosentino F, 1994. Nitric Oxide Synthase : From Molecular Biology to Serebrovascular Physiology. *NIPS* (9) : 64-66.
- Kuchel O, 1983. The Autonomic Nervous System and Blood Pressure Regulation in Human Hypertension in : (Jaquest Genest, Otto Kuchel, Pavel Hamet and Marc Cantin eds). *Hypertension Phisiology and Treatment* 2nd edition, Mc Graw Hill Book Company, Singapore pp.140-160
- Lamb FS, and Barna TJ, 1998. Chloride ion current contribute functionally to epinephrine-induced vascular contraction. *Am J Physiol*, Jul, 275(1Pt 2), pp. H151-60.
- Lauth M, Berger MM, Cattaruzza M dan Hecker M, 2000. Elevated perfusion pressure upregulates endothelin-1 and endothelin B receptor expression in the rabbit carotid artery. *Hypertension*, (35) 2 : 648-55.
- Lesson CR, Lesson TS, and Paparo A, 1996. Buku Ajar Histologi (*Text Book of Histology*), Penerjemah : S. Koesparto Sisworo dkk. (Jan Tambajong dan Sugito W. eds), Edisi V, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal 260-267.
- Liao JK, 1998. Endothelium and acute coronary syndromes. *Clinical Chemistry* 44:8 (B), pp. 1799-1808.

- Liaw L, Lombardi DM, Almeida MM, Schwartz SM, deBois D, Giachelli CM, 1997. Neutralizing Antibodies Directed Against Osteopontin Inhibit Rat Carotid Neointimal Thickening After Endothelial Denudation. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 17, pp. 188-193.
- LiQian C, Xiaohua X, Eckhart AD, Nengyu Y, Faber JE, 1995. Regulation of Vascular Smooth Muscle Growth by alpha(1)-Adrenoreceptor Subtypes in Vitro and in Situ. *J Biol Chem* (12) : 30980-30988
- Luscher TF, dan Noll G, 1993. The endothelium as a regulator of vascular tone and growth. *Am J Hypertens.* (6) 7Pt.2 : 2835-2935 (84 ref)
- Luscher TF, dan Barton M, 1997. Biology of Endothelium. *Clin. Cardiol.* (20) (Supplemen. II): II3-II10.
- Müller, VM. 1991. Interactions between neural and endothelial mechanisms in control of vascular tone. *NIPS*, (6) : 60-68.
- Miao RQ, Murakami H, Song Q, Chao L, and Chao J, 2000. Kallistatin Stimulates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration In Vitro and Neointima Formation in Balloon-Injured Rat Artery. *Circ Res* (86) : 418-424.
- Nagler A, Miao HQ, Aingorn H, Pines M, Genina O, and Vlodavsky I, 1997. Inhibition of Collagen Synthesis, Smooth Muscle Proliferation, and Injury-Induced Intimal Hyperplasia by Halofuginone. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 17, pp. 194-202.
- Rizzoni D, Enzo P, Maurizio C, Giorgio B, Maria LM, Guido T, Stefano MG, Gianpaolo B, and Enrico AR, 1998. Endothelial dysfunction in hypertension is independent from the etiology and from vascular structure. *Hypertension*; (31[part 2]) : 335-341.
- Sargowo D, 1996. Peran lipoprotein densitas rendah, Lp (a), malonilaldehyde, interleukin-2 sebagai prediktor penyakit jantung koroner. Disertasi, Universitas Airlangga Surabaya.
- Schinit VB, and VanhouttePM, 1993. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle. *European Heart Journal.* (14) (Suplement I) : 16-21.
- Schramek H and Dunn MJ, 1997. Endothelin induced intracellular Signalling pathways In : (John P. Huggins and John T. Petton, eds). *Endothelins in Biology and Medicine*, Tokyo : CRC Press, pp. 81-102.
- Setyawati A, 1995. Adrenergik, In : (Ganiswara SG, eds). *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4, Bagian farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal 57-76.
- Sleight RG, and Liebermann MA, 1998. Signal Transduction. In: (Nicholas Sperelakis Ed.) *Cell Physiology Source Book*, 2nd Ed, Academic Press, Tokyo, pp. 119-131.

- Song RH, Kocharyan HK, Fortunato JE, Glagov S, Bassiouny HS, 2000. Increased Flow and Shear Stress Enhanced In Vivo Transforming Growth Factor- β 1 After Experimental Arterial Injury, *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 20, pp. 20-923.
- Spencer RL and Hutchison KE, 1999. Alcohol, Aging and the Stress Response. *Alcohol Research & Health* (23) 4: 272-283.
- Stewart DJ, 1993. Endothelin in cardiopulmonary disease: factor paracrine vs neurohumoral. *European Heart Journal*. (14) (Suplement I) : 48-54.
- Soemantri D, 2001. Effect of Angiotensin II and ATI Receptors Antagonist on The Vascular Endothelium. Kumpulan Makalah Symposium : *A New Approach to Assessing Antihypertensive Therapy : How Do The AIIRAs The Challenge ?*. RSUD Dr. Soetomo - Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya, hal : 1-8.
- Tanaka A, Kenji K, Makoto H, Tomihiro H, Katsuhiko T and Toshishiko T, 1994. Endothelin-1 stimulates bile acid secretion and vesicular transport in the isolated perfused rat liver. *Am J Physiol* 266 (Gastrointest, Liver Physiol, (29) : G324-329.
- Thomas CP, Michael SS, and Dunn MJ, 1992. Endothelin : Receptors and Transmembran Signals. *NIPS* (7) : 207-211.
- Viedt C, Soto U, Heidemarie IKB, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J, 2000. Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Smooth Muscle Cells by Angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (20) : 940-948.
- Warner TD, 1993. Characterization of endothelin synthetic pathways and receptor subtype: physiological and pathophysiological implications. *European Heart Journal* (14) (Suplement I) : 42-47.
- Wu-Wong, Jinshyun R. *et al.* 1994. Endothelin receptors in human smooth muscle cells; antagonist potency differs on agonist-evoked responses. *Am J Physiol* 267 (Cell Physiol.) (36) : C1185-C1195.
- Xu Q, Schett G, Li C, Hu Y, and Wick G, 2000. Mechanical Stress-Induced Heat Shock Protein 70 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells Is Regulated by Rac and Ras Small G Proteins but Not Mitogen-Activated Protein Kinases. *Circ Res* (86) : 1122-1128.
- Young JB and Landsberg L, 1998. Catecholamines and the adrenal medulla. In : *Williams Textbook of Endocrinology* (Jean D. Wilson *et al* : Eds). 9th edition, W.B. Saunders Company, Tokyo. pp. 665-728.
- Zainuddin M. 1999. Metodologi Penelitian. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga, Surabaya, hal. 25 -27.

LAMPIRAN 1

PENENTUAN JUMLAH SAMPEL MINIMAL

Penentuan jumlah sampel minimal adalah berdasarkan Rumus Higgins & Kleinbaum (1985) adalah sebagai berikut :

$$n = \frac{1}{1-f} \times \frac{2(Za+Zb)^2 \cdot Sc^2}{(\bar{Xc} - \bar{Xt})^2}$$

Dimana : $\frac{n}{n}$ = besar sampel
 \bar{Xc} = rerata kelompok kontrol
 \bar{Xt} = rerata kelompok perlakuan
 Sc = simpangan baku kelompok kontrol
 f = proporsi kegagalan
 Za = harga standar $\alpha_{0,05} = 1,96$
 Zb = harga standar $\beta_{0,05} = 1,28$

Dari penelitian pendahuluan didapatkan hasil seperti tercantum dalam tabel berikut :

Hasil Penelitian Pendahuluan variabel Proliferasi Otot Polos pembuluh darah

	LAL ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)			TTM (μm)			JIOP		
	E	NS	K	E	NS	K	E	NS	K
Mean	8,841	13,835	23,597	66,667	47,500	46,667	235	204	193
Standar Deviasi	0,898	1,823	6,077	9,428	4,714	2,500	1,633	4,028	3,859

Keterangan : LAL = Luas Area Lumen, TTM = Tebal Tunika Media, JIOP = jumlah inti otot polos, E = Epinefrin, NS = Normal Salin, dan K = kontrol

Jika yang diambil sebagai patokan adalah nilai LAL, dengan $\bar{Xc} = 23,597$; $\bar{Xt} = 8,841$ dan $Sc = 6,077$. Jika nilai $f = 0$ (tanpa ada yang gagal), maka nilai n minimal adalah sebesar 3,56 . Namun jika nilai $f = 0,3$ (kegagalan 30%) maka nilai n minimal adalah sebesar 3,899.

Jadi dalam hal ini jumlah sampel minimal untuk masing-masing kelompok adalah 4 ekor (pembulatan). Jumlah sampel seluruhnya adalah 3 x 4 sama dengan 12 ekor.

Dengan demikian, jumlah sampel 8 ekor tiap kelompok atau 24 ekor jumlah keseluruhan dalam penelitian ini, masih di atas jumlah sampel minimalnya.

LAMPIRAN 2

Pembuatan Preparat Histologis

Proses pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium GRAMIK Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

Segera setelah tikus dibunuh, diambil arteri femoralisnya. Bahan jaringan tersebut kemudian segera difiksasi dengan larutan Buffer formalin untuk selanjutnya diproses berdasarkan teknik parafin dan diwarnai dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin.

Adapun langkah-langkah teknik pembuatan sediaan histologis dengan teknik parafin adalah 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 II selama 3 jam
5. Embedding : - dicetak dalam bentuk blok dan kemudian didinginkan selama 24 jam,
6. Trimming : - dikepris menjadi cetakan yang rapi,
7. Sectioning : - dilakukan penyayatan/pemotongan dengan mikrotom dengan tebal sayatan antara 5 – 7 mikron,
8. Mounting : - potongan tadi diletakkan di atas obyek gelas yang diberi egg albumin, keringkan dan sediaan siap untuk diwarnai.

LAMPIRAN 3

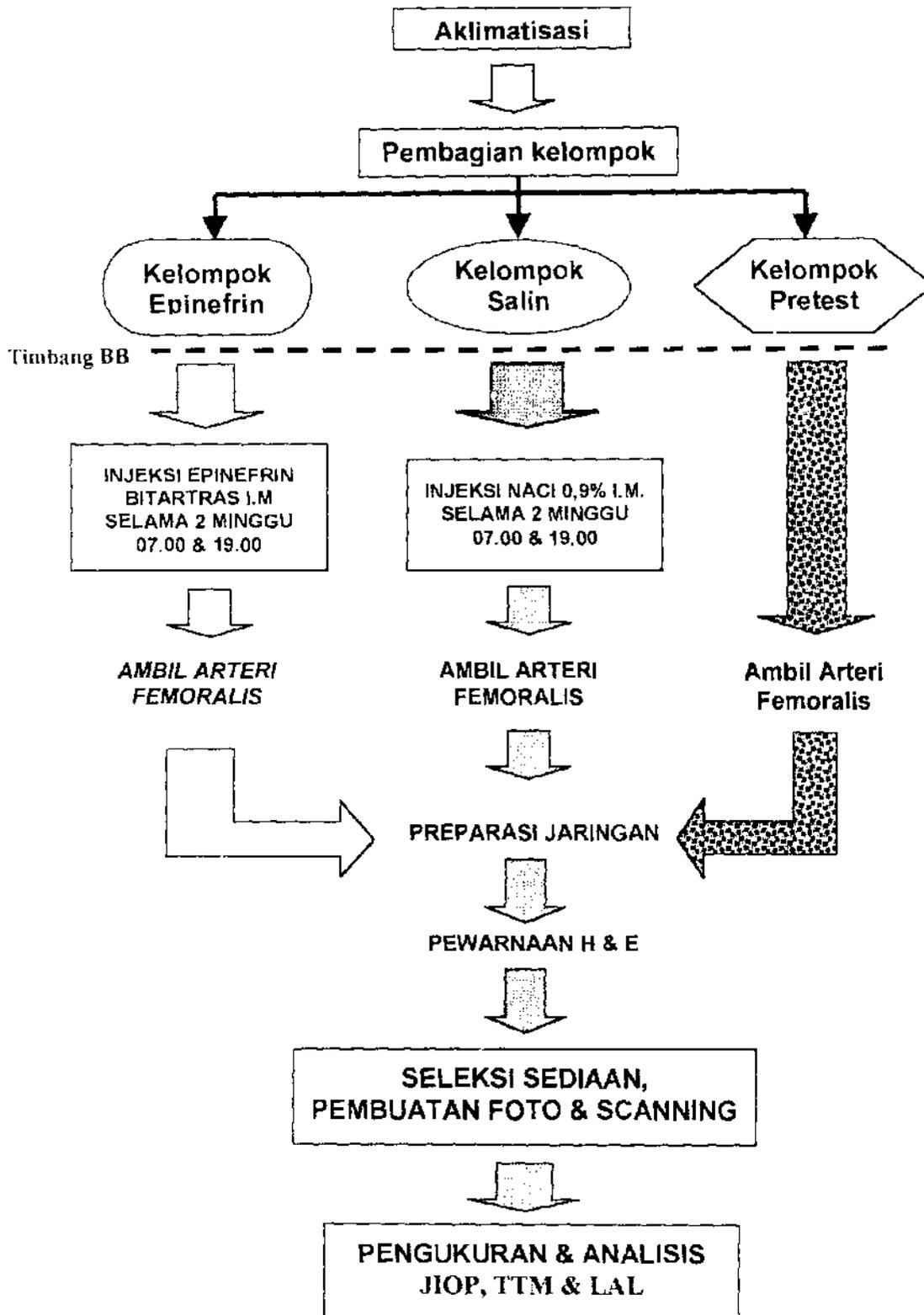
Pewarnaan Hematoksin-Eosin

Sedangkan langkah-langkah pewarnaan dengan Hematoksin-Eosin adalah sebagai berikut :

1. Deparaffinisasi : - 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 hematoksin selama 15 menit,
 - cuci dengan air mengalir (air kran) 10 celupan,
 - alkohol asam 3-10 celupan,
 - cuci dengan air lagi,
 - *counterstain* dengan eosin selama 1-2 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

BAGAN LANGKAH-LANGKAH PENELITIAN



LAMPIRAN 5

DATA HASIL PENGUKURAN VARIABEL TERGANTUNG PENELITIAN

Tabel 1. Hasil Pengukuran Luas Area lumen (LAL) arteri Femoralis

No.	Epinefrin (E) ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	Normal Saline (NS) ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	Kontrol (<i>Pretest</i>) ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)
1.	7,960	10,748	2,638
2.	10,764	12,309	4,616
3.	8,352	9,797	5,727
4.	8,538	10,635	4,809
5.	8,949	5,809	6,112
6.	6,782	2,481	3,611
7.	8,352	6,447	5,610
8.	8,685	9,498	3,401

Tabel 2. Hasil Pengukuran Tebal Tunika Media (TTM) Arteri femoralis

No.	Epinefrin (E) (μm)	Normal Saline (NS) (μm)	Kontrol (<i>Pretest</i>) (μm)
1.	73,33	40,00	30,00
2.	50,00	35,00	28,33
3.	80,00	28,33	30,00
4.	50,00	35,00	30,00
5.	70,00	37,25	25,00
6.	50,00	35,00	23,33
7.	80,00	40,00	25,00
8.	53,33	28,33	26,37

Tabel 3. Hasil Pengamatan Jumlah Inti Otot Polos (JIOP) Arteri femoralis

No.	Epinefrin (E)	Normal Saline (NS)	Kontrol (<i>Pretest</i>)
1.	275	203	125
2.	148	203	115
3.	262	122	97
4.	255	144	128
5.	226	108	94
6.	196	202	109
7.	247	161	107
8.	180	116	109

LAMPIRAN 6

BIAYA PENELITIAN

1. Pembelian, perawatan dan pemeliharaan hewan coba	: Rp. 1.000.000,00
2. Pembuatan Sediaan Histologis & Pengukuran	: Rp. 2.000.000,00
3. Pembelian Bahan dan Alat Penelitian	: Rp. 1.000.000,00
4. Biaya Operasional Penelitian	: Rp. 400.000,00
5. Lain-lain	: Rp. 100.000,00

J u m l a h : Rp. 4.500.000,00

LAMPIRAN 8

STATISTIK DESKRIPTIF

- Variabel Tergantung (Luas Area Lumen, Tebal Tunika Media & Jumlah Inti Otot Polos)

Tables

RERATA DAN SIMPANG BAKU LUAS LUMEN, TUNIKA MEDIA DAN JUMLAH INTI MENURUT PERLAKUAN

			Mean	Std Deviation
PERLAKUAN	PRETES	LUAS LUMEN A.FEM	4,566	1,246
		TUNIKA MEDIA	27,25	2,68
		INTI OTOT POLOS A.F	110	12
SALIN	SALIN	LUAS LUMEN A.FEM	8,466	3,262
		TUNIKA MEDIA	33,61	5,12
		INTI OTOT POLOS A.F	157	41
EPINEFRIN	EPINEFRIN	LUAS LUMEN A.FEM	8,548	1,110
		TUNIKA MEDIA	63,33	13,80
		INTI OTOT POLOS A.F	223	45

UJI NORMALITAS DISTRIBUSI DATA

- Variabel Tergantung (Luas Area Lumen, Tebal Tunika Media & Jumlah Inti Otot Polos)

NPar Tests Uji normalitas distribusi

A. Kelompok Pretest

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		LUAS LUMEN A.FEM	TUNIKA MEDIA	INTI OTOT POLOS A.F
N		8	8	8
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4,56550	27,2537	110,13
	Std. Deviation	1,24648	2,6758	12,40
Most Extreme Differences	Absolute	,174	,223	,161
	Positive	,153	,175	,161
	Negative	-,174	-,223	-,135
Kolmogorov-Smirnov Z		,492	,630	,458
Asymp. Sig. (2-tailed)		,969	,823	,986

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. PERLAKUAN = PRETES

B. Kelompok Salin

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		LUAS LUMEN A.FEM	TUNIKA MEDIA	INTI OTOT POLOS A.F
N		8	8	8
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	8,46550	33,8138	156,75
	Std. Deviation	3,26176	5,1223	40,53
Most Extreme Differences	Absolute	,249	,232	,238
	Positive	,119	,224	,179
	Negative	-,249	-,232	-,238
Kolmogorov-Smirnov Z		,705	,655	,672
Asymp. Sig. (2-tailed)		,703	,784	,757

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. PERLAKUAN = SALIN

c. Kelompok Epinefrin

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		LUAS LUMEN A.FEM	TUNIKA MEDIA	INTI OTOT POLOS A.F
N		8	8	8
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	8,54775	63,3325	223,25
	Std. Deviation	1,11045	13,8013	44,76
Most Extreme Differences	Absolute	,234	,266	,202
	Positive	,234	,266	,124
	Negative	-,180	-,185	-,202
Kolmogorov-Smirnov Z		,862	,752	,572
Asymp. Sig. (2-tailed)		,774	,625	,899

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. PERLAKUAN = EPINEFRIN

UJI MANOVA VARIABEL TERGANTUNG

A. General Linear Model

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
PERLAKUAN	1 PRETES	8
	2 SALIN	8
	3 EPINEFRIN	8

Descriptive Statistics

	PERLAKUAN	Mean	Std. Deviation	N
LUAS LUMEN A.FEM	PRETES	4,56550	1,24648	8
	SALIN	8,46550	3,26176	8
	EPINEFRIN	8,54775	1,11045	8
	Total	7,19292	2,77291	24
TUNIKA MEDIA	PRETES	27,2538	2,6758	8
	SALIN	33,6137	5,1223	8
	EPINEFRIN	63,3325	13,8013	8
	Total	41,4000	18,0595	24
INTI OTOT POLOS A.F	PRETES	110,13	12,40	8
	SALIN	156,75	40,53	8
	EPINEFRIN	223,25	44,76	8
	Total	163,37	58,35	24

Multivariate Tests

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	,980	303,742 ^a	3,000	19,000	,000
	Wilks' Lambda	,020	303,742 ^a	3,000	19,000	,000
	Hotelling's Trace	47,959	303,742 ^a	3,000	19,000	,000
	Roy's Largest Root	47,959	303,742 ^a	3,000	19,000	,000
PER	Pillai's Trace	1,241	10,904	6,000	40,000	,000
	Wilks' Lambda	,106	13,092 ^a	6,000	38,000	,000
	Hotelling's Trace	5,139	15,416	6,000	38,000	,000
	Roy's Largest Root	4,395	29,300 ^b	3,000	20,000	,000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+PER

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	LUAS LUMEN A.FEM	82,867 ^a	2	41,433	9,258	,001
	TUNIKA MEDIA	5934,213 ^b	2	2967,107	39,760	,000
	INTI OTOT POLOS A.F	51715,750 ^c	2	25857,875	20,416	,000
Intercept	LUAS LUMEN A.FEM	1241,713	1	1241,713	277,460	,000
	TUNIKA MEDIA	41135,040	1	41135,040	551,225	,000
	INTI OTOT POLOS A.F	640593,4	1	640593,4	505,772	,000
PER	LUAS LUMEN A.FEM	82,867	2	41,433	9,258	,001
	TUNIKA MEDIA	5934,213	2	2967,107	39,760	,000
	INTI OTOT POLOS A.F	51715,750	2	25857,875	20,416	,000
Error	LUAS LUMEN A.FEM	93,981	21	4,475		
	TUNIKA MEDIA	1567,120	21	74,625		
	INTI OTOT POLOS A.F	26597,875	21	1266,565		
Total	LUAS LUMEN A.FEM	1418,561	24			
	TUNIKA MEDIA	48636,373	24			
	INTI OTOT POLOS A.F	718907,0	24			
Corrected Total	LUAS LUMEN A.FEM	176,848	23			
	TUNIKA MEDIA	7501,333	23			
	INTI OTOT POLOS A.F	78313,625	23			

a. R Squared = ,469 (Adjusted R Squared = ,418)

b. R Squared = ,791 (Adjusted R Squared = ,771)

c. R Squared = ,660 (Adjusted R Squared = ,628)

B. Estimated Marginal Means

Kelompok Perlakuan

Estimates

Dependent Variable	PERLAKUAN	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
LUAS LUMEN A.FEM	PRETES	4,565	,748	3,010	6,121
	SALIN	8,485	,748	6,910	10,021
	EPINEFRIN	8,548	,748	6,992	10,103
TUNIKA MEDIA	PRETES	27,254	3,054	20,902	33,605
	SALIN	33,614	3,054	27,262	39,965
	EPINEFRIN	63,332	3,054	56,981	69,684
INTI OTOT POLOS A.F	PRETES	110,125	12,583	83,958	136,292
	SALIN	156,750	12,583	130,583	192,917
	EPINEFRIN	223,250	12,583	197,083	249,417

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
LUAS LUMEN A.FEM	PRETES	SALIN	-3,900	1,058	,001
		EPINEFRIN	-3,982	1,058	,001
	SALIN	EPINEFRIN	-8,225E-02	1,058	,939
TUNIKA MEDIA	PRETES	SALIN	-6,360	4,319	,156
		EPINEFRIN	-36,079	4,319	,000
	SALIN	EPINEFRIN	-29,719	4,319	,000
INTI OTOT POLOS A.F	PRETES	SALIN	-46,625	17,794	,016
		EPINEFRIN	-113,125	17,794	,000
	SALIN	EPINEFRIN	-66,500	17,794	,001

Based on estimated marginal means

- a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	1,241	10,904	6,000	40,000	,000
Wilks' lambda	,106	13,092 ^a	6,000	38,000	,000
Hotelling's trace	5,139	15,416	6,000	36,000	,000
Roy's largest root	4,395	29,300 ^b	3,000	20,000	,000

Each F tests the multivariate effect of PERLAKUAN. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

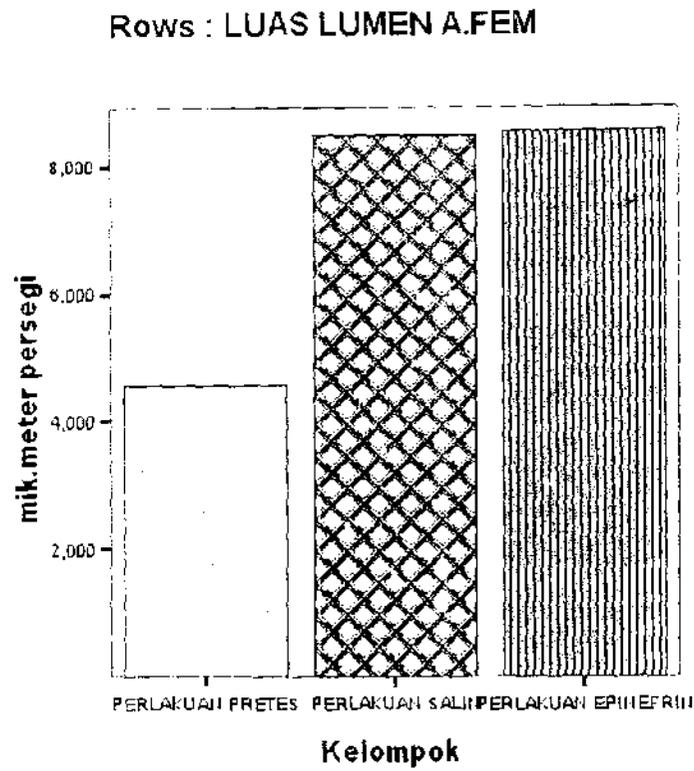
- a. Exact statistic
 b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

Univariate Tests

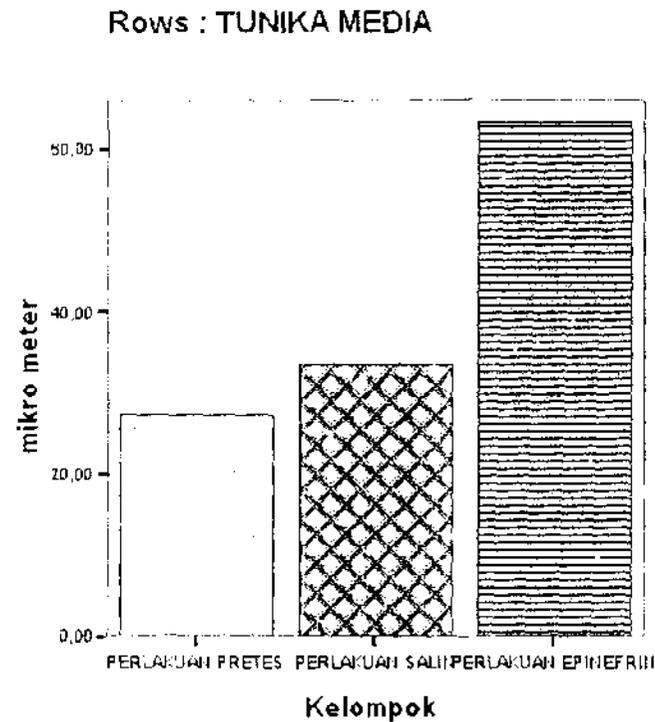
Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
LUAS LUMEN A.FEM	Contrast	82,867	2	41,433	9,258	,001
	Error	93,981	21	4,475		
TUNIKA MEDIA	Contrast	5934,213	2	2967,107	39,760	,000
	Error	1567,120	21	74,625		
INTI OTOT POLOS A.F	Contrast	51715,750	2	25857,875	20,416	,000
	Error	26597,875	21	1266,565		

The F tests the effect of PERLAKUAN. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

c. Profile Plots Variabel Tergantung

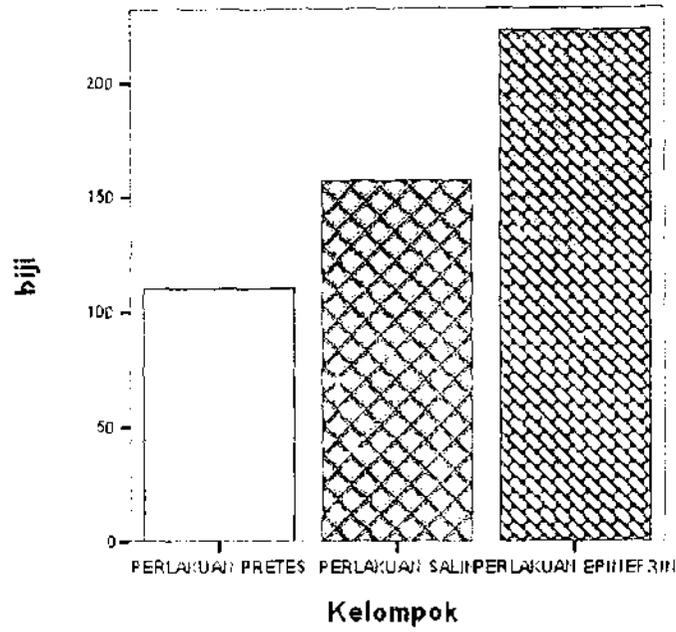


Gambar 1. Luas Area Lumen Menurut Kelompok Perlakuan



Gambar 2. Tebal Tunika Media Menurut Kelompok Perlakuan

Rows : INTI OTOT POLOS A.F



Gambar 3. Jumlah Inti Otot Polos Menurut Kelompok Perlakuan

ANALISIS DISKRIMINAN VARIABEL TERGANTUNG

A. Discriminant

Analysis Case Processing Summary

Unweighted Cases		N	Percent
Valid		24	100,0
Excluded	Missing or out-of-range group codes	0	,0
	At least one missing discriminating variable	0	,0
	Both missing or out-of-range group codes and at least one missing discriminating variable	0	,0
	Total	0	,0
Total		24	100,0

Group Statistics

PERLAKUAN		Mean	Std. Deviation	Val.d N (listwise)	
				Unweighted	Weighted
PRETES	LUAS LUMEN A.FEM	4,56550	1,24648	8	8,000
	TUNIKA MEDIA	27,25375	2,67581	8	8,000
	INTI OTOT POLOS A.F	110,12500	12,40320	8	8,000
SALIN	LUAS LUMEN A.FEM	8,46550	3,26176	8	8,000
	TUNIKA MEDIA	33,61375	5,12232	8	8,000
	INTI OTOT POLOS A.F	156,75000	40,52777	8	8,000
EPINEFRIN	LUAS LUMEN A.FEM	8,54775	1,11045	8	8,000
	TUNIKA MEDIA	63,33250	13,80131	8	8,000
	INTI OTOT POLOS A.F	223,25000	44,75888	8	8,000
Total	LUAS LUMEN A.FEM	7,19292	2,77291	24	24,000
	TUNIKA MEDIA	41,40000	18,05948	24	24,000
	INTI OTOT POLOS A.F	163,37500	58,35187	24	24,000

Tests of Equality of Group Means

	Wilks' Lambda	F	df1	df2	Sig.
LUAS LUMEN A.FEM	,531	9,258	2	21	,001
TUNIKA MEDIA	,209	39,760	2	21	,000
INTI OTOT POLOS A.F	,340	20,416	2	21	,000

b. Analysis 1

Stepwise Statistics

Variables Entered/Removed^{a,b,c,d}

Step	Entered	Wilks' Lambda							
		Statistic	df1	df2	df3	Exact F			
						Statistic	df1	df2	Sig.
1	TUNIKA MEDIA	,209	1	2	21	39,760	2	21	,000
2	LUAS LUMEN A.FEM	,130	2	2	21	17,725	4	40	,000

At each step, the variable that minimizes the overall Wilks' Lambda is entered.

- a. Maximum number of steps is 6.
- b. Minimum partial F to enter is 3.84.
- c. Maximum partial F to remove is 2.71.
- d. F level, tolerance, or VIN insufficient for further computation.

Variables in the Analysis

Step		Tolerance	F to Remove	Wilks' Lambda
1	TUNIKA MEDIA	1,000	39,760	
2	TUNIKA MEDIA	,999	30,850	,531
	LUAS LUMEN A.FEM	,999	6,059	,209

Variables Not in the Analysis

Step		Tolerance	Min. Tolerance	F to Enter	Wilks' Lambda
0	LUAS LUMEN A.FEM	1,000	1,000	9,258	,531
	TUNIKA MEDIA	1,000	1,000	39,760	,209
	INTI OTOT POLOS A.F	1,000	1,000	20,416	,340
1	LUAS LUMEN A.FEM	,999	,999	6,059	,130
	INTI OTOT POLOS A.F	,575	,575	2,201	,171
2	INTI OTOT POLOS A.F	,562	,562	2,126	,106

Wilks' Lambda

Step	Number of Variables	Lambda	df1	df2	df3	Exact F			
						Statistic	df1	df2	Sig.
1	1	,209	1	2	21	39,760	2	21,0	7,238E-08
2	2	,130	2	2	21	17,725	4	40,0	1,914E-08

C. Summary of Canonical Discriminant Functions

Eigenvalues

Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	4,308 ^a	90,6	90,6	,901
2	,448 ^a	9,4	100,0	,556

a. First 2 canonical discriminant functions were used in the analysis.

Wilks' Lambda

Test of Function(s)	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig.
1 through 2	,130	41,810	4	,000
2	,691	7,591	1	,006

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	Function	
	1	2
LUAS LUMEN A.FEM	,368	,931
TUNIKA MEDIA	,943	-,335

Structure Matrix

	Function	
	1	2
TUNIKA MEDIA	,930*	-,368
INTI OTOT POLOS A.F	,564*	-,346
LUAS LUMEN A.FEM	,335	,942*

Pooled within-groups correlations between discriminating variables and standardized canonical discriminant functions
Variables ordered by absolute size of correlation within function.

*. Largest absolute correlation between each variable and any discriminant function

a. This variable not used in the analysis.

Canonical Discriminant Function Coefficients

	Function	
	1	2
LUAS LUMEN A.FEM	,174	,440
TUNIKA MEDIA	,109	-,039
(Constant)	-5,768	-1,557

Unstandardized coefficients

Functions at Group Centroids

	Function	
	1	2
PERLAKUAN		
PRETES	-2,001	-,607
SALIN	-,628	,862
EPINEFRIN	2,629	-,255

Unstandardized canonical discriminant functions evaluated at group means

D. Classification Statistics

Classification Processing Summary

Processed		24
Excluded	Missing or out-of-range group codes	0
	At least one missing discriminating variable	0
Used in Output		24

Prior Probabilities for Groups

PERLAKUAN	Prior	Cases Used in Analysis	
		Unweighted	Weighted
PRETES	,333	8	8,000
SALIN	,333	8	8,000
EPINEFRIN	,333	8	8,000
Total	1,000	24	24,000

Classification Function Coefficients

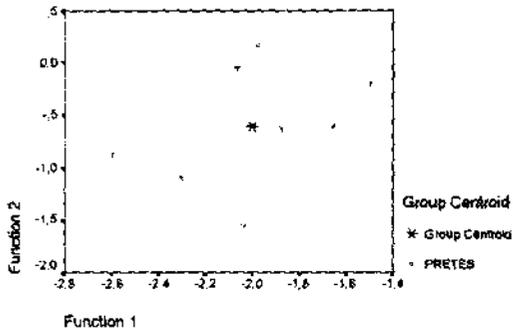
	PERLAKUAN		
	PRETES	SALIN	EPINEFRIN
LUAS LUMEN A.FEM	1,073	1,958	2,032
TUNIKA MEDIA	,374	,467	,866
(Constant)	-8,649	-17,234	-37,205

Fisher's linear discriminant functions

E. Separate-Groups Graphs

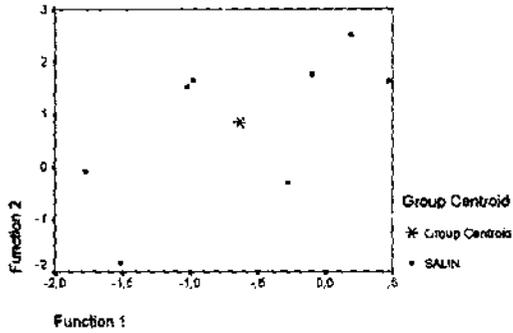
Canonical Discriminant Functions

PERLAKUAN = PRETES



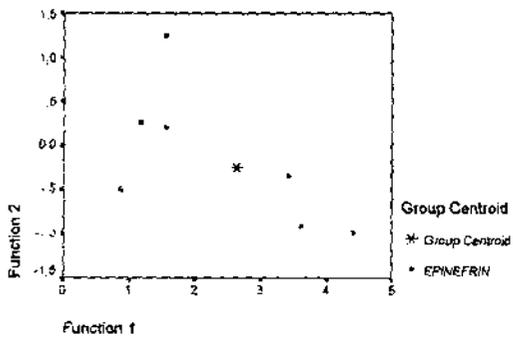
Canonical Discriminant Functions

PERLAKUAN = SALIN

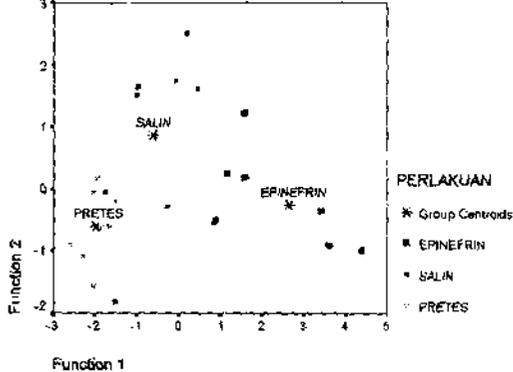


Canonical Discriminant Functions

PERLAKUAN = EPINEFRIN



Canonical Discriminant Functions



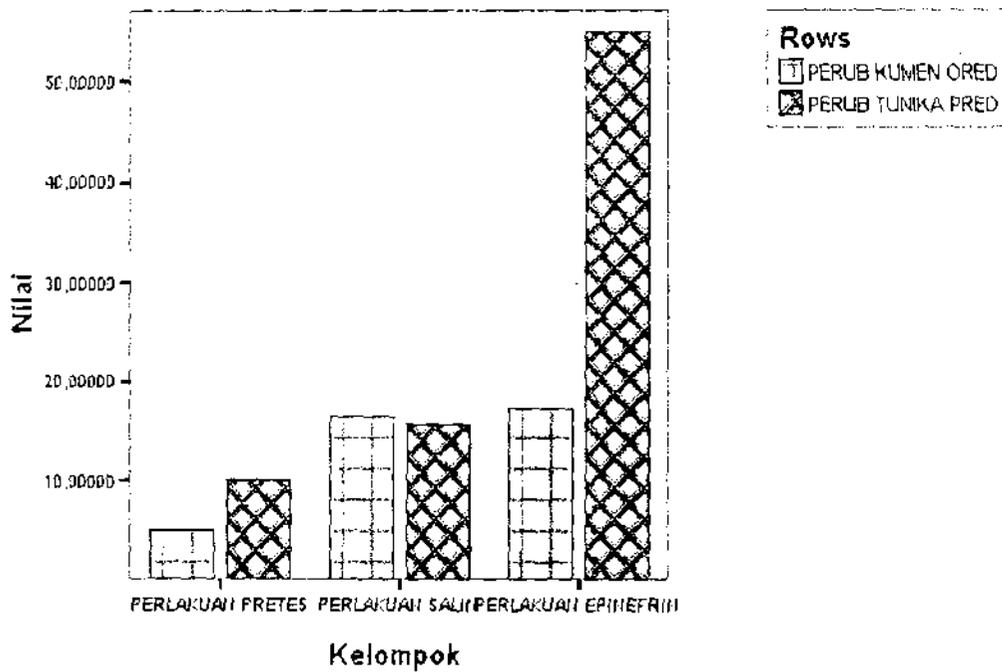
Classification Results^a

		Predicted Group Membership			Total	
		PERLAKUAN PRETES	SALIN	EPINEFRIN		
Original	Count	PRETES	8	0	0	8
		SALIN	2	6	0	8
		EPINEFRIN	0	0	8	8
%		PRETES	100,0	,0	,0	100,0
		SALIN	25,0	75,0	,0	100,0
		EPINEFRIN	,0	,0	100,0	100,0

a. 91,7% of original grouped cases correctly classified.

Tables . Kontribusi variabel pembeda menurut kelompok perlakuan

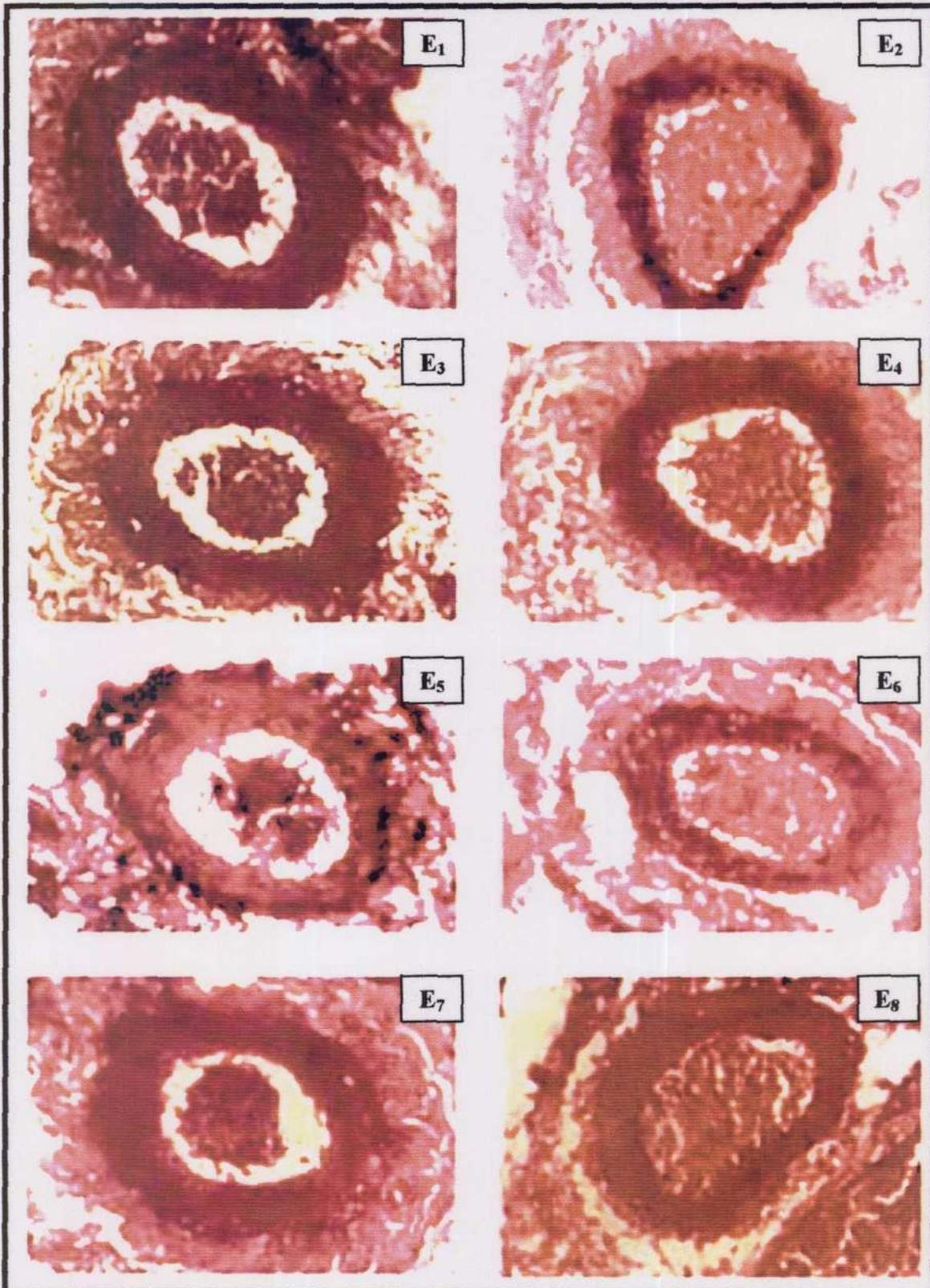
	PERLAKUAN		
	PRETES	SALIN	EPINEFRIN
KONTRIBUSI LUAS LUMEN	4,89878	16,57545	17,36903
KONTRIBUSI TUNIKA	10,19290	15,69762	54,84595



Gambar 4. Pola Respon Variabel Pembeda Menurut Kelompok Perlakuan

LAMPIRAN 9

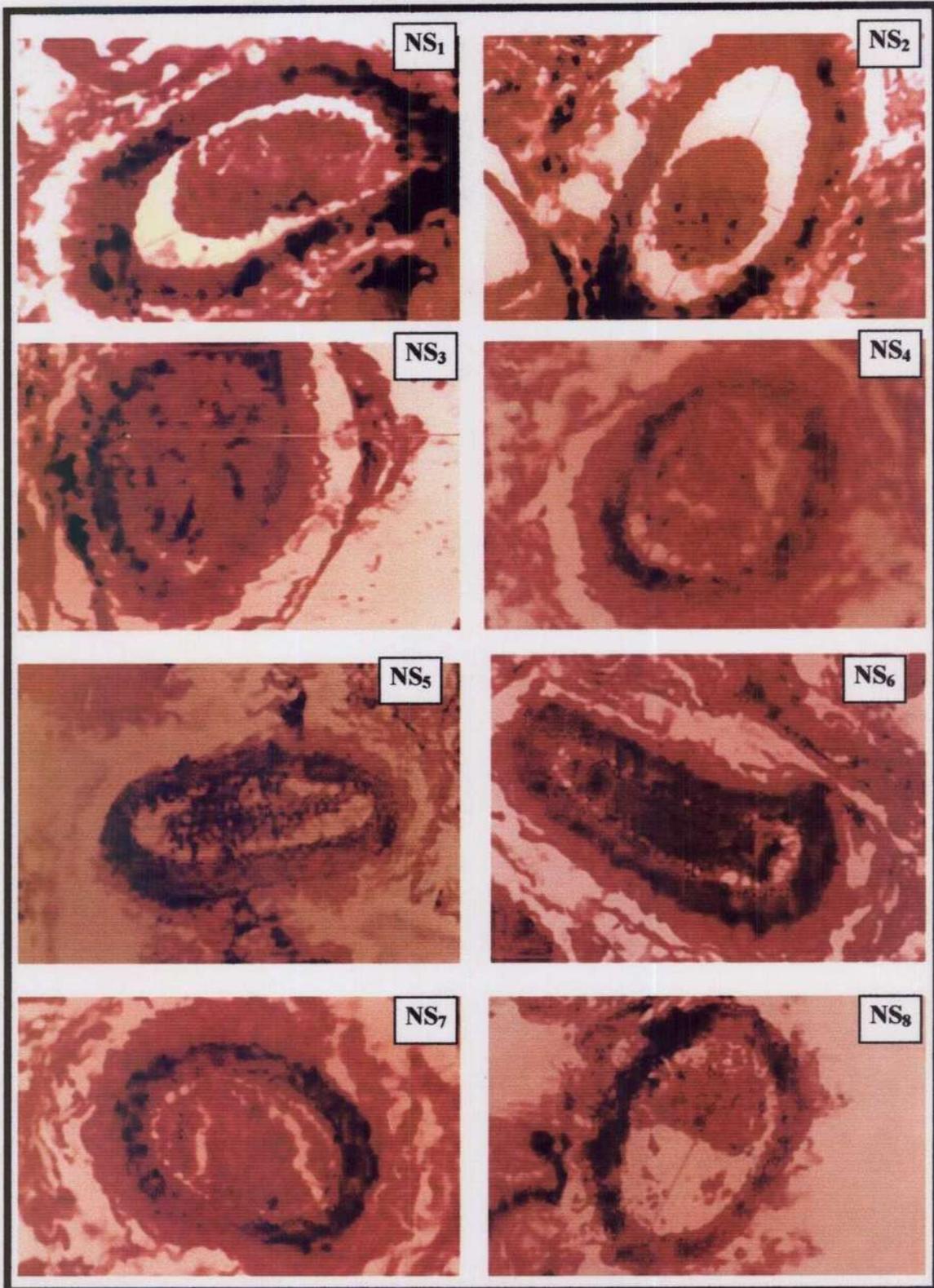
Foto Sediaan Kelompok Epinefrin



Keterangan : Gambar potongan melintang arteri femoralis, pewarnaan H-E dan pembesaran 100 kali untuk kelompok Epinefrin (E₁ = Epinefrin sampel no.1, E₂ = Epinefrin sampel no.2, E₃ = Epinefrin sampel no. 3, dstnya)

LAMPIRAN 9

Foto Sediaan Kelompok Normal Saline (NS)

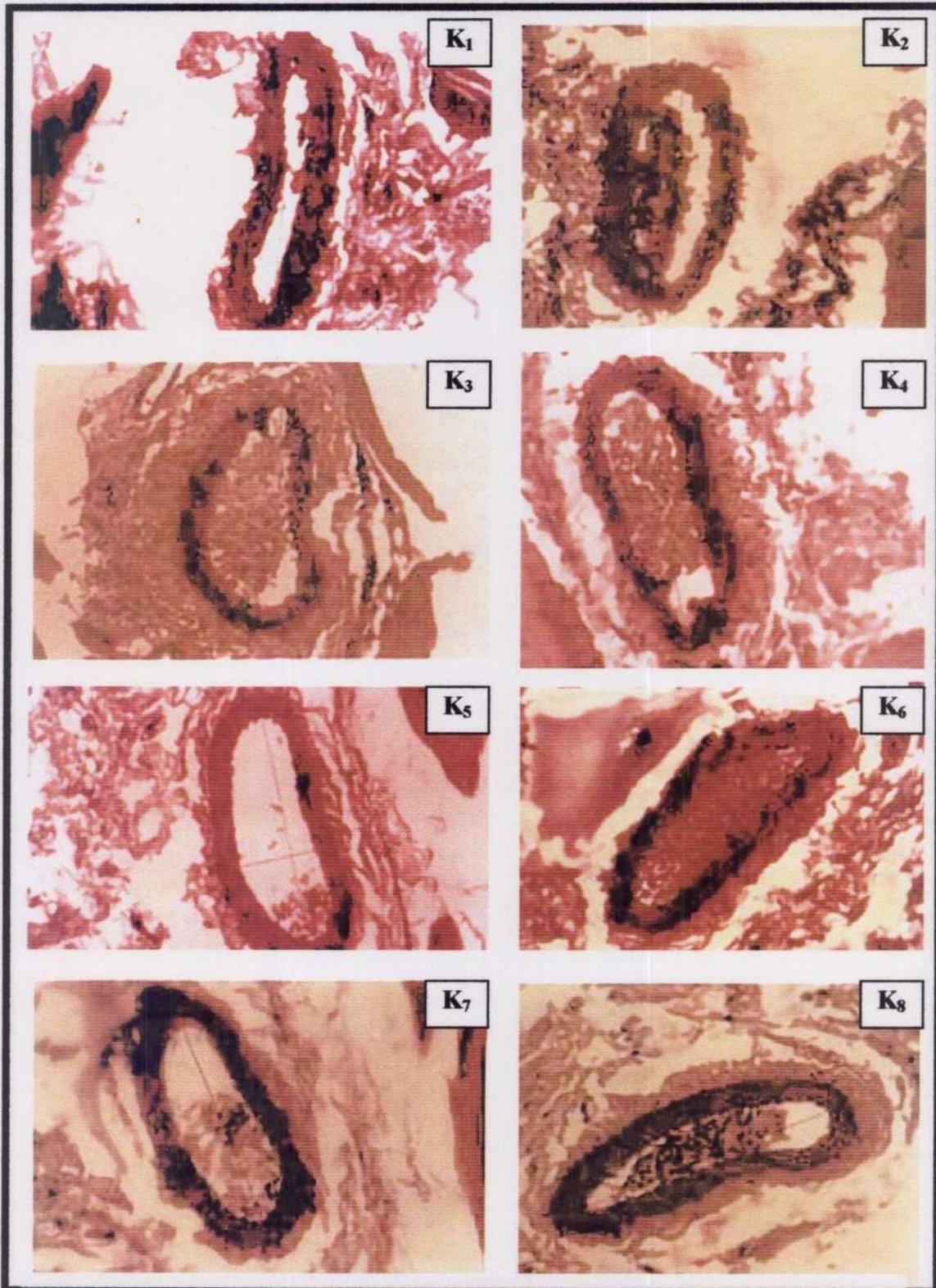


Keterangan : Gambar potongan melintang arteri femoralis, pewarnaan H-E dan pembesaran 100 kali untuk kelompok Salin (NS₁ = Normal Salin sampel no.1, NS₂ = Normal Salin sampel no.2, NS₃ = Normal Salin sampel no. 3, dstnya)

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

LAMPIRAN 9

Foto Sediaan Kelompok Kontrol *Pretest*



Keterangan : Gambar potongan melintang arteri femoralis, pewarnaan H-E dan pembesaran 100 kali untuk kelompok kontrol (K₁ = kontrol *Pretest* sampel no.1, K₂ = kontrol *Pretest* sampel no.2, K₃ = kontrol *Pretest* sampel no. 3, dstnya)