

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Membuktikan adanya pengaruh pemberian peptida polisakarida *Ganoderma lucidum* terhadap tebal tunika intima-media pembuluh darah pada hewan coba model diabetes melitus tipe 2, memerlukan adanya studi lanjut terkait komponen-komponen penelitian tersebut.

2.1 Struktur dan Fungsi Dinding Pembuluh Darah

Sistem sirkulasi dalam tubuh manusia terdiri atas sistem limfatik dan vaskular. Sistem limfatik atau sistem pembuluh limfe merupakan sistem sirkulasi tertutup yang salah satu fungsinya mengembalikan cairan jaringan darah dan bermuara di vena-vena besar. Sistem vaskular terdiri atas jantung, arteri yang mengalirkan darah menuju organ dan jaringan dalam tubuh, kapiler sebagai cabang terkecil yang berfungsi dalam pertukaran oksigen maupun substrat lainnya dan vena yang membawa aliran darah kembali ke jantung. Kedua sistem tersebut akan membentuk sistem pembuluh darah (Junqueira & Carneiro, 2007).

Dinding penyusun struktur pembuluh darah pada umumnya terdiri atas tiga lapisan atau tunika. Lapisan-lapisan tersebut yakni tunika intima, tunika media, dan tunika adventisia. Lapisan tersebut tersusun dari arah dalam keluar dan mengelilingi lumen. Di lumen ini darah mengalir dan bersirkulasi dalam tubuh manusia (Junqueira & Carneiro, 2007).

Tunika intima merupakan lapisan tipis yang terdiri atas satu lapis sel epitel pipih yang sering dikenal dengan sebutan endotelium. Selapis sel ini ditopang oleh lapisan subendotel jaringan ikat longgar. Khusus pada arteri,

tunika intima dibedakan dengan tunika media dan dihubungkan oleh lamina yang berfungsi sebagai media difusi zat-zat nutrisi bagi pembuluh darah (Junqueira & Carneiro, 2007).

Tunika media merupakan lapisan tebal yang terdiri atas otot polos berpilin, lamela elastin, serat retikulin kolagen tipe III, proteoglikan dan glikoprotein dalam jumlah yang bervariasi. Otot polos mengatur serabut vasomotor simpatis dari serabut saraf otonom. Impuls yang berjalan pada serabut saraf ini mengakibatkan kontraksi otot polos dan penurunan diameter lumen pembuluh darah. Keseluruhan proses ini disebut dengan vasokonstriksi. Sebaliknya apabila otot polos relaks, diameter lumen pembuluh darah akan meningkat dan terjadi vasodilatasi. Vasokonstriksi dan vasodilatasi merupakan fungsi tunika media dalam mempertahankan aliran darah dan tekanan darah dalam pembuluh darah (Junqueira & Carneiro, 2007).

Tunika adventisia adalah lapisan tipis yang terdiri atas serat kolagen tipe I dan elastin. Tunika adventisia berfungsi melindungi pembuluh darah. Tunika adventisia juga berperan dalam menghubungkan dan menyatukan pembuluh darah dengan jaringan disekitarnya (Junqueira & Carneiro, 2007).

Tunika intima, tunika media dan tunika adventisia yang menyusun dinding pembuluh darah, masing-masing memiliki rataan ketebalan tertentu. Pada tikus normal diketahui bahwa ketebalan tunika intima rata-rata 2.65 μm . Sedangkan tunika media pada tikus berkisar antara 71.6 μm . Rata-rata tebal tunika adventisia pada tikus 30.0 μm . (Mello *et al*, 2004).

Pada proses aterosklerosis, penebalan dinding pembuluh darah menjadi salah satu tanda awal terbentuknya plak. Semakin tinggi prevalensi merokok, konsumsi alkohol dan kadar glukosa darah berkaitan erat dengan penebalan

dinding pembuluh darah. Hal ini berkaitan dengan adanya stres oksidatif yang terjadi selama proses aterosklerosis. Stres oksidatif akan mengakibatkan terjadinya inflamasi. Proses inflamasi akan memicu proliferasi sel otot polos pembuluh darah. Proliferasi sel-sel otot polos ini menyebabkan penebalan dari tunika intima dan tunika media dinding pembuluh darah. Penebalan tunika intima dan media ini dapat meningkatkan angka kejadian gangguan kardiovaskular dan stroke (Ohira *et al*, 2011).

2.2 Aterosklerosis

Penyebab kematian dan kesakitan utama pada pasien diabetes melitus tipe 2 adalah Penyakit Jantung Koroner (PJK) yang bermanifestasi dalam bentuk aterosklerosis.

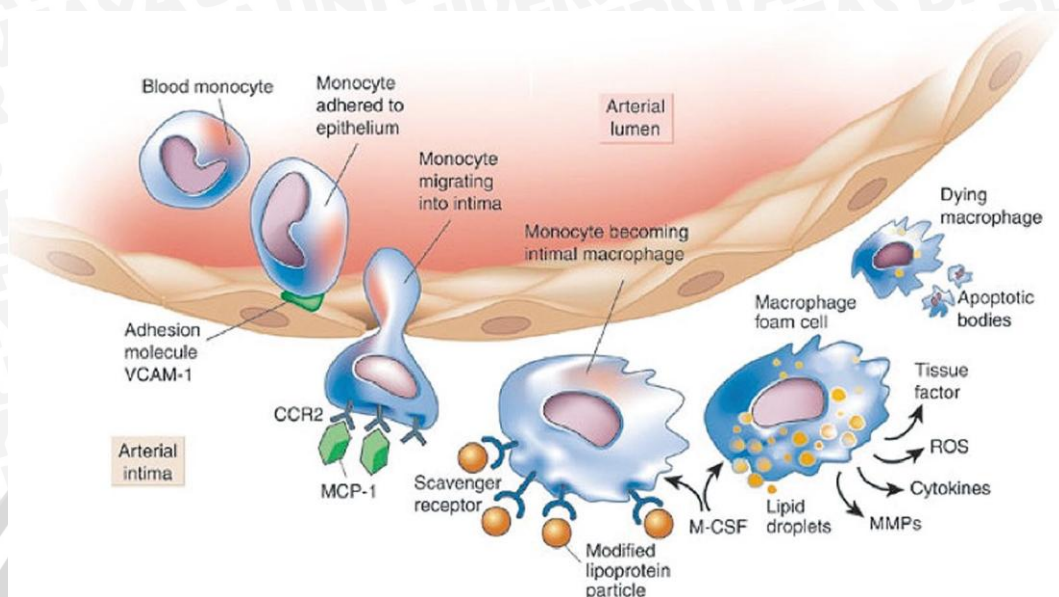
2.2.1 Definisi

Aterosklerosis adalah penyakit kronis yang dapat menyebabkan terjadinya penyakit kardiovaskular. Aterosklerosis terjadi pada arteri berukuran besar dan sedang. Aterosklerosis dapat ditemukan dengan adanya plak aterosklerosis pada dinding pembuluh darah (Drinane *et al*, 2009).

2.2.2 Etiologi

Penyebab terjadinya aterosklerosis hingga saat ini belum diketahui secara pasti, namun ada beberapa faktor risiko yang dapat memicu terjadinya aterosklerosis. Faktor risiko yang mampu menimbulkan stimuli terjadinya disfungsi endotel yakni hipertensi, merokok, resistensi insulin, obesitas dan *unhealthy diet* (Libby *et al*, 2010). Selain beberapa *lifestyle* tersebut ada pula beberapa kondisi yang dapat menimbulkan lesi aterosklerosis yakni hiperglikemia kronik, hiperinsulinemia, hipertrigliseridemia, dan dislipidemia (Shahab, 2009).

Inflamasi merupakan salah satu predisposisi terbentuknya plak aterosklerosis. Pada kondisi normal, dinding pembuluh darah memiliki kemampuan menahan adhesi dan agregasi leukosit serta cenderung bersifat fibrinolisis. Setelah terjadi inflamasi, berbagai perubahan mulai terjadi. Inflamasi pada dinding endotel menyebabkan disfungsi endotel dan terjadinya *leakage* pada jaringan pembuluh darah sehingga menyebabkan adhesi dan agregasi leukosit menuju bagian endotel tersebut. Leukosit terutama monosit mampu melekat dengan dinding pembuluh darah melalui mediator seperti sitokin proinflamasi, angiotensin II, dan lipoprotein teroksidasi. Apabila monosit telah menempel pada endotel maka *chemokine* mengaktifkan stimulus kemotaktik sehingga bisa masuk ke dalam tunika intima-media. Di tunika intima-media, monosit yang berubah menjadi makrofag mampu memproduksi lipoprotein teroksidasi. Adanya partikel lipid menghasilkan gambaran sel busa pada lesi aterosklerosis. Makrofag akan terus berproliferasi, melepas *growth factor* dan enzim. Enzim yang dilepas makrofag ini seperti *metalloproteinase* (MMPs) dan prokoagulan *tissue factor* (TS), mampu merusak *matrix extracellular* arteri. Selain makrofag inflamasi juga menyebabkan limfosit T ke tunika intima-media melalui ikatan dengan *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1). Akibatnya limfosit T menghasilkan sitokin proinflamasi seperti CD40 *ligand* dan CD154 yang juga melepas MMPs dan prokoagulan TS. CD40 *ligand* memiliki peranan dalam degradasi kolagen yang terkandung pada *matrix extracellular* arteri. Inflamasi juga berpengaruh langsung dalam menghambat metabolisme kolagen. Limfosit T menghambat produksi kolagen oleh sel otot polos melalui sitokin interferon- γ . Kekurangan kolagen pada *matrix extracellular* arteri menciptakan *fibrous cap* aterosklerosis yang mudah ruptur (Libby *et al*, 2010).



Gambar 2.1 Inflamasi berkontribusi dalam proses terbentuknya plak aterosklerosis (Libby *et al*, 2010)

Neoangiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru berkaitan dengan fase lanjut perkembangan plak aterosklerosis. Semakin banyak pembuluh darah baru semakin tinggi resiko plak aterosklerosis untuk ruptur. Angiogenesis di vasa vasorum dapat memicu perkembangan plak aterosklerosis. Hal ini berkaitan dengan nutrisi yang dibutuhkan plak aterosklerosis untuk terus berkembang. Vasa vasorum memiliki nutrisi yang dibutuhkan plak aterosklerosis untuk berkembang. Dengan adanya pembuluh darah baru semakin memudahkan nutrisi untuk masuk ke dalam plak aterosklerosis melalui dinding arteri besar. Inhibisi angiogenesis dapat menurunkan angka pertumbuhan plak aterosklerosis dan kolesterol level dalam plak (Drinane *et al*, 2009).

2.2.3 Patofisiologi

Aterosklerosis terjadi akibat terbentuknya plak aterosklerosis. Plak aterosklerosis adalah timbunan abnormal yang terdiri dari lemak, leukosit, otot polos dan kristal kolesterol akibat proses inflamasi yang terus menerus. Plak

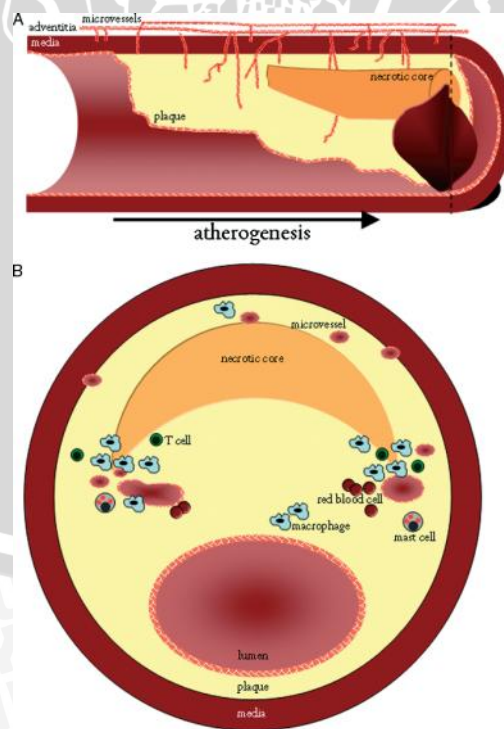
aterosklerosis dapat menurunkan aliran darah di arteri karena lumen arteri yang semakin sempit, menimbulkan nyeri dan gangguan fungsi seperti angina, gagal jantung kongestif dan penyakit vaskular perifer. Dalam kelanjutannya, plak ini dapat ruptur dan menimbulkan adanya trombus dan oklusi, bahkan menjadi emboli yang dapat menimbulkan stroke (Hahn & Schwartz, 2009).

Cikal bakal plak aterosklerosis adalah kerusakan endotel vaskular. Kerusakan endotel menyebabkan peningkatan paparan molekul adhesi pada sel endotel dan menurunkan kemampuan endotel untuk melepaskan *nitric oxide* dan zat lain yang mencegah perlekatan molekul-molekul di dinding pembuluh darah. Setelah kerusakan terjadi monosit dan lipid menumpuk di bagian yang rusak selanjutnya monosit masuk ke tunika intima pembuluh darah dan berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag mencerna dan mengoksidasi tumpukan lipoprotein menyerupai sel busa. Sel-sel busa yang bersatu menjadi *fatty streak*. *Fatty streak* bersatu dengan jaringan otot polos dan jaringan fibrosa yang berproliferasi membentuk plak aterosklerosis (Guyton *et al*, 2008).

Teori lain etiologi terbentuknya plak aterosklerosis ialah dislipidemia. Dislipidemia merupakan kondisi dimana terjadi abnormalitas kadar lipoprotein dalam tubuh. Hal ini ditandai dengan adanya peningkatan trigliserida, *very-low-density lipoprotein* (VLDL), dan *low-density lipoprotein* (LDL), disertai penurunan *high-density lipoprotein* (HDL) (Klop *et al*, 2013). LDL yang berlebih ini memperbesar kemungkinan untuk berikatan dengan matriks ekstraselular proteoglikan. LDL yang berikatan dengan proteoglikan akan melepas antioksidan dan teroksidasi. LDL yang telah teroksidasi akan memicu respon inflamasi. Dengan adanya respon inflamasi tersebut, maka meningkatkan respon adhesi

vaskular terhadap monosit atau makrofag. Faktor inflamasi ini berperan menyebabkan plak aterosklerosis terbentuk (Habib, 2012).

Tanda awal terbentuknya plak aterosklerosis ditandai dengan adanya proliferasi sel-sel otot polos pembuluh darah. Berbagai faktor seperti inflamasi, kerusakan atau disfungsi endotel, dan dislipidemia dapat menyebabkan proliferasi sel-sel otot polos tersebut. Hal ini berkaitan dengan stress oksidatif yang dialami oleh sel-sel otot polos tersebut. Sel-sel otot pembuluh darah atau dikenal dengan *Vascular Smooth Muscle Cells* (VSMC) merupakan sel yang mudah terpapar oleh ROS. Respon sel otot polos terhadap ROS adalah proliferasi sel. Adanya inflamasi, disfungsi endotel, dan dislipidemia berdampak pada bertumpuknya sitokin proinflamasi, debris dan lipid pada tunika intima dan media sehingga menyebabkan bertambahnya ketebalan dinding pembuluh darah (Mackay *et al*, 2001).



Gambar 2.2. Diagram plak aterosklerosis di dinding arteri. (A) Diagram potongan longitudinal dan (B) potongan melintang (Sluimer, 2009)

2.2.4 Ketebalan Intima-media Pembuluh Darah Sebagai Pertanda Aterosklerosis

Ketebalan tunika intima-media dapat menjadi tanda awal terjadinya proses aterosklerosis. Ketebalan tunika intima-media memiliki korelasi dengan faktor risiko sehingga menjadi prediktor terjadinya gangguan kardiovaskular di masa mendatang. Studi menyebutkan bahwa pasien dengan faktor risiko gangguan metabolik seperti diabetes melitus memiliki ketebalan tunika-intima media dua hingga tiga kali lebih tebal daripada orang normal yang diukur menggunakan ultrasonografi. Hasil ketebalan tunika intima-media menggunakan ultrasonografi seiring dengan hasil pengukuran menggunakan metode lain seperti angiografi. Pengukuran ketebalan tunika intima-media menggunakan ultrasonografi memiliki kelebihan yakni tidak invasif, lebih murah dan mampu mendeteksi lebih dini, sedangkan kekurangan yang dimiliki teknik pengukuran ini yakni hasil pengukuran dipengaruhi oleh kemampuan dari teknisi yang melakukan (Margeirsdottir *et al*, 2010).

Studi menyebutkan bahwa aterosklerosis berperan dalam kerusakan endotel dan perubahan struktur dinding pembuluh darah. Infiltrasi LDL menembus endotelium menjadi LDL teroksidasi menyebabkan terbentuknya ROS dan menyebabkan disfungsi endotel. Disfungsi endotel dapat terjadi akibat penurunan *Nitric Oxide* (NO) yang berperan menekan adhesi molekul ke dinding pembuluh darah. Selain berperan menekan adhesi molekul, NO juga berperan dalam menekan proliferasi sel otot vaskular. Adanya penurunan kadar NO menyebabkan hiperplasia dari sel-sel otot vaskular. Kedua kondisi ini menyebabkan bertambahnya ketebalan tunika intima-media dinding pembuluh darah (Bauer *et al*, 2012).

2.3 Diabetes Melitus Tipe 2 sebagai Faktor Risiko Aterosklerosis

Diabetes melitus tipe 2 merupakan salah satu faktor resiko terjadinya aterosklerosis. Untuk mengetahui bagaimana peranan Diabetes melitus tipe 2 dapat memicu terjadinya aterosklerosis diperlukan studi lanjut terkait hal tersebut.

2.3.1 Diabetes Melitus Tipe 2

Untuk mengetahui bagaimana korelasi antara aterosklerosis dengan diabetes melitus tipe 2 tentunya dibutuhkan studi pembahasan mengenai diabetes melitus tipe 2.

2.3.1.1 Definisi

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin, atau kedua-duanya (ADA, 2010).

Diabetes melitus berupa kumpulan gejala terganggunya metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh berkurangnya sekresi insulin atau penurunan sensitivitas jaringan terhadap insulin. Diabetes Melitus (DM) tipe 2 atau disebut juga *Non Insulin Dependent Diabetes Melitus* (NIDDM), disebabkan oleh penurunan sensitivitas jaringan target terhadap efek metabolik insulin atau dikenal dengan resistensi insulin (Guyton *et al*, 2008). DM tipe 2 memiliki ciri khas yakni penurunan progresif insulin, diikuti dengan ketidakmampuan sel beta pankreas untuk mengkompensasi resistensi insulin (Srinivasan *et al*, 2005).

2.3.1.2 Epidemiologi

DM tipe 2 merupakan gangguan metabolik. Di Amerika prevalensi penderita DM tipe 2 mencapai 24 juta orang. Setiap tahunnya 1,3 juta orang terdiagnosa DM tipe 2. Peningkatan jumlah kasus baru sangat tinggi antara usia

30-39 tahun (Rodbard *et al*, 2009). Prevalensi kejadian DM tipe 2 semakin meningkat diiringi meningkatnya usia harapan hidup, urbanisasi dan perubahan lifestyle (Chen *et al*, 2011). Di Indonesia sendiri, telah tercatat beberapa penelitian terkait epidemiologi DM tipe 2. Penelitian antara tahun 2001 dan 2005 tercatat di Depok didapatkan prevalensi DM tipe 2 sebesar 14,7 % dari total penduduk dewasanya. Di Makassar pada tahun 2005, tercatat 12,5 % dari total penduduk usia dewasa menderita DM. Survei yang dilakukan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia bekerja sama dengan Bidang Penelitian dan Pengembangan Departemen Kesehatan terkait Faktor Risiko Penyakit Tidak Menular di Jakarta mencatat prevalensi DM di lima wilayah DKI Jakarta sebesar 12,1% dari 1591 subyek. 3,8% terdeteksi sebagai DM, sisanya sebesar 11,2% tidak terdeteksi (Suyono, 2009).

2.3.1.3 Etiologi

Etiologi DM tipe 2 bersifat multifaktorial dengan berbagai faktor risiko yang mempengaruhi. Berbagai teori mendasari etiologi DM tipe 2. Perkembangan pada masa intrauterin sangat penting dalam kehidupan manusia. Dalam masa janin perubahan ekspresi gen DNA dapat terjadi diakibatkan berbagai sebab. Hal inilah yang menyebabkan perubahan genetik diduga mampu menjadi salah satu faktor risiko DM. Bayi dengan Berat Badan Lahir Rendah (BBLR) diduga berhubungan dengan terjadinya DM tipe 2 di kemudian hari. Dengan nutrisi yang kurang terjadi perubahan permanen pada proses metabolisme glukosa pada janin tersebut sehingga memiliki faktor predisposisi terjadinya resistensi insulin. Hubungan antara malnutrisi pada janin dan DM tipe 2 dibuktikan dalam hasil studi kohort *Dutch Hunger Famine*. Dilaporkan bahwa janin yang mengalami malnutrisi dalam masa kehamilan memiliki toleransi

glukosa yang buruk. Penelitian lain menyebutkan bahwa bayi dengan berat badan lahir lebih dari 0.4 kg juga meningkatkan risiko DM tipe 2. Dalam kehidupan intrauterin, janin yang terekspos hiperglikemia selama masa kehamilan menyebabkan abnormalitas toleransi glukosa, tidak hanya ada bayi namun juga ibu. US Diabetes Prevention Program dan Finnish Diabetes Prevention Study menyebutkan bahwa intervensi *lifestyle* mampu menurunkan risiko DM tipe 2 secara signifikan pada partisipan dengan risiko tinggi DM tipe 2 (Chen *et al*, 2011).

2.3.1.4 Patofisiologi

DM tipe 2 ditandai dengan adanya gangguan sekresi insulin ataupun gangguan kerja insulin terutama pada organ hati dan otot. Pada fase awal terjadinya resistensi insulin belum menunjukkan gejala DM secara klinis. Hal ini diakibatkan oleh sel beta pankreas yang mampu melakukan kompensasi dengan cara mensekresi insulin lebih banyak. Setelah sel beta pankreas tidak mampu melakukan kompensasi lagi, maka gejala klinis DM akan muncul ditandai dengan adanya peningkatan kadar glukosa darah (Liang *et al*, 2007). Peningkatan kadar glukosa darah diakibatkan oleh gagalnya ambilan glukosa oleh otot sebagai pengguna utama glukosa untuk membentuk energi. Produksi glukosa hati yang berlebihan juga menyebabkan peningkatan kadar glukosa darah pada saat puasa. Selain pada otot dan hati, resistensi insulin juga berdampak pada jaringan adiposa sehingga merangsang proses lipolisis dan meningkatkan asam lemak bebas. Hal ini mengakibatkan gangguan ambilan glukosa oleh sel otot dan gangguan sekresi insulin oleh sel beta pankreas (Soegondo, 2009).

Perkembangan resistensi insulin dan gangguan metabolisme glukosa biasanya terjadi bertahap. Diawali dengan peningkatan berat badan dan obesitas. Akumulasi lipid di jaringan akibat obesitas menimbulkan efek toksik dan

gangguan sinyal insulin pada jaras. Hal inilah yang menyebabkan munculnya resistensi insulin. Resistensi insulin menjadi penyebab utama peningkatan kadar gula darah (Guyton *et al*, 2008).

Pada pasien DM tipe 2 lebih mudah mengalami aterosklerosis, arteriosklerosis, penyakit jantung koroner dan lesi mikrosirkulasi multipel karena kadar kolesterol dan lipid yang sangat tinggi dalam sirkulasi darah (Guyton *et al*, 2008). Penelitian menyebutkan bahwa prevalensi aterosklerosis cenderung lebih tinggi pada pasien DM dibandingkan dengan pasien non DM. Pasien DM juga lebih berisiko mengalami trombosis, penurunan fibrinolisis, peningkatan respons inflamasi, dan glikosilasi protein yang mempengaruhi integritas dinding pembuluh darah yang meingkatkan kemungkinan terbentuknya lesi aterosklerosis (Shahab, 2009).

2.3.1.5 Penatalaksanaan

Penatalaksanaan DM diawali dengan terapi non farmakologi berupa pemberian edukasi, perencanaan makan atau terapi nutrisi medik, kegiatan jasmani, dan penurunan berat badan apabila ditemukan adanya obesitas. Bila melalui tatalaksana ini belum mampu mencapai sasaran pengendalian DM maka dilanjutkan dengan penambahan terapi medika mentosa dengan tetap melakukan pengaturan pola makan dan aktifitas fisik yang sesuai. Apabila ditemukan penyulit seperti infeksi, stres akut, gagal jantung, iskemia akut, defisiensi insulin berat, dan glikemik pada ibu hamil yang tidak terkontrol dengan perencanaan pola makan dan aktifitas, maka diperlukan terapi insulin (Soegondo, 2009).

Hingga saat ini manajemen medika mentosa yang sering digunakan adalah obat-obatan yang meningkatkan sensitivitas insulin seperti

thiazolidinedion dan *metmorfin*, atau obat-obatan yang meningkatkan pelepasan insulin dari pankreas seperti *sulfonilurea* (Guyton *et al*, 2008). Namun efek samping yang beragam, penggunaan obat dalam dosis multipel serta membutuhkan biaya yang cukup besar dalam manajemen medika mentosa menggunakan obat-obatan tersebut menjadi kekurangan manajemen terapi DM tipe 2 pada saat ini (Li *et al*, 2011).

2.3.2 Diabetes Melitus Tipe 2 dan Dislipidemia

Studi menyebutkan konsumsi tinggi glukosa berpotensi menyebabkan DM tipe 2. Glukosa dengan kadar tinggi dalam darah menyebabkan uptake glukosa ke jaringan meningkat. Transporter glukosa untuk masuk ke jaringan adiposa, sel-sel otot rangka dan sel-sel otot jantung, GLUT-4, berperan dalam proses uptake glukosa tersebut. Aktifnya GLUT-4 menstimulasi sel beta pankreas meriliskan insulin guna mengkompensasi kadar glukosa yang tinggi tersebut. Kondisi ini memicu terjadi hiperinsulinemia. Apabila kondisi ini terjadi dalam jangka waktu yang lama, sensitivitas GLUT-4 pada jaringan adiposa, sel-sel otot rangka dan sel-sel otot jantung untuk uptake glukosa ke jaringan tersebut akan semakin rendah. Akibatnya kadar glukosa akan tinggi dalam pembuluh darah sehingga terjadi hiperglikemia. Penurunan sensitivitas reseptor GLUT-4 untuk mengenali *uptake* glukosa ke jaringan sehingga insulin tidak bisa rilis oleh sel beta pankreas disebut resistensi insulin pada DM tipe 2 (Kim *et al*, 2006).

Sel-sel tubuh membutuhkan energi untuk dapat melakukan fungsinya dengan baik. Untuk mendapatkan energi didapatkan dari glukosa. Akibat terjadinya resistensi insulin, glukosa tidak *diuptake* ke jaringan adiposa, otot rangka dan jantung, sehingga untuk mendapatkan energi didapatkan dari lipid. Energi dari lipid didapatkan melalui proses lipolisis. Lipolisis yang tinggi,

menyebabkan peningkatan kadar *free fatty acid*. Di liver, *free fatty acid* akan diubah menjadi trigliserida. Terjadi hipertrigliseridemia pada pembuluh darah (Prasad & Quyyumi, 2004). Kadar trigliserida (TG) yang tinggi menstimulasi peningkatan *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL). Peningkatan kadar VLDL dan tingginya TG di plasma menyebabkan penurunan kadar *High Density Lipoprotein* (HDL) dan peningkatan konsentrasi *Low Density Lipoprotein* (LDL). Kondisi dimana tingginya kadar TG, rendahnya kadar HDL dan tingginya kadar LDL disebut kondisi dislipidemia (Mooradian, 2009).

Tingginya kadar glukosa dalam darah berpotensi mengaktivasi makrofag/monosit perifer. Monosit yang berkembang dalam kondisi kadar glukosa tinggi menginduksi sitokin proinflamasi seperti IL-1 dan IL-6. Proses inflamasi yang terjadi menginduksi protein kinase C, aktivasi NFκB, peningkatan rilis ROS yang berperan dalam proses terjadinya stres oksidatif. ROS memfasilitasi LDL mengalami oksidasi. LDL teroksidasi akan dikenali makrofag sebagai benda asing dan berusaha untuk difagositosis. Kondisi hiperglikemia menyebabkan proses fagositosis berkembang menjadi akumulasi lipid dan pembentukan sel busa. Pembentukan sel busa akan menyebabkan terjadinya penebalan tunika intima-media pembuluh darah dan dalam jangka waktu yang lama berkembang menjadi plak aterosklerosis (Chait & Bornfeldt, 2009).

2.3.3 Penebalan Tunika Intima-Media pada Diabetes Melitus Tipe 2

DM tipe 2 merupakan salah satu faktor resiko mayor dari *cardiovascular disease* (CVD). Patofisiologi DM tipe 2 sehingga dapat menyebabkan CVD berhubungan dengan inflamasi, dislipidemia, dan *prothrombotic state* (Habib, 2012). DM tipe 2 memiliki hubungan yang erat dengan aterosklerosis. DM tipe 2 merupakan salah satu faktor risiko terjadinya aterosklerosis. Penderita DM tipe 2

beresiko dua hingga tiga kali lipat terkena aterosklerosis dibandingkan dengan orang normal. Iskemia miokard yang disebabkan adanya plak aterosklerosis pada pembuluh darah koroner dan angiogenesis, biasanya asimtomatik pada penderita DM tipe 2. Tidak adanya gejala menyebabkan keterlambatan penanganan sehingga memperburuk prognosis dan meningkatkan angka mortalitas pada pasien DM tipe 2 (Habib, 2012).

Pada penderita DM tipe 2, terjadi resistensi insulin yang mengakibatkan tidak adanya insulin terhadap metabolisme glukosa sehingga efek insulin terhadap metabolisme glukosa hampir tidak ada. Kondisi yang muncul selanjutnya adalah menurunnya ambilan glukosa oleh sel otot dan sel hati sehingga kadar glukosa dalam darah sangat tinggi. Tingginya kadar glukosa darah dapat menimbulkan kerusakan jaringan namun belum diketahui mekanisme pasti bagaimana kadar glukosa darah yang tinggi mampu menimbulkan kerusakan jaringan. Kadar glukosa darah yang tinggi merangsang sekresi insulin untuk menormalkan kadar glukosa kembali. Pada resistensi insulin berkepanjangan sel beta pankreas sudah tidak mampu memproduksi cukup insulin untuk mencegah hiperglikemia lebih parah. Kurangnya kadar insulin ini juga mengakibatkan lipolisis simpanan lemak dan pelepasan asam lemak bebas ke sirkulasi darah. Kelebihan asam lemak di plasma memacu perubahan sejumlah asam lemak menjadi fosfolipid dan kolesterol di hati. Bersama-sama dengan kelebihan trigliserida yang dibentuk pada saat yang sama di hati menyebabkan dilepaskannya lipoprotein ke sirkulasi. Akibatnya lipoprotein plasma meningkat jumlahnya memberikan konsentrasi total lipid yang tinggi di sirkulasi (Guyton *et al*, 2008). Konsentrasi lipid yang tinggi menghasilkan simpanan lipid di jaringan adiposa semakin banyak. Semakin banyaknya lipid

semakin tinggi pula produksi sitokin-sitokin proinflamasi seperti IL-6 karena fungsi jaringana diposa sendiri selain sebagai tempat deposit lipid juga sebagai tempat pembentuk sitokin proinflamasi. Tingginya kadar lipid juga berdampak tingginya faktor kloting fibrinogen, inhibitor fibrinolisis, sehingga darah lebih mudah untuk membeku. Hal ini yang menyebabkan aterosklerosis mudah terjadi pada pasien dengan DM tipe 2 (Libby *et al*, 2010).

DM tipe 2 berhubungan erat dengan resiko tinggi penyakit kardiovaskular. Angka kematian tinggi pada penderita DM tipe 2 disebabkan oleh gangguan sirkulasi darah. Sebagian besar dari penderita DM tipe 2 memiliki lesi aterosklerosis di pembuluh darah. Sebagai tanda awal terjadinya aterosklerosis, penebalan tunika intima-media bisa menjadi marker terjadinya penyakit kardiovaskular pada penderita DM tipe 2. Dalam berbagai penelitian disebutkan bahwa pada subjek penderita hiperglikemia asimtomatis, metabolik sindrom dan DM tipe 2 cenderung mengalami peningkatan penebalan tunika intima-media dibandingkan dengan pembuluh darah pada subjek yang sehat. Hal ini mengindikasikan bahwa penebalan tunika intima-media dapat menjadi marker terjadinya proses aterosklerosis pada tubuh seseorang. Bertambahnya usia, lama mengalami DM tipe 2, besarnya tekanan darah baik sistolik dan diastolik mempengaruhi seberapa tebal penebalan tunika intima dan media. Ketebalan tunika intima-media dipengaruhi pula oleh jumlah leukosit. Monosit dan makrofag memiliki peranan penting dalam dalam pembentukan plak aterosklerosis. Subjek dengan kada leukosit $>500/\text{mm}^3$ cenderung lebih mudah mengalami aterosklerosis. Seiring dengan bertambahnya usia, semakin tebal tunika intima-media pembuluh darah. Namun dengan adanya faktor predisposisi seperti DM

tipe 2 lebih beresiko semakin cepatnya terjadi penebalan tunika intima-media (Matsumura *et al*, 2013).

2.4 Penebalan Tunika Intima-Media Pembuluh Darah

Penebalan tunika intima-media merupakan tanda awal histopatologi proses aterosklerosis. Penebalan tunika intima-media diprakarsai oleh proliferasi sel-sel otot polos pembuluh darah. Terjadinya proliferasi sel-sel otot polos pembuluh darah di pengaruhi oleh adanya stres oksidatif, disfungsi endotel, inflamasi, dan dislipidemia. Proses aterosklerosis yang terus menerus terjadi menyebabkan proliferasi sel-sel otot polos pembuluh darah terus terjadi. Akibatnya, plak aterosklerosis akan terbentuk dalam jangka waktu tertentu (Ohira *et al*, 2011).

Plak aterosklerosis merupakan karakteristik patologi dimana terusun atas jaringan fibrosa, jaringan lipid dan marker inflamasi. Plak aterosklerosis menjadi prekursor utama manifestasi klinis dari penyakit aterosklerosis seperti infark miokard dan stroke yang disebabkan oleh trombosis akut. Trombosis ini dapat terjadi akibat tidak stabilnya plak aterosklerosis sehingga dapat menyebabkan sumbatan di lumen pembuluh darah. Plak aterosklerosis dapat dilihat pada gambaran histologi pembuluh darah (Hellings *et al*, 2010).

Proses aterosklerosis mengakibatkan terjadinya inflamasi sebagai respon terhadap kerusakan jaringan yang terjadi. Inflamasi ini dapat mengakibatkan satu atau lebih gangguan sistemik antara lain hiperkolesterolemia, hipertensi, diabetes, hiperhomosisteinemia dan berujung pada disfungsi endotel pada dinding pembuluh darah. Disfungsi endotel memicu terjadinya perubahan struktur jaringan pada dinding pembuluh darah. Perubahan struktur yang terjadi adalah berupa akumulasi lipid, makrofag, dan limfosit T pada tunika intima. Selanjutnya,

proses berlanjut dengan berproliferasinya sel-sel otot polos. Pada akhirnya akan memicu terbentuknya plak ateroklerosis yang tersusun atas lipid, debris nekrotik, dan otot polos vaskular (Mackay *et al*, 2001).

Perubahan struktur patologi dinding pembuluh darah yang paling sering ditemukan dalam penelitian yakni hipertrofi sel-sel otot polos vaskular. Sel-sel otot polos pembuluh darah terdapat pada lapisan tunika intima dan media dinding pembuluh darah. Hipertrofi otot polos lebih mudah dianalisa daripada lesi kompleks lainnya. Hipertrofi otot polos dapat menjadi tanda awal proses ateroklerosis yang terjadi. Hipertrofi sel-sel otot polos vaskular juga dapat ditemukan tanpa diiringi penurunan diameter lumen. Penelitian menyebutkan hipertrofi sel-sel otot polos vaskular dapat ditemukan pada pembuluh darah karotis pasien dengan faktor resiko penyakit jantung koroner (PJK) yakni hiperlipidemia, hiperhomosisteinemia, diabetes maupun hipertensi essensial. Gambaran patologi yang ditemukan berupa hipertrofi sel-sel otot polos di lapisan intima-media. Sel-sel otot polos vaskular berproliferasi dan mengalami penambahan ketebalan lapisan yang signifikan. Akhirnya dinding pembuluh darah mengalami penebalan tanpa diiringi penambahan diameter keluar namun mempersempit lumen pembuluh darah. Proses *remodelling* ini merupakan respon sel-sel otot polos atas stress akibat hipertensi maupun sebab lain yang dialami dinding pembuluh darah. Proses *remodelling* otot polos vaskular ini merupakan proses pertahanan homeostasis tubuh untuk mempertahankan resistensi tekanan arteri (Mackay *et al*, 2001).

Pengukuran penebalan tunika intima-media yang terjadi pada manusia dapat menggunakan dua cara, yakni *very-high-resolution ultrasound echotracking device* yang bersifat non-invasif dan *coronary artery bypass grafting*

(CABG) yang berifat invasif. Ultrasound dapat mengukur diameter lumen dan penebalan intima yang terjadi. CABG dapat melihat perubahan struktur yang terjadi melalui preparat histopatologi (Mackay *et al*, 2001).

Regulasi homeostasis vaskular dapat tercapai apabila endotelium mampu mempertahankan keseimbangan vasodilatasi dan vasokonstriksi, inhibisi dan stimulasi, serta trombogenesis dan fibribolisis. Apabila keseimbangan ini terganggu maka terjadi disfungsi endotel. Keseimbangan vasodilatasi dan vasokonstriksi diperankan oleh substansi dilator dan konstriktor. Substansi vasodilator utama yang dirilis oleh sel endotel adalah *Nitrit Oxide* (NO). Selain sebagai vasodilator, NO juga berperan menekan agregasi platelet, infiltrasi leukosit, proliferasi sel otot polos vaskular dan menekan pembentukan LDL teroksidasi. Penurunan kadar atau aktivasi NO dapat menyebabkan terjadinya disfungsi endotel. Disfungsi endotel mengarah pada peningkatan ketebalan tunika intima-media pembuluh darah. Untuk mempertahankan ketebalan tunika intima-media dalam kondisi normal, diperlukan adanya upaya untuk mempertahankan kadar dan aktivasi NO. Meningkatkan bioavailabilitas NO dapat dicapai dengan melakukan intervensi seperti *lipid lowering therapy*, HMG-CoA reduktase inhibitor, *angiotensin-converting enzym inhibitor*, antioksidan, menurunkan hiperglikemia, dan kegiatan aktif seperti olahraga (Davignon & Ganz, 2004).

2.4.1 Metode Pengukuran Tebal Tunika Intima-Media

Metode pengukuran tebal dinding pembuluh darah diawali dengan persiapan preparat. Tikus dinekropsi kemudian diambil sampel dari potongan aorta. Pembuatan preparat menggunakan prosedur *Paraffin Block* atau *Frozen Section*. Prosedur pembuatan preparat menggunakan *paraffin block* dimulai

dengan pengambilan sampel potongan aorta dan pencucian jaringan dalam PBS untuk menghilangkan sisa-sisa darah. Menempatkan potongan aorta dalam buffer formalin dan menginkubasi selama waktu yang dibutuhkan guna fiksasi jaringan. Prosedur selanjutnya mencuci kembali potongan aorta ke dalam PBS dan disimpan dalam larutan ETOH 70% dan H₂O dengan suhu 4^oC. Potongan aorta ditempatkan ke dalam kaset histologi, kemudian direndam dalam ETOH 70 % dan disimpan dalam tempat penyimpanan. Simpan potongan aorta dalam suhu 4^oC hingga jaringan dapat dibuat preparat ada kaca objek (Claffey, 2011). Prosedur lain yang digunakan dalam mempersiapkan preparat aorta adalah *frozen section* atau potong beku. Prosedur potong beku dimulai dengan persiapan potongan aorta dan disimpan dalam matrix jaringan. Selanjutnya potongan aorta direndam dalam 2-methylbutane dingin. Setelah block jaringan siap dapat disimpan dalam dry ice atau cryostat -20^oC guna persiapan section. Proses sectioning dimulai dengan tempatkan block jaringan pada disk cryostat dan posisikan pisau pengiris untuk mengambil potongan jaringan yang paling baik. Setelah dipotong, keringkan jaringan pada ruang temperatur cryostat dan dapat disimpan dalam freezer bersuhu -70^oC. Fiksasi jaringan dapat menggunakan aseton atau alkohol atau formalin, dan proses fiksasi memakan waktu sebanyak 2 menit. Jaringan yang telah melalui proses fiksasi dapat dilakukan prosedur pengecatan (Peters, 2010).

Berbagai pengecatan dapat digunakan untuk pengecatan sampel aorta, antara lain Oil Red O dan hematoksilin-eosin (HE). Prosedur pengecatan Oil Red O dimulai dengan prosedur potong beku. Setelah preparat siap, fiksasi jaringan dengan formalin kemudian bilas dengan air. Potongan jaringan dibilas kembali dengan 60% isopropanol. Kemudian pengecatan jaringan dengan larutan Oli red O

selama 15 menit dan dibilas kembali dengan 60% isopropanol. Langkah terakhir dibilas dengan air mengalir. Hasil yang akan muncul adalah lemak berwarna merah dan inti sel berwarna biru (Ellis, 2011). Pengecatan HE juga dapat digunakan untuk mewarnai sampel aorta. Pengecatan HE dapat menggunakan preparat *frozen section* maupun *paraffin block*. Prosedur awal yang perlu dilakukan apabila menggunakan prosedur *paraffin block* adalah deparafinasi jaringan selama 45 detik dalam larutan xylene. Apabila menggunakan prosedur *frozen section* dapat meninggalkan langkah awal ini. Prosedur selanjutnya setelah preparat siap, meneteskan pewarnaan hematoksilin sebanyak 5 tetes per slide. Preparat dibilas menggunakan air hangat (30°C) selama 45 detik. Pewarna Eosin diteteskan pada preparat sebanyak 2-3 tetes kemudian dibiarkan selama 30 detik. Bilas kembali preparat menggunakan air dingin. Rendam preparat ke dalam larutan propanol selama 45 detik dan larutan xylene selama 45 detik (Fischer, 2008).

Pengamatan dan pengukuran sediaan aorta dapat dilakukan dengan prosedur *frozen section* maupun *paraffin block*. Pewarnaan jaringan aorta dapat menggunakan pewarnaan Oil red O maupun HE (Murwani *et al*, 2006). Pengamat jaringan yang lebih mendalam dapat menggunakan mikroskop binokuler (Yanuartono, 2007).

Perkembangan teknologi menghasilkan kemudahan bagi peneliti untuk mendapatkan gambaran preparat dengan pembesaran yang tinggi dan dapat didiskusikan bersama kolega. Kemudahan ini berupa *virtual slide microscopy*. *Virtual slide microscopy* tidak membatasi pengguna seperti konvensional mikroskop biasa. *Virtual slide microscopy* memungkinkan pengguna untuk berdiskusi dengan kolega dimana saja dan kapan saja. *Virtual slide microscopy* mengubah hasil pembacaan mikroskop konvensional menjadi bentuk digital.

Untuk menghasilkan digital slide mikroskopik dibutuhkan *software dot-slide system* dengan hardware khusus (Chen *et al*, 2008).

Dot-slide OlyVIA merupakan software produksi Olympus untuk melihat hasil scan dari dot-slide system yang dikembangkan Soft Imaging System GmbH (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Jerman) (Chen *et al*, 2008). Hardware yang digunakan dalam sistem ini terdiri atas 4 komponen utama seperti yang dapat dilihat pada Gambar 2.2 yakni : (1) mikroskop cahaya; (2) kamera color digital; (3) penampang yang dapat dikontrol ke semua arah menggunakan joystick dan software; dan (4) PC atau komputer yang diinstal dengan image acquisition software (www.olympus-europa.com).



Gambar 2.3. Hardware yang digunakan dalam dot-slide system scan Olyvia (Chen *et al*, 2008)

2.5 Stres Oksidatif pada Diabetes Melitus Tipe 2

Jaringan adiposa merupakan tempat penyimpanan lemak dalam tubuh manusia. Selain berfungsi sebagai tempat penyimpanan lemak, adiposa juga sebagai lokasi pembentukan sitokin-sitokin proinflamasi (Libby *et al*, 2010). Pada obesitas, *retroperitoneal fat* umumnya mengalami peningkatan hingga lebih dari

20% massa tubuh. Peningkatan jumlah ini menyebabkan resisten terhadap anti-lipolisis insulin. Lemak visceral ini mensekresikan beberapa sitokin proinflamasi seperti angiotensinogen, IL-6, IL-8, dan plasminogen activator inhibitor-1. Lemak visceral juga sumber utama terbentuknya *free fatty acid* (FFA) atau asam lemak bebas di sirkulasi dan didominasi oleh IL-6 sebagai mediator. Dengan tingginya kadar FFA semakin tinggi pula resistensi insulin dan produksi glukosa hepar. IL-6 yang disekresi lemak viseral turut berperan dalam proses inflamasi yang terjadi pada endotel dan menyebabkan disfungsi endotel. Tingginya lemak visceral juga berdampak pada tingginya infiltrasi monosit/makrofag. Infiltrasi monosit/makrofag dinisiasi oleh pembesaran sel adiposit. Pembesaran sel adiposit yang terjadi mengakibatkan tingginya stress, peningkatan produksi ROS, peningkatan sekresi FFA, dan sitokin proinflamasi (Gustafson, 2010).

High fat diet atau pakan tinggi lemak menginduksi terjadinya disfungsi endotel. Disfungsi endotel yang terjadi akibat inflamasi ini mengakibatkan terjadinya aterosklerosis. Terbentuknya plak aterosklerosis maka meningkatkan stress oksidatif dengan cara peningkatan *oxidative-sensitive-genes* (Shrivastava *et al*, 2012).

Identifikasi awal terjadinya proses aterosklerosis ditandai dengan adanya peningkatan ketebalan tunika intima-media. Ketebalan tunika intima-media ini merupakan akibat dari stress oksidatif pada dinding pembuluh darah. Kerusakan dinding pembuluh darah ini memicu disfungsi endotel. Disfungsi endotel menyebabkan terjadinya perlekatan molekul-molekul seperti lipid, debris, makrofag, dan lain-lain di tunika intima sehingga menambah ketebalan tunika intima-media. Selain faktor adhesi molekul, stress oksidatif juga memicu terjadinya hiperplasia sel-sel otot polos vaskular (Bauer *et al*, 2012).

2.6 Peran Antioksidan terhadap Stres Oksidatif

Stres oksidatif menyebabkan kerusakan biomolekuler seperti protein, lipid dan DNA berakumulasi mengarah pada patogenesis penyakit, contohnya penyakit kardiovaskular. Pada penyakit kardiovaskular, proses aterogenesis menyebabkan terbentuknya plak pada dinding pembuluh darah sehingga menyebabkan obstruksi. LDL teroksidasi menjadi faktor utama terjadinya proses aterogenesis. LDL teroksidasi menarik makrofag, selanjutnya menyebabkan terbentuknya foam cell, diiringi rilis dari *cytotoxic lipid peroxidase* sebagai produk dari LDL teroksidasi, sitokin, chemoattractant, dan adhesi molekul lainnya sehingga menyebabkan terbentuknya plak (Hollman *et al*, 2011).

Oksidan atau yang biasa dikenal dengan *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan hasil samping dari proses inflamasi, exercise, respirasi, maupun dari paparan asap rokok, polutan, radiasi dan sinar UV. Oksidan ini dapat diubah dari kondisi *free radical* menjadi *non radical* melalui peranan anti oksidan. Antioksidan berperan menetralkan *free radical* menjadi kondisi *non radical*, yang lebih stabil sehingga tidak merusak jaringan. Antioksidan berperan sebagai proteksi jaringan melalui kerja enzim seperti katalase, glutathione peroxidase, dan superoxide dismutase yang bekerja langsung menetralkan oksidan. Konsumsi antioksidan yang cukup dalam konsumsi makanan sehari-hari terbukti dapat menurunkan angka kejadian kardiovaskular. Faktor risiko penyakit kardiovaskular seperti merokok, obesitas dan DM tipe 2 berperan dalam meningkatkan rasio LDL teroksidasi dalam tubuh (Hollman *et al*, 2011).

2.7 Peptida Polisakarida (*Ganoderma lucidum*)

Ganoderma lucidum sebagai salah satu bahan herbal yang saat ini banyak digunakan sebagai obat karena unsur-unsurnya memiliki peran sebagai

anti inflamasi diduga mampu menjadi obat yang mempunyai kemampuan mencegah terjadinya aterosklerosis melalui penghambatan terbentuknya plak aterosklerosis.

2.7.1 Definisi Peptida Polisakarida

Peptida adalah rangkaian asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida. Biasanya digunakan untuk rangkaian asam amino kurang dari 100 buah. Peptida memainkan peranan penting seperti chemical messenger, neurotransmitter serta pemacu dan penghambat metabolisme tertentu (Awaludin, 2014).

Polisakarida merupakan polimer dari beberapa monosakarida yang berikatan satu sama lain (Roswiem, 2006). Polisakarida merupakan unsur struktural di dalam dinding sel dan jaringan pengikat. Jenis polisakarida yang saat ini banyak diteliti adalah polisakarida beta-glukan. Beta-glukan merupakan polisakarida yang dihasilkan oleh berbagai jenis jamur diantaranya *Agrobacterium sp.* dan *Ganoderma lucidum* melalui fermentasi glukosa. Struktur beta-glukan yang sering digunakan di bidang makanan dan farmasi karena sifatnya sebagai anti mikroba, anti kolesterol, anti inflamasi, anti oksidan, dan immunostimulan adalah beta-1,3-glukan dan beta-1,6-glukan (Lin, 2005).

2.7.2 Peptida Polisakarida *Ganoderma lucidum* sebagai Antioksidan

Ganoderma lucidum merupakan salah satu tanaman herbal yang biasa digunakan pada pengobatan tradisional Tiongkok. Dikenal sebagai "Lingzhi" di Cina. Sering digunakan sebagai pengobatan beberapa penyakit seperti hepatitis, hipertensi, bronkitis kronik, asma bronkial, kanker dan lain-lain. *Ganoderma lucidum* adalah salah satu dari famili fungi yang mudah tumbuh di pohon tumbang dan gelondong kayu dari jenis pohon berdaun lebar. Berbagai

penelitian menyebutkan bahwa polisakarida *Ganoderma lucidum* sebagai sumber utama aktivitas biologis termasuk efek anti tumor, anti inflamasi dan sitotoksitas sel hepatoma. Sedangkan ekstrak dari polisakarida berbagai spesies jamur dinilai mampu menghambat *immunostimulating* dan aktivitas anti tumor (Li *et al*, 2011).

Di beberapa provinsi di Cina, *Ganoderma lucidum* digunakan sebagai obat diabetes melitus. Penelitian menyebutkan bahwa polisakarida yang terkandung dalam *Ganoderma lucidum* memiliki efek antihiperqlikemia. Antihiperqlikemia pada peptida polisakarida *Ganoderma lucidum* bekerja dengan cara meningkatkan regenerasi sel beta pankreas, meningkatkan proses *recovery* sel beta pankreas yang rusak sehingga menstimulasi sekresi insulin. Peptida polisakarida *Ganoderma lucidum* juga dapat menurunkan dan menghambat absorpsi glukosa pada tikus (Li *et al*, 2011).

Beberapa penelitian menyatakan bahwa *Ganoderma lucidum* memiliki efek pula sebagai antioksidan dimana mampu mensupresi pembentukan radikal bebas. Amino polisakarida *Ganoderma lucidum* mampu menghambat lipid peroksidase sehingga terbentuknya LDL teroksidasi dapat diminimalisir akibat stres oksidatif. Polisakarida *Ganoderma lucidum* dapat meningkatkan kadar antioksidan sehingga menekan lipid peroksidase dan menetralsir radikal bebas (W. Liu *et al*, 2010).

Ganoderma lucidum sebagai antioksidan juga memiliki efek pada makrofag perifer. Sebagian besar makrofag berasal dari diferensiasi monosit dan dapat bergerak meninggalkan sirkulasi darah apabila ada stimulasi agent kemotaktik. Studi menunjukkan polisakarida *Ganoderma lucidum* dapat

memproteksi membran mitokondria dan membran sel dari kerusakan akibat radikal bebas (Lin, 2005).

2.8 Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2 in vivo

Dalam suatu penelitian tentunya dibutuhkan uji coba yang valid dan dapat dipertanggungjawabkan. Penelitian Diabetes melitus tipe 2 dan aterosklerosis pada masa sekarang banyak menggunakan hewan coba karena kemiripan strukturnya dengan manusia.

2.8.1 Pemilihan Hewan Coba

Banyak penelitian aterosklerosis telah dilakukan. Berbagai hewan coba digunakan dalam penelitian-penelitian tersebut. Beberapa hewan coba yang pernah digunakan adalah New Zealand *white rabbit*, *sprague dawley-rat*, dan tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Gwynee and Hess, 2000). Berbagai hewan coba tersebut memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing yang mampu menunjang penelitian. *Balb/c* adalah jenis tikus (mice) albino yang digunakan sebagai hewan coba karena kemiripannya dengan struktur sel manusia. Dalam berbagai penelitian disebutkan bahwa tikus *balb/c* baik digunakan dalam riset terkait imunologi dan onkologi karena respon sel mirip dengan manusia. *Sprague-Dawley* merupakan tikus galur albino hibrida. Kelebihan lain yang dimiliki oleh tikus jenis ini adalah memiliki tingkat reproduksi yang tinggi, tenang, dan mudah dijinakkan. Sangat mudah dibiakkan dan cocok digunakan dalam penelitian terkait pengamatan perilaku, empati, dan pro-social behaviour. Selain penelitian terkait perilaku, *Sprague-Dawley* dapat digunakan sebagai hewan coba untuk riset angiogenesis terutama di renal. Jenis biakan yang paling banyak digunakan adalah *Charles River Sprague-Dawley*. Hewan coba tikus putih lain yang sama-sama albino hibrida adalah *Rattus norvegicus* galur Wistar. *Sprague-*

Dawley merupakan galur turunan dari tikus jenis ini. *Rattus norvegicus* galur wistar dipilih karena keberhasilan dalam suatu percobaan pembuatan model aterosklerosis pada tikus (Johnson, 2012). Tikus jenis ini lebih mudah didapatkan dan lebih murah dibandingkan jenis lainnya (Kustiyah *et al*, 2003)(Murwani *et al*, 2006). Dalam penelitian lain menyebutkan bahwa *Rattus norvegicus* galur Wistar memiliki metabolisme kolesterol yang mirip dengan manusia dilihat dari fungsi HDL dan LDL. HDL dan LDL tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar dan manusia memiliki fungsi yang sama yaitu memproduksi steroid dan apolipoprotein yang sama (Cyntia, 2011).

2.8.2 High Fat Diet dan Streptozotocin

Penelitian DM tipe 2 membutuhkan hewan coba yang memiliki proses patologi dan metabolik yang sama dengan DM tipe 2 manusia. Beberapa penelitian berkembang terkait pemilihan hewan coba. Perubahan genetik yang disengaja pada hewan coba menjadi salah satu opsi yang digunakan. Tetapi hewan coba dengan mutasi genetik ini membutuhkan lingkungan yang sangat ketat dan biaya yang cukup tinggi. Oleh sebab itu, penelitian beralih menggunakan tikus yang diekspos pakan tinggi lemak atau *high fat diet*. Model ini dibuat dengan cara mengekspos tikus dengan pakan tinggi lemak dalam beberapa bulan. Hasil penelitian model ini menunjukkan peningkatan signifikan hiperglikemia tikus dikarenakan pakan tinggi lemak. Pakan tinggi lemak yang diformulasikan mengandung 58% kalori menyebabkan resistensi insulin dalam waktu 2 minggu ditandai dengan peningkatan berat badan, hiperglikemia ringan, hipertrigliseridemia, hiperkolesterolemia, dan kompensasi hiperinsulinemia (Liang *et al*, 2007). Pakan tinggi lemak dapat menginduksi resistensi insulin melalui siklus metabolisme glukosa-asam lemak. Tingginya kadar trigliserida disebabkan

peningkatan availabilitas asam lemak dan oksidasi. Diet yang dikembangkan untuk menginduksi resisten insulin memiliki ciri khas mengandung tinggi lemak atau tinggi karbohidrat, glukosa, minyak jagung atau minyak jenis lainnya, kolesterol dan pelet. (Srinivasan *et al*, 2005).

Streptozotocin (STZ) adalah agen anti mikroba hasil turunan dari mikroorganisme tanah *Streptomyces achromogenes*. Digunakan sebagai agen terapi metastasis sel pankreas dan malignansi lainnya. STZ bersifat agen diabetik sehingga digunakan untuk menginduksi DM pada hewan coba. STZ digunakan luas untuk menghasilkan baik DM tipe 1 maupun DM tipe 2 dengan cara menginduksi kematian sel beta pankreas (Zhang *et al*, 2008).

Dosis STZ menentukan bagaimana kondisi klinis hewan coba. STZ dosis tinggi digunakan untuk menghasilkan keadaan mirip DM tipe 1 sedangkan dosis rendah STZ menimbulkan gangguan ringan sekresi insulin yang pada tahap selanjutnya menimbulkan gejala klinis DM tipe 2. Dalam penelitian menyebutkan untuk menimbulkan gambaran klinis DM tipe 1 diperlukan dosis STZ injeksi peritoneal sebanyak 180-200mg/kgBB. Sedangkan untuk menimbulkan gambaran klinis DM tipe 2 dibutuhkan dosis STZ injeksi peritoneal sebanyak 100mg/kgBB. Kedua injeksi tersebut merupakan *single injection*. Dosis 40mg/kgBB dengan *multiple injection* sebanyak 5-6 kali dapat menimbulkan gambaran klinis DM tipe 1 maupun tipe 2 (Arora, 2009)

STZ bekerja selektif pada sel beta pankreas. Potensi alkilasi pada STZ mampu menginduksi nekrosis sel beta pankreas. STZ menimbulkan hiperglikemia ireversibel pada hewan coba dan menjadi pilihan utama dibandingkan alloxan. Hal ini dikarenakan STZ tidak menimbulkan revisi spontan

dan lebih dari 90% hewan coba terdiagnosa diabetes (Prasad *et al*, 2009) (Lenzen, 2008).



Gambar 2.4. Struktur kimia streptozotocin (STZ) (Lenzen, 2008).

Terjadinya endogenus stres oksidatif kronis merupakan cara STZ menginduksi terjadinya hiperglikemia. Stres oksidatif yang dijumpai oleh adanya radikal bebas mampu menimbulkan kerusakan pada jaringan bahkan organ. Studi baru-baru ini menyebutkan STZ meningkatkan *lipid peroxidase* dan menurunkan level antioksidan nonenzimatik. Peningkatan glukosa darah dan menurunnya kadar insulin di serum sangat berkaitan dengan peningkatan lipid peroksidase. Pada pasien diabetes ditemukan pula stress oksidatif yang berlangsung terus menerus (Jia *et al*, 2008).