

BAB II

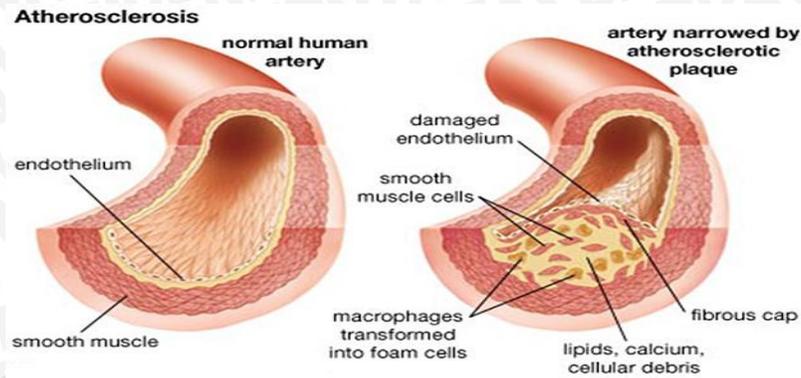
TINJAUAN PUSTAKA

Pada bab ini akan diuraikan mengenai aterosklerosis, faktor resiko, dan patofisiologi aterosklerosi sebagai awal mula penyakit kardiovaskuler. Pada bab ini juga akan dijelaskan tentang pengaruh H_2O_2 dan *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) dalam pathogenesis aterosklerosis, beserta hubungan keduanya. Pada akhir bab akan dijelaskan mengenai khasiat kulit manggis dalam menekan proses aterosklerosis melalui penurunan kadar H_2O_2 dan ekspresi VCAM-1.

2.1 Aterosklerosis

2.1.1 Definisi

Aterosklerosis merupakan gangguan pengerasan pembuluh darah karena plak. Pembentukan plak ini akan memperlambat bahkan menghentikan aliran darah, Ini berarti jaringan yang disuplai oleh arteri yang mengalami aterosklerosis akan kekurangan suplai. Hal ini akan menimbulkan nyeri atau penurunan fungsi. Kondisi ini dapat menyebabkan beberapa masalah serius. Berdasarkan tempat blokade, aterosklerosis dapat menyebabkan penyakit jantung koroner (sumbatan di jantung), stroke (sumbatan di arteri otak), dan penyakit arteri perifer yang dicirikan oleh nyeri kaki saat berjalan (Rosenblum, 2011). Ketiga penyakit yang disebutkan tadi merupakan manifestasi paling umum dari aterosklerosis.



Gambar 2.1 Perbandingan Pembuluh Darah Normal dan yang Mengalami Aterosklerosis (Merck, 2014)

2.1.2 Faktor Resiko Aterosklerosis

Terdapat beberapa faktor resiko yang memiliki kontribusi terhadap patogenesis dari aterosklerosis. Faktor-faktor tersebut secara umum dibagi dua, yaitu yang tidak dapat dimodifikasi dan faktor yang bisa dimodifikasi, adapun faktor resiko yang tidak dapat dimodifikasi adalah (Rosenblum, 2011):

- Memiliki ayah atau saudara laki-laki yang menderita komplikasi aterosklerosis sebelum umur 55
- Memiliki ibu atau saudara perempuan yang menderita komplikasi aterosklerosis sebelum umur 65
- Usia 45 tahun atau lebih bagi laki-laki dan 55 tahun atau lebih untuk wanita
- Jenis kelamin, laki-laki memiliki resiko lebih besar dibandingkan wanita

Selain faktor yang tidak bisa dimodifikasi, terdapat beberapa faktor lain resiko yang memiliki kontribusi terhadap patogenesis dari aterosklerosis. Faktor-faktor ini dikenal sebagai faktor yang bisa dimodifikasi. Faktor-faktor ini ada yang berpengaruh pada dislipidemia, respon inflamasi, maupun gangguan fungsi

pembuluh darah, yang ketiganya merupakan elemen penting dalam perkembangan aterosklerosis. Berikut adalah faktor-faktor resiko yang bisa dimodifikasi (Boamponsen,2011) :

a. Hiperkolesteremia

Kadar kolesterol *low density lipoprotein* (LDL) yang tinggi di darah merupakan salah satu sebab dari kelukaan arteri dan sel otot polos pembuluh darah. Defek pada gen yang mengkode reseptor LDL (*familial hypercholesterolemia*), abnormalitas pada mekanisme regulasi dari reseptor LDL dan diet tinggi lemak dapat berdampak pada hiperkolesterolemia yang nantinya memicu aterosklerosis. Hiperkolesterolemia dapat mengaktivasi respon inflamasi melalui ekspresi mekanisme rekrutmen leukosit. Mediator inflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), *Interleukin-1* (IL-1) dan *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF) meningkatkan ikatan LDL dengan endotel dan sel otot polos dengan cara meningkatkan ekspresi gen yang mengkode reseptor LDL. Dengan tingginya kadar LDL di endotel, leukosit mulai melekat ke endotel dan menyebabkan akumulasi lipid lebih lanjut dan berujung pada pembentukan sel busa. LDL yang teroksidasi memiliki beberapa efek terhadap dinding pembuluh darah, misalnya menghambat fungsi vasodilatasi endotelial, stimulasi produksi sitokin, dan stimulasi dari produksi *growth factor*.

b. Hemodinamik

Tempat khusus pada sistem arterial yang sangat rentan terhadap aterosklerosis adalah di bagian percabangan, lengkungan, dan percabangan, dimana aliran darah dapat terdistribusi karena peningkatan aliran turbulen.

Haemodynamic strain dan akumulasi lipid menyediakan lingkungan yang kondusif untuk inisiasi aterosklerosis. *Shear stress* yang rendah bila dipadukan dengan peningkatan *oscillatory shear stress* berdampak pada ekspresi molekul adesi. Pada tempat-tempat ini, produksi molekul adesi leukosit, *Intracellular Adhesion Molecules-1* (ICAM-1) dapat terstimulasi dan fungsi antiinflamasi dari aktivitas NO yang terhambat. Keadaan tersebut dapat menyebabkan sintesis sel otot polos dan menimbulkan respon inflamasi.

c. Hipertensi

Angiotensin II dianggap sebagai vasokonstriktor yang kuat dan memiliki peran dalam aterosklerosis dengan cara meningkatkan pertumbuhan sel otot polos. *Angiotensin II* memicu inflamasi dengan cara memfasilitasi aktivitas lipooksigenase otot polos, proses ini nanti akan menghasilkan LDL teroksidasi. *Angiotensin II* yang diproduksi pada kondisi hipertensi menimbulkan inflamasi pada lapisan intima pembuluh darah dan menyebabkan endotel dan sel otot polos pembuluh darah memproduksi *superoxide anion*. Radikal bebas yang muncul dalam plasma karena reaksi hipertensi menekan sintesis NO dan meningkatkan adesi leukosit. *Angiotensin II* juga berhubungan dengan peningkatan ekspresi IL-6 dan *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) yang merupakan aktivator inflamasi.

d. Diabetes

Lipoprotein dapat mengalami glikasi pada kondisi hiperglikemia kronis yang umumnya dijumpai pada penderita diabetes. Lipoprotein yang terglykasi ini berperan dalam aksi proinflamasi sitokin pada endotel arterial. Resistensi insulin

pada pasien diabetes mellitus tipe 2 menyebabkan dislipidemia, suatu keadaan dimana kadar HDL menurun sedangkan kadar *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) dan LDL meningkat. Glyco-oxidation, produksi radikal bebas, dan penurunan aktivitas antioksidan dapat dijumpai pada pasien diabetes. Faktor-faktor tadi akan memicu oksidasi lipoprotein yang merupakan tahap penting dalam aterosklerosis.

e. Obesitas

Saat kadar lemak visceral tinggi, maka akan ada lebih banyak asam lemak bebas yang akan dihasilkan, yang akan berujung pada peningkatan kadar VLDL, yang akan menyebabkan aterosklerosis di kemudian hari. Sintesis TNF- α and IL-6 oleh jaringan adiposa memiliki peran pada respon inflamasi dalam proses atherogenesis juga ditemui pada individu obesitas.



Gambar 2.2 Gambaran Plak Aterosklerotik pada Aorta (Anonymous, 2014)

f. Merokok

Nikotin dan karbon monoksida yang terkandung dalam rokok memiliki efek yang merusak terhadap arteri dengan cara memicu pembentukan plak pada arteri. Merokok berdampak pada kadar *circulating non esterified fatty acids* yang akan menimbulkan respon inflamasi. Radikal bebas yang dihasilkan rokok akan memicu stress oksidatif dan meningkatkan oksidasi LDL, proses yang akan meningkatkan rekrutmen monosit dan seterusnya yang merupakan proses aterogenesis. Boamponen et al. juga menerangkan bahwa toksin pada tembakau dapat menurunkan kadar HDL dan meningkatkan kadar LDL.

g. Homosistein

Homosistein memiliki sifat protrombotik yang dapat menghambat aktivitas NO dan meningkatkan sintesis kolagen. Aterosklerosis yang parah dapat dijumpai pada pasien dengan defek pada satu atau dua enzim yang penting dalam metabolisme homosistein yaitu *cystathionine beta-synthase* dan *methylenetetra-hydrofolate*. Kebanyakan dari pasien tersebut menderita infark miokardium pada usia 20 tahun yang merupakan manifestasi yang nampak akibat aterosklerosis.

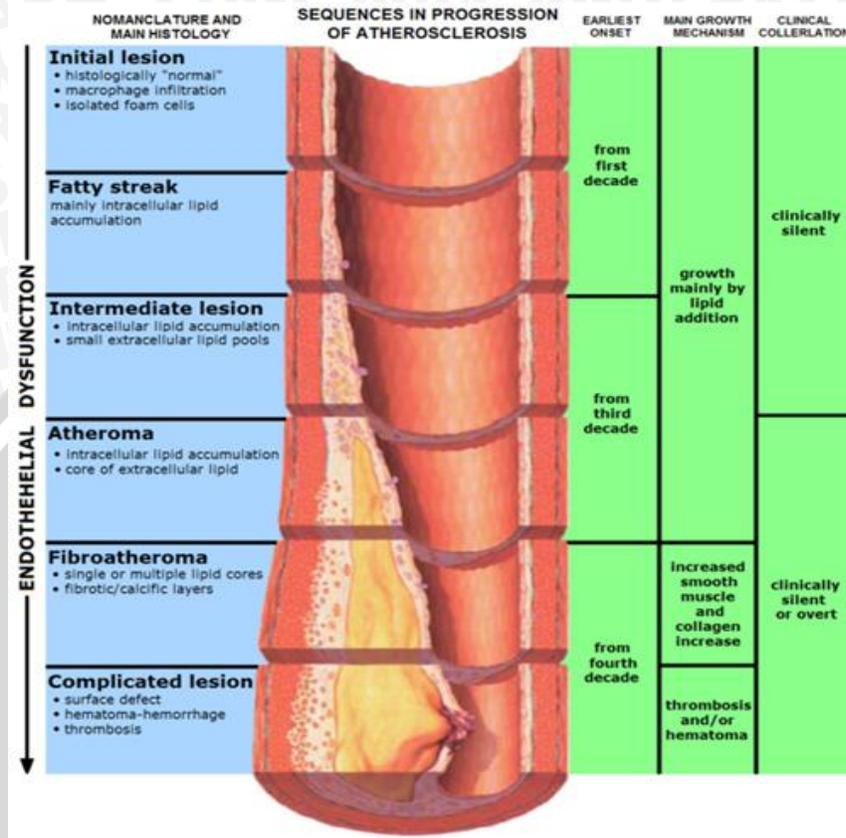
h. Infeksi

Beberapa infeksi kronis yang terjadi di luar sistem pembuluh darah seperti gingivitis, prostatitis, atau bronkitis dan infeksi interseluler meningkatkan sintesis sitokin dan mengaktivasi inflamasi yang juga memiliki peran pada perkembangan

lesi aterosklerotik. Herpesvirus, cytomegalovirus, atau infeksi *Chlamydia pneumoniae* berperan dalam inflamasi aterosklerosis yang dapat diamati pada plak aterosklerotik. Beberapa plak aterosklerotik yang diisolasi dari manusia ternyata terinfeksi *Chlamydia pneumoniae*. Mikroorganisme mensintesis toksin lipopolisakarida (LPS) dan *heat shock proteins* yang menyebabkan endotel dan sel otot polos untuk melepaskan mediator proinflamasi.

2.1.3 Patofisiologi Aterosklerosis

Arteri terdiri dari lapisan luar (*adventia*), *tunica media* (lapisan multipel dari sel otot polos) dan lapisan dalam (*tunica intima*) yang dilapisi endotel. Saat tercapai keseimbangan NO, sebagai molekul vasodilator dan *endothelin-1* sebagai molekul vasokonstriktor di arteri, endotel akan terlindung dari luka, inflamasi, dan trombosis. Normalnya, leukosit tidak terikat pada endotel, sel otot polos tidak berproliferasi, dan agregasi platelet juga terbatas (Boamponsen et al., 2011). Endotel mengatur tonus vaskuler melalui zat vasodilator dan vasokonstriktor yang mempengaruhi aktivitas otot polos vaskuler. Zat vasodilator yang penting adalah NO yang diproduksi dari asam amino *L-arginine* oleh *endotelial nitric oxide sintease* (eNOS). Selain menyebabkan vasodilatasi, NO juga menghambat oksidasi LDL, mengurangi ekspresi *leucocyte adhesion molecule* (LAM) endotel, menghambat proliferasi sel otot polos, produksi endotelin dan agregasi platelet. Dengan demikian pengurangan ketersediaan NO akan menyebabkan permulaan dan progresi proses aterosklerosis.



Gambar 2.3 Gambaran Proses Aterosklerosis (Hsu, 2014)

Saat tubuh berada dalam faktor resiko aterosklerosis, mekanisme-mekanisme diatas akan mengalami gangguan, dimulai dari inhibisi produksi NO (Boamponsen et al., 2011). Dengan adanya faktor-faktor sistemik lain misalnya dislipidemia, hipertensi, merokok, hiperglikemi akan menyebabkan kaskade aterosklerosis. Hipotesis ini menyatakan bahwa kerusakan sel endotel merupakan awal terjadinya aterosklerosis. Saat ini diketahui bahwa bukan denudasi endotel melainkan disfungsi endotel yang merupakan salah satu manifestasi dini aterosklerosis.

Telah diketahui bahwa aterosklerosis menyumbat pembuluh darah arteri karena pembentukan plak. Plak aterosklerotik tersebut terdiri dari 3 komponen utama. Komponen pertama kebanyakan tersusun dari sel otot polos dan makrofag. Komponen kedua adalah matriks jaringan ikat dan lipid ekstraseluler. Komponen ketiga adalah lipid yang terakumulasi dalam makrofag atau disebut sel busa. Perkembangan dari lesi ini adalah hasil dari stimulus inflamasi, pelepasan sitokin, proliferasi sel otot polos, sintesis matriks jaringan, serta akumulasi makrofag dan lipid (Crowther,2005). Lengkapnya patofisiologi dari aterosklerosis adalah sebagai berikut:

a. Inisiasi

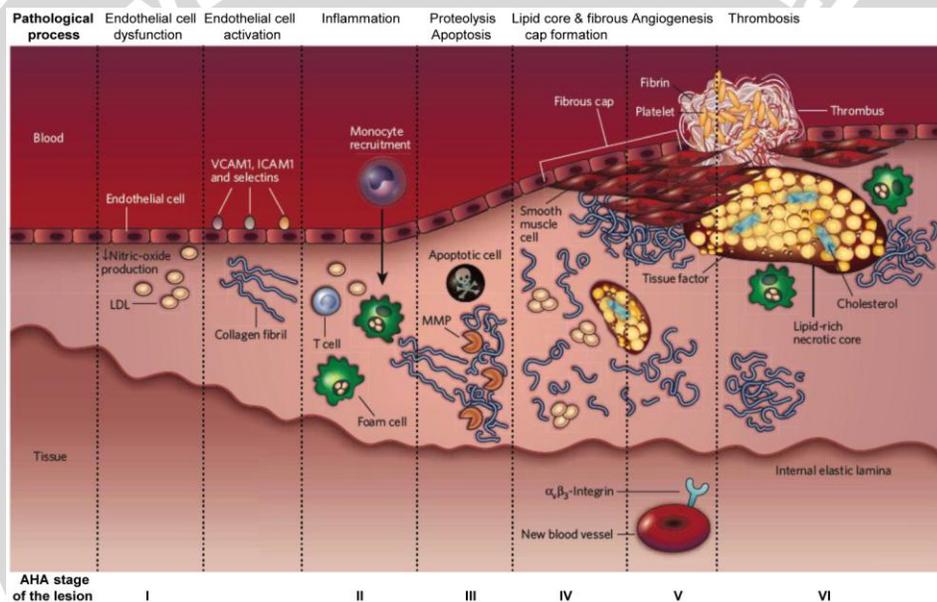
Mekanisme regulasi reseptor LDL terhenti saat kebutuhan kolesterol sel sudah tercukupi untuk metabolismenya. Mekanisme penghentian ini tidak terjadi pada *intake* lemak berlebih, misalnya saat kita mengonsumsi diet tinggi lemak atau karena gangguan mekanisme kontrol reseptor LDL atau kelainan genetik reseptor LDL. LDL berkumpul di proteoglikan dari endotelium dan saling berikatan untuk membentuk agregat. Saat berikatan dengan proteoglikan, LDL menjadi sangat cenderung untuk teroksidasi dan termodifikasi secara kimiawi.. Mula-mula LDL akan dioksidasi menjadi *minimally modified* LDL (MM-LDL), yang kemudian merangsang sel vaskuler lokal untuk menghasilkan kemokin MCP-1. MCP-1 yang terbetuk akan merekrut monosit, sitokin IL-6, IL-8 dan molekul adesi seperti VCAM-1 yang menyebabkan adesi monosit dan limfosit. Ekspresi VCAM-1 naik saat plak atheroma mulai terbentuk. Beberapa penelitian yang menggunakan tikus dan kelinci menunjukkan konsentrasi VCAM-1

meningkat sebelum rekrutmen leukosit. MCP-1 juga menyebabkan rekrutmen dan proliferasi sel otot polos (Crowther, 2005). Monosit akan berubah menjadi makrofag oleh pengaruh M-CSF yang disekresi sel endotel dan sel otot polos. Monosit dan makrofag lebih lanjut merangsang peroksidasi LDL untuk membentuk LDL teroksidasi/*oxidized LDL* (OxLDL). OxLDL akan merangsang pembentukan *leucocyte adhesion molecule* (LAM), kemokin, faktor pertumbuhan, proliferasi otot polos, menghambat vasodilatasi dan merangsang produksi radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS).

b. Pembentukan sel busa

OxLDL bersifat kemoatraktif untuk monosit dan sel otot polos. Monosit akan menempel dan migrasi ke subendotel kemudian berubah menjadi makrofag yang memfagosit OxLDL dan menjadi sel busa (*foam cell*) atau *lipid-laden macrophages*, proses ini dimediasi oleh M-CSF yang berperan dalam konversi monosit menjadi makrofag. M-CSF memfasilitasi ekspresi dari *scavenger receptor-A family* yang mengikat OxLDL untuk kemudian membentuk sel busa. Ikatan makrofag tersebut dengan OxLDL menjadikan makrofag tadi menjadi lebih statis, yang nantinya akan meningkatkan akumulasi *lipid-laden macrophages* di tunika intima. Sel busa tersebut melakukan aktivitas metabolismenya dan menskresikan mediator inflamasi dan beragam. Aktivitas tersebut termasuk rekrutmen dan proliferasi dari sel otot polos, oksidasi LDL lebih lanjut, rekrutmen monosit atau sel busa lebih lanjut dan meningkatkan kerusakan fungsi endotel (Crowther, 2005).

Disamping itu, M-CSF mampu merangsang produksi sitokin interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , *lymphotoxin*, kemokin, eikosanoid, dan faktor agregasi platelet. Lingkungan fagositik ini memiliki hubungan dengan meningkatnya meningkatnya produksi ROS seperti *superoxide anion*. Ketika produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan seseorang, stress oksidatif yang diakibatkannya akan memicu kerusakan molekul atau sel arteri (Boamponsen, 2011).



Gambar 2.4 Komponen dalam Proses Aterogenesis (Orbay et al., 2013)

c. Pembentukan plak ateroma

Sel busa yang nantinya akan membentuk *fatty streak* dengan migrasi dan proliferasi lanjut dari sel otot polos. Saat ini terjadi, *intermediate lesion* terbentuk diikuti dengan penebalan dan dilatasi dari dinding arteri. Matriks ekstraseluler juga berakumulasi dan akumulasi tersebut memicu remodelling positif atau pembesaran kompensatif untuk mengakomodasi pertumbuhan arteri

(Boamponsen, 2011). Mediator inflamasi yang dihasilkan sel otot polos pada plak aterosklerosis, antara lain IL-1 β , TNF- α , IL-6, M-CSF, MCP-1, IL-18 dan CD-40L. Efek dari mediator-mediator tadi beragam termasuk mitogenesis, proliferasi matriks intraseluler, angiogenesis, dan perkembangan sel busa (Crowther, 2005). Evolusi dari plak aterosklerotik dicirikan dengan pembesarannya yang gradual dari waktu ke waktu karena akumulasi sel busa. Plak yang tumbuh perlahan mengakumulasi lipid dalam sel busa.

Apabila terdapat akumulasi lipid ekstraseluler maka stadium *fatty streak* telah dilampaui. Lipid ekstraseluler dapat berasal dari luar atau dapat berasal dari sel busa yang mati. Akumulasi lipid ini akan menjadi inti lipid (*lipid core*) yang akan diselubungi kapsul fibrosa yang terdiri dari sel otot polos dan matriks ekstraseluler yang terdiri dari jaringan ikat yang dihasilkan otot polos. Proses tadi juga dibantu oleh leukosit yang teraktivasi bersama dengan sel arterial membentuk mediator fibrogenik dan *growth factor* yang meningkatkan pembelahan sel otot polos dan selanjutnya pembentukan dari matriks ekstraseluler yang padat. Progresi plak aterosklerosis tidak hanya tergantung akumulasi lipid tetapi juga oleh jumlah jaringan ikat yang disekresi sel otot polos dan jumlah sel otot polos sendiri sehingga plak ini merupakan suatu struktur yang heterogen (Crowther, 2005; Boamponsen, 2011).

d. Penipisan dan rupturnya kapsul fibrosa

Plak stabil mempunyai kapsul yang tebal dan inti lipid yang kecil, sedangkan plak yang tidak stabil mempunyai inti lipid besar dengan kapsula yang tipis. Pada aterosklerosis tahap lanjut, makrofag yang teraktivasi

mengurangi stabilitas kapsul fibrosa dengan cara memproduksi enzim-enzim proteolitik yang memecah konstituen kolagen kapsul. Respon inflamasi diperkuat oleh interaksi CD40/CD40L dengan sel T teraktivasi dan makrofag, aktivitas ini memicu produksi *tissue factor* (TF), *matrix metalloproteases* (MMP) dan sitokin proinflamasi. MMP adalah prortease yang memecah gelatin dan komponen kolagen tipe IV membrana basalis yang menyebabkan degradasi matrik ekstraseluler (kapsul plak) sehingga terjadi fisura dan ruptur. Seiring dengan keberadaan oxLDL, ROS, TFN- α dan IL-1, MMP dilepaskan dari sel busa dan sel otot polos, aktivitas proteolitiknya menyebabkan plak aterosklerotik melemah dan menjadi kurang stabil (Boamponsen, 2011).

Melemahnya fibrous cap membuatnya rentan terhadap stress hemodinamik. Stress tersebut menyebabkan gangguan pada plak aterosklerotik yang memicu trombosis dan mungkin juga infark miokard akut. Stimulus Protrombotik muncul saat plak ruptur. Komponen lipid yang tercecer menyebabkan respon inflamasi lebih lanjut. Pembentukan trombin dipercepat seiring dengan kontak TF, faktor *von Willebrand* dan kolagen subendotelial dengan komponen darah. Hasil dari mekanisme tersebut adalah platelet menjadi teraktivasi dan berkumpul untuk membentuk agregat. Keadaan inilah dimana penyakit kardiovaskular mulai terlihat secara bermakna (Boamponsen, 2011).

2.2 Stress Oksidatif dalam Aterosklerosis

Radikal bebas terbentuk pada banyak transformasi patologis maupun metabolik yang merupakan mekanisme pertahanan tubuh terhadap invasi biologis

dan kimiawi juga terhadap gangguan integritas jaringan (karena trauma, jejas selular, dan lain-lain). Keseimbangan antara pembentukan dan eliminasi radikal bebas menentukan stabilitas individu. Rantai reaksi radikal bebas dalam tubuh kebanyakan diinisiasi oleh ROS atau *Reactive Nitrogen Species* (RNS) yang memiliki atom oksigen atau nitrogen yang tidak berpasangan. Radikal bebas dan senyawa oksigen/nitrogen reaktif diantaranya hidroksil (OH \cdot), superoksida (O $_2^-$), nitrik oksida (NO \cdot), nitrogen dioksida (NO $_2$) dan peroksill (ROO \cdot). Peroksinitrit (OONO \cdot), asam hipoklorus (HOCl), hidrogen peroksida (H $_2$ O $_2$), singlet oksigen (1 O $_2$), ozon (O $_3$), asam nitrous (HNO $_2$) dan dinitrogen trioksida (N $_2$ O $_3$) bukanlah radikal bebas, namun dapat dengan mudah mengalami reaksi radikal bebas (Bahorun, 2006). Saat jumlah radikal bebas yang terbentuk melebihi sinyalisasi redoks normal individu. Stress oksidatif akan muncul. Stress oksidatif tadi akan memicu kerusakan oksidatif pada sel, bahkan kematian sel. Radikal bebas menginduksi kerusakan sel melalui perubahan aktivitas lipid, protein, DNA, dan karbohidrat (Malhotra, 2008).

Menurut teori stress oksidatif, aterosklerosis adalah hasil dari modifikasi oksidatif dari LDL pada dinding arteri oleh ROS. Beberapa bukti menunjukkan adalah faktor resiko untuk aterosklerosis pada umumnya meningkatkan resiko produksi ROS bebas, tidak hanya dari sel endotel, tapi juga dari sel otot polos dan sel adventitial. Oleh sebab itu, DM, hipertensi arteri, merokok, usia, dan hiperkolesterolemia dapat meningkatkan produksi ROS. Perlu dicatat, beberapa proses dapat dipicu oleh faktor resiko tadi, termasuk ekspresi molekul adesi, proliferasi dan migrasi sel otot polos, apoptosis sel endotel, oksidasi lipid, aktivasi metalloproteinase dan gangguan aktivitas vasomotor. Fungsi endotel memburuk

pada tahap awal aterogenesis dan secara kuat berhubungan dengan beberapa faktor resiko yang sudah disebutkan di atas dan produksi ROS sendiri diyakini mampu menginduksi disfungsi endotel. Stress oksidatif memicu oksidasi LDL menjadi ox-LDL, dimana bentuk ini lebih mudah diserap makrofag dibanding LDL tak teroksidasi. Telah dibuktikan bahwa sumber utama dari substansi oksidatif dan ROS pada pembuluh darah aterosklerotik adalah makrofag dan sel otot polos. Hiperkolesterolemia menstimulasi produksi radikal anion superoksida (O_2^-) sebagai progenitor ROS dari sel otot polos pembuluh darah. Meningkatnya produksi ROS dapat mengurangi produksi dan pada akhir bioavailabilitas NO, memicu vasokonstriksi, agregasi platelet, dan adesi neutrofil ke endotel

2.2.1 Hiperlipidemia sebagai Sumber Oksidan

Telah dilakukan banyak penelitian mengenai mekanisme diet tinggi lemak dan peningkatan senyawa oksidan. Dalam penelitian yang dilakukan Amin et al. pada 2011 yang juga memapar hewan cobanya, yaitu tikus wistar dengan diet tinggi lemak selama 3 bulan, menunjukkan bahwa terdapat pertumbuhan berat badan yang signifikan disusul dengan peningkatan jaringan adiposa abdominal pada kelompok tikus yang dipapar diet tinggi lemak dibandingkan dengan kelompok tikus yang diberi diet standar. Pada penelitian yang sama selain mengamati perbedaan diatas, juga mengamati perbedaan profil lemak, diantaranya kadar kolesterol total, trigliserida, dan LDL, dimana terjadi peningkatan yang signifikan pada ketiganya di kelompok tikus yang dipapar diet tinggi lemak dibanding kelompok yang diberi diet standar. Sensitivitas CRP dan biomarker lain dari stress oksidatif lebih tinggi pada

individu dengan obesitas dan berhubungan langsung dari BMI, presentasi lemak tubuh, oksidasi LDL, dan kadar trigliserida (Fernández-Sánchez et al., 2011). Naiknya biomarker stress oksidatif ini adalah tanda naiknya kadar ROS dalam tubuh.

Berdasarkan Rindler et al., 2012, beberapa mekanisme produksi radikal bebas telah diimplikasikan dengan obesitas, termasuk pelepasan adipokin proinflamasi, meningkatnya aktivitas NADPH oxidase, dan peningkatan H_2O_2 dari mitokondria. Selain itu, berdasarkan Holguin dan Fitzpatrick, 2009 peningkatan jaringan adiposa juga secara signifikan berhubungan dengan biomarker stress oksidatif. Pertumbuhan jaringan adiposa berhubungan dengan penurunan aktivitas enzim antioksidan seperti SOD, *catalase*, and *glutathione peroxidase* (GPx). Sebab lain yang menghubungkan jaringan adipose dengan produksi ROS adalah karena adiposit merupakan sumber dari sitokin-sitokin proinflamasi antara lain TNF- α , IL-1, and IL-6, sementara sitokin-sitokin tersebut adalah stimulator poten terhadap produksi ROS dan NO oleh makrofag dan monosit. *Catalase* sendiri adalah enzim yang memecah H_2O_2 (Fernández-Sánchez et al., 2011). Berdasarkan uraian di atas, dapat dikatakan bahwa untuk melihat hubungan antara diet tinggi lemak dan produksi ROS, kita perlu mempertimbangkan parameter lain, misalnya pertumbuhan jaringan lemak, atau profil lipid.

2.2.2 Peran H_2O_2 dalam Aterosklerosis

H_2O_2 sebagai senyawa oksidan yang non radikal memiliki peran dalam berbagai reaksi di dalam tubuh. Karena kemudahannya dalam berdifusi H_2O_2

mampu mengaktifkan sinyal kaskade untuk memediasi perubahan fungsi vaskuler, antara lain pertumbuhan berlebihan dari endotel, angiogenesis, proliferasi dan hipertropi sel otot polos, apoptosis sel endotelial, induksi protein inflamasi, interaksi endotel-leukosit, pembaharuan endotel, disfungsi sawar endotel dan reorganisasi sitoskeleton (Cai, 2005). Selain itu, karena sifat oksidannya yang kuat, H_2O_2 yang dihasilkan oleh sel-sel fagosit dimanfaatkan tubuh sebagai pertahanan terhadap sel bakteri maupun sel kanker yang tidak mampu dihancurkan oleh enzim lisosom (Guyton dan Hall, 2006). H_2O_2 dihasilkan oleh enzim-enzim pada membran fagosom ataupun oleh organela spesial bernama peroksisom (Guyton dan Hall, 2006). H_2O_2 ini mampu dihasilkan oleh banyak sistem enzim yang banyak terdapat di dinding pembuluh darah diantaranya enzim NADPH oksidase, mitokondria, xantin oksidase, dan eNOS (Schulz et al, 2004; Veal, 2007). Pada kondisi yang fisiologis, produksi H_2O_2 dikendalikan oleh enzim CAT atau glutathion peroksidase (GPx) menjadi air H_2O dan O_2 (Murray et al, 2003; Held, 2010).

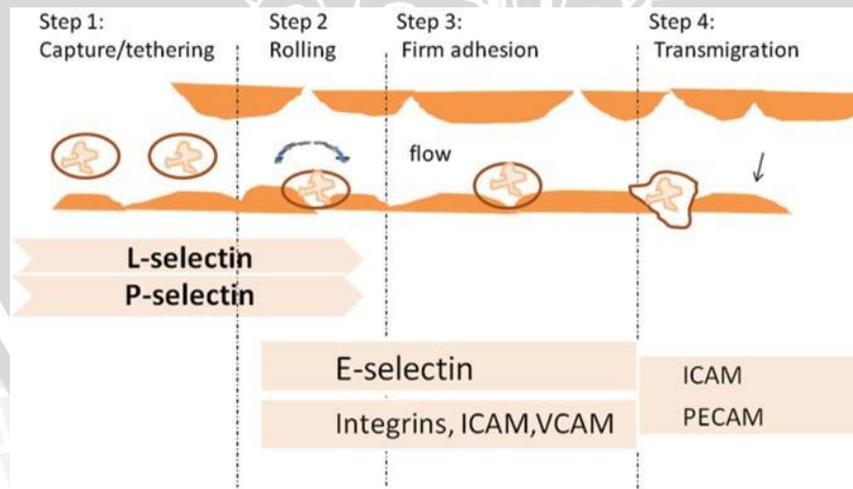
Namun, pada kadar yang lebih tinggi atau pada keadaan patologis, H_2O_2 memiliki peran dalam aktivasi gen inflamasi termasuk translokasi *Nuclear Factor-kappa Beta* (NF-kB) ke nukleus. Peningkatan kadar H_2O_2 dan sinyalisasi inflamasi tersebut disamping berdampak pada aktivasi platelet dan peningkatan rekrutmen leukosit. Pada dasarnya, H_2O_2 tidak bersifat radikal, namun bila bereaksi dengan Fe^{2+} , H_2O_2 dapat membentuk OH^+ dan OH^- . Ion hidroksil merupakan radikal bebas yang kuat, dapat merusak protein, karbohidrat, DNA, dan molekul lain dalam tubuh. Reaksi ini dikenal dengan sebutan reaksi Fenton (Murray et al, 2003; Bahorun, 2006). Produksi OH^- yang meningkat ini menimbulkan keadaan stres oksidatif.

Dalam patofisiologi aterosklerosis, makrofag yang memfagosit ox-LDL juga memproduksi SOD. SOD berperan sebagai dismutasi spontan terhadap O_2^- pada pH netral akan tetapi, juga menghasilkan H_2O_2 sehingga kadar H_2O_2 meningkat (Wicaksono et al., 2010). Proses inilah yang menjadi sumber H_2O_2 yang kemudian diubah menjadi OH^- melalui reaksi Fenton, OH^- ini akan bereaksi dengan LDL yang terperangkap di dalam lapisan intima, proses auto oksidasi ini disebut peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid mengubah LDL menjadi LDL teroksidasi (Ox-LDL) sebagai komponen penting dalam aterosklerosis (Murray et al, 2003; Navab, 2004). OxLDL yang terbentuk merangsang produksi radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang diperkirakan berfungsi sebagai *second messenger* dari lipid yang teroksidasi dan memicu ekspresi berbagai sitokin dan mediator inflamasi lainnya yang menyebabkan cedera sel endotel, penarikan sel-sel inflamasi ke dalam intima arteri, dan memicu proliferasi otot polos pembuluh darah (Crowther,2005; Hong Yang et al, 2004).

2.3 Peran VCAM-1 dalam Aterosklerosis

Leukosit merupakan komponen penting dalam aterosgenesis. Perlekatan leukosit hingga dapat terakumulasi dalam dinding pembuluh darah dimediasi oleh molekul adesi, diantaranya VCAM-1. Saat peristiwa pengikatan leukosit, molekul adesi mengaktivasi transduksi sinyal sel endotel yang kemudian mengubah bentuk sel endotel untuk membuka jalan hingga akhirnya leukosit bisa bermigrasi. Adapun pergerakan leukosit tersebut distimulasi oleh kemokin yang diproduksi endotel. Kebanyakan leukosit bermigrasi melalui celah antar sel, namun pada kondisi

inflamasi yang tinggi, sebagian kecil leukosit dapat juga bermigrasi melalui sel endotel dengan cara migrasi transeluler. Sinyal VCAM-1 memediasi perubahan struktur aktin sel endotel. Pada tempat ikatan VCAM-1, aktin sel endotel bergabung pada permukaan sel endotel, membentuk suatu struktur seperti cangkir pada jajaran sel endotel dan sel endotel primer yang diaktivasi sitokin. Proses perubahan struktur aktin ini dibantu oleh NADPH oksidase sel endotel. ROS yang terbentuk kemudian juga menginduksi pembentukan celah antar sel dan hilangnya b-catenin pada celah dalam sel endotel vena umbilikalis manusia. Pada beberapa penyakit inflamasi, proses inflamasi dapat diblok dengan cara menghambat ikatan leukosit dengan VCAM-1 atau dengan cara menghambat transduksi sinyal VCAM-1, berdasarkan pemahaman akan peran ROS terhadap ekspresi VCAM-1, maka kedua mekanisme pengikatan leukosit tersebut dapat diblok oleh antioksidan (Cook-Mills et al., 2011).



Gambar 2. 5 Peran Molekul Adesi dalam Aterosklerosis (Fotis et al., 2012)

Pada tikus Apo E -/- usia 20 minggu, VCAM-1 terlokalisasi pada daerah bahu lesi dari lesi tahap lanjut dibandingkan bagian puncak lesi. Observasi ini dikaitkan

dengan akumulasi sel busa pada daerah bahu dari lesi transisional aterosklerosis, temuan ini menunjukkan bahwa bagian bahu ini adalah tempat rekrutmen monosit dan pelebaran lesi terjadi. Dengan ini, VCAM-1 memiliki peran tidak hanya pada pembentukan lesi, namun juga pada perluasannya. Ekspresi VCAM-1 juga didapati pada pembuluh darah normal dimana terdapat sel endotel yang sedang beregenerasi dan juga pada percabangan arteri dimana banyak terjadi turbulensi aliran darah (Nakashima et al., 1998). Keterkaitan VCAM-1 dan kerusakan endotel inilah mengapa VCAM-1 juga dikenal sebagai indikasi adanya hiperaktivitas sel endotel atau merupakan hasil dari kerusakan endotel. Bersama dengan endothelin, faktor *von Willebrand*, dan penanda lainnya, peningkatan dari molekul adesi dapat menjadi prediksi dari resiko, keberadaan, dan tingkat keparahan dari penyakit pembuluh darah aterosklerotik pada seseorang (Poredos, 2011).

2.4 Metode pengukuran H₂O₂ dan VCAM-1

2.4.1 Metode pengukuran H₂O₂

Hingga sekarang telah ditemukan berbagai cara mengukur H₂O₂, mulai dari cara tradisional seperti titrasi dan spektrofotometri, atau yang lebih rumit seperti kromatografi, fluoresensi, analisis elektrokimia, dan analisis enzimatik (Zhang et al., 2013). Namun yang akan diuraikan pada subbab ini adalah metode fluorogenik dan kolorimetri yang menggunakan *Hidrogen Peroxide Assay Kit* yang digunakan dalam penelitian ini

Terdapat beberapa substrat fluorogeik, yang berperan sebagai donor hidrogen yang telah digunakan bersama-sama dengan enzim *horseradish*

peroxidase (HRP) untuk memproduksi produk *fluorescent* yang beragam, Produk *fluorescent* yang paling sering digunakan adalah *diacetyldichloro-fluorescein*, *homovanillic acid* and *Amplex® Red*. Sebagai salah satu contoh kerja adalah *Amplex Red* dioksidasi oleh H_2O_2 , dibantu dengan HRP, lalu kemudian menjadi resofurin. Resofurin ini kemudian dapat dideteksi dengan metode fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 570 nm dan panjang gelombang emisi 585 nm. Contoh lain adalah *Homovannilic acid* yang menjadi senyawa dimer saat dioksidasi oleh H_2O_2 melalui katalisis yang dimediasi oleh HRP, yang memiliki panjang gelombang eksitasi 315 nm dan panjang gelombang emisi 425 nm. Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan saat memilih menggunakan substrat yang dikatalisis oleh HRP untuk mengkuantifikasi H_2O_2 . Misalnya, aktivitas katalase endogen dapat mengurangi jumlah H_2O_2 yang akan diukur. Komponen seluler juga dapat mempengaruhi sinyal fluoresensi bergantung pada panjang gelombang eksitasi dan emisinya (Held, 2010).

Beberapa substrat kolorimetrik seperti *tetramethylbenzidine* (TMB) dan *red phenol* bersama-sama dengan HRP digunakan untuk mengukur konsentrasi H_2O_2 . Metode lain berasal dari prinsip oksidasi 2'-7' *dichlorofluorescein* (H2DCF) menjadi 2'-7' *dichlorofluorescein* (DCF), digunakan untuk mengkuantifikasi H_2O_2 . Jika dijabarkan dari awal, bermula dari bentuknya dalam senyawa diasetat, H2DCFDA dan *acetomethyl ester*-nya, H2DCFDA-AM masuk ke dalam sel, dimana esterase endogen akan memotong gugus lipofiliknya, menjadi senyawa bermuatan yang akan terperangkap dalam sel, yang nantinya akan dikonversi H_2O_2 menjadi DCF yang dijelaskan sebelumnya, senyawa ini dapat diukur dengan metode fluoresensi pada

panjang gelombang eksitasi 498nm dan panjang gelombang emisi 522 nm, Pada awalnya DCF dianggap spesifik terhadap H₂O₂, namun penemuan terbaru menunjukkan bahwa ROS lain, seperti nitrat dan senyawa hipoklorik dapat mengoksidasi H₂DCF. Ditambah lagi, baru diketahui bahwa oksidasi H₂DCF oleh H₂O₂ membutuhkan senyawa *ferrous iron*. Selain itu, saat H₂DCF tidak lagi bersifat ionic, H₂DCF tersebut dapat bebas keluar sel dan terakumulasi pada media, dimana senyawa tersebut dapat bereaksi dengan oksidan. Karena kekurangan-kekurangan tersebut, ditemukan pemeriksaan fluoresensi dengan cara lain, yaitu dengan *Peroxy Green 1* (PG1) and *Peroxy Crimson 1* (PC1), dimana pemeriksaan ini memiliki selektivitas yang tinggi, permeabilitas membrane yang tinggi, dan panjang gelombang eksitasi dan emisi yang lebih jelas. Saat bereaksi dengan H₂O₂, menghasilkan fluoresensi 10 kali lipat dengan PG1 dan 40 kali lipat dengan PC1. PG1 memiliki panjang gelombang eksitasi 460 nm dan panjang gelombang emisi 510 nm sedangkan PC1 memiliki panjang gelombang eksitasi 480 nm dan panjang gelombang emisi 584 nm (Held 2010).

Calcein-acetoxymethylester (Calcein-AM) dapat juga digunakan untuk mendeteksi aktivitas oksidatif intraseluler. Calcein-AM adalah senyawa fluorogenik permeable yang diubah oleh esterase endogen menjadi calcein yang *fluorescent*. Dulunya, calcein intraseluler digunakan sebagai indikator viabilitas sel (Held, 2010).

Metode kolorimetrik kurang sensitive dibanding deteksi fluoresensi, namun biaya instrumennya jauh lebih rendah daripada yang digunakan dalam metode fluoresensi. Pada penelitian ini juga digunakan metode kolorimetri. Pengukuran kolorimetri untuk mengukur kadar H₂O₂ pada penelitian ini menggunakan perangkat

dan protokol dari *Hidrogen Peroxide Assay Kit* (Abcam, 2012). Metode ini memiliki sensitivitas yang bagus, dan lebih sederhana. Prinsipnya adalah dengan adanya Horse Radish Peroxidase (HRP), OxiRed Probe akan bereaksi dengan H_2O_2 dan memproduksi produk yang berwarna dengan panjang gelombang maksimal 570 nm dan fluoresensi merah dengan panjang gelombang eksitasi 535 nm dan panjang gelombang emisi 587 nm. Kit ini mampu memperagakan hingga 200 reaksi dengan metode fluorometrik dan 100 reaksi dengan metode kolorimetrik. Batasan deteksinya mencapai konsentrasi 40 nM untuk H_2O_2 pada pengukuran fluorometrik. Kit ini terdiri atas 25 mL H_2O_2 assay buffer, 200 uL OxiRed Probe Red, 1 vial HRP, dan 100 ul H_2O_2 Standard (0.88M). Langkah pertama adalah menyiapkan sampel, yaitu:

- a. Menyiapkan supernatant kultur sel, serum, plasma, urin, dan cairan biologis lainnya (mengandung 0.8-6 uM H_2O_2).
- b. Disentrifugasi selama 15 menit pada 100 x g dalam 30 menit pengumpulan. Pisahkan particulate pellet.
- c. Sampel, terutama yang semacam media kultur, tissue lysate, atau plasma harus disaring pada 10 kDa MW *spin filter* untuk menghilangkan semua protein lalu disimpan pada suhu $-80^\circ C$.
- d. Sebisa mungkin semua sampel untuk segera diperiksa dan disimpan pada suhu $-80^\circ C$.
- e. Tambahkan 2-50 uL sampel pada tiap well,

Untuk pengukuran dengan metode kolorimetri langkah berikutnya, yaitu persiapan *standard curvenya* adalah :

- a. Larutkan 10 uL H_2O_2 standard 0.88 M ke dalam 870 uL H_2O_2 hingga menjadi 10mM H_2O_2 standard, lalu larutkan 10 uL H_2O_2 10mM standard dalam 990 uL dH₂O hingga menjadi 0.1 mM H_2O_2 standard.
- b. Tambahkan 0, 10, 20, 30, 40, 50 uL dari 0.1 mM H_2O_2 standar tersebut ke dalam 96-well late hingga terbentuk 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 nmol/well H_2O_2 standar. Dilakukan secara berulang hingga well-plate penuh

Langkah berikutnya adalah mencampurkan untuk setiap pengukurannya. Pada tiap well disiapkan 50 uL yang terdiri dari campuran 46 uL Assay Buffer, 2 uL OxiRed Probe, 2 uL HRP. Tambahkan campuran tersebut pada tiap sampel dan H_2O_2 standard. Campurkan hingga merata. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang hingga 10 menit. Langkah terakhir adalah analisis data.

2.4.2 Metode Pengukuran VCAM-1

Yang akan dibahas ada subbab ini adalah metode imunohistokimia dan imunofluoresens. Imunohistokimia mengkombinasikan teknik histology, imunologi, dan biokimia untuk mengidentifikasi komponen spesifik jaringan melalui reaksi antigen antibodi dengan label yang terlihat. Teknik ini menggunakan antibodi pada sel lokal spesifik dan antigen jaringan. Oleh karena banyaknya antigen target merupakan struktur protein yang dapat berubah pada konstitusi dan konformasinya, sehingga perlu difiksasi. Antibodi yang terdilusi pada buffer bersifat bebas selama periode inkubasi. Hasil dari reaksi antigen antibodi tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, konsentrasi, konstitusi buffer, dan temperature. pH merupakan faktor yang paling penting berperan karena titik isoelektris IgG yang digunakan berkisar 6.5 sampai 8.5 (Montero, 2003).

Formaldehid merupakan larutan fiksatif yang banyak digunakan untuk memfiksasi jaringan. Formalin buffer 10% banyak digunakan untuk memfiksasi jaringan pada pewarnaan imunohistokimia. Keuntungan larutan ini adalah cepat melakukan enetrasi dan mencegah sel dari autolisis (Fung dan Tam, 2010). Studi lain menyebutkan formaldehid dapat memodifikasi struksur dari protein antigen (Montero, 2003). Durasi fiksasi mempengaruhi efektivitas dalam pewarnaan imunohistokimia. Terlambat dalam melakukan fiksasi berdampak pada degradasi protein antigen pada jaringan yang mengakibatkan ikatan antibodi yang tidak spesifik dan mempengaruhi keakuratan hasil. Fiksasi yang cepat mengakibatkan ikatan antigen-antibodi hanya terdapat di daerah perifer jaringan, sedangkan bagian dalam yang belum sempat terfiksasi mengalami autolisis. Fiksasi yang lama mengakibatkan reaksi silang berlebihan pada jaringan yang mempengaruhi pewarnaan. Selain itu overfiksasi juga menurunkan imunoreaktivitas antibodi.

Dalam memproses spresimen, hal yang perlu diperhatikan adalah pengeringan jaringan, kontrol temperature pada *paraffin wax*, penggunaan temperature untuk *embedding* dan *heating*. Temperatur *paraffin wax* dikontrol pada kisaran 63°C, sedangkan untuk *embedding* dan *heating* dipertahankan dalam suhu 68°C. Penggunaan alkohol yang diulang-ulang dalam waktu lama mengakibatkan pengeringan jaringan yang tidak adekuat dan berdampak pada reaktivitas non spesifik serta pewarnaan yang lemah pada sel target.

Ada tiga cara dalam mendeteksi imunohistokimia yaitu dengan metode langsung, metode tidak langsung, dan metode deteksi berbasis polimer. Metode langsung melibatkan antibodi primer yang akan berikatan dengan antigen jaringan

secara langsung. Antibodi primer dapat dilabeli dengan *fluorochrome*, enzim, dan biotin. Keuntungan metode ini adalah sederhana dan waktu yang dibutuhkan tidak lama, namun sensitivitasnya lemah jika dibandingkan dengan metode tidak langsung. Metode tidak langsung melibatkan antibodi primer yang tidak terlabel dan antibodi sekunder yang tidak terlabel. Antibodi primer ditambahkan dengan tujuan dapat berikatan dengan antigen pada jaringan, kemudian enzim yang melabeli antibodi sekunder ditambahkan secara langsung pada antibodi primer yang mengikat antigen jaringan. Cara ini lebih sensitif dibandingkan dengan metode langsung. Metode deteksi polimer mengandung inert *polymer backbone* yang menjadi perlekatan immunoglobulin sekunder dan molekul enzim yang terlabel. Namun cara ini lebih mahal dan dapat mengakibatkan aglutinasi spontan dari antisera sehingga hasilnya menjadi negatif palsu.

Cara kedua dalam pengukuran VCAM-1 adalah dengan metode imunofluoresens, seperti yang digunakan dalam penelitian ini. Imunofluoresens juga menggunakan prinsip reaksi antigen-antibodi dimana antibodi diberi label dengan pewarnaan fluoresensi dan kompleks antigen-antibodi diamati menggunakan mikroskop ultraviolet. *Fluorochrome* adalah pewarna yang dapat mengasorpsi sinar UV dan memancarkan cahaya tampak. Maca-macam *fluorochrome* antara lain *Acridine Orange*, *Rhodamine*, *Lissamine*, dan *Calcofluor White*. Adapun yang paling sering digunakan pada imunofluoresens adalah *fluorescein isothiocyanatae* (FITC) yang memberikan warna hijau serta *tetamethyl rhodamine isothiocyanate* yang memberikan warna merah (Verma dan Riaz, 2012). Fluoresensi dapat dikuantifikasi

menggunakan *flowcytometer*, *array scanner*, instrumen *imaging* atau divisualkan menggunakan mikroskop fluoresens atau *confocal* (Robinson et al, 2010).

Ada dua metode utama dalam labeling immunofluorescence, yaitu secara langsung dan tidak langsung. Pada metode langsung, antibodi terhadap molekul yang dimaksud, secara kimia dikonjugasikan pada pewarna fluoresens. Keuntungan metode ini adalah waktu pewarnaan sampel lebih cepat dan prosedur yang lebih sederhana. Kelemahannya adalah sinyal yang didapat lebih rendah, umumnya lebih mahal dan kurang fleksibel. Pada metode tidak langsung, antibodi primer tidak dilabeli dan antibodi sekunder yang terlabeli dengan pewarna fluoresens. Keuntungan metode ini adalah sensitivitas yang lebih besar dibandingkan metode langsung, secara komersial antibodi sekunder relatif tidak mahal dan kualitasnya dapat dikontrol. Kelemahan metode ini adalah berpotensi untuk terjadinya reaksi silang (Robinson et al, 2010).

2.5 Pengaruh Kulit Manggis pada Aterosklerosis

2.5.1 Informasi Umum Buah Manggis

Manggis yang disebut-sebut sebagai 'Ratu Buah-buahan' berasal dari hutan tropis yang teduh di kawasan Asia Tenggara, yaitu hutan belantara Indonesia atau Malaysia. Dari Asia Tenggara, tanaman ini menyebar ke daerah Amerika Tengah dan daerah tropis lainnya seperti Filipina, Papua New Guinea, Kamboja, Thailand, Srilanka, Madagaskar, Honduras, Brazil dan Australia Utara. Di Indonesia manggis mempunyai berbagai macam nama lokal seperti manggu (Jawa Barat), manggus (Lampung), Manggusto (Sulawesi Utara), dan manggista (Sumatera Barat) (Nugroho, 2011). Berikut adalah taksonomi dari buah manggis:

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub-divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Ordo : Guttiferanales
Famili : Guttiferae
Genus : Garcinia
Spesies : *Garcinia mangostana* L.



Gambar 2.6 Buah Manggis (Dweck, 2013)

Pohon buah manggis biasanya memiliki tinggi 6-25 m m dengan cabang yang sangat banyak seolah-olah seperti mahkota. Dalam pertumbuhannya, manggis memerlukan iklim yang lembab. Daunnya seperti kulit, lonjong, tebal, dan berwarna hijau tua dengan permukaan atas yang sedikit mengkilap, sedangkan permukaan bawahnya kusam. batang kayunya berwarna coklat gelap. Bagian atas buah manggis dilingkupi kelopak yang menonjol terlihat bulat berwarna ungu tua atau

merah keunguan, berdiameter 3.4-7.5 cm dan kulit buahnya halus. Sebuah manggis biasanya mengandung 5-7 biji buah yang dilapisi daging buah yang tebal dan putih dengan rasa yang manis dan sedikit asam (Dweck, 2013; Pedraza-Chaverri et al., 2008).

2.5.2 Kandungan Bioaktif pada Kulit Manggis

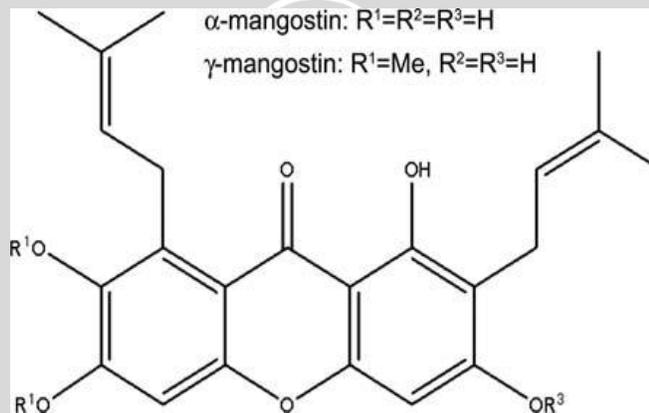
Kulit buah manggis setelah diteliti ternyata mengandung beberapa senyawa dengan aktivitas farmakologi misalnya antiinflamasi, antihistamin, pengobatan penyakit jantung, antibakteri, antijamur bahkan untuk pengobatan atau terapi penyakit HIV. Beberapa senyawa utama kandungan kulit buah manggis yang dilaporkan berperan dalam beberapa aktivitas farmakologi tersebut adalah golongan xanton (Nugroho, 2011). Xanton merupakan termasuk senyawa polifenolik. Senyawa tersebut paling banyak didapati pada bagian pericarp. Senyawa xanton yang paling banyak dipelajari adalah α -mangostin, β -mangostin, γ -mangostin, garcinone E, 8-deoxygartanin, and gartanin (Pedraza-Chaverri, 2008). Xanton dan turunannya ternyata memiliki efek yang menguntungkan dalam beberapa penyakit jantung dan pembuluh darah, antara lain penyakit iskemik jantung, aterosklerosis, hipertensi, dan trombosis. Efek-efek tersebut kemungkinan didapat dari aktivitas antioksidan, antiinflamasi, inhibitor agregasi platelet, antitrombotik, dan vasorelaksan. Selain itu xanton juga merupakan antagonis dari *nitric oxide synthase inhibitor* endogen, yang menegaskan perannya dalam pemeliharaan fungsi endotel dan mengurangi aterosklerosis. Beberapa studi epidemiologi juga menunjukkan bahwa senyawa polifenol, yang salah satunya adalah xanton memiliki manfaat untuk mencegah penyakit kardiovaskuler. Terdapat bukti bahwa xanton dapat mencegah

kerusakan jaringan kardiovaskuler pada hewan coba. Misalnya senyawa xanton dapat mengurangi *ischemia-reperfusion-induced arrhythmias* pada uji *in vivo* (Jiang et al., 2004). Pada studi yang dilakukan Jiang et al., mereka mendapati ekstrak xanton dapat meningkatkan pemulihan fungsi jantung selama reperfusi, mengurangi pelepasan *creatine kinase* (CK) pada jantung tikus, dan juga mengurangi ukuran infark miokardial pada uji *in vivo*. *Gentiacaulein* dan *gentiakoelianin*, dua contoh senyawa golongan xanton ini dapat berguna dalam pengobatan hipertensi (Jiang, 2004). Untuk manggis, banyak senyawa xanton yang dikandung pada bagian kulit, beberapa contohnya adalah adalah α -mangostin, β -mangostin, γ -mangostin, gartanin, 8-deoxygartanin, dan mangostano (Yodhnu, 2009). Di samping xanton alamiah, terdapat juga xanton-xanton sintetik yang digunakan dalam beberapa studi mengenai antioksidan, antitumoral, antiinflamasi, antialergi, antibakteri, anti jamur, anti virus, dan masih banyak lagi (Pedraza-Chaverri et al., 2008).

2.5.3 Pemanfaatan Kulit Manggis sebagai Antioksidan dan Antiinflamasi

Pada subbab sebelumnya telah dijelaskan bahwa stress oksidatif berperan penting dalam proses patologis. Oleh sebab itu, penekanan pada proses oksidatif akan sangat membantu dalam perkembangan suatu penyakit. Proses penekanan dapat melalui inhibisi dalam pembentukan ROS, misalnya inhibisi enzim NADPH oksidase dan xantin oksidase, ataupun melalui eliminasi senyawa ROS yang sudah terbentuk, misalnya melalui rekombinasi radikal atau yang lebih dikenal dengan istilah *radical scavenging* (Malhotra, 2008).

Substansi yang dapat melawan proses oksidatif tersebut dikenal disebut antioksidan. Adapapun sifat-sifat yang dikaitkan dengan senyawa antioksidan antara lain dapat menangkap oksigen radikal, menghambat reaksi *microsomal P-450-linked mixed function oxidation* (MFO), atau menekan pembentukan ROS. Ketiga hal tadi ternyata dapat ditemukan dalam senyawa polifenol.. Diantara senyawa-senyawa polifenol, golongan kumarin, xanton, dan flavon merupakan yang paling banyak diminati (Malhotra, 2008).



Gambar 2.7 Struktur kimia mangostin (Sun, 2009)

Xanton yang dikandung dalam kulit manggis sekaligus menjadi fokus dalam penelitian ini diketahui mampu menghambat peroksidasi lipid dan menghambat produksi ROS, efek ini nantinya dipercaya mampu menekan ekspresi molekul adesi (Malhotra, 2008). Dalam kajian antioksidan, xanton mampu menekan aktivitas xantin oksidase dan monoamine oksidase. Selain itu xanton juga banyak diteliti karena aktivitas antioksidan melalui aktivitas donor elektron (Kuan,2012). Dalam Sargowo, 2012, α -mangostin diketahui mampu menurunkan oksidasi LDL manusia yang

diinduksi oleh cupper dan radikal peroksil. α -mangostin adalah salah satu contoh senyawa xanton yang dikandung kulit manggis.

Selain sebagai antioksidan, xanton juga memiliki khasiat sebagai antiinflamasi sebagaimana dijelaskan pada subbab sebelumnya. Dalam percobaan yang dilakukan Sargowo et al., 2012, pemberian ekstrak kulit manggis dapat menurunkan kadar TNF- α dan IL-1 pada tikus yang diinduksi diet tinggi kolesterol. Lebih spesifik, α -mangostin dan γ -mangostin menekan gen-gen inflamasi yang diinduksi LPS yang kadarnya naik pada individu dengan obesitas, misalnya IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, dan toll-like receptor-2. α -mangostin and γ -mangostin juga dapat menekan aktivitas AP-1. γ -mangostin dapat meringankan degradasi I κ B- α dan menurunkan aktivitas NF- κ B (Bumrungpert,2009). Perlu dicatat, bahwa pada sel yang diam, NF- κ B dinonaktifkan di sitoplasma oleh inhibitor spesifik, yaitu I κ B- α (MAD3). Stimulus multipel, termasuk sitokin inflamasi, akan mengakibatkan fosforilasi dan atau/degradasi dari I κ B- α , yang akan menyebabkan translokasi NF- κ B ke nukleus. NF- κ B berikatan dengan daerah promoter dari sel target sebagai dimer yang terdiri dari 2 protein *Rel family*, kebanyakan yaitu p50 dan p65 (Zerfaoui et al., 2008; Neish et al., 1995).

2.6 Pemberian Induksi Diet Tinggi Lemak

Induksi diet tinggi lemak yang diberikan dalam penelitian ini diharapkan mampu menggambarkan kondisi aterosklerosis baik secara metabolik dan atau patofisiologi. Ada beberapa hewan coba yang pernah digunakan sebagai model aterosklerosis, diantaranya kelinci (Ameli et al, 1997), babi (Badimon, 2013) dan tikus *Rattus norvegicus* galur *Wistar* (Murwani et al, 2005). Diantara beberapa

hewan coba tersebut, tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar adalah hewan coba yang mudah didapat dan mudah penanganannya.

2.6.1 Penggunaan *Rattus norvegicus* strain Wistar sebagai Model In Vivo

Aterosklerosis

Penggunaan hewan coba aterosklerosis pertama ditemukan pada tahun 1908 oleh Ignatowski menggunakan hewan kelinci. Penelitiannya membuktikan bahwa pemberian diet yang diperkaya protein hewani pada kelinci menyebabkan pembentukan lesi pada dinding aorta (Badimon, 2013). Semenjak saat itu berbagai penelitian dilakukan untuk memperoleh hewan model aterosklerosis yang tepat. Sampai saat ini terdapat beberapa hewan coba yang dianggap mampu menggambarkan keadaan aterosklerosis, diantaranya kelinci (Ameli et al, 1997), babi (Badimon, 2013) dan tikus *Rattus norvegicus strain Wistar* (Murwani et al, 2005). Setiap hewan tersebut mempunyai kelebihan dan kekurangannya masing-masing.

Kelinci merupakan hewan coba yang paling sering digunakan sebagai hewan model aterosklerosis. Keadaan hiperkolesterolemia pada kelinci dapat dipicu dengan pemberian diet tinggi kolesterol selama beberapa hari. Hiperkolesterolemia terutama karena akumulasi kolesterol eksogen, sebab kelinci tidak mampu meningkatkan ekskresi sterol (Badimon, 2013). Kelebihan hewan coba kelinci adalah mudah dipelihara, murah, mudah ditemukan, metabolisme lipoprotein hampir sama dengan manusia, respon baik terhadap diet kolesterol, dan tersedia galur yang telah mengalami rekayasa genetik menjadi hiperlipidemia. Kelemahan kelinci adalah dibutuhkan diet yang sangat abnormal untuk menginduksi hiperkolesterolemia dan

perkembangan aterosklerosis, serta pemberian diet tinggi kolesterol jangka panjang dapat menyebabkan inflamasi massif dan hepatotoksitas (Fuster et al, 2012; Badimon, 2013).

Babi mempunyai anatomi kardiovaskular yang sangat mirip dengan manusia. Selain itu, babi juga dapat membentuk lesi aterosklerosis secara spontan, bahkan dengan diet normal. Kelebihan lainnya adalah distribusi lesi yang sama dengan manusia, yaitu di aorta, arteri koronaria, dan arteri karotis, serta metabolisme lipoprotein yang hampir sama dengan manusia. Kerugian penggunaan hewan coba babi adalah membutuhkan biaya perawatan dan pemeliharaan yang besar, sulit dipelihara (kecuali galur *minipig*), dan pembentukan lesi ateroma membutuhkan waktu yang lebih lama dibanding spesies lainnya (Fuster et al, 2012; Badimon, 2013).

Tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar (tikus Wistar) adalah tikus albino yang pertama kali ditemukan di *Wistar Institute* Philadelphia pada tahun 1909. Tikus ini kemudian disebarluaskan sebagai hewan coba yang sangat populer. Keunggulan dari tikus adalah mudah bereproduksi dan dipelihara, genetik telah dipahami dengan jelas dan tersedia galur-galur *inbred*, dan telah ada protocol baku dalam memanipulasi genetiknya. Namun, tikus Wistar cenderung resisten terhadap aterosklerosis. Hal ini disebabkan karena lipoprotein utama dalam transport lipid tikus adalah HDL, sehingga tikus mempunyai kadar HDL yang tinggi dan LDL yang rendah. Selain itu, tikus juga tidak mengekspresikan *cholesteryl ester transfer protein* (CETP), yaitu protein plasma yang digunakan untuk memindahkan kolesterol ester dari HDL ke lipoprotein lain yang pro-aterogenik. Berbeda dengan manusia,

diet tinggi lemak tidak serta merta menyebabkan aterosklerosis pada tikus Wistar (Badimon, 2013). Hal ini disebabkan karenatingginya aktivitas 7α -hidroksilase hepar yang berfungsi untuk mensintesis asam empedu, sehingga kolesterol diet yang berlebihan dapat segera dikonversi menjadi asam empedu (Horton et al, 1995). Sifat resistensi ini dapat diatasi dengan rekayasa genetik atau dengan induksi senyawa tertentu seperti tiourasil, dan asam kolat. Kelemahan lainnya adalah profil lipid plasma yang berbeda dengan manusia dan perbedaan morfologi dinding arteri (Fuster 2012; Badimon, 2013).

2.6.2 Pemberian Diet Tinggi Lemak sebagai Penginduksi Aterosklerosis

Tikus adalah hewan yang resisten terhadap aterosklerosis. Oleh karena itu diperlukan penginduksi aterosklerosis. Ada tiga senyawa yang dapat menginduksi aterosklerosis pada tikus, yaitu tiourasil (Abarbanell et al, 2010), vitamin D3 (Srinivas, 2008), dan asam kolat (Murwani et al, 2006).

Tiourasil adalah penghambat hormone tiroid, sehingga menyebabkan terjadinya hipotiroidisme. Keadaan hipotiroidisme memicu penurunan aktivitas reseptor LDL dan hiperkolesterolemia (Moghadasian, 2001; Abarbanell et al, 2010). Vitamin D3 bersamaan dengan pemberian diet tinggi lemak pada tikus mampu menyebabkan perkembangan aterosklerosis dalam waktu 5 hari (Srinivas, 2008). Pemberian asam kolat diperkirakan dapat menurunkan kadar HDL sehingga menginduksi dislipidemia. Asam kolat bekerja dengan cara meningkatkan absorpsi kolesterol dan bersamaan dengan itu menekan aktivitas kolesterol 7α hidroksilase yang mengakibatkan penurunan eksresi kolesterol (Moghadasian, 2001). Diet aterogenik dengan kadar kolesterol yang tinggi (~1%) dan asam kolat (0,25% -

0,5%) mampu mencetuskan peningkatan total kolesterol dan LDL dengan cara menurunkan produksi asam empedu, yang mana menurunkan kadar HDL (Pellizzon, 2008). Penelitian Murwani et al (2006) membuktikan bahwa pemberian diet tinggi lemak ditambah asam kolat (diet aterogenik) selama 8 minggu pada tikus Wistar terbukti menyebabkan hiperlipidemia dan menginduksi terbentuknya sel busa secara signifikan. Komposisi diet aterogenik untuk tikus Wistar adalah pakan normal gandum dan PARS yang ditambah kolesterol 2%, asam kolat 0,2%, dan minyak babi 5%. Pemberian kolesterol dan minyak babi bertujuan untuk menginduksi hiperkolesterolemia. Pemberian diet aterogenik tanpa asam kolat terbukti tidak mampu meningkatkan kadar kolesterol dan pembentukan sel busa secara bermakna (Murwani et al, 2006).

Terdapat beragam komposisi diet aterogenik. Thompson (1969) mejadi pioner pemberian diet yang mengandung 30% lemak, 5% kolesterol, dan 2% kolat pada tikus. Tikus C57BL/6J yang diberikan diet ini terbukti mempunyai lesi sel busa pada aorta, yang semakin luas dan dalam seiring lama pemberian diet ini (Smith dan Breslow, 1997; Vergnes, 2003). Pada penelitian lain komposisi diet aterogenik sebagai berikut, diet normal ditambah dengan 4% kolesterol, 1% asam kolat, dan 0,5% 2-tiourasil. Diet ini terbukti mampu menyebabkan hiperlipidemia, obesitas, menginduksi defisiensi insulin akibat hiperglikemia dan hipotiroidisme. Penelitian Srinivas (2008) menggunakan campuran 2 gram kolesterol, 8 gram lemak, dan 100 mg kalsium dalam 90 gram PARS yang diberikan tiap hari, dan vitamin D3 peroral tiap bulan. Diet ini terbukti mampu menurunkan enzim antioksidan SOD, CAT, dan GST, serta meningkatkan peroksidasi lipid yang terlihat dari peningkatan kadar

MDA. Selain itu, terdapat pula komposisi diet aterogenik menurut Colina-Coca (2014), yaitu pakan normal ditambah 2% kolesterol dan 0,5% asam kolat.

