

**BAB 2****TINJAUAN PUSTAKA**

Untuk menjelaskan pengaruh ekstrak kulit manggis dalam menghambat patogenesis aterosklerosis, maka dalam bab ini akan didahului dengan pembahasan tentang prevalensi, definisi, etiologi, faktor resiko, komplikasi, manifestasi dan pathogenesis aterosklerosis. Di dalam patogenesis aterosklerosis terdapat mekanisme terjadinya stress oksidasi. Pada penelitian yang telah ada sebelumnya menunjukkan bahwa kondisi hiperlipidemia saja tidak cukup menjadi penyebab terjadinya aterosclerosis, stres oksidatif lebih proaterogenik dibandingkan dengan hiperlipidemia saja tanpa stres oksidatif (Sargowo, 2010) sehingga diperlukan penjelasan mengenai definisi, struktur kimia, tipe, sumber, reaksi, dan produk dari radikal bebas. Dalam penelitian ini variabel yang akan diukur sebagai petanda terjadinya aterosklerosis adalah kadar MDA serum, sehingga diperlukan penjelasan mengenai MDA pula. Pada penelitian ini efek ekstrak kulit manggis yang diharapkan adalah sebagai antioksidan dan klasifikasi antioksidan. Begitu pula akan dibahas mengenai klasifikasi tumbuhan manggis, kandungan kulit manggis, dan aktifitas biologis kulit manggis. Untuk keperluan penelitian, kami akan menggunakan hewan model tikus, sehingga pada bab ini juga akan dijelaskan teori – teori yang mendukung mengenai hewan model aterosklerosis dan cara pembuatan model aterosklerosis.

## 2.1 Aterosklerosis

### 2.1.1 Prevalensi

Menurut Boudi dan Ahsan (2009), saat ini aterosklerosis merupakan penyebab kematian utama di negara maju dan diperkirakan kurang dari 25 tahun mendatang akan pula menjadi penyebab utama kematian di negara berkembang. Aterosklerosis yang progresif dapat menyebabkan berbagai masalah kesehatan seperti stroke, infark miokardial, angina pectoris, penyakit jantung koroner, penyakit iskemik jantung, dan penyakit jantung-pembuluh darah lain yang merupakan salah satu penyebab mortalitas dan morbiditas tertinggi di dunia. Penyakit kardiovaskuler merupakan penyebab nomor satu dari kematian global di dunia, banyak orang meninggal karena penyakit kardiovaskuler dibanding dengan penyakit yang lain (WHO, 2011a). Berdasarkan data Badan Kesehatan Dunia (WHO) tahun 2004, penyakit kardiovaskuler memiliki angka kematian sebesar 29,34% dari seluruh penyebab kematian yang menjadikannya peringkat pertama penyebab kematian di dunia (Boudi, 2010). Menurut perhitungan WHO menjelaskan bahwa pada tahun 2008 jumlah orang meninggal akibat penyakit kardiovaskuler sebanyak 17,3 triliun di dunia, angka tersebut mempresentasikan 30% dari total angka kematian global (WHO, 2011a). Dari angka kematian tersebut, diperkirakan 7,3 triliunnya disebabkan karena penyakit jantung koroner dan 6,2 triliun karena stroke (WHO, 2011b). Lebih dari 80% dari angka kematian akibat penyakit kardiovaskuler berada di negara dengan pemasukan yang rendah dan menengah. WHO memperkirakan pada tahun 2030 akan ada lebih dari 23 triliun orang di dunia yang akan meninggal akibat penyakit kardiovaskuler (Mathers, 2006).

Pada tahun 2010, penyakit kardiovaskuler di UK adalah pembunuh yang terbesar. Lebih dari 180.000 orang meninggal karena penyakit kardiovaskuler dan 68% diantaranya adalah pria, sekitar 80.000 diantaranya meninggal karena penyakit jantung koroner dan sekitar 49.000 diantaranya meninggal karena penyakit stroke. Ada sekitar 150.000 insiden stroke setiap tahunnya terjadi di UK. Angka kematian karena penyakit jantung koroner tertinggi berada di Scotland dan terendah ada di Inggris (British Heart Foundation, 2013). Pada tahun 2010 di United States, penyakit kardiovaskuler merupakan penyebab tersering pasien harus rawat inap di rumah sakit dan penyebab tersering kematian di Amerika (American Heart Association, 2013).

<b>Penyebab kematian</b>	<b>Proporsi kematian (%)</b>
Strok	15,4
TB	7,5
Hipertensi	6,8
Cedera	6,5
Perinatal	6,0
Diabetes Mellitus	5,7
Tumor ganas	5,7
Penyakit hati	5,1
Penyakit jantung iskemik	5,1
Penyakit sal nafas bawah	5,1
Penyakit jantung	4,6
Pnemonia	3,8
Diare	3,5
Ulkus lambung dan usus 12 jari	1,7
Tifoid	1,6
Malaria	1,3
Meningitis Ensefalitis	0,8
Malformasi kongenital	0,6
Dengue	0,5
Tetanus	0,5
Septikemi	0,3
Malnutrisi	0,2

Gambar 2.1 Pola Penyebab Kematian di Semua Kelompok Umur di Indonesia tahun 2007 (Risikesdas 2007)

Pada tahun 2004, tercatat dari sekitar 230 juta penduduk di Indonesia 400 ribu diantaranya memiliki riwayat aterosklerosis (Antara, 2010). Bahkan saat ini Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita stroke terbesar di Asia (Annisa, 2010). Menurut Ditjen Bina Yanmedik, Departemen Kesehatan Republik Indonesia 2009 menyebutkan bahwa penyakit sistem sirkulasi darah menduduki peringkat pertama dalam 10 penyakit utama penyebab kematian menurut golongan sebab sakit di rumah sakit di Indonesia tahun 2007 dengan jumlah pasien mati sebanyak 21.830 jiwa (Depkes RI, 2009). Hasil data Riskesdas tahun 2007 menyatakan bahwa Provinsi Jawa Timur mempunyai kasus hipertensi sebesar 52,2% dan kasus stroke sebesar 13,6% (Riskesdas, 2007)

### 2.1.2 Definisi

Aterosklerosis adalah penyakit arteri yang berkembang secara perlahan (kronik progresif) dengan penebalan dinding tunika intima akibat terbentuknya lesi yang disebut plak ateromatosa pada permukaan dalam dinding arteri (Maliya, 2006). Aterosklerosis adalah penyebab terbanyak yang mendasari terjadinya penyakit pada arteri koroner, arteri karotis, dan arteri perifer serta juga merupakan faktor yang mempresipitasi penyakit klinik yang mengancam jiwa seperti *acute coronary syndromes* dan stroke (Naghavi, 2003b).

### 2.1.3 Etiologi dan Faktor Risiko

Etiologi aterosklerosis bersifat multifaktorial, perpaduan antara tingkat stres yang tinggi, kebiasaan merokok serta kecenderungan untuk mengonsumsi makanan berkolesterol tinggi dapat menyebabkan gangguan metabolisme lemak sehingga terjadi hiperkolesterolemia dan akan mengarah pada keadaan dislipidemia yang dianggap sebagai salah satu faktor risiko utama aterosklerosis

(Subektif, 2005; Almatsier, 2003; Mayes, 2003). Pada penelitian profesor Sargowo di Indonesia menunjukkan bahwa kondisi hiperlipidemik saja tanpa stress oksidasi (Sargowo, 2010). Faktor aterosklerosis seperti hiperlipidemia dan tingginya kadar lipoprotein diketahui juga meningkatkan pembentukan radikal bebas ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan menyebabkan turunnya sistem antioksidan di jaringan (Ercal, 2001). ROS mempunyai efek negatif yaitu dapat merubah struktur jaringan dan menimbulkan kerusakan jaringan. Terbentuknya ROS ini dipengaruhi oleh berbagai macam faktor diantaranya adalah karena rangsangan radiasi, paparan zat kimia tertentu, infeksi, maupun inflamasi (Langseth, 1994).

Pada jurnal yang ditulis oleh Samin Yusuf yang diterbitkan *American Heart Association* (AHA), dituliskan bahwa studi epidemiologis yang banyak dilakukan oleh peneliti menunjukkan hubungan antara *risk markers* dan CVD (*Cardio Vascular Disease*). Hal tersebut dapat diklasifikasikan menjadi 2 kategori: (1) faktor risiko yang terbukti menjadi penyebab terjadinya penyakit kardiovaskuler (*risk factor*), dan (2) faktor yang menunjukkan hubungan dengan penyakit kardiovaskuler (penanda risiko / *risk marker*) (Yusuf, 2001).

Tabel 2.1 : Faktor Risiko Penyakit Kardiovaskuler (Yusuf, 2001)

Faktor risiko yang menjadi penyebab ( <i>risk factor</i> )
1. Merokok
2. LDL yang tinggi
3. HDL yang rendah
4. Tekanan darah tinggi
5. Kadar glukosa yang tinggi
6. Aktifitas fisik yang kurang ( <i>physical inactivity</i> )

7. Obesitas
8. Diet
Penanda risiko yang menunjukkan hubungan ( <i>risk markers</i> )
1. Status sosio ekonomi yang rendah
2. Kenaikan faktor prothrombin: fibrinogen, PAI-1 ( <i>plasminogen activator inhibitor</i> – 1)
3. Penanda dari infeksi atau inflamasi
4. Kenaikan homocysteine
5. Kenaikan lipoprotein (a)
6. Faktor psikologi (depresi, stress) dan kehilangan dukungan sosial

Beberapa faktor memberikan kontribusi dalam perbedaan interpopulasi yang diobservasi pada profil penyakit kardiovaskuler. Pertama, perbedaan state pada tranmisi epidemiologi dengan variasi angka harapan hidup, profil demografi yang bermacam-macam, dan kontribusi yang berbeda dari penyebab kematian. Maka, akibat dari penyakit kardiovaskuler, dan juga komposisi dari spektrum penyakit kardiovaskuler, akan bervariasi sesuai dengan dinamika dari transisi kesehatan. Yang kedua, faktor lingkungan yang berhubungan dengan risiko penyakit kardiovaskuler akan berbeda pada berbagai populasi dan mungkin sebagian akan berhubungan dengan budaya atau tahapan industrialisasi. Yang ketiga, faktor genetik, menjelaskan variasi pada risiko terjadinya penyakit kardiovaskuler dan juga terkait pada perbedaan etnik (Yusuf, 2001a). Faktor genetik berkontribusi pada kejadian gangguan lipid (*lipid disorders*), obesitas, sensitifitas terhadap garam, resistensi insulin, gangguan koagulasi, dan disfungsi endotel. Yang keempat, efek “*programming*” dari faktor yang mempengaruhi seseorang untuk bertahan hidup, juga menentukan respon individu pada perubahan lingkungan dan berkontribusi pada penyakit kardiovaskuler. Yang

kelima, faktor “programming” yang mendasari penyakit kardiovaskuler pada status nutrisi bayi dan anak-anak (Barker, 1994).

Perbedaan gaya hidup di daerah urban dan daerah rural juga mempengaruhi perkembangan dari lesi aterosklerosis. Konsumsi dari diet yang tidak baik, tingginya pengguna rokok, dan menurunnya aktifitas fisik di daerah rural, akan semakin meningkatkan faktor risiko dan menaikkan angka kejadian penyakit kardiovaskuler (Yusuf, 2001b).

Pada penelitian Salim Yusuf dikemukakan bahwa faktor risiko penyakit kardiovaskuler dapat berbeda-beda menurut variasi etnik dan regional, hal ini tentunya akan mempengaruhi pola preventif yang dilakukan di daerah tersebut. Berikut beberapa faktor risiko tersebut :

- Faktor risiko di Eropa

Penyakit kardiovaskuler di populasi orang Eropa lebih banyak dipengaruhi oleh faktor risiko klasik, seperti diet tinggi lemak, tingginya kadar kolesterol, tingginya tekanan darah, diabetes, dan merokok.

- Faktor Risiko di Jepang

Pada masyarakat Jepang, hipertensi adalah faktor risiko penyakit kardiovaskuler yang paling penting daripada kolesterol dan merokok.

- Faktor risiko di Hong Kong

Penelitian case – control yang dilakukan di Hongkong pada penderita infark miokard akut (AMI) mengindikasikan bahwa faktor risiko konvensional seperti merokok, hipertensi, atau diabetes merupakan faktor risiko yang penting. Namun,

merokok merupakan hal yang umum diantara penduduk pria di China (Lebih dari 60%) dan semakin meningkat.

- Faktor risiko di Asia Selatan

Asia selatan adalah penduduk dari India, Sri Lanka, Bangladesh, Nepal, dan Pakistan. Penelitian terbaru menyatakan bahwa penduduk Asia selatan memiliki kadar *homosistein*, *fibrinogen*, dan *plasminogen activator inhibitor* (PAI-1) yang tinggi, yang ke semuanya itu dapat menaikkan risiko terjadinya trombosis.

- Faktor risiko Hispanics

Hispanics adalah penduduk Amerika dari Cuban, Mexico, dan Puerto Rico. Faktor risiko yang banyak pada mereka adalah faktor risiko konvensional seperti merokok, hipertensi, kolesterol HDL yang rendah, kadar kolesterol yang tinggi, diabetes, kurangnya aktifitas fisik, dan obesitas.

- Faktor risiko populasi Aborigin

Faktor risiko penyakit kardiovaskuler yang sering terjadi adalah diabetes, obesitas, dan kadar kolesterol HDL yang rendah.

- Faktor risiko di Afrika

Faktor risiko tersering penyakit kardiovaskuler adalah hipertensi.

- Faktor risiko di India Timur

Di Trinidad, faktor risiko tersering adalah hipertensi.

- Faktor risiko di United States

Penduduk Afrika-Amerika dalam perkembangan penyakit hipertensi ditemukan pada usia yang lebih awal jika dibandingkan dengan penduduk kulit putih. Alasan mengapa penduduk kulit putih dan hitam berbeda dalam prevalensi hipertensi adalah karena dipengaruhi oleh perbedaan respon terhadap diet, stress, potensial genetik/ psikologi dan perbedaan dalam ekskresi sodium/ potassium (Yusuf, 2001b).

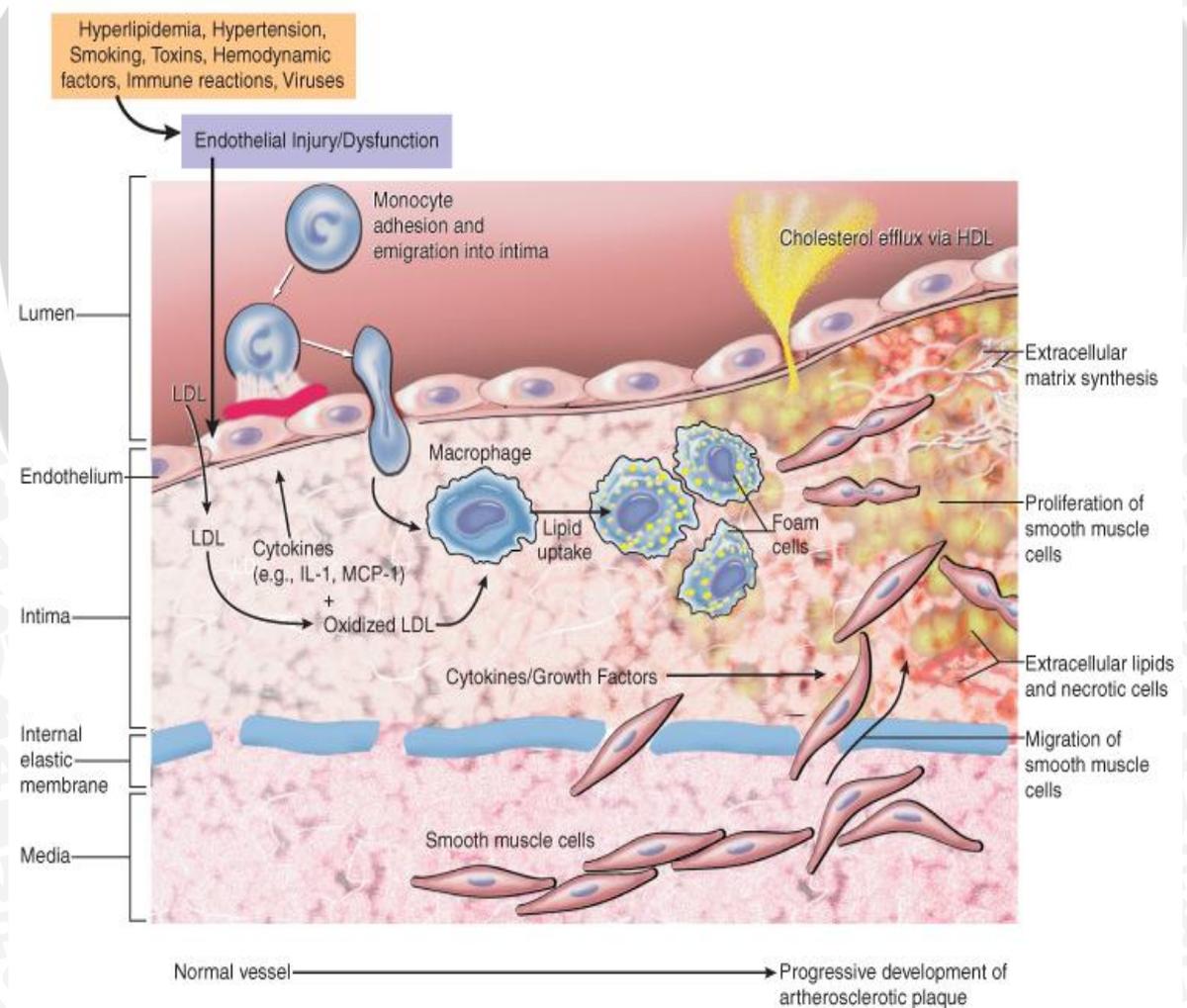
Karena variasi faktor risiko yang berbeda-beda dalam setiap regional, maka Salim Yusuf menyatakan ada dua strategi untuk upaya preventif primer yaitu "*population approach*" dan "*high-risk approach*". Strategi "*high-risk approach*" adalah mengidentifikasi individu yang mempunyai faktor risiko yang tinggi, yang kemudian diikuti dengan intervensi kebiasaan dan farmakologi. Strategi "*Population approach*" bertujuan untuk menurunkan angka kejadian penyakit disemua komunitas meskipun memberikan keuntungan yang kecil pada setiap individu namun keuntungan yang didapat untuk semua komunitas relatif terbatas karena penerima keuntungan tersebut hanya beberapa (Yusuf, 2001b).

#### 2.1.4 Komplikasi dan Manifestasi

Aterosklerosis yang terjadi di arteri koronaria seringkali menyebabkan infark miokardium dan angina pectoris. Aterosklerosis yang terjadi pada arteri yang menyuplai darah pada ditem daraf pusat akan membuat terjadinya stroke dan transient cerebral ischemia. Pada sirkulasi perifer, aterosklerosis dapat menyebabkan *intermittent claudication* dan gangrene. Keterlibatan dari sirkulasi splanchnic dapat menyebabkan iskemik mesenterika. Aterosklerosis dapat mempengaruhi ginjal seperti stenosis arteri renalis ataupun penyakit

ateroembolik. Manifestasi aterosklerosis tidak hanya berdasarkan tempat dimana dia berada, namun juga berdasarkan waktu. Pembentuk aterosklerosis pada manusia secara khas muncul lebih dari bertahun-tahun, seringkali lebih dari satu dekade. Pertumbuhan plak aterosklerosis mungkin tidak muncul di pembuluh darah linier, namun di pembuluh darah yang discontinuous. Setelah periode “*silent*” yang panjang, aterosklerosis akan memunculkan manifestasi klinis. Ekspresif klinis dari aterosklerosis dapat bersifat kronis. (Kasper, 2005).

### 2.1.5 Patogenesis



Gambar 2.2: Pembentukan Aterosklerosis (Pradana, 2012)

Hasil penelitian eksperimental pada hewan dan penelitian pada manusia banyak menyebutkan bahwa "*fatty streak*" merupakan pertanda *initial lesion* atau lesi awal dari aterosklerosis. Konsentrasi kolesterol yang tinggi dalam plasma darah dapat merubah gambaran lipoprotein menjadi dislipidemia yaitu menurunkan kadar HDL (*High density lipoprotein*) dan meningkatkan kadar LDL (*Low density lipoprotein*) plasma (Murwani, 2006). Keadaan dislipidemia yang terus menerus menyebabkan terjadinya disfungsi endotel. Disfungsi endotel akan memicu LDL masuk dan terakumulasi di tunika intima endotel arteri. Pembentukan aterosklerosis diawali dengan akumulasi lipoprotein di tunika intima endotel arteri. Akumulasi lipoprotein tersebut tidak hanya disebabkan oleh kenaikan permeabilitas atau "*leakiness*" dari permukaan endotel. Namun juga karena lipoprotein berkumpul di intima arteri karena mereka terikat pada unsur pokok dari matriks ekstraseluler. Lipoprotein yang terakumulasi di ruang ekstraseluler intima arteri biasanya berhubungan dengan molekul proteoglikan di matriks ekstraseluler, interaksi tersebut akan membuat retensi partikel lipoprotein dengan cara mengikat mereka dan memperlambat jalan keluar mereka dari intima.

Terikatnya LDL pada proteoglikan dalam jaringan menyebabkan LDL yang infiltrasi akan terperangkap lebih lama dalam jaringan dinding pembuluh darah (Howlett, 2006). Akumulasi tersebut membuat terjadinya mekanisme patogen seperti terjadinya modifikasi lipoprotein pada aterosklerosis. Trigliserida dapat menstimulasi endotel menghasilkan ROS, sehingga jaringan dinding pembuluh darah sering mengalami stress oksidasi. Hal ini menyebabkan senyawa lipid khususnya dilapisan luar LDL yang terperangkap di dalam jaringan pembuluh darah, sangat potensial mengalami oksidasi sehingga terbentuk oxLDL dan lipid

peroksida. Dua tipe dari perubahan lipoprotein yang dapat menjadi faktor resiko terjadinya aterosclerosis adalah terjadinya oksidasi lipoprotein dan *nonenzymatic glycation* (Kasper, 2005). Lipoprotein yang berada di ruang ekstraseluler intima lebih mudah untuk mengalami modifikasi oksidatif. Terdapat beberapa mekanisme yang memungkinkan terjadinya oksidasi secara *invivo* yaitu oksidasi oleh peroksinitrit, NADPH oksidasi, lipoksigenase, Cu<sup>+</sup> dan superoksid produk sel fagosit dan mungkin sekali oksidasi non enzimatis (Denisov, 2005; Adibhatla, 2010).

Adanya leukosit, mediator pertahanan tubuh, dan inflamasi yang dipicu oleh terbentuknya ox-LDL terjadi di lesi awal dari aterosclerosis. Endotelium yang normal tidak memiliki kemampuan untuk mengikat sel darah putih pada dindingnya. Namun, setelah inisiasi pertama dari diet atherogenik, dinding endotel arteri akan mengalami disfungsi endotel. Ketika monolayer endotel mengalami peradangan, monolayer endotel akan mengekspresikan molekul adhesif selektif yang mampu mengikat bermacam-macam jenis leukosit (gambar 2.2). Molekul adhesif selektif itu diantaranya adalah *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1). Beberapa studi mengatakan bahwa mekanisme *atheroprotective endogenous* yang lemah terjadi di arteri, dimana sel endotel akan mengalami gangguan aliran. Gangguan aliran dapat menambah produksi dari molekul adhesi leukosit seperti *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1). Perintah *laminar shear* untuk supaya terjadi aliran yang normal menambah produksi NO (*nitric oxide*) dari sel endotel. Molekul tersebut adalah vasodilator yang dapat berperan sebagai *anti-inflammatory autacoids*, contohnya yaitu dengan cara menekan ekspresi dari molekul adhesi. Contoh tersebut mengindikasikan bagaimana kemampuan hemodinamik dapat mempengaruhi

seluler meskipun terdapat inisiasi lesi aterosklerosis. LDL yang telah mengalami oksidasi (ox-LDL) juga dapat menambah ekspresi dari molekul adhesi leukosit. Meningkatnya ekspresi molekul adhesi selektif juga meningkatkan pembentukan atheroma. (Kasper, 2005).

Saat leukosit, yaitu monosit dan limfosit, berpenetrasi pada intima, MCP – 1 atau *monocyte chemoattractant protein -1* muncul untuk migrasi langsung monosit ke intima di tempat terbentuknya lesi. Munculnya MCP – 1 juga dipengaruhi oleh lipoprotein yang termodifikasi atau lipid yang teroksidasi. Sebagai tambahan untuk produk lipoprotein yang termodifikasi atau lipid yang teroksidasi, sitokin (protein mediator dari inflamasi) meregulasi ekspresi dari molekul adhesi untuk mengikat leukosit yang lain. Sebagai contoh IL-1 (*cytokines interleukin*) atau TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) dapat menginduksi atau menambah ekspresi dari molekul adhesi leukosit di sel endotel (Kasper, 2005).

Kolesterol LDL yang mengalami oksidasi (ox-LDL) juga berperan penting dalam memicu terjadinya inflamasi dengan mengaktifkan NF- $\kappa$ B (Monaco, 2004). Jalur pengaktifan NF- $\kappa$ B ini memicu upregulasi dari beberapa gen yang terlibat dalam permulaan dan chemokin, *macrophage colony – stimulating factor* (M-CSF), yang membuat monosit berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag mengekspresikan reseptor scavenger untuk modifikasi lipoprotein dan memakan lipid untuk menjadi *lipid – laden macrophages* atau *foam cells* atau sel busa. Sel busa (*foam cell*) yang terbentuk juga akan memproduksi radikal bebas (ROS) yang akan membuat proses aterosklerosis semakin progresif. Gamma interferon dan lymphotoxin (TNF- $\beta$ ) juga dapat menstimulasi makrofag maupun vascular endothelial cells dan SMCs.

Saat perkembangan lesi, limfosit bergabung dengan makrofag di intima, kemudian menyebabkan sekresi sitokin dan *growth factors* yang dapat mempromosikan migrasi dan proliferasi SMCs (gambar 2.2). *Injury* atau stress pada dinding juga membuat produksi dari *arterial smooth muscle cells* (SMCs) dari proteoglycans yang dapat mengikat lipoprotein partikel, memfasilitasi modifikasi oksidatif, dan promoting respon inflamasi di tempat lesi. Medial SMCs mengekspresikan enzim spesial yang dapat mendegradasi sintesa elastin dan kolagen untuk respon dalam stimulasi inflamasi. Degradasi dari matriks ekstraseluler arteri nebgijinkan penetrasi dari SMCs ke lamina elastic dan matriks kolagen untuk pertumbuhan plak. *Cross talk* antara limfosit T dan makrofag mempertinggi ekspresif dari faktor prokoagulasi yang kuat. Sehingga, ketika plak tersebut *rupture*, faktor jaringan yang disebabkan oleh sinyal inflamasi akan memicu pembentukan thrombus yang menyebabkan komplikasi akut dari ateroklerosis (Libby, 2002).

#### 2.1.5.1 Stress Oksidasi

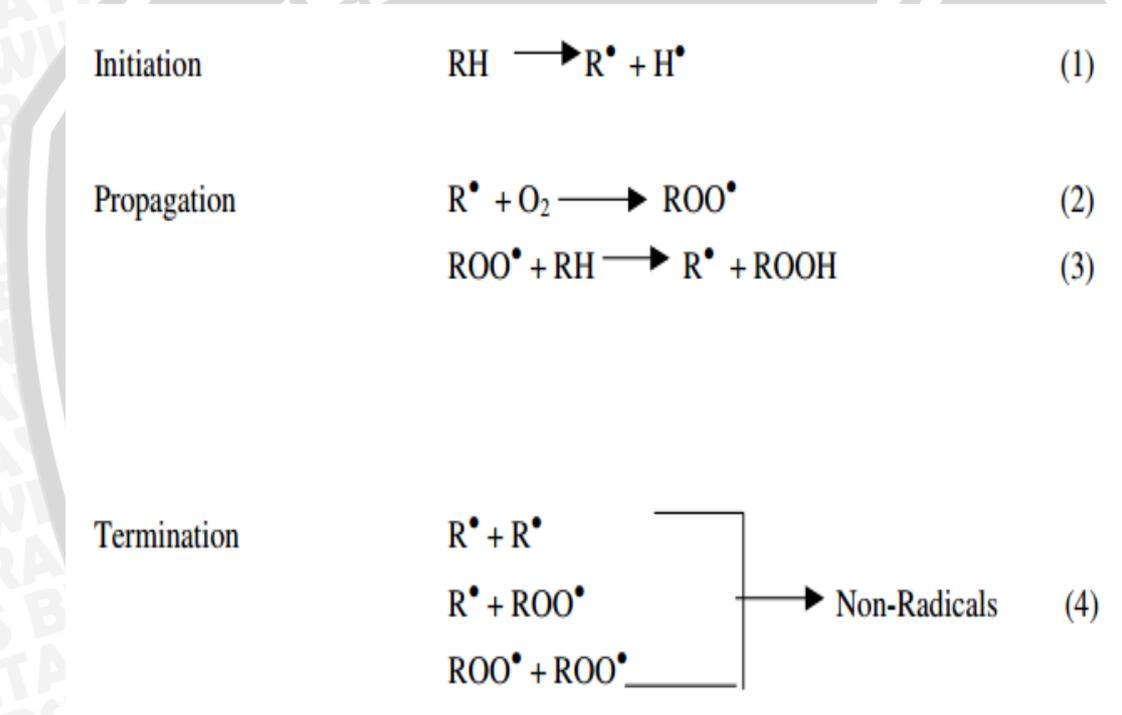
Proses metabolisme tubuh dalam sel tubuh menghasilkan oksidan. Salah satu yang dibentuk adalah ROS (*reactive oxygen species*). ROS mempunyai efek negatif yaitu dapat merubah struktur jaringan dan menimbulkan kerusakan jaringan. Terbentuknya ROS ini dipengaruhi oleh berbagai macam faktor diantaranya adalah karena rangsangan radiasi, paparan zat kimia tertentu, infeksi, maupun inflamasi (Langseth, 1994). Hiperlipidemia dan tingginya kadar lipoprotein diketahui juga meningkatkan pembentukan radikal bebas (ROS) dan menyebabkan turunnya sistem antioksidan di jaringan (Ercal, 2001). Ateroklerosis ini terjadi karena adanya suatu reaksi rusaknya proses oksidasi

stress oksidatif pada membran sel, lipoprotein, dan struktur lipid lainnya yang dikenal dengan peroksidasi lipid (Girotti, 1998). Hal inilah yang dapat menyebabkan rusaknya jaringan maupun organ.

*Low density lipoprotein* (LDL) rentan terhadap modifikasi struktural karena oksidasi, terutama partikel LDL yang padat dan kecil. LDL tertahan di intima, dengan mengikat pada proteoglikan dan mengalami modifikasi oksidatif. *Minimally modified LDL* (MM – LDL) mengandung zat yang mengoksidasi lipid yang dapat menyebabkan dinding arteri mengekspresikan gen dimana produk – produk protein tersebut berpengaruh dalam pembentukan lapisan lemak dan perlekatan monosit (Sargowo, 2005). Migrasi monosit ini dipengaruhi oleh produk protein *monocyte chemotactic protein/MCP-1* (Cushing,1990) sedangkan diferensiasi monositnya dipengaruhi oleh *macrophage – colony stimulating factor/MCSF*. Peristiwa molekular ini menyebabkan terikatnya monosit dan migrasinya monosit ke ruang subendotel serta diferensiasi monosit menjadi makrofag. Makrofag ini dapat melepaskan oksigen reaktif dan aldehide yang dapat mengubah MM – LDL menjadi bentuk modifikasi LDL yang dapat dikenali dan ditangkap oleh reseptor LDL oksidasi. Modifikasi LDL diawali dengan terjadinya peroksidasi *poly indaturated fattu acids* pada lemak LDL dan terlepasnya antioksidan seperti *alpha tocopherol* (Esterbauer, 1987).

Oksidasi LDL menyebabkan perubahan muatan apoB-100 sehingga LDL cenderung membentuk agregat dan fusi. Ox-LDL dapat berfungsi sebagai kemoatraktan sel inflamasi sehingga sel-sel inflamasi ini mengalami migrasi ke jaringan sub endotel, kemudian sel inflamasi mengekspresi *scavenger receptor* (SR). Pembentukan agregat dan perubahan muatan LDL membuat LDL tidak

dikenal reseptor *native*. Melalui SR seperti CD36, SR-A, dan SRB, makrofag dapat memfagosit oxLDL tanpa down regulasi, sehingga terjadi penumpukan LDL dan terbentuklah makrofag sel busa (Adibhatla, 2010). Afinitas LDL dalam bentuk agregat terhadap proteoglikan mengalami peningkatan dan memudahkan fagositosis pembentukan sel busa. Oksidasi lipid dapat dibedakan menjadi 3 stase yaitu inisiasi (produk dari *lipid free radicals*), propagasi, dan terminasi (produk dari *non – radicals products*).



Gambar 2.3: Stase dari Oksidasi Lipid (Mokgope, 2006)

Inisiasi adalah hasil dari pembentukan radikal bebas yang merupakan molekul yang sangat reaktif dengan elektron yang tidak berpasangan. Pada gambar tersebut R\* adalah *alkyl free radical* sedangkan H\* adalah *hydrogen free radical*. Produksi beberapa radikal bebas pada stase inisiasi sangat penting untuk memulai stase propagasi.

Saat stase propagasi, radikal bebas yang terbentuk pada fase inisiasi berubah menjadi bentuk radikal yang lain (Mokgope, 2006). Radikal tersebut akan sangat *highly reactive* dan saat reaksi propagasi mereka akan memproduksi *lipid peroxide radicals* melalui reaksi dengan *atmospheric triplet oxygen*. *Lipid hydroperoxy radicals* (ROO\*) masuk ke reaksi berantai dengan molekul lainnya dan memproduksi *lipid hydroperoxides* (ROOH) dan *lipid free radicals* yang lain (Nawar, 1996). Reaksi tersebut akan terus berlangsung selama *unsaturated lipids* atau molekul asam lemak masih ada.

Pada stase terminasi, penurunan jumlah *unsaturated lipid* atau asam lemak menyebabkan radikal saling berkaitan satu dengan lain, yang membentuk *stable non – radical compounds* (Madhavi, 1996). Produksi dari LDL yang termodifikasi oleh sel endotel dapat dicegah oleh *high density lipoprotein* (HDL) (Sargowo, 2005). Jika HDL ada dalam konsentrasi yang cukup, pembentukan MM-LDL dapat dihambat dan reaksi inflamasi dapat dicegah.

Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kondisi hiperlipidemia saja tidak cukup menjadi penyebab terjadinya aterogenesis, stress oksidasi lebih proaterogenik dibandingkan dengan hiperlipidemia saja tanpa stress oksidasi (Sargowo, 2010). LDL teroksidasi (oxLDL) pada sub endothelial dari dinding arteri merupakan kunci dalam memulai terjadinya aterosklerosis karena memberi kontribusi untuk generasi sel busa (*foam cell*), disfungsi endotel, dan proses inflamasi (Verhoye, 2009) sehingga diperlukan antioksidan sebagai pencegah patogenesis aterosklerosis.

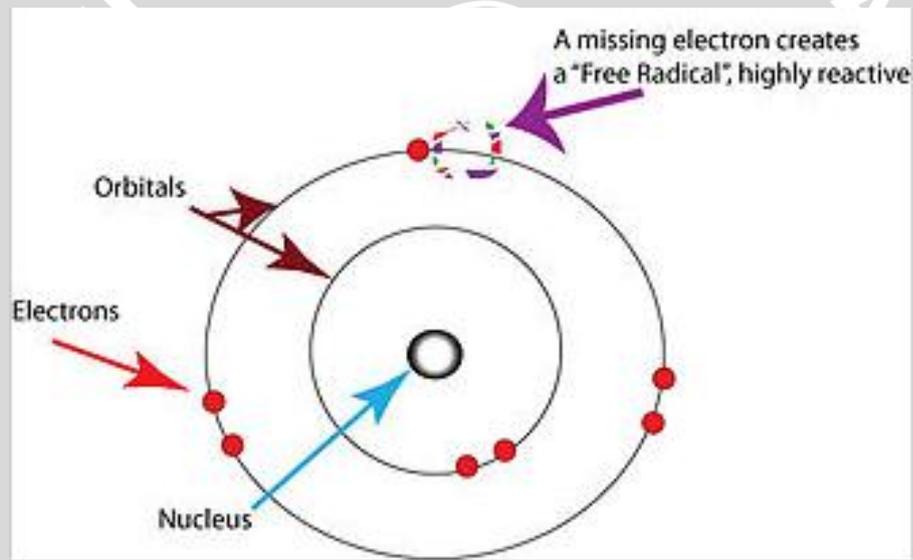
## 2.2 Radikal Bebas

### 2.2.1 Definisi radikal bebas

Pengertian radikal bebas pada abad ke 19 adalah sebuah kelompok atom yang dapat membentuk suatu molekul. Namun, pada abad ke 20 berkat penelitian Moses Romberg berkewarganegaraan Rusia, radikal bebas kemudian diartikan sebagai molekul yang relatif tidak stabil yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di orbit luarnya. Elektron yang tidak berpasangan ini mampu membentuk efek magnet yang menyebabkan radikal bebas berikatan dengan molekul yang ada di dekatnya (Saurisari, 2008). Radikal bebas ini termasuk atom hidrogen, logam – logam transisi, dan molekul oksigen (Gutteridge, 2000). Elektron yang tidak berpasangan ini sangat reaktif mencari pasangannya, dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul lain yang berada disekitarnya. Elektron yang terikat oleh senyawa radikal bebas tersebut bersifat ionik dan menimbulkan dampak yang tidak terlalu berbahaya. Namun jika elektron yang tidak berpasangan tersebut berikatan dengan elektron dari senyawa kovalen, maka akan menimbulkan efek yang berbahaya karena ikatan akan digunakan secara bersama-sama pada orbit terluarnya. Senyawa yang memiliki ikatan kovalen adalah molekul – molekul besar (biomakromolekular) seperti lipid, protein, dan DNA (Soetmaji, 1998). Radikal bebas mempunyai sifat yang sangat tidak stabil. Sifat yang tidak stabil ini disebabkan karena atom tersebut hanya memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (Winarsi, 2007)

Pada proses metabolisme yang normal, radikal bebas juga diproduksi. Adanya partikel kecil dengan tenaga besar dengan elektron bebas ini

menghasilkan beberapa fungsi fisiologis seperti mampu membunuh virus dan bakteri. Namun jika mempunyai tenaga yang sangat tinggi dan jumlah yang berlebihan, radikal bebas ini dapat merusak jaringan normal (Arief, 2007). Pembentukan senyawa radikal bebas bisa terbentuk dari senyawa lain yang sebenarnya bukan radikal namun sifatnya dapat berubah menjadi radikal (Winarsi, 2007). Radikal bebas ini akan mengganggu produksi DNA, lapisan lipid pada dinding sel, mempengaruhi pembuluh darah, dan, produksi prostaglandin (Droge, 2002).

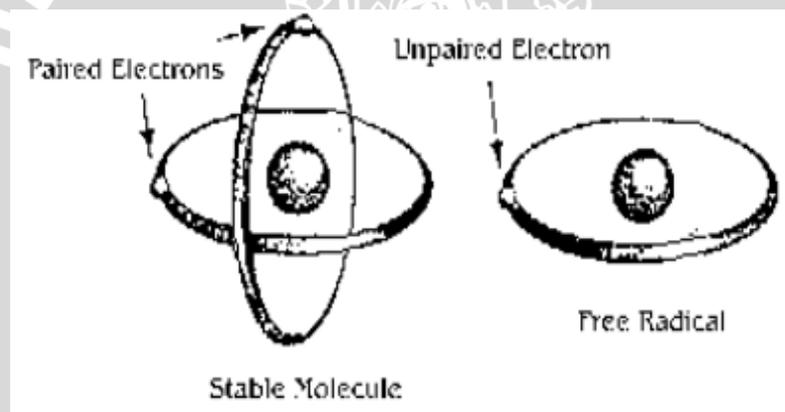


Gambar 2.4: Struktur Radikal Bebas (Healthvalue, 2012)

### 2.2.2 Struktur kimia radikal bebas

Atom terdiri dari nukleus, proton (bermuatan positif/kation), dan elektron (bermuatan negatif / anion). Jumlah proton dalam nukleus menentukan jumlah elektron yang mengelilingi atom tersebut. Jumlah elektron terluar dari suatu atom memiliki gambaran yang penting untuk menentukan sifat kimianya. Atom yang lapisan terluarnya penuh tidak akan terjadi reaksi kimia karena mencapai

keadaan stabilitas maksimum. Sedangkan atom yang lapisan terluarnya memiliki elektron yang tidak berpasangan akan berusaha melengkapinya agar dapat mencapai keadaan stabilitas maksimum, yaitu dengan cara menambah atau mengurangi elektron ataupun dengan membagi elektron – elektronnya dengan cara bergabung bersama atom yang lain. Untuk mendapatkan keadaan kimia yang stabil, radikal bebas tidak mampu bertahan lama dalam bentuk aslinya sehingga harus segera berikatan dengan bahan disekitarnya. Zat yang terambil elektronnya oleh radikal bebas akan memulai suatu reaksi berantai, yang akhirnya menyebabkan kerusakan dari sel tersebut (Arief, 2007)



Gambar 2.5: Struktur Kimia Radikal Bebas (Arief, 2007).

### 2.2.3 Tipe radikal bebas dalam tubuh

ROS (*reactive oxygen species*) adalah kelompok oksigen reaktif yang merupakan radikal bebas derivat dari oksigen yang berada di dalam tubuh (Arief, 2007). Pembentukan senyawa radikal bebas dapat terjadi dari proses kimia dalam tubuh ataupun terbentuk dari senyawa yang sebenarnya bukan radikal namun sifatnya berubah menjadi radikal (Winarsi, 2007). Radikal derivat dari oksigen ini termasuk di dalamnya adalah triplet ( $3O_2$ ), tunggal (singlet/ $^1O_2$ ),

peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), asam hipoklorus ( $\text{HOCl}$ ), hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), anion superoksida ( $\text{O}_2^-$ ), radikal hidroksil ( $-\text{OH}$ ), nitrit oksida ( $\text{NO}^-$ ), radikal alkoxy ( $\text{LO}^-$ ), dan radikal peroksil ( $\text{LO}_2$ ) (Arief, 2007).

Dalam tubuh kita juga banyak terdapat radikal bebas dari hasil metabolisme tubuh lainnya. Radikal bebas dari oksidasi molekul organik yaitu radikal bebas yang mengandung karbon ( $\text{CCL}_3$ ). Radikal bebas hasil dari penyerangan atom H ( $\text{H}^-$ ) yaitu radikal yang mengandung hidrogen. Radikal bebas yang diproduksi pada oksidasi glutation yaitu radikal bebas yang mengansung sulfur (Arief, 2007).

Tabel 2.2 Kelompok Oksigen Reaktif (Arief, 2007)

Kelompok Oksigen Reaktif	
$\text{O}_2^-$	Radikal superoksida ( <i>Superoxide radical</i> )
$-\text{OH}$	Radikal hidroksil ( <i>Hydroxyl radical</i> )
$\text{ROO}^-$	Radikal peroksil ( <i>Peroxyl radical</i> )
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hidrogen peroksida ( <i>Hydrogen peroxide</i> )
$^1\text{O}_2$	Oksigen tunggal ( <i>Singlet oxygen</i> )
$\text{NO}^-$	Nitrit oksida ( <i>Nitric oxide</i> )
$\text{ONOO}$	Nitrit peroksida ( <i>Peroxynitrite</i> )
$\text{HOCl}$	Asam hipoklor ( <i>Hypochlorous acid</i> )
$\text{LOO}$	Lipid peroksida ( <i>lipid peroxy radical</i> )

#### 2.2.4 Sumber radikal bebas

Radikal bebas yang berada di tubuh manusia bisa berasal dari proses metabolisme dalam tubuh (endogen) dan dapat berasal dari luar tubuh (eksogen) (Siswono, 2005).

##### 2.2.4.1 Dari dalam tubuh

Sumber radikal bebas dari dalam tubuh berasal dari proses autooksidasi, oksidasi enzimatik, dan *respiratory burst* (Arief, 2007). Autooksidasi menghasilkan pembentukan kelompok reaktif oksigen (Droge, 2002). Oksidasi enzimatik yaitu beberapa jenis enzim mampu menghasilkan radikal bebas seperti *xanthine oxidase*, *prostaglandin synthase*, *lipoxigenase*, *aldehyde oxidase*, dan *amino acid oxidase* (Inoue, 2001). *Respiratory burst* menggambarkan proses dimana sel fagositik menggunakan banyak oksigen selama fagositosis. Fagositik sel memiliki sistem *membran bound flavoprotein cytochrome-b-245 NADPH oxidase* yang inaktif. Teratifikasinya enzim tersebut karena bakteri yang diselimuti immunoglobulin, kompleks imun, komplemen 5a, atau leukotrien mengawali produksi superoksida (Albina, 1998). Dari dalam tubuh mencakup superoksida ( $O_2^*$ ), hidroksil ( $*OH$ ), peroksil ( $ROO^*$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), singlet oksigen ( $^1O_2$ ), oksida nitrit ( $NO^*$ ), dan peroksinitrit ( $ONOO^*$ ) (Siswono, 2005).

##### 2.2.4.2 Dari luar tubuh

Radikal bebas dari luar tubuh berasal dari asap rokok, populasi, radiasi, sinar UV, obat, pestisida, limbah industri, dan ozon (Siswono, 2005). Ada beberapa macam obat yang meningkatkan produksi radikal bebas dalam bentuk peningkatan tekanan oksigen. Radiasi pada radioterapi juga dapat menyebabkan

terjadinya kerusakan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas. Asap rokok merupakan penyebab kerusakan saluran napas karena jumlah oksidan yang pada rokok (Arief, 2007).

### 2.2.5 Reaksi radikal bebas dalam tubuh

Hiperglikemia dan inflamasi meningkatkan produksi ROS (spesies oksigen relatif) yang mengakibatkan peningkatan stres oksidatif dengan over – aktivasi NADPH oksidasi (Hariadi, 2005). Proses ini mengurangi bioavailabilitas nitrat oksida (NO) (Monaco, 2004). NADPH Oksidase memproduksi ROS utama yaitu anion superosida ( $O_2^-$ ). Secara fisiologis, produksi NO melebihi produksi  $O_2^-$  yang kemudian secara cepat dinetralkan oleh enzim antioxidant. Namun dalam kasus disfungsi endotel, produksi  $O_2^-$  melebihi produksi NO, sehingga  $O_2^-$  mengoksidasi NO yang menyebabkan terproduksi peroxinitrite dan memulai kaskade ROS. Terjadinya kaskade mengoksidasi karbohidrat, lipid, dan protein. Produk sampingan dari peroksidasi lipid adalah *malonyldialdehyde* (MDA), *4-hydroxy-nonenal* (HNE), dan *4-oxy-2-nonenal* (ONE), itu semua diperoleh dari oksidasi *polyunsaturated fatty acids*.

Pengukuran radikal bebas di dalam tubuh sulit untuk dilakukan karena radikal bebas bereaksi sangat cepat. Pengukuran radikal bebas sering dilakukan melalui produk rurunannya seperti MDA dan 4-hydroxy-nonenal (HNE) (Nabet, 1996). Status oksidatif atau antioksidan dipengaruhi oleh banyak faktor dari sindroma metabolik, yang mengarah pada oksidasi karbohidrat, lipid, dan protein.

### 2.2.6 produk oksidasi oleh radikal bebas

Diantaranya senyawa – senyawa oksigen reaktif, radikal hidroksil (OH) merupakan senyawa yang paling berbahaya karena tingkat reaktivitasnya tinggi. Radikal hidroksil dapat merusak 3 jenis senyawa penting yaitu asam lemak tak jenuh (PUFA), protein, dan DNA (Gutteridge, 2000).

#### 2.2.6.1 Produk oksidasi pada senyawa lipid

Asam lemak tak jenuh jamak (PUFA) merupakan komponen penting fosfolipid penyusun membran sel, dan mudah dirusak oleh bahan – bahan pengoksidasi; dinamakan peroksidasi lemak (Arief, 2007).



#### 2.2.6.2 Produk oksidasi pada protein

Protein memegang peran penting dalam pembentukan enzim, reseptor, antibodi, pembentuk matriks, dan sitoskeleton. Protein lebih tahan terhadap radikal bebas daripada PUFA (Arief, 2007).

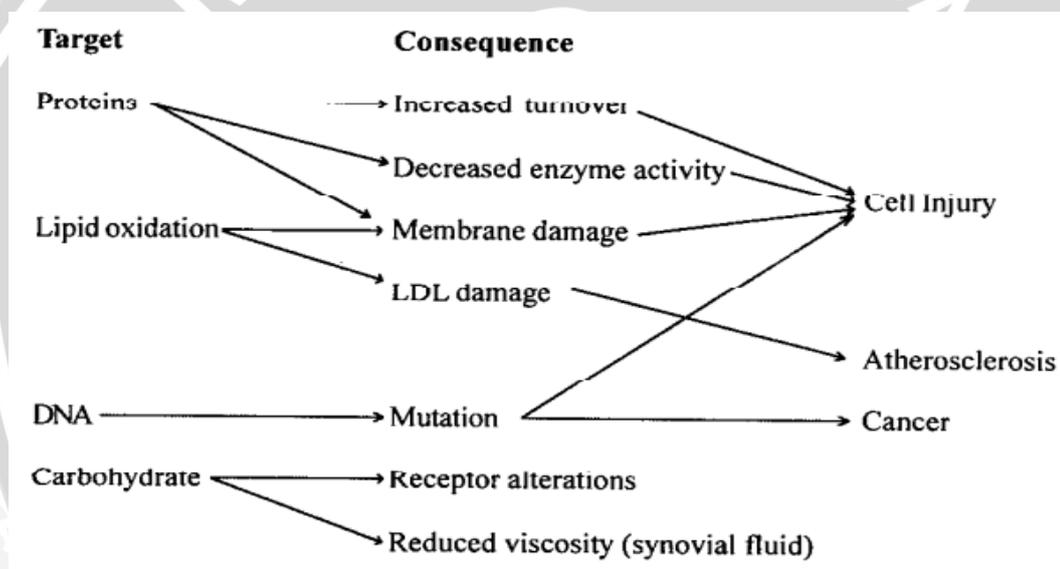
#### 2.2.6.3 Produk oksidasi pada DNA

Kerusakan pada DNA terjadi bila ada lesi pada susunan molekul. Radikal oksigen dapat menyerang DNA jika terbentuk disekitar DNA (Arief, 2007).

#### 2.2.6.4 Produk oksidasi pada karbohidrat

Ketoamine dan ketoaldehyde merupakan hasil dari oksidasi karbohidrat. Konsekuensi dari oksidasi karbohidrat adalah berkurangnya viskositas (cairan synovial) dan perubahan reseptor (Bagchi, 1998).

Gambar di bawah merupakan target peroksidasi dan konsekuensi yang dialami sehingga membuat manifestasi seperti aterosklerosis, kanker, dan *cell injury* (Bagchi, 1998)



Gambar 2.6 : Free Radical Damage (Bagchi, 1998)

### 2.3 MDA sebagai Marker Petanda Aterosklerosis

#### 2.3.1 Definisi MDA

Malondialdehyde (MDA) adalah produk dari hasil lipid peroksidasi dan hasil dari pemecahan endoperoksida. MDA dikenal  $C_3H_4O_2$ . MDA ini diukur sebagai indeks tidak langsung dari kerusakan oksidatif karena peroksidasi lipid. Dasar pemeriksaan adalah dimana satu molekul MDA akan terpecah menjadi 2 molekul

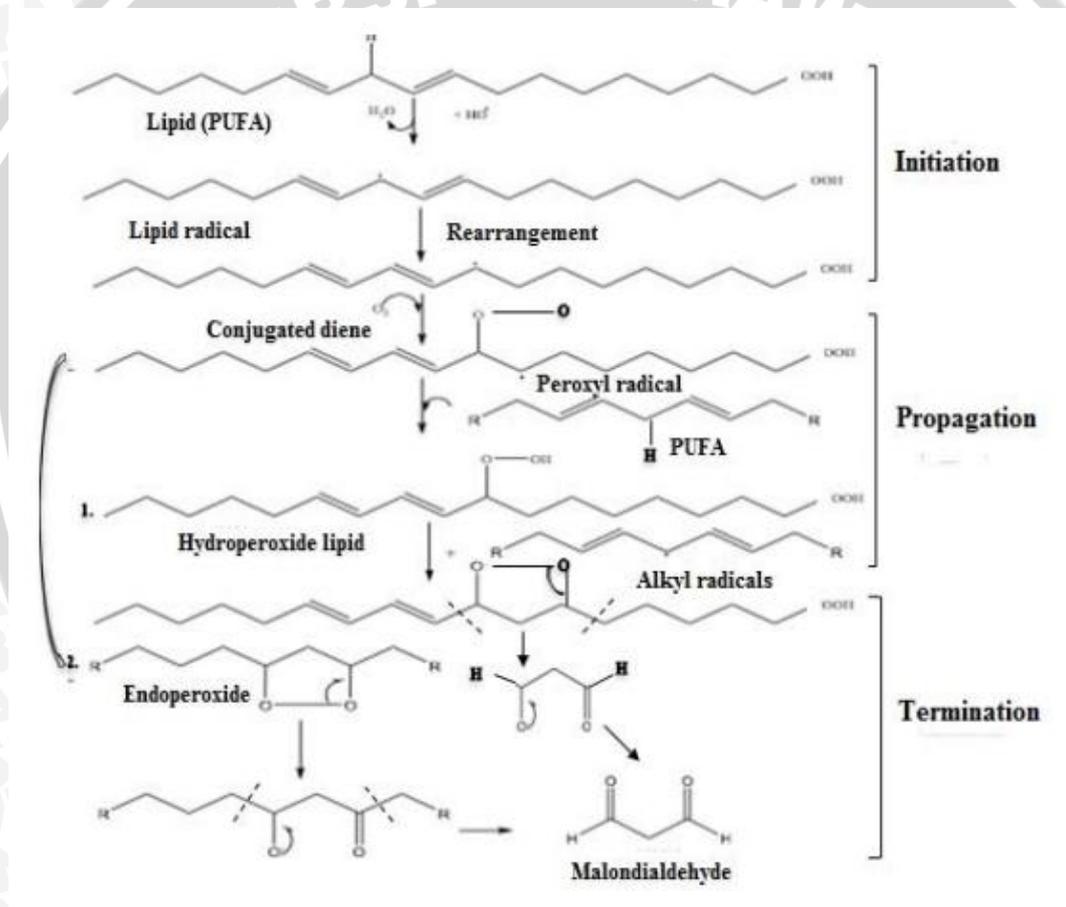
2-asam thiobarbiturat. Raksi ini berjalan pada pH 2-3. TBARS ini akan memberikan warna pink-chromogen yang dapat diperiksa secara spektrofotometrik (Arkhaesi, 2008).

Pengukuran radikal bebas di dalam tubuh sulit untuk dilakukan karena radikal bebas bereaksi sangat cepat. Pengukuran radikal bebas sering dilakukan melalui produk turunannya seperti MDA dan 4-hydroxy-nonenal (HNE) (Nabet, 1996).

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sargowo, dikemukakan bahwa pemberian pakan dengan diet tinggi lemak akan menimbulkan 3 faktor risiko aterosklerosis yaitu meningkatkan metabolisme lipid, stress oksidasi dan inflamasi. Kadar LDL dalam darah sangat mempengaruhi kadar MDA karena senyawa prekursor pembentukan MDA yaitu asam arakidonat, merupakan senyawa yang banyak sebagai lapisan fosfolipid pada membran luar LDL (Gustone, 1996). Namun kadar LDL dengan kadar MDA tidak berkorelasi cukup kuat, korelasi LDL dengan F2Isp jauh lebih besar dibandingkan dengan kadar MDA, karena F2Isp memiliki bentuk molekul yang lebih stabil, sehingga F2Isp dapat mengalami peningkatan sebanding dengan peningkatan kadar LDL. Demikian juga stress oksidasi yang dapat distimulasi oleh peningkatan LDL di pembuluh darah menjadi faktor penyebab terjadinya konversi *arachidonic acid* (AA) menjadi MDA (Sargowo, 2010). Pada penelitian sebelumnya juga disebutkan bahwa marker stress oksidasi yaitu MDA terbentuk lebih dahulu baru kemudian F2Isp. Hal ini menyebabkan korelasi MDA dengan jumlah sel busa pada perkembangan awal aterosklerosis lebih baik daripada F2Isp.

### 2.3.2 Pembentukan MDA

MDA merupakan molekul yang tidak stabil. MDA dalam aorta merupakan senyawa peroksida yang dihasilkan dari insitu asam arakidonat dari lipototein dalam sub endotel serta dari komponen membran sel penyusun jaringan pembuluh darah sedangkan MDA dalam serum berasal dari oksidasi AA di dalam lipoprotein.



Gambar 2.7 : Pembentukan MDA Berdasarkan Peroksidasi Lipid (Setin, 2013)

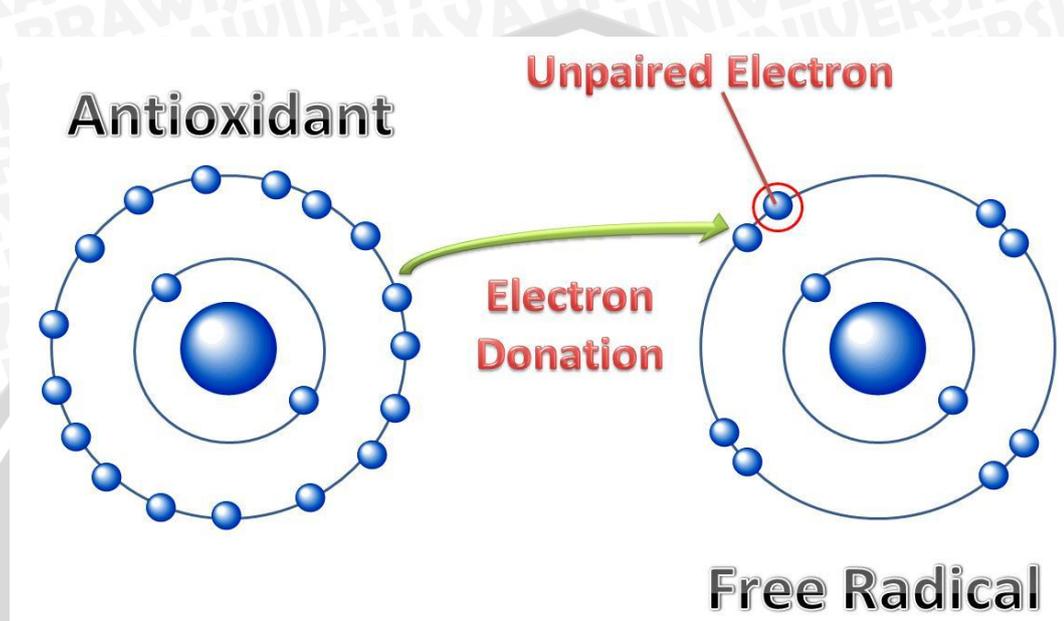
Ikatan C=C dari *polyunsaturated fatty acid (PUFA)* sebagai komponen dari lipid di sel membran dilekati oleh ROS (Setin, 2013). Peroksidasi lipid diawali dengan tahap inisiasi. Pada tahap inisiasi, asam lemak (RH) tersebut akan

terhidrogenasi menjadi radikal lipid ( $R^*$ ) dan ion hidrogen ( $H^*$ ) (Mokgope, 2006). Selanjutnya pada tahap propagasi dengan radikal peroksida ( $O_2^*$ ) dan membentuk radikal peroksida ( $ROO^*$ ). Radikal peroksida ini akan mengekstrak ion hidrogen dari lipida lain (RH) membentuk hidroksi peroksida (ROOH) dan radikal lipid baru ( $R^*$ ). Proses tersebut terus menerus berlanjut pada reaksi berantai tersebut. Pada tahap terminasi, hidroksi peroksida (ROOH) yang sangat tidak stabil terpecah menjadi senyawa organik berantai pendek yaitu malonyldialdehyde (MDA), 4-hydroxy-nonenal (HNE), dan 4-oxy-2-nonenal (ONE). Sehingga, semakin banyak jumlah radikal bebas akan meningkatkan produksi peroksidasi lipid diikuti dengan meningkatnya kadar MDA (Setin, 2013).

Peroksidasi lipid diawali dengan tahap inisiasi. Pada tahap inisiasi, asam lemak (RH) tersebut akan terhidrogenasi menjadi radikal lipid ( $R^*$ ) dan ion hidrogen ( $H^*$ ) (Mokgope, 2006). Selanjutnya pada tahap propagasi, dimana hasil dari tahap inisiasi, radikal lipid ( $R^*$ ) akan bertemu dengan radikal peroksida ( $O_2^*$ ) dan membentuk radikal peroksida ( $ROO^*$ ). Radikal peroksida ini akan mengekstrak ion hidrogen dari lipida lain (RH) membentuk hidroksi peroksida (ROOH) dan radikal lipid baru ( $R^*$ ). Proses tersebut terus menerus berlanjut pada reaksi berantai tersebut, pada tahap terminasi, hidroksi peroksida (ROOH) yang sangat tidak stabil terpecah menjadi senyawa organik berantai pendek yaitu malonyldialdehyde (MDA), 4-hydroxy-nonenal (HNE), dan 4-oxy-2-nonenal (ONE). Sehingga, semakin banyak jumlah radikal bebas akan meningkatkan kadar MDA (Setin, 2013).

## 2.4 Antioksidan

### 2.4.1 Gambaran umum



Gambar 2.8 : Mekanisme Umum Antioksidan (Clark, 2013)

Pengertian senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi reduktan atau elektron. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya radikal bebas melalui reaksi oksidasi (Winarsi, 2007). Senyawa antioksidan ini diperlukan untuk mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein dan lemak. Senyawa ini bekerja dengan cara memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa ada gangguan terhadap fungsinya dan dapat memutuskan reaksi berantai, dengan mendonorkan elektronnya maka aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat (Gutteridge, 2000).

## 2.4.2 Klasifikasi

### 2.4.2.1 Berdasar mekanisme kerja

#### 1. Antioksidan primer

Antioksidan primer mampu memberikan ion hidrogen atau elektron pada radikal bebas sehingga radikal bebas akan menjadi produk yang stabil. Hal ini akan memutus rantai pembentukan radikal bebas. Antioksidan primer ini diantaranya adalah *butylated hydroxytoluene* (BHT), *butylated hydroxyanisole* (BHA), *tertiarybutyl hydroquinone* (TBHQ), dan *gallates*. Antioksidan ini juga diketahui sebagai antioksidan sintetis (Mokgope, 2006)

#### 2. Antioksidan sekunder

Secara luas diklasifikasikan sebagai *oxygen scavenger* atau *chelator* (Mokgope, 2006). Antioksidan sekunder bekerja dengan cara mereduksi agen dengan mentransfer atom hidrogen. Asam askorbat, *ascorbyl palmitate* dan vitamin E, bekerja sebagai *oxygen scavengers* melalui reaksi dengan oksigen bebas (Gordon, 1990). *Chelator* seperti asam sitrat dan fosfat bukanlah antioksidan namun mereka efektif dalam bekerja secara sinergis dengan antioksidan primer dan scavenger oksigen. *Chelator* berfungsi sebagai pengikat logam – logam yang dapat mengkatalis reaksi oksidasi lemak seperti Fe dan Cu.

### 2.4.2.2 Berdasar sumber atau asal terbentuknya

Sumber-sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi tiga yaitu (1) antioksidan yang sudah ada di dalam tubuh manusia yang dikenal dengan enzim antioksidan. Enzim antioksidan ini diantaranya adalah SOD, GPx GSH dan CAT.

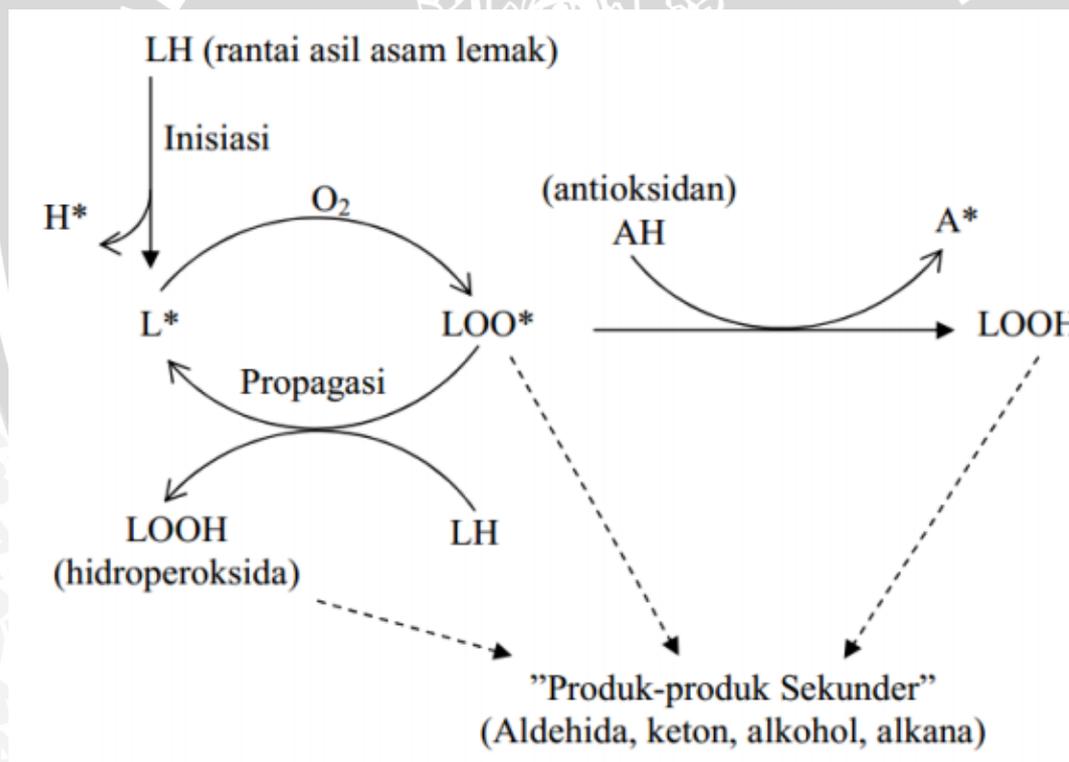
SOD (Superoksida dismutase dan katalase) mengkatalisasi dismutase dari superoksida dan hidrogen peroksida. GSH (glutation) peroksidase bekerja dengan cara mereduksi peroksida hidrogen dan organik menjadi air dan alkohol (Arief, 2007). Sedangkan, (2) antioksidan sintetis banyak digunakan pada produk pangan seperti BHA, BHT, dan TBHQ, dan (3) antioksidan alami yang banyak didapatkan berupa vitamin C, vitamin E, beta karotenoid, senyawa fenolik, turunan asam sinamat, kuomarin, tokofenol, pigmen seperti antosianin dan polifenol (Siswono, 2005; Ardiansyah, 2007). Antioksidan alami ini dapat diperoleh dari bagian-bagian tanaman, hewan dan mikroba.

#### **2.4.3 Mekanisme umum antioksidan terhadap radikal bebas**

Antioksidan mampu menetralkan radikal bebas. Antioksidan bertindak pada tahapan yang berbeda. Antioksidan ada yang bertindak pada tingkat pencegahan, intersepsi, dan perbaikan. Antioksidan yang bekerja dengan cara pencegahan yaitu mencoba untuk menghentikan pembentukan ROS (preventif antioxidant). Antioksidan tersebut termasuk SOD (Superoksida dismutase), katalase, glutathion peroksidase, glutathion, dan sistein. SOD bekerja dengan cara mengkatalisis dismutase dari superoksida menjadi  $H_2O_2$  dan molekul oksigen (Packer, 1995). Antioksidan yang bekerja dengan cara memutus reaksi rantai (chain breaking anti oxidant) contohnya vitamin C, vitamin E, glutathion, dan sistein.

Antioksidan bekerja melindungi sel dan jaringan dengan cara memusnahkan (*scavenge*) ROS secara enzimatik, mengurangi pembentukan ROS, mengikat ion logam, dan memperbaiki kerusakan sel target secara biomolekul (Robert, 2009).

Proses penambahan antioksidan pada tahap inisiasi maupun propagasi dapat menghalangi reaksi oksidasi. Molekul aktif dari lemak dapat bereaksi dengan oksigen menghasilkan peroksida aktif. Antioksidan akan mengurangi peroksida pada permulaan autooksidasi. Antioksidan akan dioksidasi secara langsung dengan peroksida dengan memutuskan rantai reaksi pembentukan gugusan peroksida tersebut sehingga reaksi oksidasi langsung atau tidak langsung dapat dicegah. Antioksidan menyebabkan peroksida yang aktif dipisahkan dari rantai reaksi dengan cara memindahkan energinya kepada antioksidan.



Gambar 2.9: Skema Autooksidasi Lipid (Sampaio, 2006)

## 2.5 Manggis

### 2.5.1 Klasifikasi Tumbuhan Manggis



Gambar 2.10 : Pohon Manggis (Kertamukti, 2012)

*Garcinia mangostana* L. merupakan tumbuhan tropis yang memiliki potensi untuk aplikasi terapeutik. *Garcinia mangostana* L. termasuk dalam family Guttiferae dan sering disebut dengan “the queen of fruits”. Tumbuhan ini banyak tumbuh di hutan tropis di beberapa Southeast Asian seperti Indonesia, Malaysia, Sri Lanka, Filipina, dan Thailand (Chaverri, 2008). Manggis merupakan salah satu buah unggulan Indonesia yang memiliki peluang ekspor cukup menjanjikan. Permintaan manggis meningkat dari tahun ke tahun seiring dengan kebutuhan

konsumen, ekspor manggis dari Indonesia mengalami peningkatan seiring dengan kebutuhan buah manggis dunia terutama Hongkong, Singapura, dan Inggris.



Gambar 2.11 : *Garcinia mangostana* L.

Kingdom: Plantae

Divisi: Magnoliophyta

Kelas: Magnoliopsida

Ordo: Malpighiales

Famili: Clusiaceae

Genus: *Garcinia*

Spesies: *Garcinia mangostana* L.

Buah manggis ini berwarna ungu gelap atau kemerahan, dengan daging yang putih, lembut, sedikit asam, dan manis (Jung, 2006). Kulit dari buah manggis ini sering digunakan untuk pengobatan oleh masyarakat di Southeast

Asians seperti pengobatan infeksi kulit dan luka (Mahabusarakam, 1987; Pierce, 2003), desentri amoeba (Garnett, 1932; Chopra, 1956), inflamasi dan diare (Balasubramanian, 1988).

### 2.5.2 Kandungan Kulit Manggis

*Garcinia mangostana L.* mempunyai banyak jenis metabolisme sekunder seperti *prenylated* dan *oxygenated xanthone* (Govindachari, 1971; Sultanbawa, 1980; Peres, 2000). Xanthone dapat terisolasi dari kulit seluruh dinding buah, dan daun dari manggis. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa xanthone yang didapatkan dari buah manggis memiliki aktivitas biologis yang luar biasa (Suksamrarn, 2006).

Jenis xanthone yang terisolasi dari kulit manggis adalah sebagai berikut (Chaverri, 2008):

Tabel 2.3 Jenis Xanthone dari Kulit Manggis (Chaverri, 2008)

Xanthone
A – mangostin
B – mangostin
Y – mangostin
Mangostanol
Mangostenol
1 – Isomangostin
1 – Isomangostin hydrate
3 – Isomangostin
3 – Isomangostin hydrate
1,6-Dihydroxy-7-methoxy-8-isoprenyl-6',6'- Dimethylpyranno(2',3':3,2)xanthone (compound 7)

Toxyloxanthone A (tranpezifolizanthone)

Calabaxanthone

Macluraxanthone

1,7-dihydroxyxanthone

Euxanthone

Cudraxanthone

8- dihydroxyxanthone G

Esmeatxanthone A

BR-xanthone A

BR-xanthone B

Mangostanin

Mangostenone A

Mangostenone B

Mangostinone

Gartanin

8-deoxygartanin

Garcinone A

Garcinone B

Garcinone C

Garcinone D

Garcinone E

Garcimangosone A

Garcimangosone B

Garcimangosone C

Garcimangosone D

Tovophyllin A

Tovophyllin B

1,5-dihydroxy-2-isoprenyl-3-methoxyxanthone

Mangostingone [7 -methoxy-2-(3- isoprenyl)-8-(3-methyl-2-oxo-3-buthenyl)-

1,3,6-trihydroxyxanthone

5,9-Dihydroxy-2,2-dimethyl-8-methoxy-7-isoprenyl-2H,6H-pyrano[3,2-b]

xanthen-6-one

2-(c,c-Dimethylallyl)-1,7-dihydroxy-3-methoxyxanthone



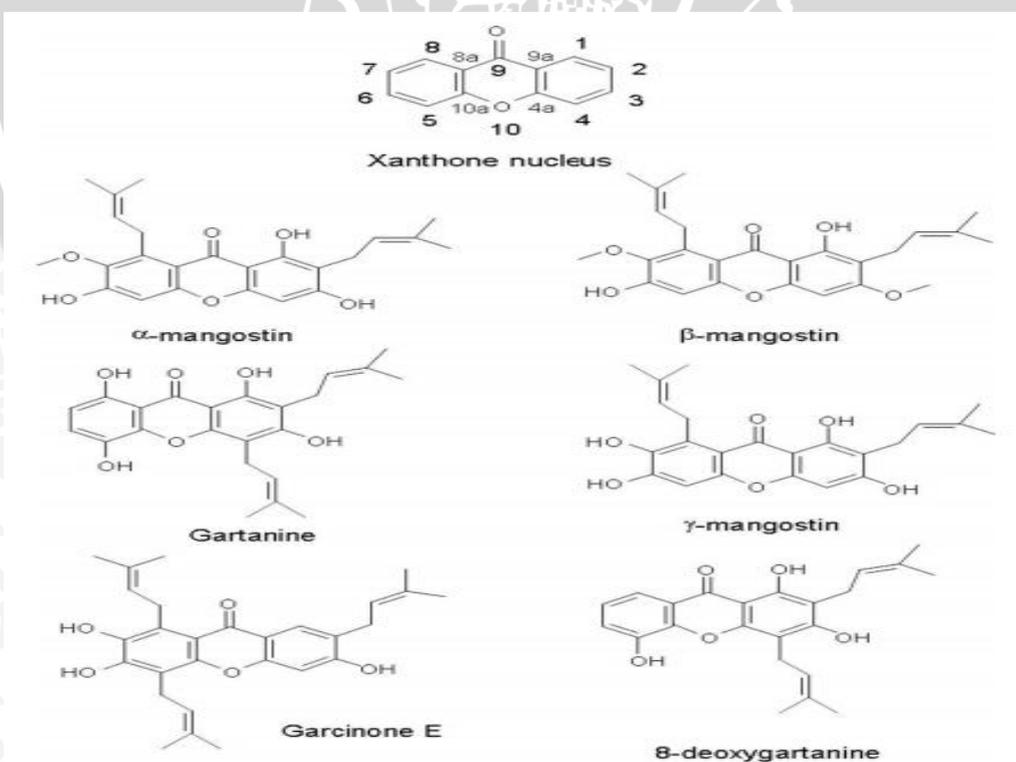
2,8-Bis(c, c-dimethylallyl)-1,3,7-trihydroxyxanthone  
1,3,7-Trihydroxy-2,8-di(3-methylbut-2-enyl) xanthone  
1,7-Dihydroxy-2-isoprenyl-3-methoxyxanthone  
2,7-Diisoprenyl-1,3,8-tribhydroxy 4-methylxanthone  
2,8-Diisoprenyl-7-carboxy-1-3 dihydroxyxanthone  
2-Isoprenyl-1,7-dihydroxy-3 methoxyxanthone  
1,3,6,7-Tereahydroxy-8-(3 methyl-2-buthenyl)-9H-xanthone-9-one

### 2.5.3 Aktifitas Biologis Kulit Manggis

Xanthone dan turunannya dilaporkan mempunyai aktivitas neuroprotective (Weecharngsan, 2006), antiulcer (Suksamrarn, 2003), dan aktivitas antioksidan (Jung, 2006), antimalarial, antimicrobial (Moongkarndi, 2004), aktivitas antiacne (Mahabusarakam, 2000), aktivitas cytoprotective (Kosema, 2007), anti kanker (Akao, 2008) dan penghambat reseptor histamin dan serotonin (Chairungsrilerd, 1996a).

Xanthone dapat diklasifikasikan menjadi 5 grup: (a) simple oxygenated xanthenes, (b) xanthone glycol-sides, (c) prenylated xanthenes, (d) xanthonolignoids and (e) miscellaneous xanthenes (Sultanbawa, 1980; Jiang, 2004).  $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $\gamma$  – mangostin, garcinone E, 8-deoxygartanin dan gartanin adalah jenis xanthone yang paling banyak dipelajari. Jenis xanthone  $\alpha$ - dan  $\gamma$ -mangostin adalah komponen bioaktif yang paling banyak ditemukan pada manggis (Jinsart, 1992). Kemungkinan xanthone menghambat efek biologisnya yaitu dengan cara menghambat induksi *nitric oxide synthase* (iNOS) dan ekspresif *cyclooxygenase-2* (COX-2) (Chen, 2007). Ekstrak kulit manggis ditemukan mempunyai aktifitas anti oksidan yang sangat signifikan pada *peroxynitrite-scavenging bioassay* (Jung, 2006). Aktifitas biologis dari  $\alpha$ -

mangostin telah diuji yaitu sebagai antagonis kompetitif pada reseptor histamine H-1 (Chairungrilerd, 1996b), aktivitas antibacterial yang melawan *Helicobacter pylori*, aktivitas anti inflamasi, dan mencegah proses oxidative damage pada LDL manusia. Pada penelitian Williams pada tahun 1995, menemukan bahwa  $\alpha$ -mangostin menurunkan oksidasi *low density lipoproteins* (LDL) (Williams, 1995). Penelitian Mahabusarakam juga menemukan bahwa  $\alpha$ -mangostin dan derivat sintetisnya mencegah penurunan  $\alpha$ -tocopherol yang diinduksi oleh oksidasi LDL (Mahabusarakam, 2000).  $\alpha$ -mangostin juga ditemukan dapat berfungsi untuk melawan produksi ROS secara langsung dan mencegah neurotoxicity. Pada penelitian profesor Sargowo yang telah dilakukan sebelumnya di Malang, Indonesia juga menyatakan bahwa cara kerja xanthone yang ditemukan di kulit manggis yaitu dengan cara menghambat kerja aktivasi transkripsi faktor NF- $\kappa$ B (Sargowo, 2010).



Gambar 2.12 : Struktur Kimia Komponen Bioaktif pada Kulit Manggis (Chaverri, 2008)

## 2.6 Model Aterosklerosis

### 2.6.1 Penggunaan *Rattus norvegicus* Strain Wistar sebagai Model In Vivo Aterosklerosis

Banyak variasi hewan coba kecil maupun besar yang digunakan dalam penelitian tentang proses aterosklerosis. Dan tidak ada model yang ideal, semuanya memiliki keuntungan masing – masing yang berbeda dan terbatasnya kemampuan adaptasi terhadap manipulasi proses aterosklerosis dan penyamaan manusia yang mengidap aterosklerosis atau pengecekan profil lipid. Murine model sering digunakan. Namun tidak semua murine yang aterosklerosis tersebut identik dengan manusia, penelitian menggunakan model murine menunjukkan proses potensi biologi dan interaksi dengan proses yang mendasar (Getz, 2012). Saat ini, semua model tikus aterosklerosis dipakai berdasarkan gangguan dari metabolisme lipoprotein yang berasal dari manipulasi diet dan atau manipulasi genetik. Meskipun, hiperlipidemia sangat penting untuk perkembangan aterosklerosis, model tikus menunjukkan bahwa banyak faktor non lipid yang dapat mempengaruhi keparahan dan karakteristik lesi (Alan, 2002). Penggunaan tikus Wistar sebagai hewan coba juga mempertimbangkan aspek kemudahan dalam mendapatkan model binatang, lebih murah, serta mampu beradaptasi dengan baik dengan teknik perlakuan (Indrapraja, 2009).

### 2.6.2 Cara Pembuatan Model Aterosklerosis

Banyak cara membuat seekor tikus menjadi model aterosklerosis. Diantaranya adalah bisa dengan cara diet kuning telur intermitten (Prasetyo, 2003), induksi kolesterol (Putri, 2013), dan diet aterogenik (Murwani, 2013).

Penelitian Prasetyo (2003) menyebutkan bahwa induksi hiperlipidemia pada binatang coba juga dapat dilakukan dengan pemberian diet kuning telur intermitten. Pada pemberian diet kuning telur intermitten ini didapatkan peningkatan kadar kolesterol total dan trigliserida secara nyata sehingga dapat meningkatkan jumlah kadar lipid dalam darah, namun LDL hanya mengalami sedikit peningkatan yaitu sebesar 1%. Namun dengan penambahan injeksi adrenalin dan diet kuning telur makan dapat meningkatkan kadar kolesterol total, LDL dan trigliserida, tetapi menurunkan kadar HDL, menambah jumlah sel busa dan menambah ketebalan dinding aorta (Lamanepa, 2005).

Pada penelitian pembuatan model hewan aterosklerosis yang lain juga dapat dengan cara menginduksi kolesterol pada tikus wistar jantan yaitu dengan mengkombinasikan pakan diet kolesterol dan propiltiourasil pada air minumnya, hal ini bertujuan agar terbentuk plak ateroma pada dinding pembuluh darah. Pada penelitian Putri (2013) menunjukkan bahwa pada semua kelompok hewan uji yang diinduksi selama 7 minggu dengan pakan diet kolesterol, propiltiourasil dalam air minum, dan pemberian kolesterol oral selama tujuh hari pada tiap fase induksi (awal induksi, akhir induksi, dan kombinasi keduanya) menunjukkan peningkatan kadar kolesterol serum total yang bermakna dan ketebalan plak ateroma yang terbentuk bermakna jika dibandingkan kelompok normal. Plak ateroma dengan ketebalan yang signifikan dan kadar kolesterol serum total tertinggi didapatkan pada kelompok perlakuan dengan kombinasi pemberian pakan diet kolesterol, propiltiourasil dalam air minum, dan pemberian kolesterol oral selama tujuh hari pada awal dan akhir induksi (Putri, 2013).

Pada penelitian Murwani (2013) dalam tujuannya mencari komposisi diet aterogenik pada tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) sebagai model hewan aeroklerosis, sampel penelitian dibagi menjadi 5 kelompok dengan komposisi pakan yang berbeda – beda namun dengan lama pemberian yang sama yaitu 8 minggu, dengan pemberian pakan sebanyak 40 mg/hari/tikus. Berikut adalah komposisi pakan tiap kelompok:

Tabel 2.4 Komposisi Pakan (Murwani, 2013)

Bahan Pakan	Pakan				
	Normal	I	II	III	IV
Confeed PAR-S	225 gr	200 gr	200 gr	200 gr	200 gr
Terigu	100 gr	100 gr	100 gr	100 gr	100 gr
Kolesterol	-	4 gr	8 gr	8 gr	8 gr
Asam Kolat	-	0,4 gr	0,4 gr	0,8 gr	0,8 gr
Minyak babi	-	10 ml	10 ml	10 ml	40 ml
Air	100 ml	85,6 ml	81,6 ml	81,2 ml	51,2 ml

Hasil penelitian Murwani menyatakan bahwa secara statistik, pada hasil pengukuran kadar kolesterol darah perbedaan yang bermakna ditemukan pada kelompok kontrol negatif atau normal dengan kelompok perlakuan pakan II, pakan III, dan pakan IV. Namun, pada pemeriksaan arcus aorta secara histopatologis pembentukan sel busa sebagai insial lesi dari aterosklerosis baru terlihat pada kelompok perlakuan pakan III dan pakan IV pada minggu ke 8.

Penelitian Ameli et al (1997) mengenai pembuatan model aterogenik pada hewan coba New Zealand White Rabbit, pada pakan normal mereka menambahkan kolesterol 1% dan minyak kacang 3%. Hasil penelitiannya

menunjukkan bahwa pada minggu ke 8 telah terbentuk fatty streak kecil pada aorta namun belum ada peningkatan kadar kolesterol darah yang bermakna.

Pemakaian kolesterol, minyak babi, dan asam kolat bertujuan untuk menginduksi LDL darah untuk mengalami peningkatan. Pada penelitian dengan menggunakan hewan laboratorium, pemberian kadar kolesterol makanan yang cukup tinggi dapat menaikkan kadar kolesterol total secara cepat. Penelitian yang dilakukan oleh Shinnik, *et al* (1990) jika menggunakan kolesterol kristal 1% di dalam diet 18 gr/ekor/hari selama 20 hari pada tikus, dapat mengubah kadar kolesterol tikus dari 85,8 mg/dl + 12,9 menjadi 112,2 mg/dl + 21,2.86. Penelitian mengenai keanekaragaman jumlah kolesterol di dalam makanan yang mempunyai efek terhadap produk endogen kolesterol pada tikus menunjukkan bahwa jika tikus diberi kolesterol sebesar 0,05%, maka 70-80% kolesterol akan disintesis di hati, usus halus dan kelenjar adrenal. Namun jika asupan kolesterol yang diberikan sebanyak 2%, maka produksi endogen akan turun. Biasanya penurunan 100 mg kolesterol dari makanan akan menyebabkan penurunan kurang lebih 0,13 mmol/L serum (Murray, 2003). Sedangkan hasil penelitian Murwani (2013) menunjukkan bahwa pemberian kolesterol <5% pada diet atherogenik selama 8 minggu tidak menimbulkan perbedaan kadar kolesterol bermakna dengan kelompok kontrol negatif.

Minyak babi mempunyai kandungan kolesterol tertinggi dibandingkan dengan minyak hewani atau nabati lainnya. Pemberian pakan tinggi lemak tinggi kolesterol dalam bentuk lemak babi 10% dan kolesterol murni sebanyak 10gr/kg pakan pada penelitian Yeny Sulistyowati (2006) terbukti dapat meningkatkan kolesterol dalam waktu 14 hari. Sedang pada penelitian Murwani (2013)

menunjukkan bahwa dengan penambahan minyak babi 5% yang diikuti dengan penambahan asam kolat 20,2% pada diet aterogenik selama 8 minggu, sudah dapat menginduksi terbentuknya sel busa dan menaikkan kadar kolesterol total secara bermakna.

Hasil penelitian Srivasta et al (2000) mengungkapkan bahwa induksi aterosklerosis pada menit diperlukan asam kolat yang ditambahkan pada pakan hewan coba. Dengan penambahan asam kolat akan memberikan gambaran lipoprotein lebih aterogenik, yaitu kadar HDL menurun dan kadar LDL meningkat. Hasil penelitian Murwani juga menunjukkan bahwa tanpa penambahan asam kolat 0.2% pada diet aterogenik selama 8 minggu, maka sel busa tidak terbentuk. Asam kolat diduga juga berfungsi untuk menurunkan kadar HDL, karena diet aterogenik tanpa penambahan asam kolat akan meningkatkan HDL maupun LDL.

Hasil penelitian Murwani (2013) menunjukkan bahwa tikus putih (*Rattus novergicus* strain *Wistar*) dapat digunakan sebagai hewan model aterosklerosis dan pada komposisi diet aterogenik yaitu dengan penambahan kolesterol 2%, asam kolat 0,2%, dan minyak babi 5% pada pakan normal selama 8 minggu dapat meningkatkan kolesterol darah secara bermakna dan menginduksi terbentuknya sel busa.