

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan selama 90 hari terhadap 20 ekor hewan coba tikus *Rattus Norvegicus Galur Wistar* jantan untuk mengetahui pengaruh pemberian *isoflapon* pada susu kedelai sebagai antioksidan dalam menghambat peningkatan jumlah *vasa vasorum* pada aorta tikus. Perlakuan terhadap tikus dalam penelitian ini terdiri dari 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (P0), dengan pemberian diet normal tanpa diberikan susu kedelai, kelompok kontrol positif (P1), dengan pemberian diet tinggi lemak tanpa pemberian susu kedelai, kelompok perlakuan 1 (D1), dengan pemberian diet tinggi lemak ditambahkan penyondean susu kedelai 0,81 gram/tikus/hari dalam 3 ml aquadest, kelompok perlakuan 2 (D2) dengan pemberian diet tinggi lemak ditambahkan penyondean susu kedelai 1,62 gram/tikus/hari dalam 3 ml aquadest, dan kelompok perlakuan 3 (D3), dengan pemberian diet tinggi lemak ditambahkan penyondean susu kedelai 3,24 gram/tikus/hari dalam 3 ml aquadest.

6.1 Jumlah *Vasa vasorum* Pada Aorta Tikus Dengan Diet Normal

Hasil penghitungan jumlah rata-rata *vasa vasorum* dari kelompok kontrol negatif / P0 adalah sebanyak 4,25 yang merupakan jumlah *vasa vasorum* paling sedikit diantara jumlah *vasa vasorum* dari kelima kelompok perlakuan. Dari analisis statistik diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol negatif (P0) dengan kelompok kontrol positif (P1) dan kelompok perlakuan dosis 1 (D1). Tetapi tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan dosis 2 (D2) dan dosis 3 (D3). Jumlah *vasa vasorum* yang hanya sedikit pada kelompok perlakuan negatif tersebut disebabkan karena

pada kelompok P0 tidak diberikan diet tinggi lemak, tetapi hanya diberi diet normal saja. Meskipun demikian kebutuhan kalornya sama-sama terpenuhi seperti pada kelompok perlakuan yang diberi diet tinggi lemak. Karena asupan makanan yang tidak mengandung banyak lemak, tidak terjadi hiperkolesterolemia dan proses aterosklerosis, sehingga jumlah *vasa vasorum* yang terbentuk tidak sebanyak pada kelompok yang diberi diet tinggi lemak.

Dalam keadaan normal radikal bebas tetap dihasilkan secara fisiologis namun dapat dinetralkan oleh antioksidan endogen (*super oksidan dismutase*, *katalase* dengan *glutation peroksidase*) sehingga pembentukan radikal bebas yang baru dapat dicegah dan radikal bebas yang ada diubah, sehingga dapat mengurangi efek negatif radikal terhadap oksidasi LDL yang akan menyebabkan terbentuknya *foam cell* yang merupakan tahap awal aterosklerosis. Pada tahun 1984, Barger, et al menunjukkan bahwa *vasa vasorum* jarang terdeteksi pada arteri koroner manusia dengan tidak adanya plak aterosklerosis. Kesimpulan yang dapat ditarik dari studi kumulatif menggunakan berbagai model hewan dan modalitas pencitraan menyebutkan bahwa angiogenik *vasa vasorum* membentuk pleksus dalam menanggapi proses penyakit. Pleksus tidak didapatkan pada hewan yang sehat (Barger et al.,1992;Endrinaldi, 2007;Mulligan-Kehoe, 2013).

6.2 Jumlah *Vasa vasorum* Pada Aorta Tikus Dengan Diet Tinggi Lemak

Hasil penghitungan jumlah *vasa vasorum* pada kelompok perlakuan positif (P1) memiliki nilai yang paling banyak yaitu rata-rata 18,5. Dari analisis statistik diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negative ($p=0,000$) dan kelompok perlakuan D1 ($p=0,005$),D2($p=0,000$) dan D3($p=0,000$). Jumlah *vasa vasorum* yang banyak pada kelompok kontrol positif disebabkan oleh pemberian diet tinggi

lemak setiap hari selama 90 hari. Diet tinggi lemak mengandung banyak asupan lemak yang berasal dari penambahan kolesterol, minyak babi dan asam kolat pada makanan sehingga dapat menginduksi terjadinya hiperkolesterolemia. Adanya peningkatan berat badan pada tikus yang lebih dari 30% juga mengindikasikan adanya hiperkolesterol yang diakibatkan oleh kondisi obesitas yang memicu timbulnya aterosklerosis.

Hiperkolesterolemia dapat memicu respon peradangan (*inflamasi*) pada pembuluh darah melalui aktivitas sel endotel, *rolling* dan *adhesi leukosit*, aktivasi platelet dan penurunan *bioavailabilitas nitric oxide* (NO). Hiperkolesterolemia juga dapat menyebabkan peningkatan jumlah radikal bebas berupa ROS (*reactive oxygen species*) sehingga terjadi disfungsi endotel yang dapat menyebabkan *infiltrasi LDL* ke dalam *subendotel* aorta. *Disfungsi endotel* memacu *adhesi monosit*, sel darah putih yang tertimbun dibawah lapisan monolayer endotel, dan menjadi *makrofag*. *Makrofag* dalam keadaan normal berperan penting selama inflamasi. *Makrofag* melakukan peran tersebut dengan bekerja sebagai sel pengangkut (*scavenger cell*) untuk mengangkut sel mati dan benda asing, dan juga melepaskan sitokin dan faktor pertumbuhan untuk memacu penyembuhan. *Makrofag* dalam dinding arteri dapat teraktivasi secara abnormal, menyebabkan suatu tipe reaksi inflamasi lambat, yang akhirnya menghasilkan plak lanjut dan berbahaya secara klinis (Philip et al., 2007).

Makrofag adalah sel yang memiliki kemampuan untuk merubah tidak hanya metabolisme anaerob tetapi juga metabolisme aerob. Hal ini dapat meningkatkan kebutuhan oksigen karena terjadinya hipoksia. Perkembangan aterosklerosis melibatkan perubahan struktural dan fungsional dalam dinding pembuluh darah. Sementara *disfungsi endotel* yang ditandai dengan gangguan relaksasi endotelium dianggap sebagai salah satu kelainan fungsional pada awal

aterosklerosis. Perubahan struktural pada lapisan *adventisia* khususnya oleh *vasa vasorum* juga dapat terjadi pada awal proses penyakit (Hermann, 2001;Mayr,2008).

Hipoksia telah dianggap sebagai hubungan antara *angiogenesis vasa vasorum* dan pertumbuhan plak. Satu hipotesis menyebutkan bahwa hipoksia menginduksi transkripsi faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF), faktor pertumbuhan angiogenik dominan. Penelitian telah menunjukkan bahwa *neovaskularisasi vasa vasorum* sesuai dengan up regulasi VEGF dan *regulator transkripsi hipoksia* yang diinduksi *faktor-1 (HIF-1)*. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa hipoksia pada plak karotid manusia berkorelasi dengan kehadiran makrofag dan *angiogenesis vasa vasorum*. Para penulis menyimpulkan bahwa hipoksia dirangsang oleh tingginya permintaan metabolisme sel-sel inflamasi.(Sluimer et al., 2008;Bayer et al., 2002; Mulligan-Kehoe, 2013).

Pada aterosklerosis terjadi pembentukan *vasa vasorum* yang merupakan kompensasi dari terjadinya hipoksia. *Angiogenesis vasa vasorum* melibatkan mekanisme molekuler yang hingga saat ini masih banyak diperdebatkan. Dari hasil penelitian disebutkan bahwa *angiogenesis vasa vasorum* dapat diketahui dari peningkatan kadar VEGFR-1 jaringan aorta yang diperiksa dengan metode ELISA.VEGFR-1 merupakan *reseptor tyrosin kinase* yang berikatan dengan VEGF.VEGFR-1 diekspresikan oleh sel inflamasi pada angiogenesis patologis yang berhubungan dengan aterosklerosis (Maes,2004).

Peningkatan kadar VEGFR-1 pada penelitian menunjukkan terjadinya *angiogenesis vasa vasorum*. Hal tersebut dikonfirmasi dengan hasil pengamatan secara histopatologi anatomi menggunakan pengecatan *HE* untuk mengidentifikasi *vasa vasorum* yang terbentuk. Pertambahan durasi dapat

meningkatkan jumlah *vasa vasorum* pada kelompok perlakuan hewan coba *Rattus Norvegicus Strain Wistar* dengan pemberian *High Fatty Diet* (Wihastuti *et al*,2014).

Dalam keadaan biasa pembuluh *adventisia* tidak meradang tetapi sekali aterogenesis berlangsung peradangan *adventisia* meningkat dengan tingkat keparahan pembentukan plak aterosklerosis. Reaksi inflamasi ini terkait dengan peningkatan *vasa vasorum*. Karena pembuluh baru ini dibentuk terhubung ke pembuluh utama, neovaskularisasi dari *vasa vasorum* ini juga dapat berfungsi sebagai entri untuk makrofag dan faktor inflamasi yang mungkin berkontribusi terhadap perkembangan penyakit (Moulton *at al*,2003;O'Brien*etal*,1996).

Pada penelitian ini jumlah *vasa vasorum* pada kelompok kontrol positif adalah yang paling tinggi dibanding dengan kelompok yang lain. Tingginya jumlah *vasa vasorum* ini sebagai kompensasi untuk memenuhi kebutuhan metabolit dinding pembuluh darah karena adanya hipoksia dan proses inflamasi sebagai akibat dari proses terjadinya aterosklerosis. Peningkatan jumlah yang berlebihan dan pembentukan *vasa vasorum* yang luas, rapuh dan belum dewasa berhubungan dengan pertumbuhan dan ketidakstabilan plak diduga dapat berdampak terhadap terjadinya ketidak stabilan plak dan berkontribusi terhadap cedera *intra plak hemorhagi* sehingga perlu untuk dihambat.

6.3 Jumlah Vasa vasorum Pada Aorta Tikus Kelompok Perlakuan

Dalam penelitian ini dapat dilihat terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan dosis 1(D1) dosis 2 (D2)maupun dosis 3(D3). Hal ini dimungkinkan karena kedelai memiliki kandungan antioksidan *isoflavon* yang tinggi. Kandungan dan manfaat yang terdapat dalam susu kedelai sangat banyak. Protein, berguna untuk

pertumbuhan, perbaikan jaringan yang rusak, penambah imunitas tubuh. Protein pada susu kedelai tersusun oleh sejumlah asam amino (*lesitin, arginin, lisin, glisin, niasin, leusin, isoleusin, treonin, triptofan, fenilalanin*). Protein yang terkandung dalam kedelai diketahui kaya akan asam amino arginin dan glisin yang merupakan komponen penyusun hormon *insulin* dan *glukogen* yang disekresi oleh kelenjar pankreas dalam tubuh kita (Sofian,2008).

Pemberian *isoflavan* dalam susu kedelai dengan dosis 0,81gram ,1,62 gram dan 3,24 gram dalam 3ml aquades/tikus/hari bersama dengan pemberian diet tinggi lemak selama 90 hari dapat menghambat peningkatan jumlah *vasa vasorum* secara bermakna ($p < 0,05$; D1 = 10,25 Dengan prosentase penurunan 44,5% dan D2 : 7,75 dengan persentase penurunan 58,1%,dosis D3;6,25 dengan prosentase penurunan 66,2% dibandingkan dengan jumlah *vasa vasorum* kelompok kontrol positif (P1 = 18,50) yang diberikan diet tinggi lemak saja. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian susu kedelai dapat menghambat peningkatan jumlah *vasa vasorum* secara bermakna. Terdapat perbedaan yang tidak bermakna ($p < 0,05$) dari jumlah *vasa vasorum* antara kelompok yang diberi susu kedelai dosis 1(D1),dosis 2(D2) dan dosis 3 (D3). Juga terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok perlakuan dosis2 (D2) dan dosis 3 (D3) dengan kelompok kontrol negatif (P0). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan pemberian susu kedelai dengan dosis 0,81,dosis 1,62 dan dosis 3,24 gram/tikus/hari dapat menghambat peningkatan jumlah *vasa vasorum* secara signifikan ($p < 0,05$).

Ikatan sejumlah asam amino dengan vitamin dan beberapa zat gizi lainnya dalam biji kedelai membentuk *flavonoid*. *Flavonoid* adalah sejenis pigmen, seperti halnya zat hijau daun yang terdapat pada tanaman yang berwarna hijau. Secara ilmiah *flavonoid* sudah dibuktikan mampu mencegah dan mengobati berbagai penyakit. Dan salah satu jenis *flavonoid* yang sangat banyak

terdapat pada biji kedelai dan amat bermanfaat bagi kesehatan adalah *isoflavon* (Sofian,2008).

Menurut penelitian, isoflavon dapat mencegah oksidasi *low-density lipoprotein* (LDL), sehingga mengurangi *atherogenesis* dan menurunkan reabsorpsi tulang, menurunkan prevalensi kanker payudara dan kanker prostat, dan mengurangi risiko aterosklerosis, penyakit neuro degeneratif dan osteoporosis (Otieno dan Shah, 2006).

Sebagai salah satu golongan *flavonoid*, senyawa bioaktif *isoflavon* yang mengandung gugus fenolik telah dilaporkan mempunyai kemampuan sebagai antioksidan dan mencegah terjadinya kerusakan akibat radikal bebas melalui dua mekanisme, yaitu mendonorkan ion hidrogen dan bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas secara langsung. Struktur *meta 5, 7-dihidroksil* pada cincin A menunjukkan kemampuan *isoflavon* untuk berperan sebagai donor ion hidrogen sehingga terbentuk senyawa yang lebih stabil dan terbentuk radikal fenoksil yang kurang reaktif . sedangkan gugus *4'-hidroksil* pada cincin B senyawa *isoflavon* berperan sebagai *scavenger* senyawa ROS (Arora *et al.*, 1998; Nijveldt *et al.*, 2001;Oteiza *et al.*, 2005).

Konfigurasi grup *hidroksil* pada cincin B senyawa *flavonoid* telah dilaporkan berperan sebagai *scavenger* senyawa ROS. Dikemukakan lebih lanjut bahwa grup *hidroksil* pada cincin B dapat mendonorkan *ion hidrogen* dengan mendonorkan sebuah elektron ke radikal *hidroksil* dan *peroksil*, menstabilkan kedua radikal tersebut, serta membentuk radikal *flavonoid* yang relatif lebih stabil. Flavonoid efektif sebagai *scavenger* radikal hidroksil dan radikal peroksil (Lee *et al.*, 2004).

Hasil penelitian membuktikan bahwa pembentukan *vasa vasorum* berhubungan dengan proses modifikasi oksidatif yang terjadi pada *Rattus Norvegicus Galur Wistar* yang diberikan diet tinggi lemak. Modifikasi oksidatif

pada dinding pembuluh darah yang berkontribusi terhadap aterogenesis memerlukan sumber anti oksidan untuk mempertahankan keseimbangan sehingga kerusakan seluler akibat dari stress oksidatif dapat diminimalkan. Berbagai substansi antioksidan dapat mencegah atau secara signifikan menghambat proses oksidasi. Antioksidan menjadi substansi yang efektif melawan kerusakan oksidatif (Haliwell.,1999;Wihastuti.,2014).

Dari hasil penelitian menggunakan susu kedelai ini pada dosis 0,81gram/tikus/hari, 1,62 gram/tikus/hari dan dosis 3,24 gram/tikus/hari terbukti dapat menghambat peningkatan jumlah *vasa vasorum* secara signifikan. Namun untuk mendapatkan jumlah *vasa vasorum* yang cenderung mendekati jumlah yang sama dengan kelompok perlakuan pakan normal adalah pada kelompok perlakuan dosis 2 dan dosis 3. Dengan demikian susu kedelai dapat dijadikan alternatif pilihan terapi non farmakologi untuk meningkatkan status anti oksidan di dalam tubuh dan mencegah progresifitas aterosklerosis. Peran *isoflavin* susu kedelai sebagai agen anti oksidan dan anti inflamasi terbukti dapat menghambat peningkatan jumlah *vasa vasorum* pada aorta tikus *Rattus Norvegicus Galur Wistar* yang diberi diet tinggi lemak.