

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui hubungan pengaruh Peptida Polisakarida dalam mengurangi ketebalan intima-media aorta tikus putih (*Rattus Norvegicus*) yang diberi diet tinggi lemak. Diet yang digunakan dalam penelitian ini mengandung kadar kolesterol yang tinggi. Kandungan yang ada di dalamnya termasuk minyak (lemak) babi, kuning telur dan minyak (lemak) kambing yang mengandung lemak jenuh sterol yang kaya kandungan kolesterol, minyak kelapa (sawit) yang mengandung banyak trigliserida dan asam cholat digunakan untuk mempertahankan kolesterol dalam darah (Dachriyanus.dkk, 2007), yang penting kaitannya dengan penebalan intima-media aorta. Sementara sampel yang digunakan secara homogen adalah tikus berjenis kelamin jantan yang sehat agar tidak dipengaruhi oleh hormone estrogen yang mempengaruhi metabolisme lemak dan kolesterol. Tikus ini berumur 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram, dipelihara dalam kandang yang berventilasi khusus dan kebersihan yang cukup.

6.1 Ketebalan Intima-media Aorta Tikus dengan Diet Normal

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap kelompok tikus dengan diet normal, didapatkan berat badan terendah hasil peningkatan berat badan sesuai dengan meningkatnya intake makanan. Pada kelompok ini digunakan pakan PARS biasa tanpa diberikan diet tinggi lemak, kelompok tikus ini mengalami peningkatan berat badan seiring dengan bertambahnya usia, dan hasil pengukuran terhadap ketebalan intima-media aorta dengan angka terkecil sebesar

68.53 μm , sedangkan angka terbesar 77.08 μm sehingga diperoleh rata-rata kelompok sebesar $72.31 \pm 3.18 \mu\text{m}$. Hal ini dapat dibuktikan dari hasil pengamatan terhadap dengan pengecatan HE.

Analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ($p < 0.05$) antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terjadi proses aterosklerosis pada tikus tersebut, sehingga ketebalan intima-media aorta jauh lebih kecil dibandingkan dengan kelompok tikus kontrol positif.

Ketebalan intima-media aorta tikus normal pada penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Mello *et al* (2004), bahwa rata-rata ketebalan intima-media aorta *Rattus norvegicus* normal adalah 2.65 μm pada tunika intimanya, dan 71.6 μm pada tunika medianya.

6.2 Ketebalan Intima-media Aorta Kelompok Tikus dengan Diet Tinggi Lemak

Pengukuran ketebalan intima-media aorta tikus pada kontrol positif adalah 82.74 μm sedangkan angka terbesar sebesar 104.25 μm sehingga diperoleh rata-rata kelompok $90.80 \pm 8.28 \mu\text{m}$. Angka ketebalan intima-media aorta kelompok ini tertinggi diantara kelompok lain. Menurut hasil analisa statistik, terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif. Begitu pula bila dibandingkan dengan kelompok tikus dengan perlakuan. Tujuan dari kelompok ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian diet tinggi lemak yang diberikan selama 8 minggu terhadap ketebalan intima-media aorta.

Kandungan kolesterol, asam lemak, dan lemak babi yang terdapat dalam makanan yang diberikan pada tikus setiap harinya dapat menyebabkan

peningkatan kadar kolesterol dalam darah. Tingginya kadar kolesterol dalam darah dapat menyebabkan kondisi hiperlipidemia pada tikus. Hiperlipidemia merupakan faktor penyebab terjadinya aterosklerosis. Mekanisme ini terjadi karena LDL akan di oksidasi oleh tubuh menjadi Ox-LDL yang selalu menghasilkan produk radikal bebas atau yang biasa disebut ROS. Apabila jumlah LDL semakin tinggi, maka makin banyak pula radikal bebas yang dihasilkan. Tubuh memiliki kemampuan secara otomatis melawan adanya radikal bebas melalui senyawa yang dinamakan antioksidan, dan apabila ROS yang dihasilkan banyak tetapi antioksidan dalam tubuh sedikit, ROS akan menurunkan viabilitas NO yang dapat memicu kerusakan endotel yang merupakan awal terjadinya proses aterosklerosis. Menurut Gunawijaya (2000), kerusakan sel endotel menyebabkan terjadinya hiperplasia sel otot polos vaskular, oleh karena ketidakmampuan sel endotel vascular mensintesis NO. Penebalan yang terjadi ini diperankan oleh fenotip sintetik yang dimiliki oleh sel otot polos oleh karena fenotip tersebut memiliki kemampuan yang lebih besar dalam mengekspresikan *VLDL*, *LDL* dan *scavenger receptor*. Dalam kondisi hiperlipidemia, kandungan *VLDL* dan *LDL* dalam darah lebih besar, sehingga semakin banyak pula stimulus aterosklerosis yang diekspresikan oleh fenotip sintetik (Doran *et al*, 2008). Penebalan dinding aorta tikus ini juga dipicu oleh reaksi inflamasi. Reaksi ini terjadi saat pembentukan Ox-LDL. Ox-LDL akan mengaktifkan faktor transkripsi $\text{NF}\kappa\beta$ yang dapat menginduksi protein-protein system imun dan molekul perantara yang dapat menimbulkan progresifitas aterosklerosis (Collins, 2001).

American heart association menggolongkan lesi aterosklerosis menjadi delapan tipe. Tipe lesi yang terjadi pada kelompok tikus penelitian ini termasuk dalam lesi tahap awal yang disebut *initial change* dimana proses yang terjadi

dalam penjelasan diatas merupakan awal dari isolasi makrofag sel busa. Apabila proses ini tidak dihambat, maka makrofag sel busa akan terus terbentuk. Terbentuknya sel busa melalui fagositosis akan terus mengeluarkan ROS yang nantinya menjadi reaksi yang lebih kompleks sampai dengan terbentuk fibrous plaque. Apabila fibrous plaque tersebut ruptur, maka akan terjadi komplikasi yang lebih berat.

6.3 Ketebalan Intima-media Aorta Kelompok Tikus dengan Diet Tinggi Lemak Yang Telah Diberikan PsP Pada 50, 150, Dan 300 mg/KgBB

Pengukuran ketebalan intima-media aorta kelompok tikus dengan diet tinggi lemak dan diberikan PsP dosis 50mg/kgBB memiliki ketebalan paling kecil 77.97 μm dan yang paling besar 95.51 μm sehingga diperoleh rata-rata kelompok sebesar $89.34 \pm 6.95 \mu\text{m}$. Kelompok tikus ini memiliki angka ketebalan yang lebih kecil dibandingkan dengan kelompok tikus kontrol positif. Pemberian diet tinggi lemak bersamaan dengan PsP dosis 50 mg/kgBB selama satu bulan dapat menurunkan ketebalan intima-media namun tidak signifikan bila dibandingkan dengan kontrol positif. Sedangkan pada kelompok tikus dengan pemberian diet tinggi lemak bersamaan dengan PsP dosis 150 mg/kgBB selama satu bulan memiliki ketebalan intima-media aorta paling kecil sebesar 78.00 μm , sedangkan yang paling besar 86.36 μm sehingga diperoleh rata-rata kelompok sebesar $80.62 \pm 3.35 \mu\text{m}$. Angka ketebalan intima-media aorta pada kelompok ini lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol positif ($90.80 \pm 8.28 \mu\text{m}$) maupun kelompok PsP dosis 50 mg/kgBB. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian dosis PsP yang ditinggikan memiliki kemampuan secara signifikan ($p < 0,05$) menurunkan ketebalan intima-media aorta tikus.

Pada kelompok perlakuan terakhir yaitu dengan memberikan diet tinggi lemak disertai dengan pemberian PsP dosis 300 mg/kgBB menunjukkan angka ketebalan intima-media aorta yang paling kecil sebesar 70.04 μm , sedangkan angka yang paling besar adalah 71.33 μm , sehingga diperoleh rata-rata kelompok sebesar $70.66 \pm 0.53 \mu\text{m}$. Rata-rata yang diperoleh dari perhitungan dinding pembuluh darah pada kelompok ini hasilnya paling kecil dari semua kelompok tikus. Bila ketebalan intima-media aorta kelompok ini dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ($90.80 \pm 8.28 \mu\text{m}$), ketebalan intima-media aorta pada kelompok ini jauh lebih kecil, begitu pula bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa dosis PsP yang lebih tinggi dapat mengurangi angka ketebalan intima-media jauh lebih banyak secara signifikan ($P < 0.05$) dibandingkan dosis yang lebih kecil.

6.4 Menganalisis Perbedaan Ketebalan Intima-media Aorta pada Tiap Kelompok

Pada hasil pengamatan, terdapat perbedaan berat badan yang signifikan antara tikus kontrol positif dengan kontrol negatif. Hal ini terjadi karena tikus pada kontrol positif diberikan diet aterogenik, sedangkan kontrol negatif diberikan diet normal. Berat badan yang tinggi memiliki potensi yang besar untuk mengalami dyslipidemia, dimana dyslipidemia merupakan faktor risiko terjadinya proses aterosklerosis.

Hasil penelitian oleh Baraas, 2006 membuktikan bahwa mengonsumsi makanan tinggi lemak dapat menyebabkan disfungsi endotel. Hal tersebut mengawali patogenesis aterosklerosis melalui oksidasi lipoprotein LDL (*Low Density Lipoprotein*). Oksidasi LDL diperantarai oleh enzim-enzim serta radikal

bebas yang ada di dalam lapisan intima pembuluh darah. ROS yang dihasilkan oleh hasil oksidasi tersebut menyebabkan kerusakan endotel dan menurunnya NO yang menyebabkan proliferasi otot polos dibawah intima. LDL yang teroksidasi (Ox-LDL) tersebut juga dikenali sebagai benda asing sehingga nantinya terperangkap di dalam makrofag, yang kemudian membentuk *lipid droplet*, dan berkembang menjadi *foam cell*. (Ross, 1999). Menurut Jingsong (2005), pada penelitian sebelumnya dengan menurunkan kadar LDL dalam darah terhadap tikus yang diberikan western diet, mampu menurunkan ketebalan intima-media pembuluh darah dengan syarat HDL yang terkandung masih dalam keadaan yang tinggi.

Kemudian berdasarkan analisis deskriptif menunjukkan bahwa ketebalan intima-media aorta pada kelompok percobaan berkisar antara 68.53 μm sampai dengan 104.25 μm . Ketebalan intima-media aorta tikus dengan angka terkecil didapatkan pada kelompok tikus dengan perlakuan normal dan tertinggi pada kelompok kontrol positif. Kemudian melalui hasil rata-rata kelompok menunjukkan ketebalan intima-media aorta dengan angka tertinggi adalah pada kelompok kontrol positif, sedangkan terendah pada kelompok perlakuan dengan PsP dosis 300mg/kgBB. Hal ini menunjukkan bahwa diet tinggi lemak berpengaruh terhadap ketebalan intima-media aorta berbanding lurus dengan kenaikan berat badan yang cenderung meningkat pada kelompok tikus.

Perbedaan yang terjadi baik antar tikus perlakuan maupun dengan kelompok kontrol dapat dibedakan melalui uji One way ANOVA dimana terdapat perbedaan signifikan antara dua kelompok yang dapat dibuktikan secara rinci melalui uji Post Hoc. Kontrol positif bila dibandingkan dengan kelompok PsP dosis 50 mg/kgBB menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan. Artinya, kedua

kelompok ini masih memiliki keadaan yang sama dimana angka ketebalan intima-media masih tinggi. Dalam hal ini PsP dosis 50 mg/kgBB tidak dapat digunakan sebagai terapi. Pada kelompok PsP dosis 150 mg/kgBB menunjukkan perbedaan yang signifikan baik dengan kelompok kontrol negatif maupun dengan kontrol positif. Hal tersebut menunjukkan bahwa PsP dosis 150 mg/kgBB belum bisa mencapai hasil yang maksimal apabila digunakan sebagai terapi menurunkan ketebalan intima-media aorta tikus. Namun sangat berbeda pada hasil perbandingan kelompok kontrol negatif dengan dosis PsP 300 mg/kgBB. Hasil menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar dua kelompok ini, sedangkan bila kontrol negatif tersebut dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, PsP dosis 50 mg/kgBB, dan PsP dosis 150 mg/kgBB akan menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hal tersebut menunjukkan bahwa dosis tinggi yang diberikan kepada kelompok tikus mampu menurunkan angka ketebalan intima-media aorta.

Perbedaan dosis PsP yang diberikan kepada kelompok tikus dalam penelitian ini adalah dari jumlah kandungan β -glukan. Semakin tinggi dosis, maka semakin besar pula kandungan β -glukan di dalamnya. Berbagai penelitian telah melaporkan manfaat β -glukan yaitu sebagai: antiseptik, antioksidan, *antiaging*, aktivator sistem kekebalan tubuh, proteksi terhadap radiasi, antiinflamasi, antikolesterol, antidiabetes, dan sebagainya (Kusmati, 2006). PsP yang mengandung beta glukan dapat digunakan untuk mencegah mekanisme aterosklerosis sebagai antioksidan sesuai dengan teori penghambatan oleh antioksidan yang dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron dan menghambat reaksi berantai pembentukan radikal bebas yang memicu terjadinya stres oksidatif (Indigomorie, 2009). Menurut Jia 2009 dan You 2002, melalui penelitian-penelitian sebelumnya, kandungan antioksidan yang

terdapat dalam polisakarida *Ganoderma lucidum* dapat mencegah penurunan enzim antioksidan jaringan dan dapat memberikan perlindungan seluler terhadap *reactive oxygen species* melalui kerusakan terhadap makrofag di sejumlah hewan model stres oksidatif.

Pernyataan mengenai peranan antioksidan terhadap stress oksidatif tersebut juga di dukung oleh penelitian yang membuktikan bahwa antioksidan yang diberikan kepada subyek dengan resiko hyperlipidemia secara efektif dapat mencegah gangguan fungsi endotel (Baraas, 2006). Antioksidan yang terdapat dalam PsP ini akan bereaksi dengan radikal bebas membentuk molekul yang stabil dan tidak membahayakan. Apabila reaksi tersebut terjadi, maka gangguan fungsi endotel pada pembuluh darah dapat dihambat. Hal tersebut dapat mencegah terbentuknya makrofag yang teraktivasi sehingga tidak ada zat *kemoatraktan* dan sitokin yang dikeluarkan. Zat kemoatraktan dan sitokin ini berperan dalam proses migrasi sel otot polos dari media. Proses inilah yang menyebabkan ketebalan intima-media pembuluh darah baik melalui adanya proliferasi sel otot polos maupun adanya tumpukan *foam cell* (Char, 2005).

Berdasarkan pada tinjauan pustaka yang ada, penelitian ini mampu membuktikan bahwa PsP dapat menurunkan ketebalan intima-media aorta tikus pada proses terbentuknya aterosklerosis. Pada umumnya tahapan reaksi dalam proses aterosklerosis ini menghasilkan ROS. Sebagai antioksidan, PsP dapat menghambat terbentuknya ROS pada tahap oksidasi LDL yang disebabkan karena hyperlipidemia dan tahap fagositosis yang dilakukan oleh makrofag. Apabila reaksi tersebut terus berlangsung, maka akan terjadi fagositosis dari makrofag terus menerus sampai dengan terbentuknya *foam cell*. *Foam cell* yang terbentuk di tunika media dinding pembuluh darah dapat menyebabkan angka

ketebalan lebih besar. PsP disini dapat menghambat terbentuknya *foam cell* lebih banyak, hal ini dapat mencegah timbulnya proses aterosklerosis yang lebih kompleks seperti akumulasi dari fibrous plak yang dapat menyebabkan sumbatan pembuluh darah. Efek anti inflamasi yang terdapat pula dalam PsP *Ganoderma lucidum* ini dapat pula menghambat munculnya agen proinflamasi yang datang akibat sifat kemoatraktan yang dimiliki oleh makrofag.

Menurut hasil pengukuran dinding aorta dari kelompok perlakuan dosis 300 mg/kgBB, hasilnya lebih kecil dari pada kontrol negatif. Maka, sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut kandungan apa saja yang terdapat dalam PsP dan uji toksisitas untuk mengetahui keamanan penggunaan PsP dosis tinggi. Meskipun dalam penelitian sebelumnya β -Glukan terbukti secara ilmiah sebagai *biological defense modifier* (BDM) dan termasuk kategori *generally recognized as safe* (GRAS) menurut FDA, serta tidak memiliki toksisitas atau efek samping (Thontowi dkk, 2007), uji toksisitas yang dilakukan adalah untuk menguji adanya kandungan zat lain yang memungkinkan terjadinya efek toksik terhadap dinding pembuluh darah maupun organ lainnya.