

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh PSP *Ganoderma lucidum* terhadap penghambatan penebalan PVAT pada aorta tikus galur Wistar jantan yang diberi diet tinggi lemak. Ketebalan PVAT dihitung pada aorta yang diambil dari tikus yang sebelumnya sudah dibedah terlebih dahulu dan kemudian dijadikan preparat dengan pulasan HE (Hematoksilin-Eosin).

6.1 Ketebalan PVAT pada Kelompok Tikus yang Diberikan Diet Normal

Pada pengukuran PVAT aorta kelompok tikus yang diberikan diet tinggi lemak (kontrol negatif), didapatkan hasil pengukuran sebesar 86,43 μm . Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil dari empat kelompok lainnya. Ini disebabkan karena kelompok kontrol negatif hanya diberikan diet normal dan bukan diet tinggi lemak seperti empat kelompok tikus lainnya, sehingga berat badan tikus pada kelompok kontrol negatif cenderung lebih rendah dibandingkan kelompok lainnya.

Berdasarkan grafik 5.2, berat badan tikus pada kelompok kontrol negatif mengalami peningkatan ± 100 gram dari awal penelitian hingga minggu ke-8, sedangkan pada minggu ke-8 hingga minggu ke-12, tikus juga mengalami peningkatan berat badan yang lebih rendah dibandingkan dengan sebelumnya, yaitu sebesar ± 80 gram. Peningkatan berat badan ini dikarenakan tikus yang masih terus tumbuh dan berkembang. Meskipun berat badan tikus kelompok kontrol negatif

paling rendah, namun berdasarkan grafik 5.1, intake pakan kelompok kontrol negatif yang diberikan diet normal merupakan intake paling tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya yang diberikan diet tinggi lemak, baik pada minggu ke-8 maupun pada minggu ke-12. Ini dikarenakan diet normal tikus per 100 gram memiliki kandungan gizi berupa energi: 344 kkal, protein: 19 gram, lemak: 4 gram, dan karbohidrat: 58 gram (Luthfiah dan Widjajanto, 2011). Diet normal tidak mengandung lemak yang tinggi, hanya sebesar 4 gram per 100 gram, sehingga tidak akan memberikan pengaruh peningkatan berat badan yang tinggi meskipun dikonsumsi lebih banyak. Berat badan tikus yang cenderung rendah ini menyebabkan tidak terjadinya peningkatan ROS dan massa PVAT yang berarti, sehingga tidak menyebabkan terjadinya disfungsi PVAT.

Pada kondisi normal, PVAT mempunyai peranan penting dalam regulasi pembuluh darah, karena PVAT mensekresi adipokin termasuk sitokin, kemokin, dan hormon yang dapat berfungsi secara parakrin, autokrin, maupun endokrin (Britton dan Fox, 2011). Adipokin yang paling sering dipelajari dan diteliti adalah adiponektin dan leptin. Fungsi adiponektin pada pembuluh darah yaitu memberikan efek vasodilatasi secara langsung, menurunkan proliferasi atau migrasi sel otot polos vaskuler, antiinflamasi, dan ikut serta memberikan efek antikontraktil. Leptin juga merupakan salah satu hormon penting yang disekresi oleh adiposit. Level leptin di sirkulasi sebanding dengan massa jaringan lemak, sehingga pada obesitas terjadi hiperleptinemia. Fungsi leptin pada pembuluh darah hampir sama dengan fungsi dari adiponektin (Szasz et al., 2013).

6.2 Ketebalan PVAT pada Kelompok Tikus yang Diberikan Diet Tinggi Lemak

Pada pengukuran PVAT aorta kelompok tikus yang diberikan diet tinggi lemak (kontrol positif), didapatkan hasil pengukuran sebesar 142,96 μm . Hasil ini lebih besar dibandingkan dengan hasil dari kelompok kontrol negatif yang memiliki ketebalan PVAT yang cenderung normal. Hasil ini juga lebih besar dibandingkan dengan hasil dari kelompok tikus yang diberikan PSP berbagai dosis.

Grafik 5.1 menunjukkan bahwa intake pakan kelompok kontrol positif menduduki posisi kedua setelah kelompok kontrol negatif. Intake pakan kelompok kontrol positif ini cenderung stabil dari minggu ke-8 hingga minggu ke-12, yaitu berkisar antara 22-24 gram. Kelompok kontrol positif ini diberikan pakan berupa diet tinggi lemak yang berbahan dasar PARS dan ditambah dengan kolesterol, asam kolat, dan minyak babi untuk menginduksi peningkatan LDL darah. PARS biasa digunakan sebagai bahan dasar dalam membuat pellet. Asam kolat ditambahkan pada PARS karena tanpa penambahan asam kolat, pemberian diet tinggi lemak selama 8 minggu tidak dapat meningkatkan kadar kolesterol dan terbentuknya sel busa secara bermakna, sehingga untuk menginduksi terjadinya proses aterosklerosis diperlukan tambahan asam kolat pada diet yang diberikan untuk tikus. Sedangkan minyak babi digunakan karena memiliki kandungan kolesterol yang lebih tinggi dibandingkan dengan minyak nabati maupun dengan minyak hewani lainnya (Murwani et al., 2013).

Dengan pemberian diet tinggi lemak ini dapat merubah profil lipid tikus menjadi lebih aterogenik, yaitu kadar HDL menjadi menurun dan LDL plasma meningkat. Sebenarnya diet tinggi lemak tanpa penambahan asam kolat akan

meningkatkan baik HDL maupun LDL, namun dengan penambahan asam kolat, HDL pun dapat diturunkan dan profil lipid dapat menjadi lebih aterogenik. Diet tinggi lemak diberikan selama 8 minggu karena berdasarkan penelitian sebelumnya yang tidak menggunakan asam kolat, telah terbentuk *fatty streak* kecil pada dinding aorta tikus meskipun memang belum terdapat peningkatan kadar kolesterol yang bermakna. Sehingga ditambahkan asam kolat dengan tujuan yang telah disebutkan sebelumnya diatas (Murwani et al., 2013).

Pemberian diet tinggi lemak pada kelompok positif ini menyebabkan peningkatan berat badan yang tinggi, sehingga tikus cenderung mengalami kelebihan berat badan. Berdasarkan grafik 5.2, berat badan tikus pada kelompok kontrol positif mengalami peningkatan ± 100 gram dari awal penelitian hingga minggu ke-8, begitu pula pada minggu ke-8 hingga minggu ke-12, tikus juga mengalami peningkatan berat badan yang sama dengan sebelumnya, yaitu ± 100 gram. Pada minggu ke-8, berat badan tikus kelompok kontrol positif tidak berbeda jauh dengan berat badan tikus kelompok yang lain. Namun pada minggu ke-12, berat badan tikus kelompok kontrol positif mengalami peningkatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya, sehingga berat badan kelompok ini menjadi paling tinggi diantara kelompok lain, yaitu sebesar 306 gram.

Berat badan yang berlebih dapat memicu perubahan pada PVAT, baik secara struktural maupun fungsional. Secara struktural, dapat terjadi peningkatan jumlah PVAT dan ukuran adiposit, sedangkan secara fungsional, dapat terjadi pergeseran fungsi PVAT yang semula protektif menjadi bersifat destruktif bagi pembuluh di sekitarnya (Fernandez-Alfonso et al., 2013). Pada keadaan tubuh

normal (tidak mengalami obesitas), PVAT memiliki efek antikontraktil (Galvez et al., 2006), namun pada pasien atau hewan model obesitas, terjadi perubahan pada pola ekspresi faktor-faktor yang dihasilkan oleh PVAT, sehingga efek anti kontraktil dan fungsi vaskular lainnya menghilang (Owen et al., 2013). Hilangnya efek antikontraktil dari PVAT ini terkait dengan penurunan regulasi dari ADRF dan leptin (Fernandez-Alfonso et al., 2010).

Diet tinggi lemak juga menyebabkan sitokin dan kemokin yang disekresi oleh PVAT menjadi lebih proinflamasi dan ini terkait dengan terjadinya stress oksidatif pada PVAT (Bailey-Downs et al., 2013). Selain itu, diet tinggi lemak juga menyebabkan penurunan adiponektin, peningkatan makrofag dan stress oksidatif vaskular pada tikus. Sitokin proinflamasi yang dikeluarkan oleh PVAT dapat menarik makrofag sehingga memperberat inflamasi dan disfungsi PVAT tersebut (Wang et al., 2012). Peningkatan stress oksidatif yang disebabkan oleh pemberian diet tinggi lemak ini kemudian dapat meningkatkan aktivitas NADPH oksidase dan produksi O_2^- serta menurunkan ekspresi dan aktivitas SOD, sehingga terjadi gangguan produksi H_2O_2 . Mekanisme inilah yang berkontribusi terhadap hilangnya efek antikontraktil dari PVAT (Marchesi et al., 2009).

SOD dan H_2O_2 sebenarnya merupakan ROS yang mempunyai peran penting dalam modulasi fungsi pembuluh darah oleh PVAT. NADPH oksidase merupakan sumber utama dari O_2^- pada pembuluh darah dan juga diekspresikan pada PVAT arteri tikus (Gao et al., 2006). O_2^- nantinya akan dikonversi oleh SOD menjadi H_2O_2 , ROS yang lebih stabil. H_2O_2 merupakan substansi vasoaktif yang dapat menginduksi respon kontraktile maupun relaksasi pada pembuluh darah dengan beberapa

mekanisme (Ardanaz dan Pagano, 2006). Efek kontraktile dari H_2O_2 disebabkan oleh aktivasi cyclooxygenase secara langsung dan juga peningkatan Ca^{2+} intraseluler (Suvorava et al., 2005). H_2O_2 juga menginduksi relaksasi endotel yaitu dengan membuka kanal K^+ pada otot polos dengan mengoksidasi residu sisteinnya dan juga dengan mengaktifkan soluble guanylate cyclase (sGC) dari otot polos (Gao et al., 2006). Karena O_2^- menyebabkan kontraksi, sedangkan H_2O_2 menyebabkan relaksasi pembuluh darah, hasil akhir dari kedua efek tersebut akan bergantung pada keseimbangan produksi kedua ROS tersebut, sehingga aktivitas SOD pada PVAT disini sangatlah penting (Gil-Ortega et al., 2009). Selain itu, peningkatan ROS dapat mengaktifkan PPAR- γ yang dapat memicu terjadinya peningkatan jumlah PVAT dan ukuran adiposit sehingga menyebabkan PVAT lebih menebal dan semakin memperberat disfungsi PVAT yang terjadi.

6.3 Ketebalan PVAT pada Kelompok Tikus yang Diberikan Diet Tinggi Lemak dan PSP dengan Dosis 50, 150, dan 300 mg/kgBB

Pada pengukuran PVAT aorta kelompok tikus yang diberikan diet tinggi lemak dan PSP dengan dosis 50, 150, dan 300 mg/kgBB, didapatkan hasil pengukuran berturut-turut sebesar 125,06; 114,56; dan 104,98 μm . Ketiga hasil ini lebih kecil dibandingkan dengan ketebalan PVAT dari kelompok kontrol positif. Secara deskriptif, penurunan ketebalan PVAT mulai terjadi pada pemberian PSP dengan dosis 50mg/kgBB dan terus terjadi hingga pemberian dosis PSP 300 mg/kgBB. Ini menunjukkan bahwa seiring dengan penambahan dosis PSP, maka ketebalan PVAT akan semakin menurun.

Grafik 5.1 menunjukkan bahwa intake pakan tiga kelompok dosis PSP 50 mg/kgBB, 150 mg/kgBB, dan 300 mg/kgBB lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan kontrol negatif. Intake pakan tiga kelompok tersebut sedikit meningkat 1-2 gram dari minggu ke-8 hingga minggu ke-12. Intake pakan ini cenderung stabil pada kisaran 16-20 gram. Pakan yang diberikan pada ketiga kelompok dengan dosis PSP ini sama dengan kelompok kontrol positif, yaitu diet tinggi lemak selama 8 minggu terlebih dahulu agar profil lipidnya bisa menjadi lebih aterogenik, baru kemudian diberikan PSP dan diteruskan pemberian diet tinggi lemaknya selama 4 minggu pada awal minggu ke-9 untuk melihat pengaruh terapinya.

Dengan diberikan pakan diet tinggi lemak tersebut, berdasarkan grafik 5.2 berat badan kelompok tikus perlakuan dengan berbagai dosis PSP ini lebih tinggi dari kelompok kontrol negatif, namun masih lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Pada awal penelitian, berat badan tikus tiga kelompok ini hanya berkisar ± 100 gram dan kemudian mengalami peningkatan pada minggu ke-8 hingga melebihi 200 gram. Hingga minggu ke-12, berat badan tikus tiga kelompok ini masih terus mengalami kenaikan, sehingga mencapai ± 270 gram.

PSP yang bersifat sebagai antioksidan yang dapat menghambat peningkatan ROS sehingga menghambat terjadinya stres oksidatif yang dapat menurunkan ekspresi dan aktivitas SOD, sehingga tidak terjadi peningkatan O_2^- yang tinggi. Tidak adanya stress oksidatif ini juga menyebabkan PPAR- γ menjadi tidak teraktivasi, sehingga tidak terjadi peningkatan jumlah adiposit yang berpengaruh pada

ketebalan PVAT. Sehingga dapat terjadi penurunan ketebalan PVAT seiring dengan pemberian dosis PSP.

6.4 Analisis Perbedaan Ketebalan PVAT pada Tiap Kelompok Tikus

Pada selang kepercayaan 95%, hasil uji *Post Hoc* menunjukkan bahwa ketebalan PVAT pada kelompok kontrol positif berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif, kelompok PSP dosis 150 mg/kgBB dan kelompok tikus dengan dosis PSP 300 mg/kgBB. Ini menunjukkan bahwa pemberian diet tinggi lemak tanpa pemberian PSP berpengaruh dalam peningkatan ketebalan PVAT tikus, yang disebabkan oleh karena peningkatan kadar ROS dan radikal bebas lainnya. Selain itu, ketebalan PVAT pada kelompok kontrol negatif tidak berbeda bermakna dengan kelompok tikus dengan dosis PSP 150 mg/kgBB dan PSP 300 mg/kgBB. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian PSP dengan dosis 150 mg/kgBB pada tikus yang diberi diet tinggi lemak sudah memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan ketebalan PVAT pada tikus yang diberi diet tinggi lemak sehingga ketebalannya mendekati normal. Dari hasil analisis yang didapat, dapat diambil kesimpulan bahwa PSP dapat menurunkan ketebalan PVAT mulai dari dosis terkecil yaitu 50 mg/kgBB hingga dosis terbesar yaitu 300 mg/kgBB. Namun perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol positif baru terlihat pada dosis PSP 150 mg/kgBB, sehingga dosis ini sudah dapat dikatakan sebagai dosis yang signifikan pengaruhnya dalam menurunkan ketebalan PVAT.

PSP yang terkandung dalam *Ganoderma lucidum* berperan sebagai antioksidan yang dapat menghambat penebalan PVAT dengan cara menangkap

ROS yang meningkat akibat dari pemberian diet tinggi lemak. Mekanisme penangkapan ROS ini disebabkan oleh peningkatan aktivitas enzim-enzim *scavenger* seperti SOD dan CAT. Hal ini berkaitan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa pemberian PSP dapat meningkatkan aktivitas dari SOD dan CAT yang merupakan dua enzim *scavenger* utama dalam menghilangkan racun-radikal bebas *in vivo*. Peningkatan aktivitas ini memungkinkan bahwa PSP mempunyai aktivitas penangkap radikal bebas yang dapat menimbulkan efek menguntungkan terhadap perubahan patologis yang disebabkan oleh adanya O_2^- dan OH^- (Jia *et al.*, 2008). Selain itu, pada penelitian lain juga telah dilaporkan bahwa pemberian PSP dapat mencegah atau meredam penurunan enzim antioksidan jaringan pada sejumlah hewan model stres oksidatif sehingga menyebabkan timbulnya perlindungan seluler terhadap ROS (Lakshmi *et al.*, 2006).

Penangkapan ROS oleh enzim *scavenger* ini menyebabkan terjadinya penghambatan aktivasi dari PPAR- γ yang merupakan *master regulator* dari adipogenesis. Namun mekanisme ROS dalam mengaktivasi PPAR- γ ini belum diketahui secara pasti (Liu *et al.*, 2012). Akibat adanya penghambatan aktivasi dari PPAR- γ , diferensiasi dan infiltrasi dari preadiposit pun juga terhambat sehingga tidak terjadi peningkatan jumlah adiposit yang dapat menyebabkan terjadinya disfungsi PVAT (Meijer *et al.*, 2011). Oleh karena adanya penghambatan terhadap penebalan PVAT, hal inilah yang kemudian menyebabkan tidak terjadinya peningkatan sitokin-sitokin proinflamasi dan penurunan NO, sehingga proses disfungsi endotel pun dapat dicegah. Jika disfungsi endotel dapat dicegah, diharapkan tidak terjadi proses-proses selanjutnya yang dapat menyebabkan terbentuknya plak aterosklerosis.