

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Degeneratif

2.1.1 Definisi

Penyakit degeneratif adalah penyakit non infeksi yang disebabkan oleh menurunnya fungsi sel, jaringan dan organ sejalan dengan bertambahnya usia manusia. Penyakit degeneratif merupakan penyakit kronik menahun yang banyak mempengaruhi kualitas hidup serta produktifitas seseorang. Penyakit-penyakit degeneratif tersebut antara lain penyakit kardiovaskuler (jantung dan pembuluh darah) termasuk hipertensi, diabetes melitus dan kanker (Brunner dan Suddarth, 2002). Sedangkan menurut Japardi (2012), penyakit degeneratif adalah istilah yang secara medis digunakan untuk menerangkan adanya suatu proses kemunduran fungsi sel saraf tanpa sebab yang diketahui, yaitu dari keadaan normal sebelumnya ke keadaan yang lebih buruk. Penyebab penyakit sering tidak diketahui, termasuk diantaranya kelompok penyakit yang dipengaruhi oleh faktor genetik atau paling sedikit terjadi pada salah satu anggota keluarga (faktor familial) sehingga sering disebut penyakit heredodegeneratif. Cowers tahun 1902 menekankan adanya istilah abiotrophy untuk penyakit seperti tersebut di atas yang artinya menunjukkan adanya penurunan daya tahan sel neuron dan mengakibatkan kematian dini. Konsep di atas mewujudkan hipotesa bahwa proses penuaan (usia) dan penyakit degeneratif dari sel mempunyai proses dasar yang sama.

Ada beberapa penyakit yang dahulu dimasukkan ke dalam penyakit degeneratif, tetapi sekarang diketahui mempunyai suatu dasar gangguan metabolik, toksik dan nutrisi (defisiensi zat tertentu) atau disebabkan suatu slow virus. Dengan berkembangnya ilmu, memang banyak penyakit yang dulu

penyebabnya tidak diketahui akhirnya diketahui sehingga tidak termasuk penyakit degeneratif. Sedangkan penyakit yang penyebabnya tidak diketahui dan mempunyai kesamaan dimana terdapat disintegrasi yang berjalan progresif lambat dari sistem susunan saraf dimasukkan ke dalam golongan ini. Istilah yang agak membingungkan yaitu pemakaian yang tidak konsisten dari istilah atrofi dan degeneratif, dua istilah ini digunakan pada penyakit degeneratif. Spatz mengatakan bahwa gambarannya secara histopatologis berbeda. Atrofi gambaran khasnya berupa proses pembusukan dan hilangnya neuron dan tidak dijumpai produk degeneratif, hanya jarak antar sel yang melebar dan terjadi fibrous gliosis. Degeneratif menunjukkan proses yang lebih cepat dari kerusakan neuron, mielin dan jaringan dengan akibat timbulnya produk-produk degeneratif dan reaksi fagositosis yang hebat dan gliosis selular. Jadi perbedaan atrofi dan proses degeneratif yaitu pada kecepatan terjadinya dan tipe kerusakannya. Banyak penyakit yang merupakan proses degeneratif ternyata diketahui kemudian penyebabnya adalah proses metabolik. Tetapi ternyata pada kejadian atrofi, ada beberapa yang dasarnya adalah gangguan metabolik juga (Japardi, 2012).

Penyakit ini butuh waktu bertahun-tahun sebelum berkembang ke tahap di mana gejala yang jelas muncul. Penyakit jantung, stroke, dan penyakit perifer arterial merupakan penyakit yang mematikan. Diseluruh dunia jumlah penyakit ini terus bertambah. Ketiga kategori penyakit ini tidak lepas dari gaya hidup yang kurang sehat yang banyak dilakukan seiring dengan berubahnya pola hidup. Menurut *World Health Organization* (WHO), penyakit degeneratif ini telah menambah peliknya kondisi kesehatan sebagian negara di dunia, yang selama ini telah dihipit permasalahan banyaknya kasus penyakit menular dan infeksi yang tergolong non degeneratif. Tercatat hingga akhir tahun 2005 saja penyakit degeneratif telah menyebabkan kematian hampir 17 juta orang di

seluruh dunia. Jumlah ini menempatkan penyakit degeneratif menjadi penyakit pembunuh manusia terbesar (Wilson *et al.*, 2013).

2.1.2 Etiologi Umum

Penyakit degeneratif timbul karena faktor usia, tidak bisa disembuhkan namun dapat dikendalikan. Salah satu cara menjaga kesehatan tubuh dengan gaya hidup sehat. Jika kita mengetahui munculnya penyakit sejak awal mungkin dapat dilakukan pengendalian dengan cara yang sederhana seperti aktivitas fisik tertentu dan mengubah pola makanan. Mengetahui munculnya penyakit sejak awal adalah satu-satunya cara untuk mengendalikan penyakit sebelum menjadi kronis. Penyakit degeneratif sebenarnya dapat diminimalisasi, dengan cara meminimalkan faktor resiko penyebabnya, karena memang kasus penyakit degeneratif pada umumnya disebabkan oleh faktor resiko yang telah diketahui (Brunner dan Suddarth, 2002).

Penyakit-penyakit kronis seperti kardiovaskuler, tekanan darah tinggi, kencing manis, kanker dan sebagainya, sudah menjadi masalah yang mewabah. Sebagai contoh, untuk penyakit yang paling sering seperti kardiovaskular, merokok dan diabetes mellitus serta tembakau adalah faktor risiko penting. Faktor resiko terus meningkat seiring dengan perubahan pola hidup modern. Dimana kebiasaan makan masyarakat seperti makanan cepat saji, makanan tinggi lemak dan gula dan jenis pekerjaan yang tidak banyak mengeluarkan tenaga (Brunner dan Suddarth, 2002).

2.2 Aterosklerosis

2.2.1 Definisi

Aterosklerosis berasal dari kata Yunani *athero* yang berarti bubur atau pasta dan *sclerosis* artinya kekerasan, seperti pengerasan sebagian peradangan,

pembentukan jaringan ikat meningkat atau penyakit zat intersisial (Salma, 2011). Aterosklerosis adalah bentuk spesifik dari arteriosklerosis. Meskipun kedua istilah tersebut dalam aplikasinya dapat saling menggantikan. Aterosklerosis merupakan pengerasan pembuluh darah arteri yang disebabkan karena penumpukan simpanan lemak (plak) dan substansi lainnya (Mayo, 2005).

Pengertian mengenai aterosklerosis mulai berkembang setelah adanya hipotesis *response to injury* dan hipotesis kelainan lipid. Aterosklerosis adalah perubahan dinding arteri yang ditandai adanya akumulasi lipid ekstra sel, rekrutmen dan akumulasi leukosit, pembentukan sel busa, migrasi dan proliferasi mioisit, deposit matrik ekstra sel (misalnya: kolagen, kalsium), akibat pemicuan multifaktor berbagai patogenesis yang bersifat kronik progresif, fokal atau difus, bermanifestasi akut maupun kronis, serta menimbulkan penebalan dan kekakuan arteri (Wijaya, 2011).

Aterosklerosis adalah suatu kondisi berupa pengumpulan lemak (lipid) di sepanjang dinding arteri. Lemak ini kemudian mengental, mengeras (membentuk deposit kalsium), dan akhirnya mempersempit saluran arteri sehingga mengurangi suplai oksigen maupun darah ke organ-organ tubuh. Aterosklerosis merupakan salah satu penyakit dimana terjadi pengerasan pada pembuluh darah. Tiga proses utama yang menyertai proses aterogenesis adalah penumpukan plak di dinding pembuluh darah, pembentukan jaringan fibrous, dan terjadi penyumbatan multipel. Sebenarnya tubuh dapat menyimpan kolesterol yang tidak digunakan di dinding pembuluh darah, namun saat jumlah kolesterol yang masuk berlebihan (hiperkolesterolemia), maka terjadi penumpukan di dinding pembuluh darah yang disebut plaque atau atheroma. Penumpukan ini membuat bentuk dari lumen pembuluh darah menjadi tidak rata, memicu sitokin pro-inflamasi seperti IL-6 dan TNF α untuk datang. Hal ini membuat makrofag pun datang untuk merusak hal yang tidak normal ini. Inflamasi pun terjadi,

Disamping itu, makin menebalnya lapisan pembuluh darah membuat robeknya lapisan dinding sehingga terjadi bekuan darah yang malah dapat menyumbat aliran darah dalam arteri (Salma, 2011).

Arteri adalah pembuluh darah yang membawa oksigen dan nutrisi dari jantung ke anggota, tubuh yang lain. Ciri-ciri arteri yang sehat yaitu fleksibel, kuat dan elastis. Lapisan permukaan dalamnya licin sehingga darah dapat mengalir tanpa batasan. Tetapi, suatu waktu, terlalu banyak tekanan pada arteri dapat menyebabkan dinding pembuluh darah menjadi tebal dan kaku, akhirnya akan membatasi darah yang mengalir ke organ dan jaringan. Proses ini disebut arteriosklerosis atau pengerasan pembuluh arteri (Mayo, 2005). Aterosklerosis dapat mempengaruhi arteri pada tubuh, termasuk arteri di jantung, otak, tangan, kaki, dan panggul. Akibatnya, penyakit yang berbeda dapat berkembang berdasarkan arteri yang terkena (NHLBI, 2006).

Aterosklerosis adalah perubahan dinding arteri yang ditandai akumulasi lipid ekstrasel, recruitment dan akumulasi lekosit, pembentukan sel busa, migrasi dan proliferasi miosit, deposit matriks ekstrasel, akibat pemicuan patomekanisme multifaktor yang bersifat kronik progresif, fokal atau difus, bermanifestasi akut maupun kronis, serta menimbulkan penebalan dan kekakuan arteri. Aterosklerosis disebabkan faktor genetik serta intensitas dan lama paparan faktor lingkungan (hemodinamik, metabolik, kimiawi eksogen, infeksi virus dan bakteri, faktor imunitas dan faktor mekanis), dan atau interaksi berbagai faktor tersebut (Sloop *et al.*, 2011).

2.2.2 Prevalensi Aterosklerosis

Penyakit jantung koroner dan penyakit pembuntuan pembuluh darah lain merupakan kasus dengan angka kematian tertinggi di dunia. Angka kematian akibat penyakit kardiovaskular sebanyak 60% dari jumlah seluruh angka

kematian di dunia. Manifestasi klinis yang terjadi akibat aterosklerosis berupa penyakit jantung koroner, penyakit serebrovaskular, dan penyakit arteri perifer terjadi pada dua dari tiga laki-laki dan satu dari dua wanita setelah umur 40 tahun. Aterosklerosis merupakan penyakit kronik progresif dengan fase asimtomatik (tanpa gejala) yang lama (Robinson, 2009).

Setiap tahun, 785.000 kasus baru penyakit jantung koroner diperkirakan muncul dengan angka serangan berulang sebanyak 485.000 kasus. Penyakit jantung koroner sendiri menyebabkan kematian pada satu dari enam pasien jantung koroner pada tahun 2007. Dislipidemia merupakan factor risiko mayor terjadinya penyakit jantung koroner. Berdasarkan survey, 33.600.000 orang dewasa lebih dari sama dengan umur 20 tahun atau 15% dari total penduduk Amerika memiliki kadar serum kolesterol total lebih dari 240 mg/dL. Angka kejadian penyakit jantung koroner di wilayah Eropa juga tinggi, yaitu 42% pada pria dan 38% pada wanita usia di bawah 75 tahun sebagai penyebab kematian tertinggi dari total seluruh kasus kematian (Jellinger *et al.*, 2012).

Kecenderungan jumlah kasus penyakit kardiovaskuler akibat aterosklerosis juga tinggi di Indonesia. Penyakit jantung koroner dengan gejala sindrom koroner akut merupakan kasus dengan angka kematian tertinggi dibandingkan penyebab kematian lain di Indonesia. Angka kematian akibat jantung koroner sebesar 16% telah meningkat menjadi 26,4% dari jtotal keseluruhan kasus yang menyebabkan kematian. Jumlah kasus penyakit jantung koroner sendiri memiliki kecenderungan mengalami peningkatan berdasarkan berdasarkan hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga Nasional (SKRTN). Angka kematian akibat penyakit jantung koroner tiap tahunnya diperkirakan terdapat 53,5 penderita per 100.000 penduduk di Indonesia (Sindo, 2012).

2.2.3 Etiologi Aterosklerosis

Aterosklerosis disebabkan faktor genetik serta intensitas dan lama paparan faktor lingkungan (hemodinamik, metabolik, kimiawi eksogen, infeksi virus dan bakteri, faktor imunitas dan faktor mekanis), dan atau interaksi berbagai faktor (Ross, 2009).

Aterogenesis dimulai ketika terjadi jejas pada endotel arteri, sehingga mengaktivasi atau menimbulkan disfungsi endotel. Paparan jejas pada endotel, memicu berbagai mekanisme molekuler dan seluler yang menginduksi dan mempromosi lesi aterosklerotik. Kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang tinggi merupakan penjejas utama endotel dan miosit. Kemampuan *Oxidized-LDL* (Ox-LDL) dalam memulai terjadinya aterosklerosis menunjukkan bahwa Ox-LDL sangat mudah menimbulkan terbentuknya sel busa. *High Density Lipoprotein* (HDL) cenderung membawa kolesterol menjauhi arteri dan kembali ke hati, menyingkirkan kolesterol yang berlebihan di plak ateroma dan menghambat perkembangan plak ateroma. Hipertensi menginisiasi disfungsi endotel dalam proses aterogenesis. Stres oksidatif dapat mempromosi aktivasi atau disfungsi endotel, serta menginduksi ekspresi molekul adesi, sehingga memacu migrasi monosit. Pola pemahaman ekspresi gen bisa membantu menjelaskan perbedaan kerentanan terhadap agen penyebab aterosklerosis. Aterosklerosis jelas bukan hanya merupakan akibat sederhana dari akumulasi lipid, namun juga akibat respon inflamasi, namun bila komponen inflamasi berbahaya bagi arteri secara selektif dapat dimodifikasi dengan mempertahankan keutuhan aspek protektifnya, maka bisa tercipta pandangan baru dalam diagnosis dan manajemen penyakit pada 50 persen pasien kardiovaskuler yang tidak mengalami hiperkolesterolemia (Ross, 2009).

2.2.4 Faktor Resiko Aterosklerosis

Faktor resiko utama penyakit aterosklerosis adalah merokok, hipertensi (>140/90 mmHg), low density lipoprotein kolesterol (>100 mg/dl), high density lipoprotein kolesterol (<40 mg/dl), diabetes mellitus, riwayat keluarga berupa penyakit jantung koroner prematur, usia (pria >45 tahun, wanita >55 tahun), kegemukan (indeks massa tubuh > 30 kg/m²), inaktivitas fisik dan diet aterogenik. Diketahui juga bahwa faktor-faktor ini dapat berinteraksi satu sama lainnya dalam meningkatkan resiko penyakit kardiovaskuler pada pasien (Paquette *et al.*, 2000).

Sekarang ini klinisi dan para penyelidik menyadari bahwa inflamasi jelas memainkan peran penting dalam perkembangan aterosklerosis. Kesadaran ini semakin meningkatkan penelitian untuk paparan kronis atau infeksi yang secara potensial dapat menyebabkan inflamasi dalam pembuluh darah. Dugaan infeksi yang mungkin paling tidak dapat memperparah aterosklerosis adalah cytomegalovirus, virus herpes simplex, *Chlamydia pneumonia*, *Helicobacter pylori*, dan penyakit periodontal (Susanto, 2010).

2.2.5 Patofisiologi

2.2.5.1 Aterosklerosis Akibat Lipid yang Abnormal

LDL adalah lipoprotein utama pengangkut kolesterol dalam darah yang terlibat dalam proses terjadinya aterosklerosis. Perkembangan aterosklerosis berawal dari masuknya LDL ke dalam lapisan tunika intima pembuluh darah. *Low Density Lipoprotein* yang terperangkap di pembuluh darah akan teroksidasi menjadi Ox-LDL. Penumpukan Ox-LDL di lapisan tunika intima disebabkan oleh ikatan antara molekul proteoglikan di matriks ekstraselular intima dan LDL (terjadi disfungsi endotel). Ikatan ini memperlambat keluarnya molekul lipoprotein dari intima (Kasper *et al.*, 2005).

Oxidized-LDL memicu pelepasan senyawa yang menyebabkan komponen sel darah putih (monosit) masuk kedalam pembuluh darah (makrofag). Sel darah putih yang ada di dalam pembuluh darah berubah menjadi makrofag akan menangkap ox-LDL melalui reseptor *scavenger* pada makrofag. Hal ini menyebabkan terbentuknya sel busa (*foam cells*). *Oxidized*-LDL berfungsi sebagai faktor kemotaksis bagi monosit yang mengakibatkan penumpukan sel-sel radang. Keradangan terjadi karena Ox-LDL mengaktifkan faktor transkripsi NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Faktor transkripsi NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang berperan penting dalam menginduksi regulasi berbagai macam gen dalam respon inflamasi dan proliferasi sel. Faktor transkripsi NF- κ B yang teraktivasi akan menginduksi terbentuknya protein sistem imun dan molekul/zat perantara seperti molekul adhesi (*intercellular adhesion molecule -1/ ICAM-1, vascular adhesion molecule -1/ VCAM-1*), sitokin (*tumor necrosis factor- α / TNF- α , Interleukin-1/ IL-1*), substansi vasoaktif (*Endothelial Nitric Oxide Synthases/ eNOS, Nitric Oxide/ NO*) dan faktor koagulasi (*Plasminogen Activator Inhibitor-1/ PAI-1*) melalui transkripsi gen (Wihastuti *et.al*, 2007).

Penimbunan sel busa ini di ruang subendotel pembuluh darah merupakan bukti paling awal adanya pertumbuhan plak aterosklerotik yang dikenal sebagai *fatty streak*. Sitokin pro-inflamasi seperti TNF α dan IL-1 menstimulasi produksi *Platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *Fibroblast growth factor* (FGF) yang memiliki peran dalam pembentukan plak. *Platelet-derived growth factor* sendiri menyebabkan migrasi *smooth muscle cell* (SMC) dari tunika media ke tunika intima. Akibatnya lapisan di bawah garis pelindung arteri berangsur-angsur mulai menebal dan jumlah sel otot meningkat, kemudian jaringan parut (*fibrous plaque*) yang menutupi bagian tersebut terpengaruh oleh sklerosis. Apabila jaringan parut itu pecah, sel-sel darah yang beredar mulai melekat ke bagian dalam yang

terpengaruh. Tahap berikutnya gumpalan darah dengan cepat terbentuk pada permukaan lapisan arteri yang robek. Kondisi ini dengan cepat mengakibatkan penyempitan dan penyumbatan arteri secara total (Mamat, 2008; Rahmawati, *et.al*, 2006).

2.2.5.2 Aterosklerosis Akibat Infeksi Kronis

Di samping faktor-faktor resiko klasik, ada prediktor “baru” yang juga ikut berperan di dalam patogenesis penyakit kardiovaskuler. Ini meliputi infeksi kronik atau aktivasi kronik dari proses inflamasi dalam sirkulasi darah. Pertanda inflamasi di dalam darah ditemukan berkaitan dengan risiko terjadinya penyakit kardiovaskuler, seperti *C Reactive Protein* (CRP) (Wangsarahardja, 2005).

Ada beberapa kemungkinan untuk terjadinya penyakit kardiovaskuler di mana penyebab infeksi (*infectious agents*) dapat merangsang atau meningkatkan proses kejadian aterosklerosis: invasi langsung pada dinding pembuluh darah sehingga menimbulkan respon inflamatorik yang selanjutnya menyebabkan peningkatan limfosit dan makrofag; pelepasan lokal dari endotoksin LPS yang dapat meningkatkan ambilan (*uptake*) ester kolesterol oleh makrofag untuk membentuk sel busa (*foam cells*); kemiripan bentuk (*mimicry*) molekuler dari *heat shock protein-60* (Hsp-60) mikrobal dengan Hsp manusia menginduksi suatu reaksi autoimun; efek sistemik tak langsung (*indirect*) yang melepaskan LPS ke dalam darah menyebabkan kerusakan endotelium; dan induksi dari perubahan-perubahan dalam lipoprotein oleh sitokin yang secara tidak langsung merupakan predisposisi aterosklerosis pada penderita (Wangsarahardja, 2005).

Lipopolisakarida kuman dengan protein pengikat (*binding protein*) dari pejamu membentuk suatu kompleks menjadi *LPS-binding protein* (LBP) yang kemudian mengikat reseptor CD14 pada monosit dan makrofag. Peristiwa pengikatan ini menyebabkan ekspresi dan pelepasan mediator imun proinflamasi

dan sitokin. Paparan sistemik pada bakteri dan endotoksin lipopolisakarida dapat menimbulkan gangguan metabolisme lipid yang terjadi melalui peningkatan sitokin yang beredar di dalam darah, seperti seperti TNF- α , IL-1, IL-6 dan interferon. LPS bekerja sebagai pemicu sistemik yang dapat mengaktifkan suatu rangkaian sitokin proinflamasi yang menimbulkan komplikasi vaskuler dan koagulasi terkait dengan aterosklerosis (Wangsarahardja, 2005).

Pembentukan aterosklerosis diawali dengan sirkulasi monosit menempel pada endotel, penempelan endotel ini diperantarai oleh beberapa molekul adhesi pada permukaan sel endotel, yaitu ICAM-1, endotelial *cell adhesion molecule-1* (ECAM-1) dan VCAM-1. Molekul adhesi ini diatur oleh sejumlah faktor yaitu produk bakteri LPS, prostaglandin dan sitokin. Setelah berikatan dengan endotel kemudian monosit berpenetrasi kelapisan lebih dalam dibawah lapisan intima, terjadi pembesaran monosit dan terbentuk *atheromatous plaque* (Mealey dan Perry, 2006; Kinane, 1998).

Pembentukan *atheromatous plaque* dan penebalan dinding pembuluh darah menyebabkan penyempitan lumen pembuluh darah, akibatnya terjadi berkurangnya aliran darah. Trombosis sering terjadi setelah pecahnya *plaque atheromatous*, terjadi pengaktifan platelet dan jalur koagulasi. Kumpulan platelet dan fibrin dapat menutupi pembuluh darah menyebabkan iskemi seperti angina atau Infark miokard (Mealey dan Perry, 2006; Kinane, 1998).

2.3 Sel Endotel

2.3.1 Definisi

Endotelium adalah lapisan tipis sel-sel yang melapisi permukaan bagian dalam pembuluh darah dan pembuluh limfatik, yang membentuk batas antara sirkulasi darah atau getah bening di lumen dan sisanya dari dinding pembuluh

darah. Sel-sel yang membentuk endotelium disebut sel endotel. Sel endotel dalam kontak langsung dengan darah yang disebut sel endotel vaskular, sedangkan dalam kontak langsung dengan getah bening yang dikenal sebagai sel endotel limfatik. Sel endotel vaskular melapisi seluruh sistem peredaran darah, dari jantung ke kapiler terkecil. Selain sebagai *barrier* terhadap difusi makromolekul ke jaringan, sel endotel pembuluh darah juga mempunyai fungsi lain seperti pengaturan tonus otot polos pembuluh darah, haemostasis dan koagulasi, serta pertahanan tubuh dan angiogenesis (Tortora *et al.*, 2011; Nurhidayat, 2010).

2.3.2 Pembentukan Sel Endotel

Sel endotel terbentuk dari diferensiasi sel mesodermal menjadi hemangioblast, yang mengarah pada pembentukan struktur vaskuler pertama yang disebut *primitive blood islands*. Hemangioblast dari pusat pulau menghasilkan *hematopoietic stem cells*, sedangkan hemangioblast di tepi pulau berdiferensiasi menjadi angioblast, prekursor dari sel endotel matur. Di bawah pengaruh dari *vascular endothelial growth factor* (VEGF), angioblast dan sel-sel endotel yang baru terbentuk berpindah ke matriks yang tersusun terutama dari kolagen dan hyaluronan, sehingga terjadi fusi dari *blood islands*, terjadi *remodeling* menjadi struktur tubuler dan terbentuk primitive vascular plexus yang pertama. Tubulus-tubulus ini mengalami vasculogenesis sehingga menjadi pembuluh darah besar, yang akan memberikan vaskularisasi pada embrio. Proses ini membutuhkan banyak kondisi fisiologis maupun patologis, seperti embrionik development, *wound healing*, regenerasi jaringan dan *tumor growth*. Proses ini diregulasi oleh keseimbangan antara agen pro- dan anti-angiogenik (Schmidt *et al.*, 2007; Lamalice *et al.*, 2007).

2.3.3 Migrasi Sel

Migrasi sel adalah suatu proses dalam pengembangan dan pemeliharaan organisme multiseluler. Pembentukan jaringan selama perkembangan embrio, penyembuhan luka dan tanggapan sistem imun serta semua proses yang memerlukan gerakan diatur sel dalam arah tertentu ke lokasi tertentu. Migrasi sel memainkan peran penting dalam berbagai proses fisiologis normal, termasuk embriogenesis, angiogenesis, penyembuhan luka, perbaikan dari usus, kerusakan mukosa, dan pertahanan kekebalan tubuh. Kesalahan selama proses ini memiliki konsekuensi serius, termasuk cacat intelektual, penyakit pembuluh darah, pembentukan tumor dan metastasis (Li *et al.*, 2005).

Sel sering bermigrasi sebagai respons terhadap sinyal eksternal tertentu, termasuk sinyal kimia dan sinyal mekanik. Sel mencapai gerakan aktif dengan mekanisme yang sangat berbeda. Banyak organisme prokariotik kurang kompleks menggunakan flagela atau silia untuk mendorong diri mereka sendiri. Migrasi sel eukariotik biasanya jauh lebih kompleks (Aalst *et al.*, 2004).

Migrasi sel endotel merupakan salah satu inti dari banyak proses fisiologis dan patologis dalam sistem kardiovaskuler, seperti angiogenesis, perbaikan dari arteri yang rusak dan *vascular graft healing*. Migrasi sel endotel adalah komponen penting dalam *wound healing* dari dinding arteri yang rusak. Adanya disfungsi dari proses ini mengakibatkan terjadinya disfungsi endotel sehingga host mudah terkena penyakit seperti aterosklerosis (Aalst *et al.*, 2004).

2.3.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Migrasi Sel Endotel

2.3.4.1 Remodeling Aktin Dalam Migrasi Sel Endotel

Aktin adalah komponen sitoskeletal dari sel endotel yang tersusun dari 43-kDa subunit globular monomer (G-aktin) yang terpolimerisasi menjadi filamen heliks (F-aktin). Pembentukan F-aktin berkaitan erat dengan hidrolisis ATP

(*Adenosine triphosphate*) oleh aktivitas ATPase intrinsik. ATP-aktin kemudian dikonversi menjadi ADP(*Adenosine diphosphate*)-aktin, sementara aktin monomer bergeser sepanjang filamen menuju ujung akhir. *Remodeling* konstan dari sitoskeleton aktin menjadi filopodia, lamelipodia dan *stress fibers* yang esensial untuk migrasi sel (Yamaguchi dan Condeelis, 2007; Lamalice *et al.*, 2007).

Filopodia adalah tonjolan membran yang berisi filamen aktin paralel panjang yang tersusun dalam bundel yang erat. Struktur ini berperan sebagai sensor stimuli motilitas. Lamelipodia adalah tonjolan sitoplasmik yang membentuk garis depan penyebaran migrasi sel. *Stress fibers* adalah filamen aktin dengan polaritas terbalik terhubung oleh α -aktinin dan myosin dan terdistribusi sepanjang serat kontraktile. Ketiga struktur tersebut sangat esensial dalam menjalankan *actin-based endothelial cell motility*: (1) merasakan sinyal motogenik oleh filopodia; (2) protrusi oleh lamelipodia dan *pseudopodia-like extension*; (3) penempelan protrusi ke *extracellular matrix* (ECM); (4) kontraksi badan sel agar dapat bergerak maju oleh *stress fibers*; (5) pelepasan tonjolan belakang; (6) *recycling* dari material adesif dan *signaling* (Lamalice *et al.*, 2007).

2.3.4.2 Regulasi Migrasi sel endotel

Migrasi sel endotel memiliki tiga mekanisme penting: *Chemotaxis*, migrasi menuju gradien kemoatraktan terlarut; *haptotaxis*, migrasi menuju ligan yang amobil; dan *mechanotaxis*, migrasi yang dihasilkan oleh dorongan mekanik. Dalam angiogenesis, migrasi sel endotel dihasilkan oleh 3 mekanisme ini (Lamalice *et al.*, 2007).

Biasanya kemotaksis dari sel endotel diatur oleh *growth factors* seperti VEGF dan *basic fibroblast growth factors* (bFGF), sementara haptotaksis berhubungan dengan meningkatnya migrasi sel endotel dengan respon dari

integrins binding ke komponen ECM. Berhubungan karena lokasinya terletak di lapisan dalam pembuluh darah, sel endotel selalu kontak dengan tekanan geser (*shear stress*) dari aliran darah, yang berperan dalam mengaktifkan jalur migrasi (Li *et al.*, 2005; Lamalice *et al.*, 2007).

Banyak macam-macam sitokin yang berperan dalam regulasi kemotaksis migrasi sel endotel selama angiogenesis. Tiga promotor utama dari tipe actin-based motility adalah VEGF, bFGF, dan angiopoietin. Sitolin lainnya yang ikut berperan adalah FGF-2, *hepatocyte growth factor*, *platelet derived growth factor*, *epidermal growth factor*, *transforming growth factor- β* , interleukin, *tumor necrosis factor- α* , *platelet-activating factor*, ephrins, *soluble adhesion molecules*, endoglin, dan angiogenin. *Vascular endothelial growth factor* memiliki peran penting dalam meregulasi fungsi dari sel endotel. *Vascular endothelial growth factor* merupakan agen angiogenik poten yang meregulasi semua langkah utama dari proses angiogenik, termasuk proliferasi dan migrasi sel endotel (Schmidt *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005).

Extracellular Matrix termasuk berperan penting dalam migrasi sel endotel. Gradien dari komponen ECM amobil seperti kolagen mendorong migrasi sel endotel tanpa tergantung dari sitokin kemotaktik. Jenis migrasi ini disebut haptotaksis, yang dapat didefinisikan sebagai sel yang bergerak ke arah protein ECM. Interaksi adhesif yang memacu haptotaksis dari sel endotel diatur oleh komponen ECM dan integrin. Endotel vaskular ditopang oleh ECM yang terdiri dari sel endotel, perisit, dan sel otot polos. Integrin juga membantu migrasi angiogenik dengan membantu sel endotel untuk berikatan dengan ECM. Khususnya, aktivasi integrin memungkinkan koneksi fungsional antara adhesi fokal dan sitoskeleton aktin yang dibutuhkan dalam migrasi sel. Selain itu, integrin juga aktif berperan dalam menginisiasi dan meregulasi sinyal angiogenik (Lamalice *et al.*, 2007; Davis dan Senger, 2005; Li *et al.*, 2005).

Mengingat bahwa sel endotel merupakan bagian interior dari pembuluh darah, mereka secara konstan selalu berhubungan dengan *shear stress* dari aliran darah, bagian tangensial dari tekanan hemodinamik. *Shear stress* merupakan gesekan yang diberikan pada endotelium dari aliran darah. Dalam mikrosirkulasi, *shear stress* memandu sel endotel sepanjang jalur interstisial saat *wound healing*. Dalam kasus itu, *shear stress* membimbing lamelipodia dan migrasi sel endotel mengikuti arah aliran. *Shear stress* mempengaruhi setiap langkah dari migrasi sel, baik migrasi sel kemotaktik dan maupun haptotaktik. Respon sel endotel terhadap *shear stress* melibatkan disosiasi kontak antar sel dan aktivasi beberapa jalur signaling yang meremodel sitoskeleton aktin untuk mengaktifkan migrasi sel endotel dengan cara yang terpolarisasi (Lamalice *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005).

Migrasi sel endotel adalah komponen penting dalam proses angiogenesis dan regenerasi yang membutuhkan regulasi yang ketat dari peran sel kontraktile dan nonkontraktile. Proses ini membutuhkan integrasi sinyal dari stimulus kemotaktik, haptotaktik dan mekanotaktik (Li *et al.*, 2005).

2.3.5 Nitric Oxide (NO) dan Nitric Oxide Synthase (NOS)

2.3.5.1 Definisi

Nitric Oxide (NO) merupakan salah satu molekul signaling dan efektor biologis. NO diproduksi oleh grup enzim yang disebut *Nitric Oxide Synthases* (NOS). Enzim ini mengkatalis produksi NO dan L-sitruilin dari L-arginin, O₂, dan NADPH-derived electrons. Sistem tubuh mamalia memiliki 3 isoform dari enzim ini: *neuronal* NOS (nNOS atau NOS1) diekspresikan di sistem saraf pusat dan perifer dan juga di otot rangka; *inducible* NOS (iNOS atau NOS2) diekspresikan di banyak jenis sel, khususnya makrofag; dan *endothelial* NOS (eNOS atau NOS3) diekspresikan di sel endotel vaskuler dan kardiomyosit. Merupakan

isoform NOS utama di dinding pembuluh darah. Dari namanya menunjukkan karakter dari aktivitas atau jenis jaringan yang memproduksi dari enzim yang disebutkan di atas. Namun sekarang diketahui bahwa masing-masing isoform enzim tersebut diekspresikan oleh berbagai jenis jaringan dan sel (Forstermann dan Sessa, 2011; Liu dan Huang, 2007).

Ketiga isoform utama tersebut memiliki kesamaan struktur dan memiliki mekanisme katalis yang identik. Mereka semua membutuhkan sejumlah kofaktor untuk beraktivitas seperti flavin adenin dinukleotida (FAD), flavin mononukleotida (FMN), heme, kalmodulin, dan tetrahidrobiopterin. Dibutuhkan tiga domain berbeda dalam enzim ini untuk bekerja sebagai katalis: domain reduktase, berisi gugus FAD dan FMN yang berbagi asam amino yang homolog dengan sitokrom P-450 reduktase. Domain ini mentransfer elektron dari NADPH ke domain oksigenase; domain oksigenase, bekerja mengkatalis konversi arginin menjadi sitrulin dan NO yang berisi tempat ikatan untuk heme, tetrahidrobiopterin, dan arginin; *calmodulin-binding* domain, yang dibutuhkan di setiap aktivitas dari semua isoform NOS. Kofaktor kalmodulin normalnya berfungsi sebagai sensor konsentrasi Ca^{2+} intraseluler yang hanya bekerja saat terjadi elevasi level Ca^{2+} intraseluler (Forstermann dan Sessa, 2011).

2.3.5.2 NO Vaskuler dan eNOS

Di pembuluh darah, NO diproduksi oleh eNOS dan berfungsi sebagai vasodilatator sehingga memiliki peran dalam mengatur tekanan aliran darah. *Nitric Oxide* teraktivasi oleh tekanan mekanik seperti *blood shear stress* dan stimulasi agonis seperti bradikinin dan asetilkolin. Di dalam sistem kardiovaskuler eNOS utamanya memiliki efek protektif dalam pembuluh darah. saat inflamasi dan aterosklerosis, NO memiliki peran dalam mencegah apoptosis dari sel endotel dan mempertahankan integritas dari lapisan monolayer sel endotel. Selain itu, NO juga bekerja sebagai inhibitor terhadap agregasi platelet, ekspresi

molekul adhesi, dan proliferasi *vascular smooth muscle cell* (VSMC) (Forstermann dan Sessa, 2011; Kawashima dan Yokoyama, 2004).

Fungsi NO sebagai anti-inflamasi bekerja saat stimulus aterogenik menstimulasi ekspresi molekul adhesi dan kemokin yang akan mengarah pada pengerahan sel-sel inflamasi. *Nitric Oxide* bekerja menghambat aktivasi dan translokasi nuklear dari NF- κ B, menghambat ekspresi molekul adhesi yang terstimulasi sitokin, dan mengurangi adhesi dan aktivasi neutrofil dan monosit. Inhibisi kemoatraktan monosit tampaknya merupakan aspek penting dari NO sebagai anti-inflamasi dalam aterosklerosis (Forstermann dan Sessa, 2011; Channon *et al.*, 2000).

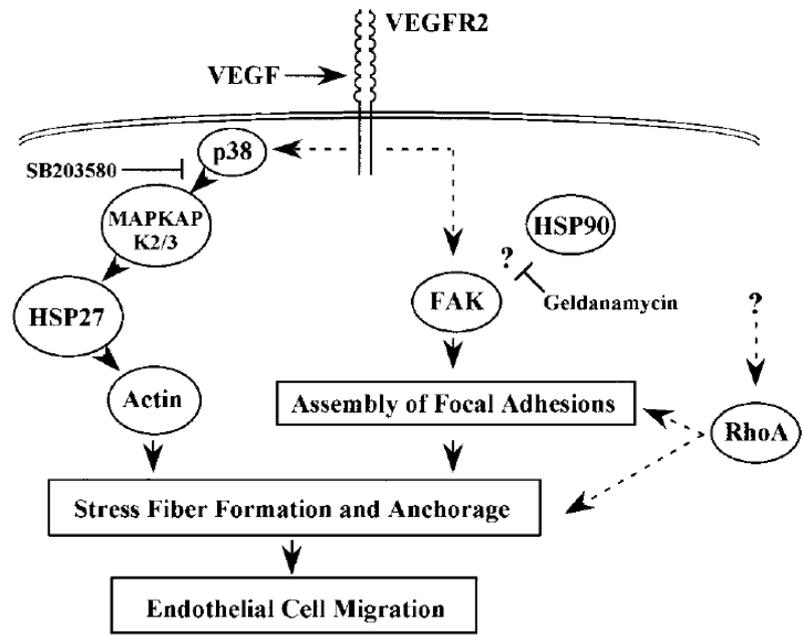
Patologi terkait kerusakan eNOS biasanya mengakibatkan gangguan dari produksi atau signaling NO. Gangguan dari produksi maupun bioavailabilitas NO telah dikaitkan dengan berbagai macam penyakit seperti hipertensi, hiperkolesterolemia, diabetes, dan *heart failure*. *Nitric Oxide* juga memiliki fungsi penting sebagai *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) dalam pemeliharaan hemostasis vaskuler. Disfungsi endotel terkait rusaknya fungsi ini karena berkurangnya bioaktivitas NO yang berasal dari eNOS merupakan langkah penting dari aterosklerosis (Kawashima dan Yokoyama, 2004).

2.3.5.3 Peran NO dalam Migrasi Sel Endotel

Migrasi sel merupakan proses yang kompleks yang membutuhkan berbagai koordinasi inter- dan intraseluler seperti reorganisasi sitoskeleton, renovasi matriks, modulasi adesi sel dan induksi kemoatraktan. Sel endotel yang mengalami perlukaan melakukan regenerasi salah satunya dengan migrasi dan proliferasi pada sel-sel endotel. Fasilitasi angiogenesis dilakukan melalui aktivitas parakrin, yaitu dengan melepaskan mediator yang berperan penting pada aktivasi sel endotel matur, diantaranya NO. *Nitric Oxide* diketahui dapat mempengaruhi fungsi migrasi sel endotel yang penting dalam angiogenesis, yaitu

melalui jalur signaling *vascular endothelial growth factor and receptors/ vascular endothelial receptor-2* (VEGF/ VEGFR2). Peran NO sebagai regulator utama dari migrasi sel dan angiogenesis berdasarkan pengamatan bahwa melalui NO diproduksi oleh eNOS diikuti aktivasi VEGFR-2/PI3K/Akr-PKB dalam sel endotel yang teraktivasi oleh VEGF (Nugrahenny *et al.*, 2012; Lamalice *et al.*, 2007; Murohara *et al.*, 1999).

Dalam sel endotel, VEGF menginduksi akumulasi *stress fiber* yang terkait dengan polimerisasi aktin dan pembentukan *focal adhesion* pada sel endotel. Reorganisasi sitoskeletal ini menghasilkan aktivitas motogenik sel. VEGF ini melalui VEGFR2 mengatur migrasi sel endotel melalui induksi aktivasi *Stress-activated Protein Kinase-2/p38* (SAPK2/p38), fosforilasi *Focal Adhesion Kinase* (FAK), dan meningkatkan aktivitas migrasi. Aktivasi SAPK2/p38 memicu polimerisasi aktin, sedangkan FAK memulai perakitan *Focal Adhesion*. Kedua proses ini berperan dalam pembentukan *stress fiber* yang penting untuk proses migrasi sel endotel. Polimerisasi aktin dan perakitan *Focal Adhesion* ini akan mengakibatkan reorganisasi sitoskeleton yang juga dibutuhkan untuk migrasi sel (Rousseau *et al.*, 2000).



Gambar 2.1 Mekanisme VEGF dalam memediasi migrasi sel endotel (Rousseau *et al.*, 2000)

2.4 Lipopolisakarida

2.4.1 Definisi

Lipopolisakarida adalah sebuah molekul besar berupa kompleks antara senyawa lipid dan polisakarida dengan ikatan kovalen. Senyawa LPS banyak ditemukan pada lapisan luar membran sel bakteri gram-negatif dan bersifat endotoksin, yang memicu aktivasi sistem kekebalan (Warren *et al.*, 2010).

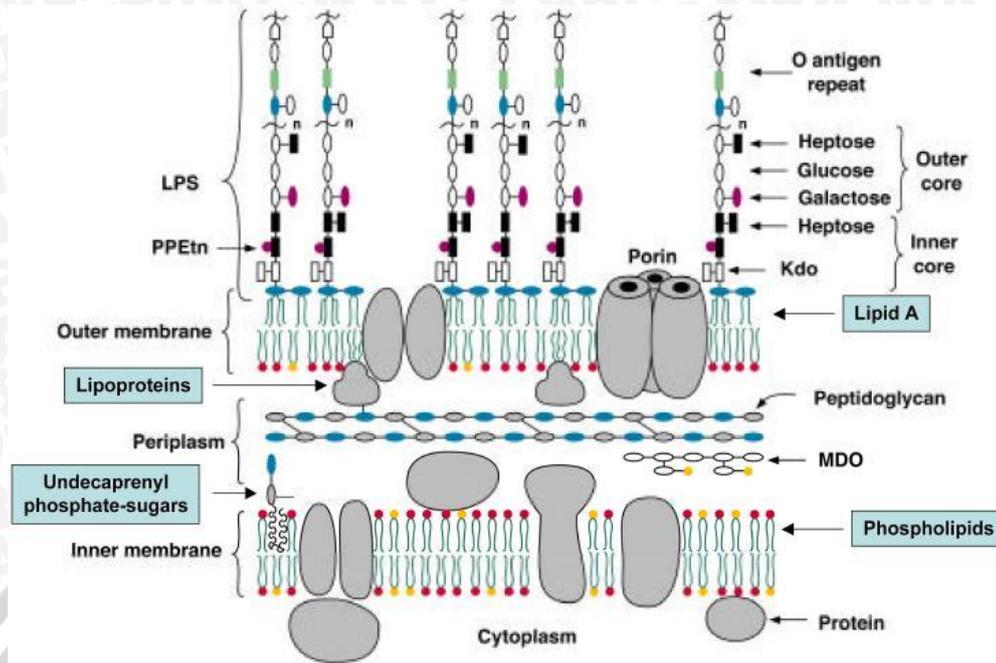
Lipopolisakarida dilepas ke dalam sirkulasi oleh bakteri gram negatif yang mati, sehingga berinteraksi dengan lapisan endotel dari pembuluh darah. Lipopolisakarida terbukti bertanggung jawab dalam banyak kerusakan atau disfungsi sel endotel berhubungan dengan gram negatif sepsis. Produk kuman ini menyerang dan masuk ke dalam jaringan dan berkontak dengan berbagai sel

pejamu termasuk monosit dan makrofag (Wangsarhardja, 2005; Bannerman dan Goldblum, 2003).

Bagian besar dari lapisan luar membran bakteri gram negatif ini merupakan faktor resiko kuat untuk terjadinya inflamasi vaskuler. Dalam patogenesis penyakit menular, tingginya level LPS dalam sirkulasi mengakibatkan respon inflamasi dari sel endotel, juga terjadi peningkatan permeabilitas endotel, sekresi kemokin dan penarikan leukosit (Liu *et al.*, 2011)

2.4.2 Struktur

Sesuai dengan namanya, LPS tersusun dari komponen lipid dan polisakarida. Lipopolisakarida terdiri dari lipid A, polisakarida inti, dan O-Antigen. Lipid A adalah glikolipid yang terdiri dari disakarida glukosamin yang tersubstitusi ikatan beta (1,6)-nya. Lipid A bertanggung jawab terhadap efek toksik dengan cara menstimulasi pembentukan dan sekresi sitokin yang menimbulkan gejala toksemia. Stimulasi tersebut terjadi karena Lipid A bersama dengan LBP akan berikatan ke reseptor CD14 dari sel makrofag. Polisakarida inti adalah kompleks polisakarida kompleks yang biasanya terhubung dengan lipid A melalui ikatan 3-deoksi-D-manno-octulosonat (KDO). Antigen-O terdiri dari rantai subunit oligosakarida identik (linear atau bercabang) dengan panjang yang bervariasi. Antigen-O terdapat di lapisan terluar dinding sel bakteri, sehingga merupakan target dari pengenalan sistem imun host (Raetz dan Whitfield, 2002).



Gambar 2.2 Struktur LPS dalam dinding sel bakteri (Raetz dan Whitfield, 2002)

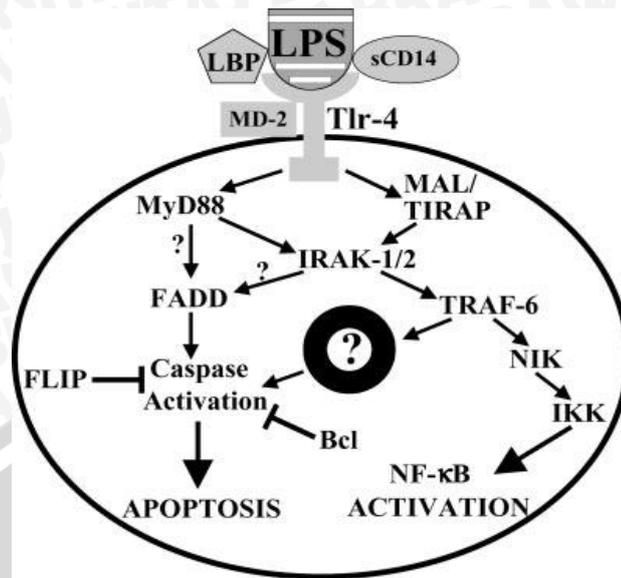
2.4.3 Fungsi LPS terhadap Bakteri

Lipopolisakarida merupakan komponen utama dari membran luar bakteri Gram-negatif, memberikan kontribusi besar terhadap integritas struktural dari bakteri, dan melindungi membran dari beberapa jenis serangan kimia. Lipopolisakarida juga meningkatkan muatan negatif dari membran sel dan membantu menstabilkan struktur membran keseluruhan. Hal ini sangat penting untuk gram-negatif bakteri, yang hasilnya kematian jika bermutasi atau dihapus. Lipopolisakarida merupakan endotoksin, dan menginduksi respon yang kuat dari sistem kekebalan tubuh hewan normal. Hal ini juga telah terlibat dalam aspek non-patogen ekologi bakteri, termasuk adhesi permukaan, kepekaan bakteriofag, dan interaksi dengan predator seperti amuba (Warren *et al.*, 2010).

2.4.4 Respon *Cellular Signaling Host* terhadap LPS

Reseptor yang terlibat dalam rekognisi LPS di sistem seluler adalah *membrane-associated* CD14 (mCD14). Membrane-associated CD14 adalah glikoprotein yang ditemukan di sel monosit dan neutrofil. Meskipun LPS bisa berikatan langsung dengan mCD14, afinitasnya akan sangat meningkat saat LPS berikatan kompleks dengan adanya protein fase akut LPS-binding protein (LBP). Sel endotel tidak memiliki mCD14, dapat teraktivasi oleh LPS yang bersama dengan LBP dan *soluble* CD14 (sCD14). Senyawa LBP ini memfasilitasi transfer LPS ke sCD14 dan ikatan kompleks LPS-sCD14 ini dapat dikenali oleh sel endotel. sCD14 juga memiliki peran dalam memediasi apoptosis yang diinduksi LPS (Bannerman dan Goldblum, 2003).

Dibutuhkan reseptor transmembran untuk mentransduksi signal LPS melewati membran plasma. Reseptor ini, yang biasa disebut *Toll-like receptor* (Tlr)-4. Reseptor ini diekspresikan oleh sel monosit juga oleh sel-sel endotel. Secara genetik terbukti mengatakan bahwa Tlr-4 adalah reseptor bagi LPS (Bannerman dan Goldblum, 2003).



Gambar 2.3 Signaling LPS dalam sel endotel (Bannerman dan Goldblum, 2003)

Toll-like receptor-4 terlibat dalam signaling LPS dan dibutuhkan dalam aktivasi transkripsi faktor NF-κB. Setelah aktivasi dari reseptor Tlr-4, mengaktifkan beberapa reaksi lanjutan, mengakibatkan aktivasi kaskade kinase yang melibatkan NF-κB-inducing kinase (NIK) dan IκB kinase (IKK). IκB merupakan inhibitor dari NF-κB. IKK memediasi fosforilasi dari IκB, mengakibatkan degradasi IκB melalui jalur proteosom membuat NF-κB dapat bertranslokasi ke nukleus di mana nantinya akan mengaktifkan ekspresi gen. Aktivasi NF-κB yang diinduksi LPS akan memediasi sel endotel meningkatkan produksi IL-6, IL-8, IL-1β, ekspresi E-selektin, ICAM-1, dan VCAM-1. Selain mempromosikan ekspresi gen proinflamasi, NF-κB juga bekerja sebagai agen apoptosis maupun non-apoptosis dalam sistem seluler. Beberapa *signaling* molekul yang melibatkan aktivasi NF-κB oleh LPS memiliki kesamaan dengan aktivasi apoptosis yang diinduksi LPS (Bannerman dan Goldblum, 2003).

2.4.5 Reaksi Host terhadap LPS

Dalam respon terhadap paparan LPS sistemik, host akan memproduksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 β serta interferon gamma (IFN- γ). Produksi sitokin proinflamasi dan induksi mediator yang lebih distal seperti NO, *platelet activation factor* (PAF) dan prostaglandin menyebabkan hipotensi, perfusi organ inadkuat dan kematian sel yang berhubungan dengan *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* (MODS). Status proinflamasi ini didefinisikan sebagai *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS). Induksi sistem imunitas innate secara besar-besaran ini dapat dan seringkali menimbulkan efek katastrofik pada pasien dengan sindroma sepsis (Kayser *et al.*, 2005; Singleton *et al.*, 2006).

LPS secara langsung menimbulkan respon dari sel endotel yang hampir sama dengan respon tubuh yang timbul saat terjadi sepsis, seperti peningkatan produksi sitokin proinflamasi (IL-6, IL-8, IL-1 β), peningkatan ekspresi molekul adhesi (*E-selectin*, ICAM-1, VCAM-1 dan peningkatan ekspresi *tissue factor*). Selain aktivasi tersebut, LPS juga menginduksi *programmed cell death* atau apoptosis pada sel endotel. LPS molekul signal juga memiliki peran dalam mengatur aktivasi proapoptotik NF- κ B yang diinduksi LPS dan respon nonapoptotik dari sel endotel. Apoptosis endotel terlibat dalam patogenesis dari berbagai penyakit seperti aterosklerosis, gagal jantung kongestif dan *systemic capillary leak syndrome* (Bannerman dan Goldblum, 2003).

2.5 Reactive Oxygen Species dan Stres Oksidatif

2.5.1 Definisi

Radikal bebas atau stres oksidatif adalah zat kimia yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas ini terbentuk dari pemecahan ikatan kimia yang mana tiap pecahan menyimpan satu elektron atau

dari penggabungan zat non radikal dan radikal yang mana jumlah elektronnya akan ganjil. Hal ini dapat diatasi dengan reaksi redox di mana zat radikal bertemu dengan zat radikal lainnya. *Reactive oxygen species* (ROS) adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas dan kelompok nonradikal. Kelompok radikal bebas antara lain *superoxide anion* (O_2^-), *hydroxyl radicals* ($OH\cdot$), dan *peroxyl radicals* ($RO_2\cdot$). Yang nonradikal misalnya *hydrogen peroxide* (H_2O_2), dan *organic peroxides* (ROOH) (Halliwell and Whiteman, 2004; Bahorun *et al.*, 2006).

Radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif yang diproduksi dalam jumlah yang normal, penting untuk fungsi biologis, seperti sel darah putih yang menghasilkan H_2O_2 untuk membunuh beberapa jenis bakteri dan jamur serta pengaturan pertumbuhan sel, namun ia tidak menyerang sasaran spesifik, sehingga ia juga akan menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membran sel, organel sel, atau DNA, sehingga dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel (Winarsi, 2007). Namun dalam keadaan tertentu, produksi radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif melebihi sistem pertahanan tubuh, kondisi yang disebut sebagai stres oksidatif (Agarwal *et al.*, 2005).

Manusia dan makhluk hidup aerob lain dapat menoleransi oksigen (O_2) karena memiliki system transfer elektron dan enzim untuk oksigen, pertahanan dengan atiodksidan untuk melindungi dari efek toxic dari ROS. *Reactive oxygen species* dan RNS (*Reactive nitrogen species*) selalu diproduksi di makhluk hidup, hal ini meliputi mekanisme lepasnya elektron O_2 dari system transport elektron mitokondria, sitokrom p-450 dan b5 yang memproduksi radikal bebas. Proses transport elektron di mitokondria sendiri diduga menghasilkan O_2^- sebanyak 1-3 % dari total O_2 yang dihirup dalam proses menghasilkan energy. O_2^- ini juga dihasilkan dalam proses fagositosis oleh sel-sel leukosit, seperti neutrofil, monosit, marofag, dan eosinofil untuk menginaktivasi bakteri dan virus. Saat

proses fagositosis terjadi, konsumsi O_2 meningkat drastis oleh karena aktivasi *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oksidase di membran yang mereduksi O_2 menjadi O_2^- . Tetapi banyak juga molekul di dalam tubuh kita yang mudah teroksidasi bila mengalami kontak dengan ROS ini seperti katekolamin, tertrahidrofolat (Bahorun, 2006).

Di dalam sel mamalia, beberapa sumber enzimatik yang berpotensi menjadi sumber ROS antara lain respirasi mitokondria, jalur enzim lipooksigenase dan siklooksigenase asam arachidonat, sitokrom p-450s, xantin oksidase, *Nicotinamide adenine dinucleotide* (NADH) oksidase, NADPH oksidase, NO sintase, peroksidase, dan hemoprotein lainnya (Cai dan Harrison, 2000).

2.5.2 Mekanisme Pertahanan Seluler Host terhadap ROS

Reaksi detoksifikasi ROS merupakan bagian penting untuk kelangsungan dan survival semua bentuk kehidupan aerobik. Mekanisme pertahanan ditujukan untuk memelihara keseimbangan antara produksi dan eliminasi ROS. Ketidakseimbangan yang mengakibatkan meningkatnya ROS dan keadaan pro-oksidatif disebut stres oksidatif (Held, 2012).

Setiap sel memiliki cara yang berbeda-beda untuk mengeliminasi efek merusak dari ROS. Superoksida Dismutase (SOD) mengkatalis reaksi konversi dari 2 anion superoksida menjadi molekul hidrogen peroksida (H_2O_2) dan O_2 . Di dalam peroksisom sel eukariotik, enzim katalase mengkonversi H_2O_2 menjadi air dan oksigen, reaksi ini menyelesaikan detoksifikasi ROS melalui SOD. Glutation Peroksidase merupakan kelompok enzim yang mengandung selenium, yang juga mengkatalis degradasi H_2O_2 (Held, 2012).

Ada beberapa jenis antioksidan molekul kecil non-enzim yang juga berperan dalam detoksifikasi ROS. Glutation merupakan bagian penting

pertahanan intraseluler terhadap efek merusak dari ROS. Reaksi dengan molekul ROS mengoksidasi glutathion, bentuk yang tereduksi tersebut diregenerasi oleh reaksi redoks dengan NADPH-dependen reduktase. Vitamin C atau asam askorbat merupakan molekul larut air yang bisa mereduksi ROS, sementara vitamin E (α -tokoferol) merupakan molekul larut lemak yang memiliki peran yang sama di membran sel (Held, 2012).

2.5.3 ROS dan Kerusakan Sel

Protein, lemak membran, karbohidrat dan asam nukleat dapat menjadi sasaran kerusakan sel akibat ROS. Kerusakan radikal bebas ini diperkirakan berperan menimbulkan penyulit pada banyak penyakit. Oksidasi asam amino dalam protein menimbulkan fragmentasi protein, pembentukan ikatan silang dan agregasi, dan kerentanan terhadap digesti proteolitik. Peroksidasi molekul lemak selalu mengubah atau merusak struktur molekul lemak. Apabila lemak yang rusak adalah konstituen suatu membran biologis, susunan lapis ganda lemak yang kohesif dan organisasi struktural akan terganggu. Radikal bebas tanpa oksigen juga merupakan sumber utama kerusakan DNA (Smith *et al.*, 2005).

Produksi ROS berlebihan, yang melebihi mekanisme pertahanan antioksidan endogen, akan mengakibatkan reaksi di mana ROS mengoksidasi makromolekul biologis, seperti DNA, protein, karbohidrat, dan lipid. Kondisi ini biasa disebut sebagai stres oksidatif. Telah terbukti bahwa meningkatnya stres oksidatif terlibat dalam patogenesis dari beberapa penyakit kardiovaskuler, seperti hiperkolesterolemia, aterosklerosis, hipertensi, diabetes dan gagal jantung (Smith *et al.*, 2005; Cai dan Harrison, 2000).

2.5.4 Pengaruh Lipopolisakarida dalam meningkatkan ROS

Respons sistemik terhadap LPS akan menyebabkan aktivasi NF- κ B sebagai salah satu protein faktor transkripsi yang akan meningkatkan produksi mediator-mediator inflamasi atau sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 β serta IFN- γ (Rose *et al.*, 2004). *Tumor necrosis factor- α* dan IL-1 menyebabkan peningkatan sintesis dan merangsang produksi IL-6, IL-8 dan IL-10. *Tumor necrosis factor- α* dan IL-1 memperantarai inflamasi melalui produksi IL-8 dan dengan merangsang ekspresi dari molekul adhesi (Abbas, 2007).

Sitokin aktivator makrofag yang poten adalah IFN- γ . Setelah bakteri masuk ke dalam fagolisosom sel dalam proses fagositosis, makrofag akan membunuh dengan pembentukan ROS melalui jalur *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI) (Abbas, 2007).

Adanya induksi TNF- α terhadap sel endotel mengakibatkan peningkatan produksi ROS dari mitokondria sel endotel. Meningkatnya TNF- α akan mengaktifkan *signaling cascade* dalam sel yang akan memacu pembentukan ROS oleh mitokondria (Corda *et al.*, 2001).

Dalam respon terhadap stres dan *injury*, sel endotel akan menghasilkan ROS dan nitrogen *intermediates*. Pembentukan radikal bebas ini akan berakibat ketidakseimbangan antara keadaan pro- dan antioksidan. Hal ini lebih lanjut mengakibatkan terjadinya stres oksidatif dan kerusakan sel. Meningkatnya ROS atau berkurangnya antioksidan akan menimbulkan terjadinya apoptosis di berbagai jenis sel, termasuk sel endotel. Lipopolisakarida memiliki efek timbulnya ROS dalam sel endotel. Timbulnya ROS oleh LPS ini berkaitan dengan onset apoptosis. *Reactive oxygen species* meningkatkan produksi faktor pro-apoptotik melalui peningkatan permeabilitas membran mitokondria. Salah satu dari faktor tersebut adalah sitokrom-c, kofaktor yang menjalankan pengaturan *caspase-9*-

activating apoptosome. ROS juga dilaporkan meningkatkan ekspresi dan aktivasi dari *caspase-8* dan juga *caspase-3* (Bannerman dan Goldblum, 2003).

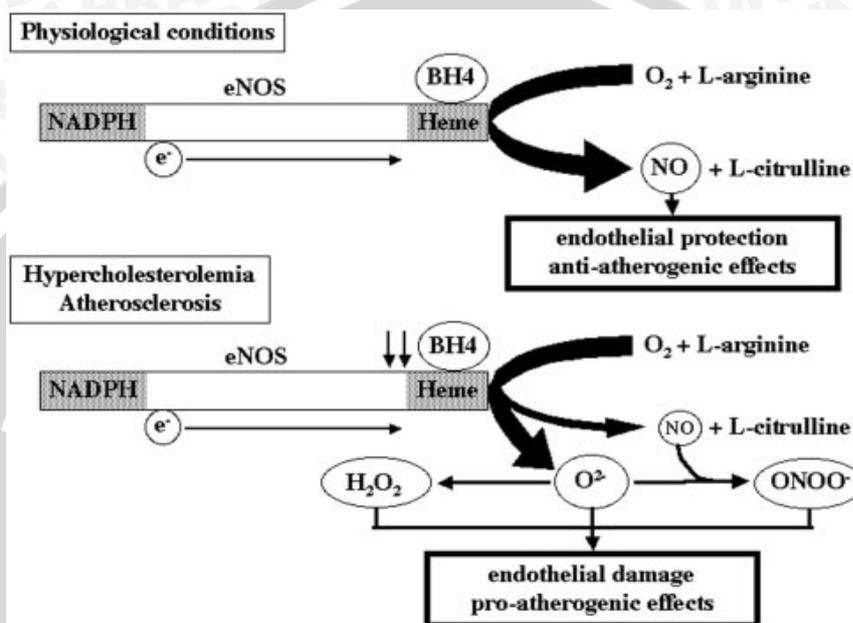
Kunci dari aktivasi apoptosis sel endotel adalah aktivasi NF- κ B dan translokasi nuklear, yang dibutuhkan dalam berbagai aktivitas sel, termasuk juga ekspresi dari beberapa sitokin dan molekul adhesi. Beberapa studi mengatakan beberapa molekul *signaling* yang bekerja sebagai mediator apoptosis juga berkontribusi dalam meregulasi aktivasi NF- κ B (Bannerman dan Goldblum, 2003).

2.5.5 Pengaruh ROS Terhadap eNOS

Dalam keadaan fisiologis, NOS yang aktif bersama dengan kofaktor L-arginin dan tetrahidrobiopterin (BH4) memproduksi NO. Tetrahidrobiopterin merupakan kofaktor esensial untuk NOS, namun memiliki kemungkinan untuk terjadi *uncoupling*. Tetrahidrobiopterin meregulasi kerja NOS dengan berbagai cara: transport besi hem dalam NOS; meningkatkan ikatan arginin; berikatan dengan NOS dan bekerja sebagai kofaktor *redox-sensitive*; meningkatkan afinitas substrat NOS; bekerja dalam transport elektron; dan yang terpenting, menstabilkan formasi dimer NOS, dimana merupakan fungsi penting dari aktivitas NOS (Montezano dan Touyz, 2011).

Suatu studi menunjukkan bahwa ROS mengoksidasi BH4 dalam pembuluh darah dari hewan hipertensi. Saat kadar BH4 menurun, struktur dimer berubah sedemikian rupa sehingga domain oksidase enzim menjadi *uncoupling*, sehingga proses katalis secara fungsional menjadi *uncoupled*. Reduksi enzimatik molekul oksigen oleh eNOS menjadi tidak lagi *couples* dengan L-arginin, sehingga menghasilkan superoksid berbahaya ketimbang NO yang protektif. *Endothelial Nitric Oxide Synthases uncoupling* berkontribusi dalam meningkatnya produksi ROS dan menurunnya produksi NO sehingga akhirnya terjadi disfungsi endotel.

Berkurangnya bioavailabilitas BH4 dan uncoupling eNOS beserta stres oksidatif telah terbukti terlibat pada pasien-pasien dengan diabetes, penyakit jantung koroner, gagal jantung dan *ischaemia-reperfusion injury* (Montezano dan Touyz, 2011; Landmesser, 2003).



Gambar 2.4 Peran divergen eNOS dalam aterosklerosis (Kawashima dan Yokohama, 2004)

2.5.6 Pengaruh ROS Terhadap NO vaskuler

Peningkatan produksi superoksida atau ROS secara signifikan dapat menurunkan kadar NO vaskuler pada pembuluh darah yang aterosklerotik. Laju reaksi ROS dengan dengan SOD adalah $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, sedangkan laju reaksi ROS dengan NO adalah $6-10 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Angka ini menunjukkan bila konsentrasi NO 5 kali di bawah konsentrasi SOD, 50% ROS yang ada akan bereaksi dengan NO membentuk peroksinitrit (Estevez dan Jordan, 2002).

Nitric Oxide merupakan senyawa yang relatif stabil dan radikal bebas non-reaktif bila dalam keadaan fisiologis, meskipun patologis, NO tidak akan

mengeluarkan efek toksik terhadap sel tubuh. *Nitric Oxide* dapat bereaksi dengan ROS, menghasilkan oksidan berpotensi peroksinitrit, di mana peroksinitrit ini dapat menginduksi apoptosis atau nekrosis, tergantung dari konsentrasinya. Peroksinitrit ini bersifat sitotoksin yang dapat menghambat jalur komunikasi seluler yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidup sel. Peroksinitrit kemudian dapat mengoksidasi kofaktor eNOS, yaitu BH4, mengakibatkan kondisi eNOS *uncouple*. Penurunan NO diketahui dapat mengganggu peran VEGF dalam migrasi sel endotel. (Nugrahenny *et al.*, 2012; Estevez dan Jordan, 2002).

2.5.7 Pengaruh ROS Terhadap Migrasi Sel Endotel

Jumlah dan durasi pembetukan ROS di dalam sel dapat memberikan pengaruh pada migrasi sel endotel. Moldovan *et al.* (2000) melaporkan bahwa produksi ROS oleh sel endotel di daerah vaskuler yang mengalami perlukaan dibutuhkan untuk proses migrasi sel. Keadaan tersebut menyebabkan peningkatan superoksida atau ROS intraseluler yang digunakan untuk reorganisasi sitoskeleton yang diperlukan untuk migrasi sel. *Coupling* tirosin kinase dan superoksida menghasilkan polimerisasi aktin yang juga diperlukan untuk proses migrasi sel. Bila superoksida ini berlebih, dapat mengganggu migrasi sel endotel melalui gangguan sitoskeleton sel. Menurut penelitian Moldovan *et al.* (2000) dan Clements *et al.* (2003), peningkatan superoksida lebih lanjut akan mengakibatkan peningkatan produksi peroksinitrit dalam jumlah besar, yang akan menghambat polimerisasi aktin dan mengganggu kemotaksis neutrofil dan migrasi fibroblast (Moldovan *et al.*, 2000; Aalst *et al.*, 2004, Clements *et al.*, 2003).

Dalam beberapa kondisi patologis, seperti peningkatan ROS pada penyakit degeneratif kardiovaskuler mengakibatkan area besar perlukaan sel endotel dan kesulitan untuk melakukan regenerasi. Penghambatan pada migrasi

sel endotel mengakibatkan disfungsi endotel dan terganggunya regenerasi vaskuler (Nugrahenny *et al.*, 2012; Aalst *et al.*, 2004).

2.6 Disfungsi Endotel

Disfungsi endotel dapat didefinisikan sebagai ketidakseimbangan antara faktor-faktor relaksasi dan konstiriksi endotel, antara mediator prokoagulan dan antikoagulan, atau antara zat-zat yang menghambat dan mendorong pertumbuhan. Pada dasarnya, disfungsi endotel terjadi karena penebalan matrik sub endotel, misalnya pada aterosklerosis yang menyebabkan NO sulit mencapai otot polos. Penyakit tertentu dapat menyebabkan disfungsi endotel, antara lain aterosklerosis, hipertensi, hiperkolesterolemia, dan diabetes mellitus. Penyakit-penyakit tersebut menyebabkan disfungsi endotel sehingga terjadi vasokonstriksi, hipertrofi dan proliferasi otot polos, adesi leukosit, akumulasi lemak, dan trombosis (Sargowo, 2003).

Dengan adanya disfungsi endotel akibat beberapa kondisi seperti diabetes dan penyakit jantung akan berdampak pada timbulnya penyulit penyakit tersebut, seperti mikro angiopati, iskemia, gagal ginjal, dan sebagainya (Nurhidayat, 2010).

2.7 Kultur Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)

Kultur jaringan berarti membudidayakan suatu jaringan tertentu yang mempunyai sifat seperti induknya. Kultur jaringan (*Tissue Culture*) merupakan salah satu cara perbanyakan jaringan secara vegetatif. Kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan jaringan dengan cara mengisolasi bagian jaringan, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan secara aseptik yang kaya nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam wadah tertutup yang tembus cahaya sehingga bagian jaringan dapat memperbanyak diri dan

membentuk jaringan lengkap. Pengertian kultur sel adalah sel yang dapat hidup secara *in vitro* dan masih mempunyai sifat-sifat mirip dengan sel intak/sel asalnya, Lepas dari pengaruh sistemik, sel-sel tertentu mengadakan proliferasi tetapi masih dalam keadaan tidak terdiferensiasi. Kultur sel merupakan metode untuk mempelajari perubahan fungsi sel/jaringan tanpa pengaruh sistemik. Mula-mula merupakan fragmen jaringan yang diletakkan di cawan kultur. Kultur sel dimulai dengan menanam sel-sel embrionik. Kultur sel dapat dipakai untuk bermacam penelitian, antara lain aktivitas intraseluler, intraseluler flux, ekologi sel, interaksi antar sel. Untuk mengamati sel dan jaringan tubuh yang berukuran kecil diperlukan mikroskop dan pengetahuan pemrosesan jaringan dan istilah-istilah dalam pengamatan mikroskopis sel (Noor, 2013).

Kultur HUVECs adalah kultur jaringan yang diperoleh dari sel endotel vena umbilicus manusia dengan media yang memungkinkan HUVECs dapat tumbuh. Kultur HUVECs adalah kultur sel yang berasal dari sel endotel vena umbilical manusia (Nurhidayat, 2010). Kultur HUVECs merupakan model penelitian yang tepat dalam mempelajari struktur dan fungsi dari sel endotel terhadap stimulus eksogen (Liu *et al.*, 2011).

2.8 Manggis (*Garcinia mangostana* Linn)

2.8.1 Taksonomi

- Kingdom : Plantae
Divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Ordo : Guttiferales
Famili : Clusiaceae
Genus : *Garcinia*
Spesies : *Garcinia mangostana* Linn.



**Gambar 2.5 Buah Manggis
(Ropiah, 2009)**

Garcinia mangostana Linn (manggis) merupakan tanaman yang hijau sepanjang musim. Tanaman ini banyak ditemukan di daerah Asia Tenggara, termasuk di Indonesia. Buahnya dijuluki ratu buah karena rasanya yang enak dan karena bentuk kelopaknya yang menyerupai mahkota (Pedraza-Chaverri, 2008).

Manggis merupakan salah satu buah yang digemari oleh masyarakat Indonesia. Tanaman manggis berasal dari hutan tropis yang teduh di kawasan Asia Tenggara, yaitu hutan belantara Indonesia. Dari Asia Tenggara, tanaman ini menyebar ke daerah Amerika Tengah dan daerah tropis lainnya seperti Filipina, Papua New Guinea, Kamboja, Thailand, Srilanka, Madagaskar, Honduras, Brazil dan Australia Utara. Manggis merupakan salah satu buah unggulan Indonesia yang memiliki peluang ekspor cukup menjanjikan (Prihatman, 2000).

Permintaan manggis meningkat dari tahun ke tahun seiring dengan kebutuhan konsumen terhadap buah yang mendapat julukan ratu buah (*Queen of Fruits*). Ekspor manggis dari Indonesia mengalami peningkatan seiring dengan kebutuhan buah manggis dunia terutama Hongkong, Singapura, dan Inggris (Prihatman, 2000).

Manggis mempunyai berbagai macam nama local khususnya di Indonesia seperti manggu (Jawa Barat), manggus (Lampung), Manggusto

(Sulawesi Utara), manggista (Sumatera Barat). Pohon manggis dapat tumbuh di dataran rendah sampai di ketinggian di bawah 1.000 m dpl. Pertumbuhan terbaik dicapai pada daerah dengan ketinggian di bawah 500-600 m dpl. Pusat penanaman pohon manggis adalah Kalimantan Timur, Kalimantan Tengah, Jawa Barat (Jasinga, Ciamis, Wanayasa), Sumatera Barat, Sumatera Utara, Riau, Jawa Timur dan Sulawesi Utara (Prihatman, 2000).

Buah manggis dapat disajikan dalam bentuk segar, sebagai buah kaleng, dibuat sirop/sari buah. Secara tradisional buah manggis digunakan sebagai obat sariawan, wasir dan luka. Kulit buah dimanfaatkan sebagai pewarna termasuk untuk tekstil dan air rebusannya dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Batang pohon dipakai sebagai bahan bangunan, kayu bakar/kerajinan (Prihatman, 2000).

2.8.2 Karakteristik Fisik Manggis

Manggis atau mangosteen (*Garcinia mangostana*) merupakan tanaman yang hampir seluruh bagian tanamannya dapat dimanfaatkan, mulai dari daging buah, kulit luar, daun, batang hingga akar. Berdasarkan data dari jurnal agrikultura, komponen terbesar dari buah manggis adalah kulit buah (60,82% dari berat buah utuh), sedangkan daging buah adalah komponen kedua terbesar (35,51% dari berat buah utuh). Sisanya adalah komponen daun kelopak buah (3,67% dari berat buah utuh). Dari keseluruhan buah utuh tersebut hampir semua komponen buah dapat dimanfaatkan, kecuali biji yang tidak memenuhi syarat untuk pembenihan hanya dapat dimanfaatkan untuk bahan kompos saja. Kulit manggis mengisi kurang lebih 60% dari berat total manggis. Hal ini berarti, dalam 1 kg manggis dapat diperoleh 600 gram kulit manggis (Ropiah, 2009; Prihatman, 2000).

2.8.3 Kandungan

Buah manggis merupakan spesies terbaik dari genus *Garcinia* dan mengandung gula sakarosa, dekstrosa dan levulosa. Dari beberapa penelitian, dapat diketahui komposisi nutrisi dari buah manggis per 100 gram-nya, yang dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Komposisi	Jumlah
Kadar Air (%)	80,2 – 84,9
Energi (kal)	60 -63
Protein (g)	0,5 – 0,6
Lemak (g)	0,1 – 0,6
Karbohidrat(g)	14,3 -15,6
Serat (g)	5 – 5,1
Kalsium (mg)	0,01 - 8
Fosfor (mg)	0,02 -12
Besi (mg)	0,2 – 12
Vitamin B1 (mg)	0,03
Vitamin B2 (mg)	0,03
Vitamin B5/ niasin (mg)	0,03
Vitamin C (mg)	4,2

Tabel 2.1 Komposisi Nutrisi per 100 gram Buah Manggis
(www.thewisegardener.com, 2002)

Menurut Qosim (2007) diketahui komposisi bagian buah yang dimakan per 100 gram meliputi 79,2 gram air, 0,5 gram protein, 19,8 gram karbohidrat, 0,3 gram serat, 11 mg kalsium, 17 mg fosfor, 0,9 mg besi, 14 IU vitamin A, 66 mg vitamin C, vitamin B1 (thiamin) 0,09 mg, vitamin B2 (riboflavin) 0,06 mg, dan vitamin B5 (niasin) 0,1 mg. Daging buah manggis berwarna putih, bertekstur halus dan rasanya manis bercampur asam

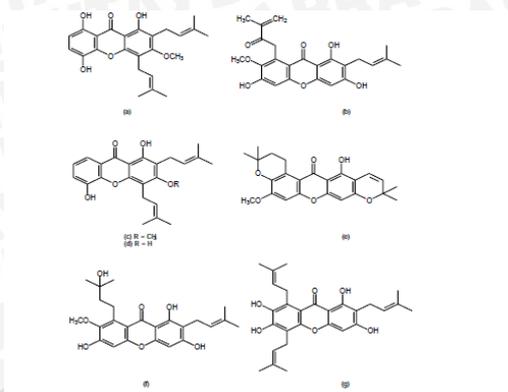
sehingga menimbulkan rasa khas dan segar. Buah manggis termasuk buah eksotik yang sangat digemari oleh konsumen karena rasanya lezat, bentuk buah yang indah dan tekstur daging buah yang putih halus sehingga manggis mendapat julukan *Queen of Tropical Fruit*. Secara tradisional buah manggis adalah obat sariawan, wasir, dan luka.

Di dalam kulit manggis, terdapat suatu senyawa antioksidan bernama xanton. Xanton adalah suatu senyawa organik dengan struktur molekul $C_{13}H_{8}O_2$. Xanton merupakan antioksidan yang kuat (Monajjemi *et al.*, 2011).

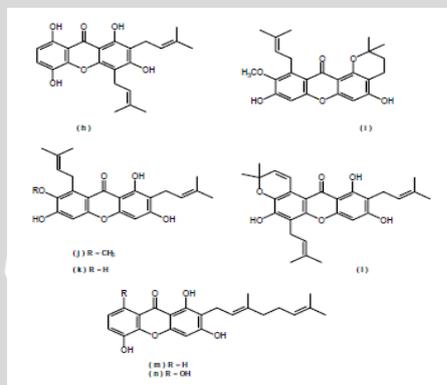
Senyawa xanton dalam kulit manggis adalah sumber antioksidan terbanyak yang ditemukan di alam. Sejauh ini kurang lebih ada 40 jenis xanton yang telah ditemukan di dalam buah manggis (Monajjemi *et al.*, 2011).

Diantara banyaknya jenis xanton yang telah ditemukan, yang paling sering diteliti adalah jenis α -mangostin, β -mangostin, γ -mangostin, garcinone E, garcinone E, 8-deoxygartanin, dan gartanin (Pedraza-Chaverri, 2008). Alfa-mangostin, misalnya, berperan dalam melawan terjadinya proliferasi sel leukemia manusia HL60 dengan memicu terjadinya apoptosis. Gamma mangostin berperan dalam menghambat aktivitas siklooksigenase dan menekan konversi asam arakidonat menjadi prostaglandin E2 (Kosem *et al.*, 2007).

Berikut adalah gambar struktur kimia xanton yang terdapat pada Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*).



Gambar 2.6 Struktur kimia dari 8-hidroksikudraksanton G (a), mangostinon (b), kudraksanton G (c), 8-deoksigartanin (d), garsimangoson B (e), garsinon D (f), dan garsinon E (g). (Jung, 2006)



Gambar 2.7 Struktur kimia dari gartanin (h), 1-isomangostin (i), alfa-mangostin (j), gamma-mangostin (k), tovofillin A (l), mangostinon (m), dan smeathxanthon A (n). (Jung, 2006)

Sedangkan menurut Haryadi (2011), beberapa kandungan yang terdapat dalam kulit manggis antara lain:

a. Xanton

Anti-oksidan yang terdapat dalam kulit buah Manggis dengan kadar yang tinggi memiliki sifat yang baik dan bermanfaat bagi tubuh, seperti anti-peradangan, anti-diabetes, anti-kanker, anti-bakteri, antijamur, anti-plasmodial, dan mampu meningkatkan kekebalan tubuh, hepatoprotektif.

Di dalam senyawa xanton yang paling banyak terkandung dalam buah Manggis ialah kandungan α -mangostin dan γ -mangostin.

b. Alfa-mangostin

Alfa-mangostin adalah senyawa yang sangat berkhasiat dalam menekan pembentukan senyawa karsinogen pada kolon. Selain α -mangostin, senyawa xanton juga mengandung gamma-mangostin yang juga memiliki banyak manfaat dalam memberikan proteksi atau melakukan upaya pencegahan terhadap serangan penyakit.

c. Tanin

Tanin adalah senyawa lain yang terkandung dalam kulit buah Manggis, memiliki aktifitas anti-oksidan.

d. Antosianin

Antosianin memiliki kemampuan sebagai anti-oksidan yang baik dan memiliki peranan yang cukup penting dalam mencegah beberapa penyakit seperti kanker, diabetes, kardiovaskuler, dan neuronal. Antosianin merupakan kelompok pigmen yang terdapat dalam tanaman dan biasanya banyak ditemukan dalam bunga, sayuran maupun buah-buahan seperti Manggis, Stroberry, Rasberry, Apel, dan lainnya.

e. Anti-inflamasi (Peradangan)

Kulit buah Manggis memiliki kemampuan sebagai antiinflamasi (anti-peradangan).

f. Anti-kanker

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa kandungan xanton dalam kulit buah Manggis mampu berperan sebagai senyawa anti-kanker. Kulit buah Manggis memiliki sifat antiproliferasi untuk bisa menghambat pertumbuhan sel kanker, selain juga mampu menghancurkan sel kanker.

g. Anti-mikroba

Kulit buah Manggis juga dikenal memiliki daya anti-mikroba terhadap beberapa bakteri seperti *Staphylococcus aureus*. Bakteri ini sangat resisten terhadap anti-biotik metisilin.

2.8.4 Manfaat Manggis

Sejak dahulu, manggis telah banyak digunakan untuk mengobati berbagai penyakit seperti diare, sakit perut, disentri, luka yang terinfeksi, supurasi, dan ulkus kronis (Pedraza-Chaverri, 2008).

Berdasarkan beberapa penelitian eksperimental belakangan ini, ditemukan bahwa manggis memiliki banyak efek untuk kesehatan, antara lain efek antioksidan, antitumor, antiinflamasi, antialergi, antibakteri, antifungal, antiviral, dan antimalarial (Pedraza-Chaverri, 2008; Weecharangan *et al.*, 2006; Kosem *et al.*, 2007).

Kulit manggis yang dahulu hanya dibuang saja ternyata dapat dikembangkan sebagai obat. Kulit buah manggis setelah diteliti ternyata mengandung beberapa senyawa dengan aktivitas farmakologi misalnya antiinflamasi, antihistamin, pengobatan penyakit jantung, antibakteri, antijamur. Beberapa senyawa utama kandungan kulit buah manggis adalah golongan xanton. Senyawa xanton yang telah teridentifikasi, diantaranya α -mangostin dan γ -mangostin. Senyawa xanton yang telah teridentifikasi, diantaranya adalah 1,3,6-trihidroksi-7-metoksi-2,8-bis(3-metil-2-butenil)-9H-xanten-9-on and 1,3,6,7-tetrahidroksi-2,8-bis(3-metil-2-butenil)-9Hxanten-9-on. Keduanya lebih dikenal dengan nama α -mangostin dan γ -mangostin (Jinsart, 1992). Ho *et al* (2002) melaporkan senyawa xanton yang diisolasi dari kulit buah manggis, ternyata juga menunjukkan aktivitas farmakologi yaitu garcinon E. Lebih lanjut, Jung *et al* (2006) berhasil mengidentifikasi kandungan xanton dari ekstrak larut dalam diklorometana, yaitu 2 xanton terprenilasi teroksidasi dan 12 xanton

lainnya. Dua senyawa xanton terprenilasi teroksigenasi adalah 8-hidroksikudraksanton G, dan mangostingon [7-metoksi-2-(3-metil-2-butenil)-8-(3-metil-2-okso-3-butenil)-1,3,6-trihidroksiksanton. Sedangkan keduabelas xanton lainnya adalah : kudraksanton G, 8-deoksigartanin, garsimangoson B, garsinon D, garsinon E, gartanin, 1-isomangostin, α -mangostin, γ -mangostin, mangostinon, smeathxanthon A, dan tovofillin A (Mardiana, 2011).

Pemanfaatan kulit buah manggis sebenarnya sudah dilakukan sejak lama. Kulit buah manggis secara tradisional digunakan pada berbagai pengobatan di Negara India, Myanmar Sri langka, dan Thailand. Secara luas, masyarakat Thailand memanfaatkan kulit buah manggis untuk pengobatan penyakit sariawan, disentri, cystitis, diare, gonorea, dan eksim (Mardiana, 2011).

Kulit buah manggis dibuat menjadi salep untuk mengobati eksim, air rebusan kulit manggis juga digunakan sebagai ramuan untuk mengobati luka, demam, diare, sariawan dan sembelit, selain itu juga bubuk atau serbuk dari kulit manggis yang dikeringkan juga bermanfaat untuk mengobati disentri (Mardiana, 2011).

2.8.5 Efek Farmakologi Xanton pada ekstrak kulit Manggis

2.8.5.1 Aktivitas antihistamin

Dalam reaksi alergi, komponen utama yang mengambil peran penting adalah sel mast, beserta mediator-mediator yang dilepaskannya yaitu histamin dan serotonin. Alergi disebabkan oleh respon imunitas terhadap suatu antigen ataupun alergen yang berinteraksi dengan limfosit B yang dapat memproduksi imunoglobulin E (IgE). Imunoglobulin E yang diproduksi kemudian menempel pada reseptor Fc ϵ RI pada permukaan membran sel mast. Setelah adanya interaksi kembali antara antigen-antibodi, akan merangsang sel mast untuk melepaskan histamin (Kresno, 2001).

Dari penelitian yang dilakukan Chairungrilerd *et al.* (1996a, 1996b, 1998) dapat diketahui bahwa α -mangostin dikategorikan sebagai pengeblok reseptor histaminergik khususnya H1, sedangkan γ -mangostin sebagai pengeblok reseptor serotonergik khususnya 5-hidroksitriptamin 2A atau 5HT2A. Lebih lanjut, Nakatani *et al.* (2002a) melakukan penelitian ke arah mekanisme ekstrak kulit buah manggis tersebut. Dari penelitian ini, ekstrak etanol 40 % buah manggis adalah paling poten dalam menghambat sintesa PGE2 dan pelepasan histamin.

2.8.5.2 Antiinflamasi

Dari hasil penelitian Nakatani *et al.* (2002b) diketahui bahwa senyawa yang mempunyai aktivitas anti-inflamasi adalah gamma-mangostin. Gamma-mangostin merupakan xanton bentuk diprenilasi tetraoksigenasi. Gamma-mangostin menghambat secara poten pelepasan PGE2 pada sel glioma tikus C6 yang diinduksi Ca^{2+} ionophore A23187. Gammamangostin menghambat perubahan asam arakidonat menjadi PGE2 dalam mikrosomal, ini ada kemungkinan penghambatan pada jalur siklooksigenase. Pada percobaan enzimatik in vitro, senyawa ini mampu menghambat aktivitas enzim COX-1 dan COX-2. Lebih lanjut, Nakatani *et al.* (2004) membuktikan γ -mangostin secara langsung menghambat aktivitas enzim IKK, untuk kemudian mencegah proses transkripsi gen COX-2 (gen target NF κ B), menurunkan produksi PGE2 dalam proses inflamasi.

2.8.5.3 Anti-oksidan

Selanjutnya, Weecharansan *et al.* (2006) melakukan penelitian aktivitas antioksidan beberapa ekstrak kulit buah manggis yaitu ekstrak air, etanol 50 dan 95%, serta etil asetat. Metode yang digunakan adalah penangkapan radikal bebas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa semua ekstrak mempunyai potensi sebagai penangkal radikal bebas, dan ekstrak air dan etanol mempunyai potensi lebih besar. Berkaitan dengan aktivitas

antioksidan tersebut, kedua ekstrak tersebut juga mampu menunjukkan aktivitas neuroprotektif pada sel NG108-15. Seiring dengan hasil tersebut, Jung *et al.* (2006) melakukan penelitian aktivitas antioksidan dari semua senyawa kandungan yang menunjukkan aktivitas poten adalah : 8-hidroksikudraxantone, gartanin, α -mangostin, γ -mangostin dan smeachxanthone A.

2.8.5.4 Antikanker

Ho *et al.* (2002) berhasil mengisolasi beberapa senyawa Xanton dan menguji efek sitotoksitas pada sel line kanker hati. Berdasarkan penelitian tersebut, senyawa garsinon E menunjukkan aktivitas sitotoksitas paling poten. Sementra itu, Moongkarndi *et al.* (2004) melaporkan bahwa ekstrak metanol kulit buah manggis menunjukkan aktivitas sangat poten dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara SKBR3, dan menunjukkan aktivitas apoptosis. Di lain pihak, Matsumoto *et al.* (2003) melakukan uji serupa yaitu aktivitas antiproliferatif dan apoptosis pada pertumbuhan sel leukemia manusia HL60. Berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya, alfa-mangostin menunjukkan aktivitas anti-proliferasi dan apoptosis terpoten diantara senyawa xanton lainnya. Alfa-mangostin diduga kuat mem-perantarai apoptosis jalur mitokondria. Perubahan mitokondria tersebut meliputi : pembengkakan sel, berkurangnya potensial membran, penurunan ATP intraseluler, akumulasi senyawa oksigen reaktif (ROS), dan pelepasan c/AIF sitokrom sel.

2.8.5.5 Antimikroorganisme

Suksamran *et al.* (2003) bersama kelompoknya asal Thailand, melakukan penelitian potensi antituberkulosa. Hasilnya, α -mangostin, γ -mangostin dan garsinon B menunjukkan aktivitas paling poten menghambat kuat terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Selanjutnya, Sakagami *et al.*, (2005) membuktikan α -mangostin aktif terhadap bakteri Enterococci dan *Staphylococcus aureus* yang masingmasing resisten terhadap vancomisin dan

metisilin. Ini diperkuat dengan aktivitas sinergisme dengan beberapa antibiotika (gentamisin dan vancomisin) terhadap kedua bakteri tersebut. Sementara itu, Mahabusarakam *et al.* (2006) melakukan pengujian golongan Xanton termasuk mangostin, pada *Plasmodium falciparum*. Hasil menunjukkan bahwa mangostin mempunyai efek antiplasmodial level menengah, sedangkan Xanton terprenilasi yang mempunyai gugus alkilamino menghambat sangat poten.

2.8.5.6 Aktivitas lainnya

Telah disebutkan sebelumnya bahwa alfa-mangostin memiliki aktivitas antioksidan dan penangkal radikal bebas. Berkaitan dengan fakta tersebut, alfa-mangostin mampu menghambat proses oksidasi LDL yang sangat berperan dalam aterosklerosis (William *et al.*, 1995). Sementara itu, Gopalakrishnan *et al.* (1997) melaporkan bahwa senyawa Xanton mangostin dari kulit buah manggis mampu menghambat pertumbuhan jamur patogenik: *Fusarium oxysporum vasinfectum*, *Alternaria tenuis*, dan *Dreschlera oryzae*.

2.8.6 Antioksidan

Oksidasi adalah jenis reaksi kimia yang melibatkan pengikatan oksigen, pelepasan hidrogen, atau pelepasan elektron. Proses oksidasi adalah peristiwa alami yang terjadi di alam dan dapat terjadi dimana-mana tak terkecuali di dalam tubuh kita. Antioksidan bersifat sangat mudah teroksidasi atau bersifat reduktor kuat dibanding dengan molekul yang lain. Jadi keefektifan antioksidan bergantung dari seberapa kuat daya oksidasinya dibanding dengan molekul yang lain. Semakin mudah teroksidasi maka semakin efektif antioksidan tersebut (Indigomorie. 2009).

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang mampu menunda, memperlambat atau menghambat reaksi oksidasi makanan atau obat. Antioksidan merupakan zat yang mampu melindungi sel melawan kerusakan

yang ditimbulkan oleh radikal bebas, seperti singlet oksigen, superoksida, radikal peroksida dan radikal hidroksil (Yuswantina, 2009).

Fungsi paling efektif dari antioksidan dalam menghambat terjadinya oksidasi adalah dengan menghentikan reaksi berantai dari radikal-radikal bebas (*primary antioxidant*). Berkaitan dengan fungsinya senyawa antioksidan dapat diklasifikasikan dalam 5 tipe antioksidan yaitu (Yuswantina, 2009):

1. *Primary antioxidants*, yaitu senyawa-senyawa fenol yang mampu memutus rantai reaksi pembentukan radikal bebas asam lemak. Dalam hal ini memberikan atom hidrogen yang berasal dari gugus hidroksi senyawa fenol sehingga terbentuk senyawa yang stabil. Senyawa antioksidan yang termasuk kelompok ini, misalnya BHA (*butyl hidroksilanisol*), BHT (*butyl hidrotoluen*), dan tokoferol.
2. *Oxygen scavengers*, yaitu senyawa-senyawa yang berperan sebagai pengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi. Dalam hal ini, senyawa tersebut akan mengadakan reaksi dengan oksigen yang berada dalam sistem sehingga jumlah oksigen akan berkurang. Contoh dari senyawa-senyawa kelompok ini adalah vitamin C (asam askorbat), askorbil palminat, asam eritorbat, dan sulfat.
3. *Secondary antioxidant*, yaitu senyawa-senyawa yang mempunyai kemampuan untuk berdekomposisi hidroperoksida menjadi produk akhir yang stabil. Tipe antioksidan ini pada umumnya digunakan untuk menstabilkan poliolefin resin. Contohnya yaitu asam tiodipropionat dan dilauril tiopropionat.
4. *Antioxidative Enzyme*, yaitu enzim yang berperan mencegah terbentuknya radikal bebas. Contohnya *glukosa oksidase*, *superoksida dismutase* (SOD), *glutathione peroksida dismutase* dan katalase.
5. *Chelators sequestrants*, yaitu senyawa-senyawa yang mampu mengikat logam seperti besi dan tembaga yang mampu mengkatalisa reaksi oksidasi

lemak. Senyawa yang termasuk didalamnya adalah asam sitrat, asam amino, *ethylenediaminetetra acetid acid* (EDTA), dan fosfolipid.

Senyawa antioksidan terkuat, yang terdapat dalam kulit manggis adalah senyawa xanton yang merupakan senyawa organik turunan dari *difenil-γ-pyron*. Senyawa xanton merupakan substansi kimia alami yang dapat digolongkan dalam senyawa jenis fenol atau *polyphenolic*. Karena itulah, senyawa xanton dapat digolongkan sebagai senyawa polar. Senyawa ini memiliki rumus molekul $C_{13}H_8O_2$, sehingga memiliki massa molar sebesar 196,19 10 gram/ mol. Dalam penamaan menurut IUPAC, senyawa ini diberi nama *9H-xanthen-9-one*.

2.8.7 Mekanisme Kerja Antioksidan

Sesuai mekanisme kerjanya antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama tersebut sering disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberi atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida ($R\cdot$, $ROO\cdot$) atau mengubahnya ke bentuk stabil, sementara turunan radikal antioksidan ($A\cdot$) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipid. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju antioksidan dengan berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan rantai oksidan dengan mengubah radikal lipida ke bentuk lebih stabil. Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi. Radikal-radikal antioksidan ($A\cdot$) yang terbentuk pada reaksi tersebut stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru. Radikal-radikal antioksidan dapat saling membentuk produk non radikal. Reaksi penghambatan antioksidan primer

terhadap radikal lipid adalah sebagai berikut : Inisiasi : $R\bullet + AH \rightarrow RH + A\bullet$

Propagasi : $ROO\bullet + AH \rightarrow ROOH + A\bullet$ (Yuswantina, 2009).

2.8.8 Pengaruh Ekstrak Kulit Manggis terhadap ROS sebagai Upaya Proteksi Kardiovaskuler

Hingga saat ini berdasarkan penelitian yang ada hanya α -mangosteen dan gamma-mangosteen yang memiliki efek farmakologi seperti anti oksidan, anti proliferasi, pro-apoptosis, anti karsinogenik, dan antimikroba (Nugroho, 2012). Menurut Kumar *et al.* (2013) mekanisme xanton sebagai anti inflamasi adalah xanton berperan menangkap radikal bebas (ROS) yang memicu keluarnya mediator pro-inflamasi seperti TNF- α yang mengakibatkan stres oksidatif.

Diungkapkan adanya aktivitas scavenging radikal hidroksil dari beberapa xanton yang diisolasi dari bubuk buah manggis. Hanya α -mangostin dari 16 xanton yang diuji menunjukkan aktivitas scavenging terhadap radikal hidroksil. Kemampuan ekstrak kulit manggis sebagai antioksidan xanton juga menghambat I κ B kinase sehingga menghambat aktivasi NF- κ B, sehingga terjadi penurunan TNF- α dan IL-1 dalam sirkulasi. Dengan menurunnya kadar TNF- α dan IL-1 dalam sirkulasi maka respon inflamasi termasuk respon seluler yang terlibat dalam regulasi imun dapat dihambat, sehingga proses difungsi endotel tidak terjadi (Sargowo *et al.*, 2010; Weecharansan *et al.*, 2006).

Xanton mampu bekerja sebagai antioksidan dalam 2 cara, yang pertama dengan sebagai penetralisir radikal bebas dengan cara mendonorkan elektronnya, yang kedua adalah dengan menstimulasi produksi antioksidan endogen (Weecharansan *et al.*, 2006), seperti yang dibuktikan Devi Sampath (2007).

2.8.9 Cara pengekstrakan Kulit manggis

Ekstraksi adalah pemisahan suatu zat dari campurannya dengan pembagian sebuah zat terlarut antara dua pelarut yang tidak dapat tercampur untuk mengambil zat terlarut tersebut dari satu pelarut ke pelarut yang lain. Seringkali campuran bahan padat dan cair (misalnya bahan alami) tidak dapat atau sukar sekali dipisahkan dengan metode pemisahan mekanis atau termis yang telah dibicarakan. Misalnya saja, karena komponennya saling bercampur secara sangat erat, peka terhadap panas, beda sifat-sifat fisiknya terlalu kecil, atau tersedia dalam konsentrasi yang terlalu rendah (Rahayu, 2009).

2.8.9.1 Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Ekstraksi

Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi adalah:

1. Tipe persiapan sampel,
2. Waktu ekstraksi,
3. Kuantitas pelarut,
4. Suhu pelarut, dan
5. Tipe pelarut (Utami, 2009).

Untuk persiapan sampel, Proses ekstraksi mula-mula diawali dengan pencucian buah manggis. Buah manggis yang telah bersih kemudian dipisahkan antara kulit dengan daging buah. Penggunaan kulit manggis ini dikarenakan bagian ini memiliki kandungan xanton 27 kali lebih banyak dari daging buahnya. Kulit manggis yang telah terpisah kemudian mengalami proses pemisahan kembali dengan kulit lunak dan kulit keras (kulit terluar). Pemisahan dilakukan karena penggunaan kulit luar akan membuat rasa dari produk xanton menjadi pahit. Kulit bagian lunak yang telah diperoleh selanjutnya mengalami proses penghancuran. Penghancuran dimaksudkan untuk memperkecil ukuran dari bahan sehingga dapat mempercepat pelarutan komponen xanton dan meningkatkan rendemen ekstraksi (Rahayu, 2009).

Pelarut untuk ekstraksi senyawa organik terbagi menjadi golongan pelarut yang memiliki densitas lebih rendah dari pada air dan pelarut yang memiliki densitas lebih tinggi dari pada air. Kebanyakan pelarut senyawa organik termasuk dalam pelarut golongan pertama, seperti misalnya dietil eter, etil asetat, dan hidrokarbon (light petroleum, heksan dan toluen). Pelarut yang mengandung senyawa klorin seperti diklorometan adalah pelarut yang termasuk dalam golongan pelarut kedua. Pelarut ini memiliki toksisitas yang rendah tetapi mudah membentuk emulsi. Beberapa pelarut yang biasa digunakan untuk ekstraksi diantaranya adalah metanol, etanol, etil asetat, aseton dan asetonitril dengan air dan atau HCL (Houghton, 1998).

2.8.9.2 Proses Ekstraksi Kulit Manggis

Suatu proses ekstraksi biasanya melibatkan tahap-tahap berikut :

1. Mencampur bahan ekstraksi dengan pelarut dan membiarkannya saling berkontak, dalam hal ini terjadi perpindahan massa dengan cara difusi pada bidang antarmuka bahan ekstraksi dan pelarut. Dengan demikian terjadi ekstraksi yang sebenarnya, yaitu pelarutan ekstrak.
2. Memisahkan larutan ekstraksi dari rafinat, kebanyakan dengan cara penjernihan atau filtrasi.
3. Mengisolasikan ekstrak dari larutan ekstrak dan mendapatkan kembali pelarut, umumnya dilakukan dengan menguapkan pelarut. Dalam hal-hal tertentu larutan ekstrak dapat langsung diolah lebih lanjut atau diolah setelah dipekatkan (Hardojo, 1995).

Dalam proses Ekstraksi Kulit Manggis, Sejumlah gram sampel dimaserasi dalam pelarut (± 100 gram sampel dlm 1-2 L pelarut). Dimaserasi minimal 3 hari. Lalu diambil larutannya dengan disaring, kemudian dipekatkan. Dari ekstrak kental itu diberikan pelarut. Setelah itu dicampurkan sampai rata, diendapkan

dan dievaporasi. Ekstraksi yang didapatkan adalah dalam bentuk pasta. Dan untuk pemberian ke hewan coba dilarutkan dengan aquades (Rahayu, 2009).

