



Pengaruh antioksidan Probucol terhadap kadar Malondialdehide (MDA) dan jumlah "Circulating Endothel Cells" pada tikus putih yang menerima stressor

The effect of Probucol antioxidant on Malondialdehyde (MDA) level and total circulating endothelial cells of rats exposed to stressor

Lilik Maslachah¹, Rahmi Sugihartuti¹, Sri Agus Sudjarwo²

¹Department of Medical Pharmacy, Airlangga University School of Medicine, Surabaya

²Department of Pharmacology, Airlangga University School of Medicine, Surabaya

KEYWORDS antioxidant; probucol; stressor; endothelium

ABSTRACT *The objective of the study was to find out the effect of Probucol as an antioxidant on Malondialdehyde (MDA) level and total circulating endothelial cells of rats exposed to stressor. This study was a post test only control group design using 35 three-months old male wistar rats divided into 5 groups consisting of 7 rats each namely the control groups (Po1, Po2) and the experiment groups (P1, P2, P3). Details of the treatment to each groups are as follows: Group Po1 were given per oral Probucol dilution solution for 3 weeks
Group Po2 were given per oral Probucol dilution solution and stressor for 3 weeks
Group P1 were given per oral Probucol dose I (5 mg/rat) and stressor for 3 weeks
Group P2 were given per oral Probucol dose II (10 mg/rat) and stressor for 3 weeks, and
Group P3 were given per oral Probucol dose III (20 mg/rat) and stressor for 3 weeks
Malondialdehyde (MDA) level and total circulating endothelial cells were measured using "Buege and Aust (1978) and Hladovic and Rossman (1973)" method modified by Wijayanto (1996). Data on MDA level and total circulating endothelial cells were analyzed by using analysis of variant (Anova). The presence of significant difference was confirmed by using LSD test. Correlation between MDA level and total circulating endothelial cells was analysed by using "scatter plot" and r (rho) tests. The results showed a significant increase of MDA level of Po1 compared to Po2 ($P < 0.05$). Significant decrease of MDA level ($P < 0.05$) was observed in group P1, P2 and P3 compared to that of the Po1 and Po2 control groups. The results also showed a significant increase of total circulating endothelial cells of the control group Po1 compared to that in the control group Po2 ($P < 0.05$), while significant decrease of total circulating endothelial cells ($P < 0.05$) was observed in group P1, P2 and P3 compared to that of the control group Po2. It can be concluded that stressor may increase MDA level and total circulating endothelial cells.*

Kesulitan hidup yang semakin berat saat ini membuat banyak orang tidak dapat beradaptasi, yang akhirnya akan mempengaruhi keseimbangan (homeostasis) di dalam tubuhnya, yang pada keadaan kronik dapat menimbulkan gangguan terhadap sistem organ dengan tingkatan yang berbeda-beda (Covelli, 1992). Bila beban rangsangan yang diberikan melebihi batas ambang, maka akan timbul respon stress, yaitu respon yang terjadi pada saat individu tidak mampu mengatasi beban fisik atau psikologik (Riley, 1981). Latihan fisik berat bisa merupakan stressor yang dapat menyebabkan seseorang berada dalam kondisi yang patologik (Chandrasoma, 1991). Studi terbaru menunjukkan bahwa kejadian depresi, hipertensi dan penyakit jantung, adalah

penyakit yang diperkirakan ada hubungannya dengan respon stress yang memegang peranan penting dalam masalah kesehatan (Atkinson, 1993).

Selama latihan fisik yang berat dapat dilepaskan radikal bebas yang salah satunya berasal dari xanthine oxidase yang terdapat dalam sel endotel pembuluh darah kapiler. Sejumlah studi telah melaporkan peranan xanthine oxidase sebagai penyebab kerusakan jaringan akibat adanya radikal oksigen. Xanthine oxidase dilaporkan terlibat dalam

Correspondence:

Drh. Lilik Maslachah, M.Kes., Department of Medical Pharmacy, Airlangga University School of Medicine, Surabaya, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47, Surabaya 60131, Telephone (031) 5020251 ext.131

sejumlah penyakit termasuk kerusakan jaringan selama iskemia pada usus, paru, otak, jantung dan otot rangka. Xanthine oxidase adalah enzim yang dapat mengkatalisis oksidasi hypoxanthine menjadi xanthine, juga pada oksidasi xanthine menjadi asam urat. Selama stress metabolic xanthine dehidrogenase berubah secara reversible dan irreversible menjadi bentuk enzim xanthine oxidase dan peningkatan pembentukan AMP yang harus dieliminasi secara terus menerus dari sel. Penumpukan AMP ini menyebabkan hypoxanthine menumpuk pada intra dan ekstra seluler yang menyebabkan aktivitas enzim xanthine oxidase semakin tinggi. Peranan xanthine oxidase sebagai penghasil radikal oksigen sangat besar selama stress oxidative karena efek xanthine oxidase memperkecil hambatan kerusakan jaringan. Telah dilaporkan juga bahwa aktivasi neutrofil disebabkan oleh perubahan xanthine dehidrogenase menjadi xanthine oxidase pada sel endotel, dan penyumbatan dapat terjadi karena akumulasi dan adhesi neutrofil pada dinding endotel dan jaringan yang lain dan dalam waktu yang lama dapat menimbulkan iskemia dan nekrosis sel (Sjodin *et al.*, 1990).

Endotel mempunyai peran yang sangat penting dalam menjaga integritas pembuluh darah. Pada keadaan normal mediator Vasodilatasi pada pembuluh darah adalah EDRF (*Endothelium-Derived Relaxing Factor*) dan Prostaglandin. EDRF tidak hanya bekerja untuk dilatasi otot polos pembuluh darah, tetapi juga berperan menghambat proliferasi otot polos, agregasi platelet, merangsang disagregasi platelet dan menghambat adhesi platelet pada permukaan endotel. Selain itu juga EDRF bekerja sebagai agen anti inflamasi dengan menghambat adhesi monosit dan neutrofil pada permukaan endotel dan bekerja sebagai anti oksidan. EDRF dapat mencegah oxidative LDL sebagai mediator oksidasi atherogenik, yang ditunjukkan dengan kerjanya menghambat atherosklerotik. Proses atherosklerotik disebabkan oleh peningkatan dan akumulasi LDL (*Low Density Lipoprotein*) pada ruang sub endotel. Dengan menurunnya pelepasan EDRF peranan perlindungan oleh endotel juga menurun sehingga sel aktif meningkatkan proses atherogenesis yang prosesnya diperantai oleh peningkatan oksidasi LDL dan oksidan stress dalam dinding pembuluh darah (Flavahan and Vanhoutte, 1995).

Endotel merupakan target organ salah satu penyakit yaitu hipertensi, hal ini terjadi karena adanya atherosclerosis pada pembuluh darah. Hipertensi merupakan faktor risiko pada morbiditas dan mortalitas untuk penyakit kardiovaskuler. Pengaruh

hipertensi pada morfologi dan fungsional endotel pembuluh darah adalah sel endotel mengalami peningkatan volume, karena adanya penonjolan dalam lumen, adanya fibrin dan sel deposit yang meningkat pada ruang sub-intimal dan adanya platelet serta monosit yang meningkat pada endotel pembuluh darah (Luscher and Tanner, 1993).

Perbaikan fungsi endotel dengan pemberian terapi antioksidan belum banyak diketahui. Probucol sebagai obat hipolipidemik mempunyai efek antioksidan yang dapat menghambat proses atherogenik karena adanya oksidasi LDL pada dinding pembuluh darah arteri, sehingga dapat menghambat atheroma yang tidak tergantung efeknya pada lemak darah (Opie, 1991). Radikal bebas mempunyai kemampuan untuk inaktivasi EDRF atau berinteraksi dengan transduksinya yang dapat dicegah atau dihambat oleh antioksidan probucol, disamping itu antioksidan Probucol dapat menurunkan hambatan kerja LDL pada pelepasan EDRF (Evans and Bruckdorfer, 1992).

Probucol sebagai antioksidan yang poten berpengaruh terhadap AOE (*Antioxidant Enzyme*) dan kadar MDA pada tikus yang mengalami nefrektomi subtotal pada tingkat kronik. Hal ini menunjukkan bahwa terapi dengan Probucol sangat nyata pada gangguan fungsi renal yang dihubungkan dengan kemampuannya mempertahankan glomerular AOE (Tang, 1996).

Probucol dapat menurunkan kadar basal Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), Macrophage Colony Stimulating Factor (MCSF) sangat nyata. Hasil ini mendukung bahwa VCAM-1, MCSF memainkan peran penting dalam proses atherogenesis dan diyakini bahwa antiatherogenik dari Probucol mempunyai peran penting (Fruebis, 1997).

Dengan merujuk pada fakta di atas dalam penelitian ini antioksidan Probucol digunakan untuk mencegah disfungsi endotel yang disebabkan oleh adanya stressor. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk (i) membuktikan bahwa antioksidan Probucol dapat menghambat peningkatan kadar Malondialdehyde pada tikus putih yang menerima stressor dan (ii) untuk membuktikan bahwa antioksidan Probucol dapat menghambat peningkatan jumlah "*Circulating Endotel*" tikus putih yang menerima stressor.

BAHAN DAN CARA KERJA

Dalam penelitian ini digunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan, umur 3 bulan, sehat dengan berat badan sekitar 200 gram.

Prosedur penelitian

a. Tahap persiapan

Seluruh hewan percobaan yang berumur 3 bulan dikondisikan dengan lingkungan, pakan, selama 7 hari, sambil diamati kondisi kesehatannya.

b. Pemberian stressor pada tikus

Pemberian stressor pada tikus dilakukan dengan memberikan beban kerja aktivitas fisik renang "*Behavioural despair*" (Willner, 1990). Satu hari sebelum perlakuan tikus ditimbang berat badannya untuk menentukan berat beban pada ekor, dengan beban ekor 2% dari berat badan tikus, kemudian memasukkan hewan coba ke dalam air dan diusahakan supaya hewan berenang. Selanjutnya hewan coba dirangsang 3x secara mekanik (menekan pantatnya) tidak memberikan gerakan berenang atau dengan menghitung sampai 5 kali, maka hewan coba diangkat dari air. Dilakukan setiap hari selama 3 minggu tiap pukul 07.00 WIB selama 30 menit.

c. Tahap perlakuan

Seluruh hewan percobaan dibagi secara acak dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus. Probucol diberikan secara oral dengan menggunakan sonde sehari sekali selama 3 minggu setelah kira-kira 30 menit tikus diberi perlakuan stressor selama 3 minggu juga. Perincian mengenai perlakuan terhadap masing-masing kelompok adalah sebagai berikut:

Kelompok kontrol:

Kelompok Po1 : hanya diberi pelarut Probucol peroral selama 3 minggu

Kelompok Po2 : diberi pelarut Probucol dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu

Kelompok perlakuan:

Kelompok P1 : diberi Probucol dosis I (5 mg/ekor) dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu

Kelompok P2 : diberi Probucol dosis II (10 mg/ekor) dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu

Kelompok P3 : diberi Probucol dosis III (20 mg/ekor) dan diberi perlakuan stress selama 3 minggu

Pada hari terakhir setelah mendapat perlakuan seluruh hewan percobaan dari semua kelompok dianestesi dengan eter dan diambil darahnya sebanyak 5-8 ml melalui jantung

(*cardiac puncture*), dimasukkan dalam tabung yang telah diisi dengan anti koagulansia Na Sitrat 3,8% (1 : 10) untuk sampel pemeriksaan "*Circulating Endothel Cell*" yaitu sekitar 2 ml darah dan 200 μ l asam sitrat. Untuk pemeriksaan kadar MDA serum sisa darah tanpa koagulansia kemudian didiamkan selama 1/2 jam, selanjutnya dipusingkan selama 10 menit, serum diambil dan disimpan pada -20°C, sampai dilakukan pemeriksaan MDA selanjutnya.

Pemeriksaan sampel darah

Penetapan kadar Malondialdehida dalam darah

Penetapan kadar malondialdehida dalam darah dilakukan dengan metode Buege and Aust (1978) berdasarkan jumlah malondialdehida yang bereaksi dengan reagen asam tiobarbiturat. Kadar malondialdehida yang terdeteksi ini dianggap identik dengan konsentrasi peroksida lipid plasma.

Cara memperoleh dan penghitungan endotel

Pemeriksaan "*Circulating Endothel Cell*" dilakukan dengan menggunakan metode Hladovec and Rossmann (1973), dengan modifikasi metode yang dikembangkan oleh Widjayanto *et al.* (1995).

Analisis data

Data yang terkumpul dari pemeriksaan kadar MDA dan "*Circulating endothel Cell*" dianalisis dengan uji analisis varian (Anava). Bila terdapat perbedaan diantara kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji LSD.

Untuk melihat korelasi kadar Malondialdehida (MDA) serum dengan jumlah "*Circulating Endothel Cell*" digunakan uji korelasi dengan "*Scarter Plot*" dengan memperhatikan r (ρ), dan square (r^2) nya.

Apabila $t > 1,96$ maka H_0 ditolak ($H_1 : r \neq 0$) pada "*level of confidence*" 95%, artinya kita yakin bahwa ada hubungan (korelasi) antara MDA serum dengan "*Circulating Endothel Cell*" dan bukan karena kebetulan.

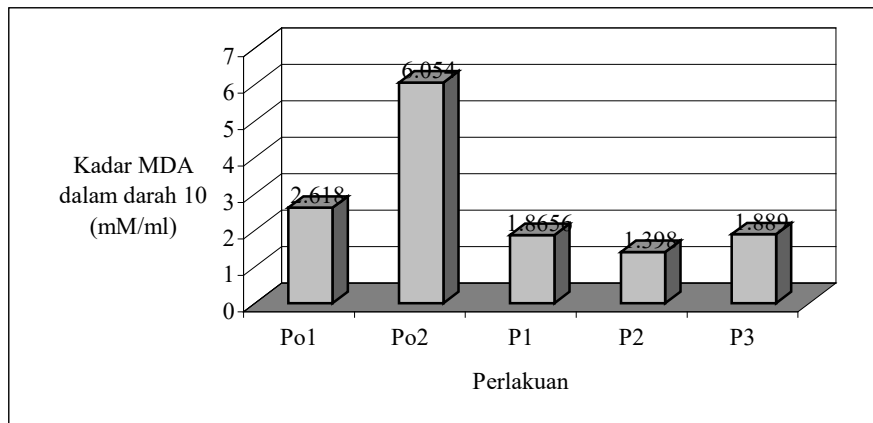
HASIL

Hasil penelitian pengaruh antioksidan Probucol terhadap kadar Malondialdehida (MDA) dalam darah pada tikus putih yang menerima stressor disajikan dalam Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel 1. Kadar MDA dalam darah pada tikus yang menerima stressor dan penambahan antioksidan Probuocol pada berbagai dosis $\mu\text{M}/\text{ml}$.

Ulangan No	Perlakuan				
	Po1	Po2	P1	P2	P3
1	2.341	6.571	1.918	1.241	1.721
2	2.736	6.386	1.692	1.58	1.692
3	2.426	5.633	1.682	1.467	2.116
4	2.313	5.826	1.749	1.523	1.692
5	2.679	5.957	2.003	1.551	1.889
6	2.649	6.268	1.974	1.269	2.256
7	3.179	5.738	1.861	1.156	1.861
$\bar{X} \pm \text{SD}$	2.618 \pm 0.300	6.054 \pm 0.356	1.8656 \pm 0.113	1.398 \pm 1.716	1.889 \pm 0.2209

Keterangan :
 Po1 : Kontrol
 Po2 : Kontrol Stressor
 P1 : Stressor + antioksidan Probuocol dosis 5 mg/ekor
 P2 : Stressor + antioksidan Probuocol dosis 10 mg/ekor
 P3 : Stressor + antioksidan Probuocol dosis 20 mg/ekor

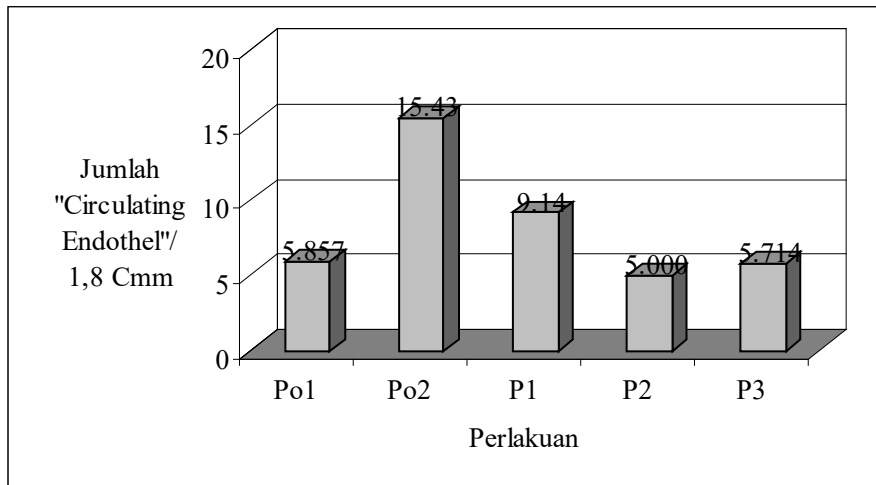


Gambar 1. Rata-rata kadar MDA dalam darah ($\mu\text{M}/\text{ml}$) pada tikus putih yang menerima stressor dan penambahan antioksidan Probuocol pada berbagai dosis.

Hasil penelitian pengaruh Probuocol terhadap jumlah "*Circulating Endothel Cell*" pada tikus putih yang menerima stressor dan pemberian antioksidan Probuocol pada berbagai dosis disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 2.

Tabel 2. Jumlah "*Circulating Endothel Cell*" pada tikus putih yang menerima stressor dan antioksidan probuocol pada berbagai dosis / 1,8 Cmm.

Ulangan No	Perlakuan				
	Po1	Po2	P1	P2	P3
1	6	14	13	4	7
2	4	8	6	4	5
3	2	16	8	4	6
4	6	20	10	9	3
5	6	19	13	2	9
6	8	22	6	7	7
7	9	9	8	5	3
$\bar{X} \pm \text{SD}$	5.857 \pm 2.340	15.43 \pm 5.41	9.14 \pm 2.97	5.000 \pm 2.309	5.714 \pm 2.215



Gambar 2. Rata-rata jumlah "Circulating Endothel Cell" pada tikus putih yang menerima stressor dan penambahan antioksidan Probuocol pada berbagai dosis/1,8 Cmm

Data pengukuran kadar MDA dalam darah

Analisis varian (Anava) kadar MDA dalam darah diantara kelompok perlakuan, menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$). Untuk membandingkan antar masing-masing kelompok dilanjutkan dengan uji "t".

Pada kelompok yang tidak menerima perlakuan/kontrol (Po1) diperoleh nilai rata-rata kadar MDA dalam darah adalah $2,618 \pm 0,300 \mu\text{M/ml}$. Jika dibandingkan dengan kelompok yang hanya menerima stressor (Po2) yang nilai rata-rata kadar MDA dalam darah $6,054 \pm 0,356 \mu\text{M/ml}$, terlihat adanya peningkatan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

Tetapi, jika dibandingkan dengan kelompok stressor yang diberi antioksidan Probuocol pada berbagai dosis (P1, P2, P3) nilai rata-rata kadar MDA dalam darahnya berturut-turut adalah $1,866 \pm 0,113 \mu\text{M/ml}$, $1,398 \pm 0,172 \mu\text{M/ml}$, dan $1,889 \pm 0,221 \mu\text{M/ml}$, yang menunjukkan adanya penurunan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

Pada kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis I, 5 mg/ekor (P1) nilai rata-rata kadar MDA dalam darah adalah $1,866 \pm 0,113 \mu\text{M/ml}$. Ini menunjukkan penurunan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$), jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis II, 10 mg/ekor (P2) yang nilai kadar MDA dalam darah sebesar $1,398 \pm 0,172 \mu\text{M/ml}$.

Tetapi jika kelompok ini dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis III, 20 mg/ekor (P3) yang nilai rata-rata kadar MDA dalam darah sebesar $1,889 \pm 0,221 \mu\text{M/ml}$, maka dijumpai perbedaan yang tidak bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P > 0,05$).

Sementara itu kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis II, 10 mg/ekor (P2) menunjukkan nilai rata-rata kadar MDA dalam darah $1,398 \pm 0,172 \mu\text{M/ml}$. Jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis III, 20 mg/ekor (P3) yang nilai rata-rata kadar MDA dalam darah sebesar $1,889 \pm 0,221 \mu\text{M/ml}$, maka terdapat perbedaan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

Data perhitungan jumlah "Circulating Endothel"

Analisis varian (Anava) jumlah "Circulating Endothel Cell" diantara kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$). Kemudian antar masing-masing kelompok dibandingkan dengan uji "t". Pada kelompok yang tidak menerima perlakuan / kontrol (Po1) diperoleh nilai rata-rata jumlah "Circulating Endothel Cell" $5,857 \pm 2,340 / 1,8 \text{ Cmm}$. Peningkatan yang bermakna pada $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$) tampak jika kelompok ini dibandingkan dengan kelompok stressor (Po2) yang memiliki nilai rata-rata jumlah "Circulating Endothel Cell" $15,43 \pm 5,41 / 1,8 \text{ Cmm}$.

Perbedaan yang bermakna $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$) juga teramati jika kelompok ini dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis I, 5 mg/ekor (P1) yang nilai rata-ratanya $9,14 \pm 2,97 / 1,8 \text{ Cmm}$. Tetapi ada perbedaan yang tidak bermakna $\alpha = 5\%$ ($P > 0,05$) jika kelompok ini dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis II, 10 mg/ekor (P2) yang nilai rata-ratanya $5,000 \pm 2,309 / 1,8 \text{ Cmm}$.

Sementara itu perbedaan yang tidak bermakna $\alpha = 5\%$ ($P > 0,05$) juga ditunjukkan jika kelom-

pok ini dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis III, 20 mg/ekor (P3) yang nilai rata-ratanya $5,714 \pm 2,215 / 1,8$ Cmm.

Pada kelompok stressor (Po2) yang memiliki nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel Cell*" $15,43 \pm 5,41/1,8$ Cmm jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol pada berbagai tingkat dosis (P1, P2, P3) yang nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel Cell*" berturut-turut $9,14 \pm 2,97 / 1,8$ Cmm $5,000 \pm 2,309/1,8$ Cmm dan $5,714 \pm 2,215/1,8$ Cmm terlihat adanya perbedaan yang bermakna $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

Pada kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis I, 5 mg/ekor (P1) nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel Cell*" $9,14 \pm 2,97/1,8$ Cmm. Jika dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis II, 10 mg/ekor (P2) yang nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel Cell*" $5000 \pm 2,309 / 1,8$ Cmm terlihat adanya perbedaan yang bermakna $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

Perbedaan yang bermakna $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$) juga tampak jika kelompok ini dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis III, 20 mg/ekor (P3) dengan nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel Cell*" $5,714 \pm 2,215 / 1,8$ Cmm.

Sementara itu tidak adanya perbedaan yang bermakna $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$) ditunjukkan jika kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis II, 10 mg/ekor (P2) yang memiliki nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel Cell*" $5,000 \pm 2,309/1,8$ Cmm dibandingkan dengan kelompok stressor dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis III, 20 mg/ekor (P3) yang memiliki nilai rata-rata jumlah "*Circulating Endothel Cell*" $5,714 \pm 2,215 / 1,8$ Cmm.

Hubungan/korelasi kadar MDA dalam darah dan jumlah "*Circulating Endothel Cell*"

Untuk melihat korelasi kadar MDA dalam darah dengan jumlah "*Circulating Endothel Cell*" digunakan uji korelasi dengan "Scarter Plot" yang hasilnya menunjukkan bahwa korelasi antara kadar MDA dalam darah dan jumlah "*Circulating Endhotel Cell*" sebesar 0,719 artinya ada keterkaitan antara kadar MDA dalam darah dengan jumlah "*Circulating Endothel Cell*".

Untuk melihat regresinya diperoleh model regresi $Y = 2,49 + 2,07X$ artinya makin tinggi jumlah "*Circulating Endothel Cell*" yang ditemukan dalam

sirkulasi darah menunjukkan makin besar kadar MDA dalam darah.

PEMBAHASAN

Pemberian stressor pada tikus putih dengan memberikan beban kerja aktivitas fisik yang berlebihan menyebabkan peningkatan kadar malondialdehide (MDA) dalam darah dan jumlah "*Circulating Endothel Cell*" jika dibandingkan dengan tikus putih yang tidak menerima perlakuan/kontrol. Brady *et al.* (1979) telah melaporkan bahwa ada peningkatan lipid peroksida pada jaringan hati dan otot segera setelah aktivitas fisik yang diukur dengan menggunakan tes TBARS. Hal ini karena pada keadaan stress akibat latihan fisik yang berlebihan dan stress emosional dapat menyebabkan sympatoadrenal discharge, yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan kadar noradrenalin dan adrenalin yang sangat tinggi (Kestin *et al.*, 1993). Sozmen *et al.* (1998) juga melaporkan bahwa katecholamine (noradrenalin dan adrenalin) sebagai sumber yang sangat penting dalam pembentukan radikal bebas oksigen, yaitu dengan cara autooksidasi dalam reaksi yang kompleks.

Peningkatan jumlah "*Circulating Endothel Cell*" pada tikus yang menerima stressor disebabkan oleh peningkatan produksi radikal bebas sehingga menyebabkan peningkatan kadar peroksidasi fosfolipid yang ditunjukkan dengan peningkatan kadar MDA dalam darah dari hasil peroksidasi lipid, hal ini dapat menyebabkan efek sitotoksik, kerusakan jaringan dan disfungsi sel endotel sehingga endotel lepas dari membrane dasar ikut sirkulasi darah yang dapat dilihat dengan peningkatan jumlah "*Circulating Endothel*" (Ward *et al.*, 1988, Sozmen *et al.*, 1998).

Disfungsi sel endotel dapat mengganggu keseimbangan antara faktor relaksasi dan kontraksi dari otot polos pembuluh darah sehingga dapat menyebabkan spasme arterial (Sozmen *et al.*, 1998). Hal ini menunjukkan bahwa endotel mempunyai peran yang sangat penting sebagai pengatur vaskuler, sebagai target dari peningkatan tekanan darah. Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Baumann *et al.*, 1973) menunjukkan bahwa pemberian stress fisik pada orang normal dan hipertensi dapat meningkatkan tekanan darah baik systolik maupun diastolik.

Sementara itu, tikus yang menerima stressor dengan pemberian Probuocol pada berbagai tingkat dosis menunjukkan penurunan kadar MDA dalam darah dan penurunan jumlah "*Circulating Endothel*

Cell" yang bermakna jika dibandingkan dengan tikus putih yang menerima stressor saja. Simon *et al.* (1993) telah melakukan penelitian yang hasilnya menunjukkan bahwa pemberian antioksidan Probuocol dapat menurunkan peroksidasi lipid plasma pada hewan yang menerima kholesterol, dan mempunyai efek perlindungan terhadap sel endothel. Hal ini menunjukkan bahwa efek perlindungan Probuocol pada fungsi sel endothel mungkin berhubungan dengan efek Probuocol sebagai antioksidan yang mempunyai kemampuan dalam menurunkan peroksidasi lipid yang mengganggu fungsi relaksasi yang tergantung endothel pada atherosklerosis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa radikal bebas menginduksi peroksidasi lipid yang dapat menyebabkan kerusakan atau disfungsi sel endothel dan dapat dihambat/dicegah oleh antioksidan Probuocol.

Probuocol bekerja sebagai antioksidan pemutus reaksi berantai dan mempunyai kemampuan menghambat peroksidasi lipid dan modifikasi oksidasi partikel LDL. Pemberian antioksidan Probuocol pada kelinci dapat meningkatkan respon relaksasi yang tergantung pada endothel. Diketahui bahwa pada keadaan hiperkholesterolemia dapat terjadi peningkatan pembentukan superoksida oleh endothel, superoksida ini secara langsung dapat menginaktivasi nitric oxide dan juga dapat meningkatkan oksidasi LDL dengan membentuk peroksinitrit. Studi terbaru menunjukkan bahwa Probuocol dapat meningkatkan respon endothel dependent vasodilator, tidak hanya mencegah oksidasi LDL tetapi juga memberantas radikal bebas oksigen dalam dinding pembuluh darah (Anderson *et al.*, 1995).

Hasil penelitian Chen and Tseng (1998) menunjukkan bahwa efek antioksidan Probuocol 10 kali lebih kuat dibanding dengan vitamin E jika dilihat pada kemampuan 50% konsentrasinya menghambatnya (IC50) terhadap MDA yang berturut-turut Probuocol > Vitamin E > Vitamin C. Hasil ini menunjukkan bahwa antioksidan Probuocol efektif mencegah oksidasi LDL dalam sistem sel bebas.

Hasil penelitian Inoue dan Ohara (1998) menunjukkan bahwa Probuocol dapat menurunkan pembentukan O_2^- endothel pada pembuluh darah dari kelinci hiperkholesterolemia, yang ditunjukkan dengan penurunan TBARS plasma dan peningkatan "*endothel dependent*" relaksasi pada pembuluh darah hiperkholesterolemia. Mekanisme kerja Probuocol adalah dengan menurunkan kecepatan produksi O_2^- dan/atau meningkatkan pemberantasan O_2^- dalam dinding pembuluh darah. Peningkatan produksi O_2^- dalam pembuluh darah ini dapat menyebabkan inaktivasi nitric oxide dan pembentukan peroksinitrit

yang sangat kuat efeknya pada sel endothel. Probuocol tidak hanya menurunkan inaktivasi dari nitric oxide tetapi juga mempunyai efek perlindungan terhadap oksigen reaktif melalui penurunan produksi O_2^- endothel. Induksi nitroglycerin pada relaksasi pembuluh darah dengan pemberian antioksidan Probuocol tidak mempunyai efek, ini menunjukkan bahwa efek perlindungan Probuocol pada disfungsi dan relaksasi pembuluh darah melalui fungsi endothel, tidak langsung mempengaruhi pada sel otot polosnya.

Pada pemberian antioksidan Probuocol pada berbagai tingkat dosis menunjukkan bahwa pada dosis 5 mg/ekor (P1) dibandingkan dengan dosis 10 mg/ekor kadar MDA dalam darah dan jumlah "*Circulating Endothel Cell*" menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hasil ini menunjukkan bahwa peningkatan pemberian dosis 2 kali P1 memberikan hasil yang lebih baik pada penurunan kadar MDA dalam darah dan jumlah "*Circulating Endothel Cell*".

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Dujovne *et al.* (1994) yang hasil penelitiannya menunjukkan bahwa Probuocol dosis 1.000 mg/hari (*full dose*) dan 500 mg/hari (*half dose*) efektif dalam mencegah induksi tembaga terhadap oksidasi VLDL dan LDL. Persentasi rata-rata hambatannya sampai 2 minggu setelah pemberian Probuocol berkisar 95% dan efeknya masih tetap setelah pemberian Probuocol selama 4 minggu. Maka jelas bahwa pemberian terapi antioksidan Probuocol dosis 10 mg/ekor efektif menghambat oksidasi kholesterol LDL sehingga dapat menurunkan kadar MDA dalam darah sebagai hasil peroksidasi lipid yang dapat meningkatkan efek sitotoksik. Selanjutnya pengaruh kadar MDA yang rendah dapat meningkatkan perlindungan terhadap sel endothel pembuluh darah.

Pemberian antioksidan Probuocol dosis 20 mg/ekor menyebabkan peningkatan kadar MDA yang bermakna tetapi peningkatan jumlah "*Circulating Endothel Cell*" tidak bermakna. Sementara itu pada pemberian antioksidan Probuocol dosis 20 mg/ekor menunjukkan perbedaan kadar MDA dalam darah yang tidak bermakna dibandingkan dengan pemberian antioksidan Probuocol dosis 5 mg/ekor, tetapi penurunan jumlah "*Circulating Endothel Cell*" yang bermakna. Pemberian antioksidan Probuocol dosis 10 mg/ekor memberikan kadar MDA dalam darah paling rendah diantara kelompok perlakuan. Ini menunjukkan bahwa antioksidan Probuocol dosis 10 mg/ekor merupakan dosis efektif, sedangkan pemberian antioksidan Probuocol dosis 20 mg/ekor yang menunjukkan peningkatan kadar MDA yang bermakna tetapi jumlah "*Circulating Endothel Cell*" yang tidak bermakna dengan kelompok P2, menun-

jukkan efek perlindungan antioksidan Probuco-
 l yang masih efektif. Dosis tersebut lebih baik jika
 dibandingkan dengan pemberian antioksidan Probu-
 col dosis 5 mg/ekor yang masih menunjukkan pe-
 ningkatan jumlah "*Circulating Endothel*" yang tinggi
 dibandingkan dengan kontrol. Dikatakan oleh
 Dujovne *et al.* (1994) bahwa pemberian antioksidan
 Probuco- l dosis 1.000 mg/hari cepat mencapai efek
 antioksidan yang sempurna tetapi waktu pember-
 sian obat juga terjadi lebih cepat dari pada pasien
 yang menerima dosis 500 mg/hari, sehingga dapat
 dikatakan pemberian antioksidan Probuco- l pada
 dosis 10 mg/ekor dan 20 mg/ekor pada tikus putih
 yang menerima stressor mempunyai efek perlintu-
 ngan yang sempurna terhadap endotel pembuluh
 darah.

Jika dibandingkan dengan kelompok P2,
 kadar MDA yang meningkat pada kelompok P3
 mungkin disebabkan oleh struktur yang dimiliki oleh
 antioksidan Probuco- l yang memiliki cincin aromatik
 dan cincin aromatik ini mempunyai sifat yang sangat
 stabil karena mampu mengadakan resonansi se-
 hingga sukar untuk diadisi, akibatnya sifat lipofilitas
 tinggi. Untuk dapat diekskresi obat harus bersifat
 polar sehingga antioksidan Probuco- l diabsorpsi
 kembali untuk menjadikan lebih polar. Akibat
 reabsorpsi dapat terjadi akumulasi dalam darah,
 sehingga penggunaan dosis lebih dari 20 mg/ekor
 harus hati-hati.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil penelitian pengaruh antioksidan
 Probuco- l terhadap kadar Malondialdehyde (MDA)
 dalam darah dan jumlah "*Circulating Endothel Cell*"
 dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Pemberian stressor pada tikus putih dapat me-
 nyebabkan peningkatan kadar MDA dalam
 darah dan jumlah "*Circulating Endothel Cell*".
2. Pemberian antioksidan Probuco- l dosis 10 mg/
 ekor mempunyai efek perlindungan yang sem-
 purna terhadap endotel pembuluh darah jika
 dilihat dari penurunan kadar MDA dalam darah
 dan jumlah "*Circulating Endothel Cell*". pada tikus
 putih yang menerima stressor.

Saran

1. Penelitian pemberian stressor dan penambahan
 antioksidan Probuco- l perlu dilakukan pada
 pembuluh darah aorta terpisah untuk melihat
 efeknya terhadap sel endothel yang dapat

mempengaruhi relaksasi dan kontraksi otot
 polos pembuluh darah.

2. Perlu dilakukan penelitian pemberian beberapa
 antioksidan lain untuk melihat perlindungan
 terhadap sel endothel dan kerusakan vaskuler
 pada keadaan stress yang disebabkan karena
 latihan fisik yang berat.

UCAPAN TERIMAKASIH

Disampaikan kepada DP3M Ditjen Dikti
 Depdiknas atas biaya penelitian Dosen Muda tahun
 2001, juga kepada Yayasan Supersemar yang telah
 membantu dana selama peneliti menempuh
 pendidikan S2 untuk penyelesaian penelitian.

KEPUSTAKAAN

- Atkinson RL 1993. Introduction TO Psychology. 8th Ed.
 Harcourt Brace Jovanovich, Inc. pp. 222-237.
- Anderson TJ, Meredith IT, Yeung Ac 1995 The Effect Of
 Cholesterol Lowering And Antioxidant Therapy On
 Endothelium Dependent Coronary Vasomotion, N Engl,
 J Med 332: 488-93.
- Baumann R, Ziprian H, Godicke W 1973. The Influence
 Acute Psychic Stress Situations On Essential
 Hypertensive At The Early Stage Of The Disease,
 Psychother, Psychosom 22 : 131-140.
- Brady PS, Bady LJ, Ullrey DE 1979. Selenium, Vitamin E
 and Response To Swimming Stress In The Rat. J. Nutr
 109 : 1103-1109.
- Buege JA and Aust SD 1978. In Methods in Enzymology.
 Academic Press New York Vol 52. Pp. 302-310.
- Chandrasoma, Taylor 1991. Concise Pathologi. London:
 Prentise-Hall International Inc. Pp. 48-70.
- Chen Ch, Tseng HP 1998 Effect Of Antioxidant In
 Endothelial Cells Exposed To LDL. Life Sci. 62 (19):
 Pp 1277-82
- Coveli V 1992. What Is Stress. How Does It Correlate With
 The Immune System. In Stress And The Immune
 System. Annals New York Academy Of Sciences. Pp.
 212-215.
- Dujovne CA, Harris WS, Collegerrond LL 1994. Compari-
 son Of Effects Probuco- l Versus Vitamin E on Ex Vivo
 Oxidation Susceptibility Of Lipoprotein in Hiper-
 lipoproteinemia. The American J. Of Cardiology. July I
 (74) : 38-42
- Evan CR, And Bruckdorfer KR 1992. Free Radical,
 Lipoprotein and Cardiovascular Dysfunction. A.J.H.
 February.8.Part2 (5); 28s-41s.
- Flavahan NA and Vanhoutte PM 1995. Endothel Cell
 Signaling and Endothelial Dysfunction. AJH.. February 8
 part 2 (5): 50s- 60s.
- Fruebis. V Gonzalez 1997. Effect Probuco- l Treatment on Gen
 Expression of VCAM-I, MCP-I and M-CSF in the Aortic
 Wall of LDL Receptor Deficient Rabbits During Early

- Atherogenesis. *Arteroscler- Tromb- Vasc-Biol.* July 17 (7): 1289 - 1303.
- Hladovec J and Rossmann P 1973. Circulating Endothelial Cells Isolated Together With Platelets And The Experimental Modification Of Their Counts In Rats. *Thrombosis Research.* 3 : 665-674.
- Inoue N, Ohara Y 1998. Probucol Improves Endothelial-dependent Relaxation and Decreases Vascular Superoxide Production In Cholesterol-fed Rabbits. *Am j Med schi.* Apr. 8 (8) : 4-6.
- Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR 1993. Effect OF Strenuous Exercise On Platelet Activation State And Reactivity *Circulation* 88 (1) : 1502 - 1511.
- Lusher TF, Tanner FC 1993. Endothelial Regulation of Vascular Tone and Growth. *A.J.H.* July. Part 2. 6(7) : 283S-293S.
- Massey V 1970. On Mechanism of Inactivation of Xanthine Oxidase by allopurinol. *Journal of Biological Chemistry.* 245:2837-2844.
- Riley 1981. Psychoneuroendocrinologi on Immono Competence and Neoplasia *Science*; 212: 1100-09
- Simon BC, Nhaudenschild CC, and Cohen RA 1993. Reservation Endothelium Dependent Relaxation In Atherosclerotic Rabbit Aorta By probucol. *J. Cardiovasc Pharmacol* (21) :6
- Sozmen B, Kazaz L, Taskiran D, Tuzun S, and Sozmen EY 1998. Effect of N Dicycloprorylemethyl-amino-2-oxazoline (s-3341) on Antioxidant Status and Nitric Oxide in Hypertensive patients, *Current Medical Research and Opinion.* 14(2 : 89-96.
- Syodin B, Westing YH, and Apple FS 1990. Biochemical Mechanisms During for Oxygen Free Radical Formation During Exercise. *Sport Medicine.* 10 (4): 236-254.
- Vanhotte PM 1993. Other Endothelium Derived Vasoactive Factors. *Circulation.* May 87 (5) : V9 - V17.
- Tang, Ji, Li 1996. Effect of Probucol on mRNA Expression of Glomerular Antioxidant Enzymes in Rat With Subtotal Nephrectomy. *Chin Med J Engl.* Oct. 109 (10) : 780-786.
- Ward PA, Warren JS, and Johnson KJ 1988. Oxygen Radicals, Inflammation and Tissue Injury. *Free Radical Biology & Medicine.* 5: 403-408.
- Widjajanto E, Widodo A, Rudianto A 1996. Circulating Endothel dan Lipid Profile Pada penderit Diabetes Melitus. Konggres Nasional III, Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia dan The Fourth Conference on Clinical Pathology, Yogyakarta, 20 Juni - 4 Juli 1996.
- Willner P 1990. Animal Models of Depression: an overview. *Pharmac. Ther.* 45: 423-455.