

I Putu Dedy Arjita

# BIOASSAY NITRIC OXIDE KULTUR SEL ENDOTEL



# BIOASSAY NITRIC OXIDE KULTUR SEL ENDOTEL

Endotel merupakan lapisan sel di bagian dalam pembuluh darah. Pada pembuluh darah sel endotel merupakan satu lapisan penahan yang mencegah terjadinya perpindahan sebagian besar bahan yang terdapat dalam darah keluar dari pembuluh darah. Hanya sebagian kecil bahan-bahan tersebut dapat melewatinya, semakin luas dan kompleksnya peran endotel, baik sebagai lapisan penahan, sebagai tempat metabolisme maupun tempat sintesa berbagai substansi vasoaktif.

Endotelium memegang peranan penting dalam proses pertumbuhan, homeostasis dan tonus vaskuler dengan menghasilkan berbagai mediator, terutama mediator *nitric oxide* (NO) yang dahulu dikenal sebagai *endothelial-derived relaxing factor (EDRF)*. Generasi radikal bebas dan stres oksidatif dalam kondisi diabetes kemungkinan mempengaruhi sintesa NO yang selanjutnya dapat mempengaruhi kontraktilitas pembuluh darah.

Buku ini juga membahas mekanisme normal dan patomekanisme seluler berkaitan dengan stress oksidatif, kontraktilitas pembuluh darah dalam kaitannya dengan fungsi endotel dan sel otot polos pembuluh darah.



**I Putu Dedy Arjita, S.Pd., M.Kes.**, Lahir di Lombok Utara, 15 Maret 1970. Pendidikan di FKIP Jurusan Biologi Universitas Mataram, Nusa Tenggara Barat (1993). Program Pascasarjana dari Program Studi Ilmu Biomedik Pascasarjana Universitas Brawijaya Malang (2001). Penulis adalah Dosen PNS dpk. di Proqram Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Islam Al-Azhar.



Penerbit : CV. AA. RIZKY  
Alamat : Jl. Raya Ciruas Petir,  
Puri Citra Blok B2 No. 34 Pipitan  
Kec. Walantaka - Serang Banten  
E-mail : [aa.rizkypress@gmail.com](mailto:aa.rizkypress@gmail.com)  
Website : [www.aarizky.com](http://www.aarizky.com)

ISBN 978-623-405-130-8



---

**BIOASSAY NITRIC OXIDE  
KULTUR SEL ENDOTEL**

---

**Undang-undang No.19 Tahun 2002 Tentang Hak Cipta**  
**Pasal 72**

1. Barang siapa dengan sengaja melanggar dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam pasal ayat (1) atau pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling sedikit 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp.1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp.5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran hak cipta terkait sebagai dimaksud pada ayat (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp.500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah)

# **BIOASSAY NITRIC OXIDE KULTUR SEL ENDOTEL**

**I Putu Dedy Arjita**



**PENERBIT:  
CV. AA. RIZKY  
2022**

# **BIOASSAY NITRIC OXIDE KULTUR SEL ENDOTEL**

© Penerbit CV. AA RIZKY

**Penulis:**  
**I Putu Dedy Arjita**

**Desain Cover & Tata Letak:**  
Tim Kreasi CV. AA. Rizky

Cetakan Pertama, Juli 2022

**Penerbit:**  
**CV. AA. RIZKY**  
Jl. Raya Ciruas Petir, Puri Citra Blok B2 No. 34  
Kecamatan Walantaka, Kota Serang - Banten, 42183  
Hp. 0819-06050622, Website : [www.aarizky.com](http://www.aarizky.com)  
*E-mail: aa.rizkypress@gmail.com*

**Anggota IKAPI**  
**No. 035/BANTEN/2019**

**ISBN : 978-623-405-130-8**  
xii + 96 hlm, 23 cm x 15,5 cm

Copyright © 2022 Hak Cipta pada Penulis

**Hak cipta dilindungi undang-undang**  
Dilarang memperbanyak buku ini dalam bentuk dan dengan cara  
apapun tanpa izin tertulis dari penulis dan penerbit.

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Kuasa yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulisan Buku dengan judul : **BIOASSAY NITRIC OXIDE KULTUR SEL ENDOTEL** ini dapat diselesaikan dan diterbitkan sesuai dengan target waktu yang telah ditetapkan.

Endotel merupakan lapisan sel di bagian dalam pembuluh darah. Pada pembuluh darah sel endotel merupakan satu lapisan penahan yang mencegah terjadinya perpindahan sebagian besar bahan yang terdapat dalam darah keluar dari pembuluh darah. Hanya sebagian kecil bahan-bahan tersebut dapat melewatinya, semakin luas dan kompleksnya peran endotel, baik sebagai lapisan penahan, sebagai tempat metabolisme maupun tempat sintesa berbagai substansi vasoaktif.

Endotelium memegang peranan penting dalam proses pertumbuhan, homeostasis dan tonus vaskuler dengan menghasilkan berbagai mediator, terutama mediator *nitric oxide* (NO) yang dahulu dikenal sebagai *endothelial-derived relaxing factor (EDRF)*. Generasi radikal bebas dan stres oksidatif dalam kondisi diabetes kemungkinan mempengaruhi sintesa *NO* yang selanjutnya dapat mempengaruhi kontraktilitas pembuluh darah.

Buku ini menjadi istimewa karena disiapkan secara khusus sebagai referensi bagi mahasiswa kedokteran, kesehatan, dan akademisi, serta peneliti yang pada prinsipnya membahas pengukuran senyawa dalam jumlah kecil, semisal

nitric oxide dalam kondisi hiperglikemia, sampai pada situasi stress oksidatif secara *in vitro* pada kultur sel endotel pembuluh darah vena umbilikalis manusia. Buku ini juga membahas mekanisme normal dan patomekanisme seluler berkaitan dengan stress oksidatif, kontraktilitas pembuluh darah dalam kaitannya dengan fungsi endotel dan sel otot polos pembuluh darah.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada berbagai pihak yang telah membantu sehingga dapat diterbitkannya tulisan ini. Tentu saja penulis merasa bahwa buku ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu segala masukan baik berupa saran maupun kritik yang konstruktif sangat diharapkan.

Akhirnya semoga buku referensi ini dapat bermanfaat bagi siapa saja yang ingin belajar dan mendalami tentang teknik bioassay dan kultur sel.

Mataram, Juli 2022

**Penulis**

# DAFTAR ISI

PRAKATA .....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
A. Problematika <i>Bioassay Nitric Oxide</i> Kultur Sel Endotel.....	1
B. Ruang Lingkup .....	5
BAB 2 STRUKTUR DAN FUNGSI SEL ENDOTEL.....	7
A. Struktur Sel Endotel .....	7
B. Permeabilitas Sel Endotel.....	9
C. <i>Intercellular Junction</i> .....	10
D. <i>Fenestrata Endothelial</i> .....	12
E. <i>Plasmalemmal Vesicles</i> .....	12
F. <i>Transendothelial Channel</i> .....	13
BAB 3 AKTIVITAS SEL ENDOTEL.....	15
A. Aktivitas Biologis Sel Endotel .....	15
B. Regulasi Tonus Vaskuler.....	16
C. Prokoagulan dan Protrombosis.....	21
D. Inflamasi dan Imunitas .....	25
E. Disfungsi Endotel .....	27
BAB 4 HIPERGLIKEMIA, STRES OKSIDATIF DAN VASKULOPATI.....	29
BAB 5 MEKANISME KERUSAKAN AKIBAT HIPERGLIKEMIA .....	31
A. Peningkatan Aktivitas Sorbitol-Pathway.....	31

	B. Peningkatan Gliko-Oksidasi.....	32
	C. Peningkatan Glikosilasi Non-Enzimatis.....	32
	D. Aktivitas Diacylglycerol-Protein Kinase C (DAG-PKC) Pathway.....	33
BAB 6	ENDOTEL DAN KONTRAKTILITAS PEMBULUH DARAH .....	35
	A. Definisi Endotel dan Kontraktilitas Pembuluh Darah .....	35
	B. Sintesa <i>Nitric Oxide</i> dan Relaksasi Pembuluh Darah .....	38
	C. Dampak Radikal Bebas terhadap Membran Sel Endotel .....	40
	D. Sistem Proteksi terhadap Radikal Bebas.....	41
BAB 7	MODULASI <i>VASCULAR ENDOTHELIAL</i> <i>CADERIN (VE-CADERIN)</i> DAN <i>VEGF</i> .....	43
	A. Hubungan antar Sel Endotel.....	43
	B. <i>Tight Junctions</i> (TJ) .....	44
	C. <i>Gap Junctions</i> (GJ) .....	45
	D. <i>Adherens Junction</i> (AJ) atau <i>Zonula Adherens</i>	46
	E. <i>Sindesmos</i> atau Komplek <i>Adherens</i> .....	46
	F. Jalur Endogen Modulasi Sel Endotel .....	47
	G. Strategi Farmakologi untuk Mengontrol Permeabilitas Sel Endotel .....	51
BAB 8	PEMBUATAN KULTUR SEL ENDOTEL DARI <i>HUMAN UMBILICAL VEIN</i> <i>ENDOTHELIAL CELLS</i> (HUVECs) .....	53
	A. Pembuatan Larutan <i>HEPES</i> .....	54
	B. Pembuatan Larutan <i>Bicarbonate-Phenol Red</i> ...	54
	C. Pembuatan Larutan <i>Gentamycine</i> .....	54

D. Pembuatan Medium <i>Cord Collection</i> .....	54
E. Pembuatan Larutan <i>Pen-Strep</i> .....	55
F. Pembuatan Larutan <i>Glutamine</i> .....	55
G. Pembuatan Medium <i>Serum Free</i> .....	55
H. Pembuatan Medium <i>Kultur</i> .....	55
I. Pembuatan Larutan <i>Collagenase</i> .....	56
J. Metode Pembuatan Kultur Sel Endotel Umbilikus.....	56
K. Pembuatan Larutan <i>Trypsin</i> .....	58
L. Pembuatan Larutan <i>EDTA</i> .....	58
M. Pembuatan <i>Trypsin-EDTA</i> .....	58
N. Pembuatan <i>ECCGF-Heparin</i> .....	58
O. Pembuatan <i>Growth Factor Containng Medium</i>	59
P. Pembuatan Sub-kultur Sel Endotel Umbilikus..	59
<b>BAB 9 PENENTUAN EFEK <i>NITRIC OXIDE</i> SECARA BIOASSAY.....</b>	<b>61</b>
A. Kadar Glukosa Tinggi.....	61
B. Preparasi Aorta Marmut.....	61
C. Pengukuran Sintesa <i>Nitric Oxide</i> .....	63
<b>BAB 11 IMPLEMENTASI BIOASSAY <i>NITRIC OXIDE</i> KULTUR SEL ENDOTEL.....</b>	<b>65</b>
A. Hasil Riset.....	65
B. Indikasi Hasil Kajian.....	75
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>87</b>
<b>TENTANG PENULIS.....</b>	<b>95</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 1	Protein Interseluler Endotel.....	45
Tabel 2	Analisis Sidik Ragam dan Uji Beda Nyata Terkecil pada Taraf Nyata 5%.....	75

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	CD154 Perubahan Ekspresi Gen .....	19
Gambar 2	Mekanisme Pelepasan Nitrit Oksida pada Sel Endotel.....	20
Gambar 3	Aktivasi Sel Endotel yang Memicu Status Prokoagulan.....	23
Gambar 4	Mekanisme Infeksi Virus pada Kerusakan Jaringan.....	28
Gambar 5	Kemungkinan Adanya Kaitan Antara Hiperglikemia, Stres Oksidatif Dan Komplikasi Vaskulopati.....	50
Gambar 6	Mekanisme Efek <i>Polyol-Pathway</i> Terhadap Fungsi Sel.....	31
Gambar 7	Pembentukan Advanced -glycosilated end Product (AGEs) .....	33
Gambar 8	Berbagai Mediator Neurohumoral Melalui Reseptor Yang Ada Di Permukaan Sel Endotel Pembuluh Darah.....	37
Gambar 9	Tipe Hubungan Sel pada Endotel berdasarkan Morfologi dan Fungsi Karakteristik.....	43
Gambar 10	Organisasi Molekuler VE-cadherin dari AJs Sel Endotel.....	47
Gambar 11	Phosphporilasi VE- cadherine .....	48
Gambar 12	Modifikasi Fungsi AJs Sel Endotel pada Beberapa Kondisi Permeabilitas yang Meningkatkan.....	49

Gambar 13 Hilangnya respon relaksasi aorta marmut tanpa endotel terhadap asetilkolin $10^{-6}$ M yang diprekontraksikan dengan phenylephrine $10^{-6}$ M .....	65
Gambar 14 Dose-response curve antara konsentrasi isosorbid dinitrat dengan respon penurunan kontraksi yang sebelumnya telah dikontraksikan dengan phenylephrine $10^{-6}$ M... 66	66
Gambar 11 Kultur Sel Endotel Normal (Perbesaran : 400) .	67
Gambar 12 Dose-response Curve untuk Kultur Sel Endotel Normal.....	68
Gambar 13 Sel Endotel Kondisi Glukosa 22 mM selama 3 hari. (Pembesaran : 400) .....	69
Gambar 14 Dose-response curve untuk kultur sel endotel dengan glukosa 22 mM selama 3 hari.....	70
Gambar 15 Sel Endotel Kondisi Glukosa 33 mM selama 3 hari. (Perbesaran : 400) .....	71
Gambar 6 Dose-Response Curve Untuk Kultur Sel Endotel Dengan Glukosa 33 Mm Selama 3 Hari.....	72
Gambar 7 Grafik nilai rata-rata sintesa nitric oxide pada kultur sel endotel kondisi normal dan perlakuan dengan pemaparan kadar glukosa tinggi selama 3 hari .....	73
Gambar 8 Grafik nilai rata-rata sintesa nitric oxide pada kultur sel endotel kondisi normal dan perlakuan dengan pemaparan kadar glukosa 22 mM selama 3 dan 9 hari .....	74

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### A. Problematika *Bioassay Nitric Oxide Kultur Sel Endotel*

Prevalensi pasien diabetes mellitus tipe 1 dan tipe 2 di dunia pada tahun 2015 dinyatakan sebagai penyakit gangguan metabolik dan Indonesia merupakan 7 negara besar untuk prevalensi diabetes melitus (I. P. D. Arjita, 2015). Hasil survey dari world health organization (WHO) diperkirakan pada tahun 2035 prevalensi penyakit DM di Indonesia meningkat menjadi 14,1 juta jiwa, angka ini melampaui negara China, India, Amerika Serikat, Brazil, Russian dan Mexico (Amalia, dkk, 2021).

Hasil *United Kingdom Perspective Diabetes Study (UKPDS)* menyatakan bahwa hiperglikemia berkaitan dengan terjadinya peningkatan risiko komplikasi kardiovaskuler. Berbagai alasan teoritik menjelaskan bahwa hiperglikemia yang dikaitkan dengan glikasi protein dan makromolekul, memungkinkan terjadinya komplikasi makroangiopati dan mikroangiopati yang melibatkan peranan sel endotel pembuluh darah (Sirangelo & Iannuzzi, 2021).

Pengaruh toksik hiperglikemia terhadap pembuluh darah antara lain diduga berlangsung melalui proses glikasi non-enzimatis, perubahan-perubahan *sorbitol-myoinositol*, gangguan redoktase intrasel dan pertahanan antioksidan yang berkurang, serta aktivasi jalur reaksi *diacylglycerol-*

*protein kinase C* (Samaddar & Koneri, 2019). Mekanisme-mekanisme tersebut dapat meningkatkan secara akut maupun kronis pembentukan radikal bebas dan menimbulkan stres oksidatif. Selanjutnya, radikal bebas yang terbentuk akan menyebabkan terganggunya keseimbangan oksidan-antioksidan dan mengakibatkan kerusakan pada protein, *phospholipid-membrane* dan *deoxyribonucleic acid (DNA)* sebagai makromolekul di dalam sel endotel (Radhakrishnan & Kowluru, 2021). Walaupun demikian faktor yang dikendalikan secara genetik berperan dalam sistem pertahanan antioksidan yang terbukti dari adanya variasi daya tahan individu terhadap komplikasi kronik diabetes (Radhakrishnan & Kowluru, 2021).

Meningkatnya pembentukan radikal bebas melalui berbagai jalur reaksi biokimia pada penyakit diabetes mellitus akan mengakibatkan komplikasi terhadap perubahan kontraktilitas pembuluh darah (Nuraeni & Arjita, 2019). Peningkatan produksi radikal bebas dapat merusak struktur dan fungsi sel endotel pembuluh darah, menyebabkan penebalan sel otot polos seperti pada aterosklerosis dan mengubah fungsi reseptor baik yang berada di permukaan sel endotel maupun sel otot polos, serta perubahan fungsi kanal ion pada sel otot polos dan sel endotel (Saghiri et al., 2021).

Menurunnya respon vasodilatasi pembuluh darah akibat tingginya pembentukan radikal bebas terjadi melalui mekanisme kerusakan reseptor untuk vasodilatasi di permukaan sel endotel, deaktivasi sintesa *nitric oxide* serta penurunan aktivitas *second messenger* di dalam sel endotel

dan sel otot polos pembuluh darah (I. Arjita, Widodo, & Widjanto, 2002). Di samping itu tingginya pembedakan radikal bebas dapat berinteraksi dengan *nitric oxide* membentuk peroksinitrit yang pada konsentrasi tinggi merupakan oksidan yang sangat kuat. Sedangkan penurunan responsivitas terhadap sintesa *nitric oxide* dapat terjadi melalui pembentukan *plaque atheroma* dan penebalan dinding pembuluh darah akibat proliferasi sel otot polos pada aterosklerosis (Salahshoor, Mohammadi, Roshankhah, Najari, & Jalili, 2019).

Penemuan *endothelium-derived relaxing factor* yang tidak lain adalah molekul *nitric oxide* dan berpotensi sebagai vasodilator oleh Loh et al. (2022) ternyata mendorong kajian farmakologis yang menghasilkan penemuan berbagai jenis reseptor yang terdapat di permukaan sel endotel yang apabila ligannya berikatan dengan reseptor-reseptor tersebut akan menghasilkan mediator yang menyebabkan terjadinya pengendalian kontraktilitas pembuluh darah secara lokal (I. P. D. Arjita, 2022; Loh et al., 2022).

Al-Suhaimi (2022) mengemukakan bahwa berbagai mediator neurohumoral disintesa akibat stimulus reseptor yang ada di permukaan sel endotel menghasilkan *endothelium-derived relaxing factor* atau *nitric oxide* oleh sel endotel dan menyebabkan terjadinya relaksasi pembuluh darah. Reseptor tersebut antara lain adalah reseptor asetilkolin, histamin, adrenalin dan nor-adrenalin, bradikinin, thrombin, *arachidonic acid*, vasopressin, serotonin dan *adenosine diphosphate* (Al-Suhaimi, 2022).

Paparan sel endotel pembuluh darah pada kondisi hiperglikemia mungkin akan menyebabkan terjadinya kerusakan reseptor yang terdapat pada membrane sel endotel untuk vasodilatasi, sehingga terjadi penurunan sintesa *nitric oxide* serta meningkatkan pembentukan *superoxide-anion* yang secara langsung meredam aktivitas *nitric oxide*. Perubahan fungsi reseptor akibat radikal bebas yang dihasilkan dari jalur reaksi biokimia pada kondisi hiperglikemia akan dapat mengubah respon kontraktilitas pembuluh darah (Behl & Kotwani, 2015).

Kajian secara *in vitro* pada *human umbilical vein endothelial cells (huvecs) culture* yang dipapar dengan kadar glukosa tinggi (33 mmol/L) telah membuktikan bahwa terjadi peningkatan generasi radikal bebas yang dapat menginduksi antioksidan enzimatis, meningkatkan *release proagulan* dan vasokonstriktor serta mengganggu sintesis vasodilator. Meningkatnya pembentukan radikal superoksida akan memicu terjadinya stres oksidatif sebagai suatu faktor yang memegang peranan penting di dalam patogenesis komplikasi diabetes mellitus (Wang, dkk, 2019).

Dari uraian di atas tampak bahwa *nitric oxide* merupakan bahan vasoaktif utama yang disintesa sel endotel sebagai vasodilator. Walaupun dalam kenyataannya relaksasi pembuluh darah tidak hanya terjadi akibat pembentukan *endothelium-derived hiperpolarizing factor (EDHF)* dan *prostacyclin* oleh sel endotel pembuluh darah, respon vasodilatasi pembuluh darah juga disebabkan oleh sintesa *endothelial-derived relaxing factor* (molekul *nitric*

*oxide*) yang dapat menembus membrane sel otot polos pembuluh darah tanpa melalui reseptor.

Dengan demikian untuk mengetahui dan menjelaskan apakah pada *human umbilical vein endothelial cells (huvecs) culture* yang dipapar dengan berbagai kadar glukosa tinggi, akan menyebabkan perubahan sintesa *nitric oxide* setelah dirangsang dengan adenosin diphospat, maka diperlukan kajian *bioassay* dengan mendeteksi efek relaksasi dan kontraksi aorta marmot yang sudah dihilangkan endoteliumnya.

## **B. Ruang Lingkup**

Endotelium merupakan lapisan paling dalam pembuluh darah dan merupakan organ terbesar di dalam tubuh. Sel endotel vaskuler berperan penting dalam kontrol homeostasis dan trombosis. Endotelium terlibat dalam regulasi ekstravasasi leukosit, adhesi dan akumulasi subendotel, pencegahan adhesi platelet yang akan memicu proses trombotik, regulasi patensi pembuluh darah untuk menjaga suplai aliran darah yang adekuat. Apabila fungsi endotelium berlangsung normal, maka semua fungsi ini dalam keadaan seimbang, sedangkan ketidak-seimbangan pada berbagai proses tersebut akan memicu disfungsi endotel. Dengan demikian, sel endotel merupakan barometer lingkungan mikro sebagai sensor terhadap kompartemen ekstraseluler dan memberikan respon yang terkadang menguntungkan, akan tetapi juga mungkin merugikan.

Selain itu, sel endotel juga bertanggung jawab atas regulasi pertumbuhan jaringan ikat disekitarnya. Pada

keadaan basal inaktif, sel endotel mencegah proliferasi sel otot polos dengan cara mensekresi *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), serta ekspresi permukaan *heparan like molecule*. Sedangkan pada keadaan aktif, produksi sitokin atau *growth factor* yang terjadi jika perubahan susunan sel endotel

Struktur dan Fungsi Sel Endotel mengakibatkan proliferasi sel-sel otot polos, kemudian akan mensekresi *platelet derived growth factor* (PDGF) dan *basic fibroblast growth factor (bFGF)*, akibat disfungsi endotelium akan memberikan efek mitogenik pada sel otot polos dan memainkan peranan pada pembentukan plak arterosklerosis. Aktivasi sel endotel dapat terjadi akibat berbagai macam jejas seperti produksi sitokin patologis, infeksi virus, pembentukan radikal bebas. Beberapa penyakit terjadi akibat gangguan sel endotel seperti: arterosklerosis, metastasis kanker, penyakit akibat radang dan hipertensi. Zat antiendotelial ditemukan pada Diabetes melitus, *Raynaud's disease*, *Kawasaki disease*, vaskulitis dan reaksi penolakan jaringan transplantasi.

\*\*\*\*\*

## BAB 2

# STRUKTUR DAN FUNGSI SEL ENDOTEL

### A. Struktur Sel Endotel

Sel endotel yang diperkirakan mempunyai berat 1 kilogram tersebar di seluruh tubuh mempunyai heterogenitas yang ditunjukkan dalam perbedaan struktur dan fungsi menurut pembuluh darah yang ditempatinya. Bahkan, mempunyai heterogen dan perbedaan komposisi antigen, kandungan metabolik, dan respon terhadap *growth factor*. Heterogen sel endotel tidak hanya teramati pada berbagai organ, akan tetapi juga teramati pada pembuluh darah dengan ukuran yang berbeda disatu organ. Sebagai contoh, sel endotel yang melapisi pembuluh mikro di *white matter* otak bersifat mendatar dan memanjang, sedangkan sel endotel yang melapisi pembuluh darah besar, antara lain aorta dan vena umbilikus berbentuk poligonal.

Sel endotel mempunyai tipe morfologi yang berbeda pada setiap organ yang berbeda sehingga dapat beradaptasi pada *microenvironment* yang bervariasi. Sel endotel pada otak, paru dan jaringan otot membentuk susunan yang rapat dan bersambungan sehingga bersifat *barrier*. Pada kelenjar endokrin dan ginjal, sel endotel membentuk pola lapisan yang tidak berkesinambungan dengan gap antar sel dan fenestra intraseluler. *Microenvironment* lokal mempunyai pengaruh yang besar terhadap sel endotel. Sel endotel

mempunyai respon yang berbeda terhadap berbagai *growth factor*.

Bentuk sel endotel bervariasi pada pohon vaskuler. Meskipun sel endotel secara khusus berbentuk mendatar, sel ini gemuk berisi atau kuboid pada venula endotel tinggi. Ketebalan sel endotel bervariasi antara kurang dari 0,1  $\mu$ m pada vena dan kapiler serta sampai 0,1  $\mu$ m di aorta. Penelitian pembuluh darah tikus didapatkan sel endotel aorta panjang dan sempit (55 x 10  $\mu$ m) dengan aksis panjang seiring dengan aliran darah. Sel endotel pada arteri pulmoner lebih luas dan pendek (30 x 14  $\mu$ m) membentuk rektangular, sedangkan pada vena pulmoner lebih besar dan berbentuk bulat. Sel endotel pada vena cava inferior panjang, sempit dan rektangular. Pada muskulus kremaster menciit, sel endotel arteriol lebih panjang dari vena (rasio panjang ke lebar secara berurutan adalah 7,45  $\mu$ m<sup>2</sup> dan 2,66 $\mu$ m<sup>2</sup>) dan mempunyai luas permukaan yang tinggi (1200  $\mu$ m<sup>2</sup> vs 600  $\mu$ m<sup>2</sup>). Pada penelitian mikrosirkulasi trakea, sel endotel berbentuk spindel dan memanjang di arteriole, berbentuk ireguler di kapiler besar, elips dan ireguler di venula setelah kapiler, serta membulat di venula pengumpul.

Sel endotel mempunyai *clathrin-coated pits*, *clathrin-coated vesicles*, *multivesicular bodies* dan lisosom yang mencerminkan komponen struktural *pathway* endositik. Makromolekul sebagai target endositosis akan dibawa ke lisosomal untuk degradasi. Beberapa kasus, endositosis akan diputar kembali ke permukaan sel atau diseleksi oleh komponen sel yang lain meliputi badan golgi dan endoplasmik retikulum. Endositosis berlangsung dengan

cara proses non spesifik (fase *fluid*) atau melalui jalur yang bergantung bergantung pada reseptor. *Pathway* bergantung pada reseptor yang bertanggung jawab untuk uptake LDL, transferin, albumin, ceruloplasmin dan AGEs.

Di samping endositosis, sel endotel juga mampu mentransitosis yang bertujuan transfer molekul transeluler melintasi endotel. Transitosis diperantarai oleh struktur khusus termasuk *caveola* dan *vesiculo-vacuolar organelles (VVOs)*. *Caveola* adalah vesikel berbentuk labu terikat membran yang biasanya terbuka pada sisi luminal atau abluminal akan tetapi terkadang bebas di sitoplasma. Kerapatan *caveola* jauh lebih besar di endotel kapiler (mencapai 10.000 per sel) dibandingkan di arteri, arteriole, vena atau venula. Jumlah *caveola* lebih tinggi pada endotel non fenestrata terutama di hati, jantung dan otot skeletal.

## **B. Permeabilitas Sel Endotel**

Selapis sel endotel vaskuler melayani barrier selektif, dinamik yang mengatur transpor cairan dan makromolekul antara darah dan interstitial. Berbagai stimulus fisik, inflamasi dan bioaktif akan mengubah barrier endotelial, memicu pembentukan gap paraseluler sehingga meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan mengganggu fungsi organ. Ketepatan fungsi barrier sel endotel diperlukan bentuk atau struktur sitoskeletal yang dari masing-masing sel secara individu dan integritas sel endotel monolapis. Integritas memerlukan *junction interseluler* yang tidak mengalami gangguan dan kontak antara sel dengan matriks ekstraseluler. Sel endotel vaskuler

mempunyai gap, *adherens*, dan *tight junctions*. Struktur tersebut merupakan komunikasi yang mengandung beberapa protein untuk beberapa jalan pengaturan. Protein integral, transmembran (*VE-cadherin*, *occludin*, *claudins*, *PECAM*) dari junction, pada sisi sitoplasma berkoneksi dengan filamen sitoskeletal (mikrofilamen dan filamen intermediate) melalui hubungan protein intraseluler (*catenins*, *actinin*, *protein zonula occludens*). Struktur dinamik dari tiga komponen utama sitoskeleton sel endotel yaitu F-actin, microtubul (MT) dan filamen intermediate merupakan komponen penting dalam keseimbangan kontraktile dan gaya tahanan yang menyatakan bentuk aktual dari sel.

Penelitian permeabilitas vaskuler dengan eksperimen perfusi mendukung model prediksi adanya dua ukuran pori-pori, yakni satu mempunyai radius 4 nm dan satunya mempunyai radius 25-30 nm. Sebagian protein plasma berukuran 5-13 nm dengan berat molekul antara 30-930 kDa dengan demikian akan melewati pori yang besar meskipun protein dengan berat molekul kecil dapat menggunakan pori yang lebih kecil.

### **C. Intercellular Junction**

Perlekatan antara sel endotel dengan matrik ekstraseluler (MES) disekitarnya diperantarai oleh reseptor adhesif permukaan sel grup integrin. Integrin membuat perlekatan serta berfungsi memberikan sinyal antara sel endotel dengan MES dan interkasi keduanya sangat penting untuk menjaga polaritas sel endotel dan susunannya

sepanjang pembuluh darah. Integrin adalah protein hemodinamis yang tersusun atas dua subunit ikatan non kovalen  $\alpha$  dan  $\beta$ . Terdapat 18 subunit  $\alpha$  dan 8 unit  $\beta$  yang dikombinasikan secara beragam menjadi 24 heterodimers yang berbeda. Molekul integrin yang terdapat pada sel endotel mencakup  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  dan  $\alpha 1$ , 2, 3.5, 6,  $\alpha v\beta 3$  dan  $\alpha v\beta 5$ .

Dua jenis *intercellular junction* ditemukan di endotel yakni *tight junction* (zona occludens) yang biasanya terdapat di regio apikal celah antar sel serta *adherens junction* (juga disebut zona adherens). *Tight junction* membentuk barier transpor antar sel endotel (disebut transpor paraseluler) dan menjaga polaritas sel antara luminal dan abluminal. Komposisi *junction* bervariasi pada berbagai bentuk pembuluh darah. Arteri besar berkembang pada sistem *tight junction* dengan baik, untuk mendukung fungsinya pada paparan terhadap aliran darah pulsatif. Mikrovaskuler *junction* yang ada, lebih sempit di arteri dibandingkan kapiler. Disorganisasi alamiah *tight junction* pada venula postkapiler memediasi ekstrasvasasi kandungan plasma dan leukosit yang diinduksi inflamasi. Sebaliknya, pada sawar darah otak kaya akan *tight junction*.

Beberapa penelitian awal mengasumsikan bahwa celah antar sel endotel secara morfologis ekuivalen dengan pori kecil. Akhirnya diungkapkan bahwa pada kondisi fisiologis *endothelial junction* pada kapiler mempunyai derajat permeabilitas yang rendah untuk makromolekul (diameter  $>2$  nm).

Sebaliknya pada vena, setelah kapiler dan vena muskuler akan kehilangan organisasi *endothelial junction*. Sekitar 30% pada lokasi tersebut membentuk gap 6 nm dan nampaknya permeabel terhadap makromolekul dengan diameter  $< 5,5$  nm, akan tetapi tidak bagi makromolekul diameter  $> 7$  nm. Diyakini bahwa *junction* di vena setelah kapiler merupakan *pathway* potensial untuk transpor sistem pori kecil. Selama inflamasi, permeabilitas venula *junctions* akan meningkat.

#### **D. Fenestrata Endothelial**

Fenestrata endotel adalah permukaan yang bulat dan diafragma (sampai diameter 70 nm diameter) kekurangan lipid lapis ganda yang koneksi pada bagian depan endotel. Struktur ini ditemukan pada kapiler kelenjar endokrin, ginjal, pleksus koroid, badan siliari dan mukosa gastrointestinal. Bagaimanapun, proteoglikan mengandung muatan negatif yang tinggi dan berhubungan dengan aspek luminal dari diafragma. Hal ini menyebabkan pembatasan pasase melalui fenestrata protein plasma anionik.

#### **E. Plasmalemmal Vesicles**

Pada berbagai *beds* kapiler, sel endotel mengandung populasi *small membrane-bound vesicles* yang besar (70 nm diameter luar). Struktur tersebut membuka pada sisi luminal atau abluminal sel endotel atau bebas dalam sitoplasma. Selama transpor, makromolekular besar rupanya teramati secara bebas pada *plasmalemmal vesicles*.

Dihipotesiskan bahwa vesikel ini bergerak secara bebas dari luminal kedepan abluminal sel endotel membawa plasma, atau pada arah yang berlawanan membawa cairan interstitial. Vesikel ini akan mengambil bagian terbesar dari plasma (transport fase cairan) atau dapat membawa molekul yang akan diabsorpsi pada membran vesikular secara elektrostatis atau lokasi ikatan spesifik. Fase transport cairan melalui vesikel plasmalemmal merupakan mekanisme utama pertukaran protein transendotelial antara jaringan dan darah.

#### **F. *Transendothelial Channel***

Struktur ini diproduksi akibat fusi beberapa *plasmalemmal vesicles* dan atau invaginasi vesikuler yang terbuka pada kedua sisi sel endotel. Pada endotel fenestrata, struktur ini terdapat sebagai vesikel tunggal dengan pembukaan diafragma pada kedua sisi endotel. Endotel kontinyu dari kapiler dan venula, pembukaan *channel* melalui diafragma.

Transport makromolekul plasma melalui rute paraseluler tersebut bergantung kepada:

1. Sifat fisiko-kimia yang meliputi ukuran molekul, bentuk dan muatan,
2. Sifat sel endotel yang meliputi kesempitan *junction*, muatan listrik berkaitan dengan ultrastruktur yang terlibat pada transport,
3. Gaya plasma dan hemodinamik misalnya tekanan hidrostatis atau gradien tekanan osmotik koloid. Rute ini biasanya mendukung transport melalui mekanisme difusi,

yang efektif bagi protein dalam konsentrasi tinggi di plasma.

\*\*\*\*\*

## **BAB 3**

### **AKTIVITAS SEL ENDOTEL**

#### **A. Aktivitas Biologis Sel Endotel**

Tiga dekade terakhir, secara primer terjadi akibat kemampuan untuk kultur sel endotel vaskuler dari berbagai pembuluh yang spesifik, terdapat perubahan dramatik dalam persepsi dari peranan sel endotel. Pada awalnya, sel ini dipandang sebagai sel pasif, sekalipun selektif, merupakan barier permeabilitas antara darah dengan jaringan, saat ini dipertimbangkan sebagai organ yang aktif dan secara alamiah bersifat multifungsional. Sel endotel dapat mengatur respon imun, mengendalikan status koagulasi darah, berperan sebagai antarmuka untuk permeabilitas darah dan jaringan, angiogenesis dan perbaikan pembuluh darah, serta memodulasi tonus vaskuler. Berbagai fungsi tersebut akan terlibat dalam homeostasis tubuh atau terkait dengan berbagai kondisi patologis. Fungsi ini berkembang dari awalnya sebagai transpor larutan atau makromolekul menjadi fungsi responsif terhadap berbagai rangsangan yang terjadi dalam hitungan menit, yang ditandai oleh sintesis dan sekresi. Sel endotel berperan sebagai regulator melalui produksi beberapa agen vasoaktif dan agen yang mengatur status koagulasi.

## B. Regulasi Tonus Vaskuler

Sel endotel mengatur tonus vaskuler pada saat istirahat maupun olahraga. Sejumlah substansi vasoaktif mengendalikan fungsi ini secara ketat, melengkapi jaringan kerja dengan rangsangan mekanis yakni *shear stress* dan tekanan. Reaksi endotelium terhadap rangsangan menghasilkan pelepasan agen yang mempengaruhi fungsi vasomotor melalui relaksasi otot polos pembuluh darah yang dimediasi endotel, melalui penghambatan agregasi platelet, melalui dukungan fibrinolisis, menghasilkan pelarutan mikrotrombi untuk menjaga aliran darah tetap normal.

Vasodilatasi endotel tergantung oleh adanya induksi oleh aliran darah terhadap reseptor agonis spesifik antara lain bradikinin, asetilkolin dan direduksi oleh adanya faktor risiko pembuluh darah klasik meliputi: hipertensi, hiperkolesterolemia, diabetes, merokok, penuaan, penyakit aterosklerosis dan inflamasi. Sel endotel memproduksi prostasiklin dan nitrit oksida yang dapat menghambat aktivasi platelet dan neutrofil. Sel endotel juga berkontribusi terhadap sekresi protein C melalui sekresi kofaktornya yakni protein S. Sel endotel adalah sumber adenin dinukleotida yang dalam kondisi tertentu mampu memicu vasodilatasi.

Salah satu kunci fungsi endotel adalah untuk menjamin aliran darah yang adekuat, yang diatur oleh sekresi berbagai substansi. Saat ini telah dipahami bahwa endotelium berperan dalam vasodilatasi melalui produksi nitrit oksida derivat endotelium. Endotelium bertanggung

jawab untuk produksi vasodilator yang lain meliputi prostasiklin. Prostrasiklin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) dan nitrit oksida (NO) adalah dua vasodilator utama, yang lain termasuk *endothelium derived hyperpolarising factor* dan *C-type natriuretic peptide*. PGI<sub>2</sub> dan NO menunjukkan efek tambahan yakni mampu menghambat agregasi platelet. Yang tergolong vasokonstriktor disekresi endotel meliputi endothelin-1 (ET-1), angiotensin II (Ang II), thromboxane A<sub>2</sub> dan *reactive oxygen species* (ROS).

PGI<sub>2</sub> adalah inhibitor dari agregasi platelet, merupakan vasodilator kuat pada berbagai pembuluh darah. Kadar secara sistemik di dalam sirkulasi sangat rendah sehingga PGI<sub>2</sub> diyakini bekerja secara lokal ketika disintesis dan dilepaskan dari endotelium oleh rangsangan trombin, bradikinin, atau adenin nukleotida (dilepaskan dari agregasi platelet). Mekanisme yang memicu sintesis PGI<sub>2</sub> disebabkan oleh kemampuan agonis untuk berpasangan dengan reseptor kemudian memicu sinyal sehingga menyebabkan peningkatan kalsium ionisasi intraseluler. Kalsium ionisasi intraseluler ini dihasilkan dari simpanan internal sehingga pelepasan PGI<sub>2</sub> tidak bergantung pada kadar kalsium ionisasi ekstraseluler. Peningkatan kalsium akan mengaktifkan fosfolipase A<sub>2</sub> sehingga memicu pelepasan prekursor arakhidonat dan fosfolipid, akibatnya terjadi sintesis PGI<sub>2</sub> yang bersifat *short lived*. Hal ini disebabkan oleh mekanisme regulasi dengan cepat akan menurunkan kadar kalsium kembali ke kadar semula.

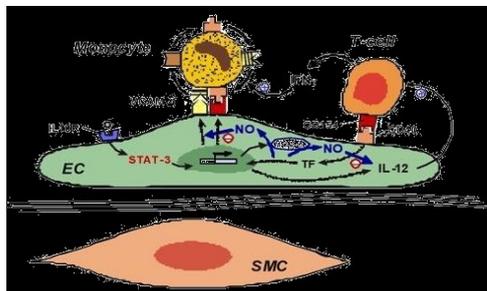
Nitrit oksida adalah gas yang sifatnya tidak stabil, larut dalam lipid, serta disintesis dari sel endotel oleh asam

amino L-arginine melalui aksi nitrit oksida sintase endotel (eNOS) yang secara klasik diaktivasi oleh berbagai agonis, meliputi asetilkolin, histamin dan bradikinin. Nitrit oksida dibentuk dari atom nitrogen guanidino pada arginin dan enzim NO sintase pada endotelium sifatnya bergantung kepada calmodulin/ $\text{Ca}^{2+}$ . Pelepasan NO lebih panjang dibandingkan pelepasan PGI<sub>2</sub> sebagai respon terhadap agonis yang sama. Mekanisme ini tidak menunjukkan efek takifilaksis akibat tantangan ulang dengan agonis yang sama, akan tetapi sensitif terhadap perubahan  $\text{Ca}^{2+}$  eksternal. Senyawa ini dilepaskan pada kondisi basal dan sebagai respon terhadap rangsangan farmakologis. Rangsangan fisiologis terhadap produksi NO endotel diidentifikasi sebagai peningkatan aliran darah melalui lumen pembuluh darah, yang dalam vasodilatasi dimediasi oleh endotel secara akut, cenderung menormalkan *shear stress*.<sup>14</sup> NO berikatan dengan enzim guanil-siklase memiliki efek pleotropik terhadap pembuluh darah sehingga menyebabkan relaksasi otot polos pembuluh darah, menjaga tonus otot dalam keadaan basal. NO juga berperan di dalam menghambat trombosis dengan menghambat adhesi, aktivasi dan sekresi platelet serta degradasi platelet. NO juga menghambat adhesi leukosit dan sel endotel serta proliferasi tunika intima baru yang dipicu oleh adanya *injury* dengan cara menghambat proliferasi dan migrasi sel otot polos.

Selain NO, endotelin, prostasiklin dan *platelet activating factor* juga merupakan vasoregulasi pembuluh darah. Endotelin (ET) adalah kelompok yang terdiri atas 21

peptida asam amino yang tersusun atas tiga kelompok (ET-1, ET-2, ET-3), ketiganya mengatur tonus vasomotor, proliferasi sel dan produksi hormon. ET-1 diproduksi oleh sel endotel, sel otot polos pembuluh darah yang dipicu oleh stres, hipoksia dan iskemia. Mayoritas (75%) ET-1 diarahkan ke sisi luminal dan bereaksi dengan mengikatkan ke reseptor spesifik pada sel otot polos sehingga menyebabkan vasokonstriksi. Sedangkan ET-2 diproduksi di ginjal dan usus, ET-3 diproduksi di otak dan gastrointestinal. ET-1 merupakan vasokonstriktor endogen utama dan 100 kali lebih poten dari noradrenalin. Beberapa penyakit berhubungan dengan konsentrasi endotelin, kadar endotelin meningkat pada preeklamsi, penyakit jantung kongestif, infark serebral serta memiliki nilai prognostik. Endotelin dapat juga menyebabkan bronkokonstriksi pulmoner sehingga menyebabkan hipertensi pulmoner.

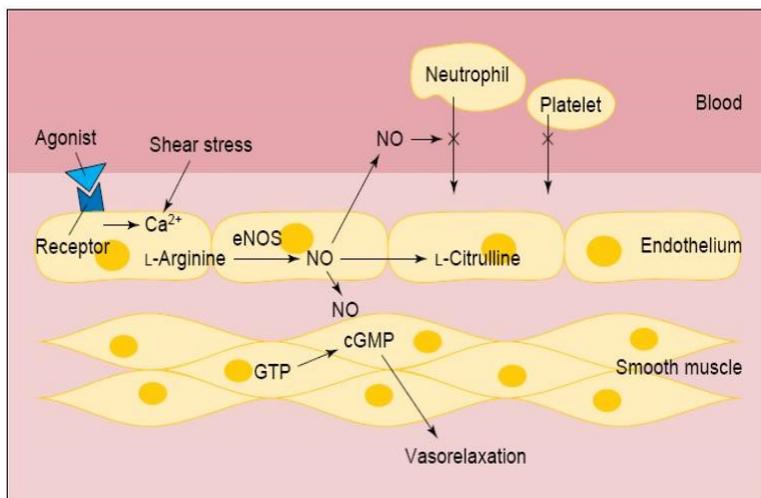
Prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) merupakan eukasoid yang tidak disintesis pada kondisi istirahat, produksinya dirangsang oleh adanya gangguan fungsi endotel dan hemodinamik. PGI<sub>2</sub> yang dilepaskan akan berikatan dengan reseptor non spesifik pada platelet dan otot polos pembuluh darah untuk menghambat vasokonstriksi.



Gambar 1 CD154 Perubahan Ekspresi Gen

Sedangkan *Platelet Activating Factor (PAF)* merupakan fosfolipid yang berikatan dengan permukaan endotel dan bereaksi pada *juxtacrine* dengan mengikat reseptor yang ada pada permukaan leukosit. Jika diberikan PAF dapat menyebabkan vasodilatasi sampai vasokonstriksi tergantung dosis yang diberikan.

Sejumlah penelitian klinis dan eksperimental selanjutnya mengkonfirmasi semua endotel arteri dan sedikit dari endotel vena akan melepaskan EDRF. Beberapa kondisi patofisiologis juga menginduksi disfungsi endotel yang ditandai oleh penurunan vasodilatasi bergantung kepada endotel. Ketika disfungsi endotel menjadi parah, akan menyebabkan penghapusan pelepasan EDRF, agonis yang secara normal memicu vasodilatasi tergantung endotel akan memicu vasokonstriksi.



Gambar 2

Mekanisme Pelepasan Nitrit Oksida pada Sel Endotel

Sel endotel juga mengekspresikan ektopeptidase yang mengkonversikan angiotensin I menjadi angiotensin II, inaktivasi bradikinin dan memproduksi endotelin aktif dari endotelin besar. Secara normal, endotelium, platelet dan neutrofil akan berinteraksi secara homeostatik. Gangguan pada endotel akan memicu trombosis dan disfungsi endotel yang juga berefek mirip sebagai perubahan nontrombogenik menjadi trombogenik.

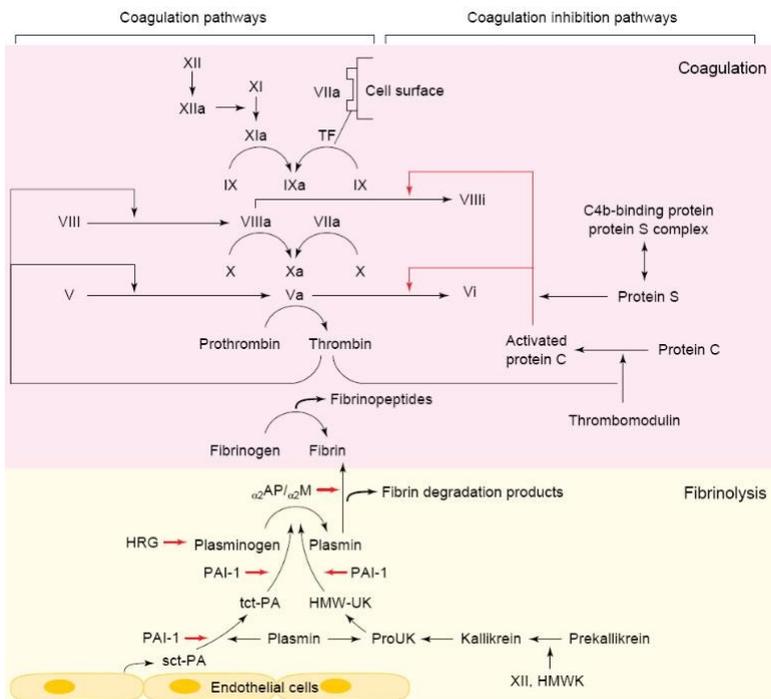
### C. Prokoagulan dan Protrombosis

Pada kondisi normal, endotelium menjaga keseimbangan antara permukaan sel terkait faktor koagulan antara lain *tissue factor (TF)*, satu dari beberapa molekul yang mampu menginduksi *pathway* koagulasi dan protein antikoagulan (trombomodulin dan protein S). *Pathway* antikoagulan termasuk protein C, protein S dan sitokin (IL-8) merupakan jalur umum pada koagulasi terkait inflamasi. Selain itu, berbagai sitokin (IL-1, IL-6 dan TNF-) juga mampu mengekspresikan molekul adhesi. Aksi sitokin pada sel endotel maupun yang dilepaskan oleh sel endotel juga mempengaruhi berbagai aspek fungsi endotel. TNF- mampu menginduksi ekspresi TF pada sel endotel serta memicu penurunan regulasi trombomodulin dan protein S. Selanjutnya, TF akan memulai kaskade koagulasi. Lebih jauh lagi, stimulasi oleh IL-1 atau TNF- akan mengubah status sel endotel dari antikoagulasi menjadi prokoagulasi.

Sel endotel juga mampu bertindak sebagai trombogenik melalui sekresi faktor *von Willebrand*, yang menstabilisasi faktor VIII dan bertindak sebagai kofaktor

untuk adhesi platelet. Glikoprotein terpolimerisasi yakni faktor von Willebrand yang di dalam sirkulasi membawa faktor pembekuan VIII, disekresikan secara konstitutif oleh sel endotel. Sebagai tambahan, faktor von Willebrand adalah kofaktor penting untuk adhesi platelet ke subendotel terutama pada kondisi *shear stress* yang tinggi. Faktor ini disekresikan secara langsung pada matriks subendotel dan juga disimpan dalam granul penyimpanan endotel, pelepasan eksositosis akan terjadi secara cepat yang dipicu oleh agonis, antara lain trombin.

Sebagai respon terhadap *shear stress* rendah atau rangsangan yang lain, sel endotel menjadi protrombotik, mensekresikan *platelet-activating factor* dan mengekspresikan tromboplastin (*tissue factor*, *tissue factor III*) pada permukaan sel.<sup>1</sup> *Platelet activating factor* yang merupakan mediator formasi platelet atau fibrin yang dapat menormalkan koagulasi lokal dan perbaikan pada lokasi cedera. Endotelium dapat berkontribusi secara langsung terhadap trombosis melalui pelepasan *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), yang melawan efek fibrinolitik dari *tissue type plasminogen activator* (t-PA), mencegah atau membatasi koagulasi dan kerusakan vaskuler dan kemudian membantu koagulasi darah.



Gambar 3

### Aktivasi Sel Endotel yang Memicu Status Prokoagulan

Ketika jalur intrinsik dari koagulasi darah dimulai, sel endotel seperti halnya sel platelet akan menyediakan permukaan untuk koordinasi reaksi kaskade, melalui ikatan dengan faktor IXa, Xa dan mungkin VIIIa, mensintesis faktor V dan mempresentasikan faktor pada permukaan, serta mengekspresikan fosfolipid yang cocok untuk membentuk kompleks yang mengaktifkan faktor Xa dan protrombin.

Secara normal, sel endotel tidak seperti berbagai sel ekstravaskuler, tidak mengekspresikan *tissue factor* (tromboplastin, TF) sehingga tidak menjadi *trigger pathway*

ekstrinsik dari koagulasi. Ekspresi TF akan meningkat akibat paparan dengan trombin, IL-1, TNF-, dan lipopolisakarida bakteri. Respon ini memberikan bukti bahwa sel endotel akan menunjukkan perilaku fenotif yang berbeda akibat pemberian sitokin. Dalam ranah hemostasis dan trombosis, senyawa tersebut memicu beberapa perubahan yang menyebabkan perilaku sel endotel menuju kearah prokoagulan. Dengan demikian, sebagai tambahan terhadap ekspresi *tissue factor*, akan terjadi peningkatan agonis untuk mensekresi faktor *von Willebrand* dari granula penyimpanan, menurunkan sekresi tPA dan meningkatkan pelepasan PAI-1.

Endotelium mampu melakukan fibrinolisis dalam rangka meyakinkan patensi dan perfusi vaskuler. Setelah sekresi *tissue plasminogen activator* (tPA) oleh endotelium, plasmin aktif akan dibentuk dan akan memicu degradasi fibrin. Sebaliknya, endotelium dan jaringan yang lain akan mensekresi *plasminogen-activator inhibitor-1* (PAI-1) yang menghambat tPA dan fungsi sebagai agen antifibrinolitik.

Apabila fibrinolisis endogen efektif, mobilisasi cepat t-PA dari endotel sangat penting karena disolusi trombus lebih efektif apabila t-PA ketika terbentuk atau setelah munculnya trombus. Apabila terdapat status proinflamasi maka terjadi ketidakseimbangan fibrinolisis sehingga terbentuk mikrotrombus yang memicu oklusi arteri dan infark jaringan.

#### **D. Inflamasi dan Imunitas**

Terdapat banyak bukti bahwa sel endotel berperan penting pada inisiasi dan mempertahankan inflamasi, berdiri sejajar dengan protagonis respon inflamasi yang lain, yakni sel T dan monosit. Sebagai respon terhadap berbagai rangsangan antara lain perubahan *shear stress* dan paparan dari perubahan lingkungan atau hormonal, ekspresi molekul adhesi pada sel endotel akan meningkat dan memicu perlekatan sel inflamasi.

Secara normal, sel endotel menyediakan barier permeabilitas selektif terhadap pasase dari konstituen plasma dari lumen menuju jaringan ekstrasvaskuler. Barier ini akan rusak, terutama pada bagian vasodilatasi mikrovaskuler selama respon inflamasi akut. Mekanisme ini didasari oleh aksi bradikinin dan histamin pada vasodilatasi endotel sehingga memicu peningkatan permeabilitas interseluler. Mekanisme yang lain bergantung kepada marginasi dan emigrasi leukosit neutrofil.

Emigrasi neutrofil merupakan konsekuensi dari pembentukan molekul kemotraktan pada lokasi inflamasi dan atau peningkatan adhesi molekul pada permukaan endotel. Adhesi monosit pada permukaan sel endotel juga meningkat apabila endotelium diaktivasi oleh sebelum perlakuan dengan sitokin dan dalam respon pengobatan monosit dengan IL-3 atau G/MC-SF. Sel endotel juga mengatur lalu lintas limfosit pada lokasi inflamasi kronik.

Antigen yang diekspresikan pada permukaan sel endotel mungkin berperan penting pada regulasi imun. Meskipun sel endotel manusia secara konstitutif

mengekspresikan antigen MHC class II, ditemukan pada semua sel yang mempresentasikan antigen, konsekuensi fungsional dari ekspresi antigen class II pada kondisi molekul kostimulasi klasik tetap menjadi perdebatan.

ICAM-1 diekspresikan pada sel endotel aktif dan dapat berfungsi untuk merangsang stimulasi limfosit T via CD18/CD11a pada beberapa vasodilatasi tetapi tidak pada sistem yang lain. Stimulasi sel endotel terhadap sel T CD4 yang diukur oleh produksi IL-2 bergantung kepada interaksi fungsi limfosit yang berhubungan dengan antigen-3 pada sel endotel dan CD2 pada sel T.

Yang lebih menarik, presentasi antigen dalam absennya kostimulasi akan tetapi terdapat adhesi sel-sel yang kuat, dimediasi oleh molekul asesori yang ditampilkan pada permukaan sel endotel, gagal untuk mencapai *threshold* yang diperlukan untuk aktivasi sel T. Sel endotel juga dipertimbangkan sebagai semi profesional APC akibat kemampuannya untuk meningkatkan respon sel T dan produksi sitokin.

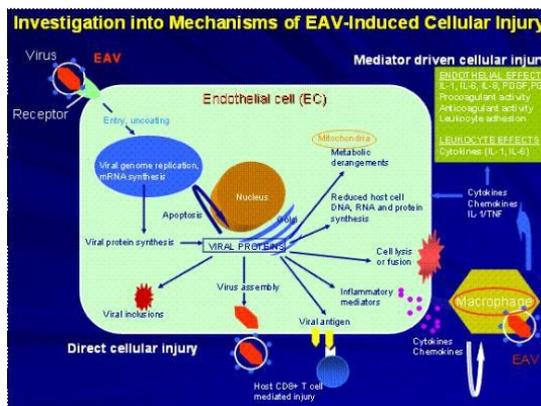
Tahap inisial dari migrasi leukosit tertahannya leukosit dan kontak dengan permukaan ekstraseluler. Tahap ini diperantarai oleh selektin yang mengikat leukosit sehingga terjadi peningkatan adhesi molekul dengan aktivasi integrin, *leukocyte function associated antigen 1 (LFA-1)* dan antigen A-4 (VLA-4). Pada endotel normal tidak berikatan dengan leukosit, hanya endotel yang teraktivasi yang berespon terhadap sitokin termasuk IL 1, TNF $\alpha$  dan lipolisakarida yang menunjukkan adanya adhesi molekul dan dapat berikatan dengan leukosit.<sup>20</sup>

## E. Disfungsi Endotel

Kontraktilitas pembuluh darah normal melibatkan sistem mikro yang dilakukan bahan vasoaktif yang disintesis oleh sel endotel berikatan dengan berbagai macam reseptor. Interaksi ligan dan reseptor mengubah proses metabolisme, permeabilitas kapiler, trafik leukosit, agregasi trombosit, pembekuan, imunologi dan proses angiogenesis. Regulasi lokal kontraktilitas pembuluh darah melalui *muscular smooth muscle* oleh sel endotel terjadi dengan melepaskan produk vasoaktif seperti NO sebagai *Endothelium Derived Relaxing Factors* (ERDF).<sup>21</sup> NO yang disintesis dari asam L-arginin melalui enzim Enos dapat merangsang relaksasi otot polos vaskuler. Disfungsi endotel merupakan gangguan sistemik, yang disebabkan oleh berbagai macam jejas penyakit seperti hipertensi, diabetes melitus, dislipidemia, inflamasi dan jejas reperfusi pasca iskemia. Keadaan patologis, sel endotel teraktivasi untuk menghasilkan faktor konstriksi seperti *tromboxan A2*, prostaglandin H<sub>2</sub> dan radikal bebas yang menghambat NO. Stres oksidatif memainkan peranan sangat penting dalam perubahan sel endotel. Adanya ketidakseimbangan antara faktor kontraksi dan relaksasi yang terjadi pada sel endotel disebut disfungsi endotel.

Pada penyakit demam berdarah terjadi permeabilitas vaskuler yang meningkat ditandai dengan kebocoran plasma ke jaringan interstitial mengakibatkan hemokonsentrasi, efusi pleura, hipoalbuminemia yang bisa menyebabkan syok. Mekanisme terjadinya permeabilitas kapiler yang meningkat belum diketahui dengan jelas. Diduga terjadinya

permeabilitas yang meningkat akibat aktivasi sel endotel akibat terpapar oleh monosit yang terinfeksi virus dengue. Adanya ikatan antara virus dengue dengan antibodi akan membentuk kompleks yang akan melekat pada monosit melalui reseptor Fc, kemudian monosit ini akan mengeluarkan sitokin yang menyebabkan sel endotel teraktivasi sehingga mengekspresikan molekul adhesi seperti *vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)* dan *intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)*. Adanya molekul yang terlarut merupakan pertanda aktivasi atau kerusakan sel endotel. Adanya peningkatan sekresi sitokin seperti *von Willebrand (Vwf)*, *tissue factor (TF)*, *platelet activating factor (PAF)*, *plasminogen activating factor (PAI)*, prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) dan NO serta penurunan *tissue plasminogen activator (Tpa)* dan trombomodulin, oleh karena itu terjadi disfungsi endotel yang ditandai dengan peningkatan permeabilitas vaskuler.



Gambar 4

Mekanisme Infeksi Virus pada Kerusakan Jaringan

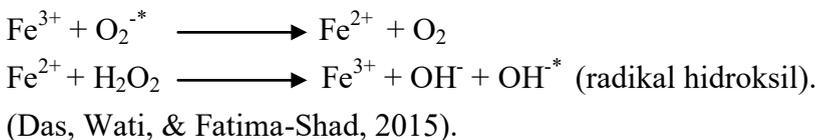
\*\*\*\*\*

## BAB 4

# HIPERGLIKEMIA, STRES OKSIDATIF DAN VASKULOPATI

Berbagai jalur reaksi biokimia yang terkait dengan kondisi hiperglikemia seperti *polyol pathway*, auto-oksidasi glukosa, glikasi protein dan sintesa prostanoid akan meningkatkan pembentukan radikal bebas dan dapat menimbulkan stres oksidatif (Liu, Setiawan, Ang, Yam, & Mehta, 2019).

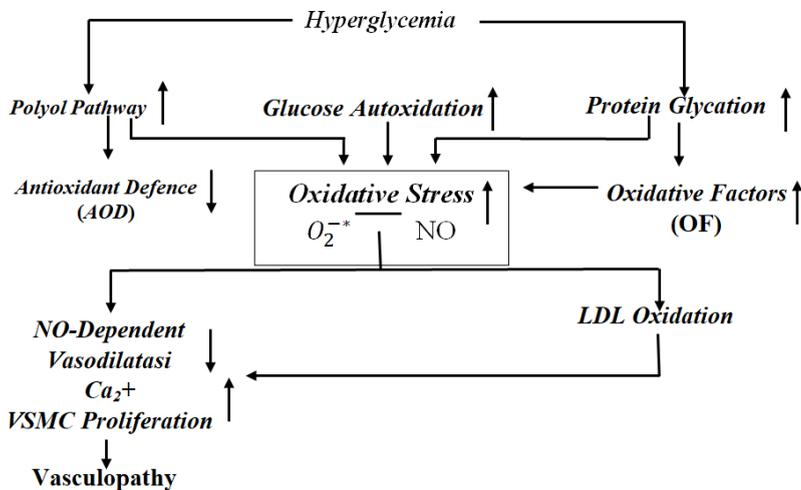
Radikal bebas yang terlihat dalam berbagai proses patologis sebagian besar justru radikal bebas endogen yang terbentuk sebagai produk metabolisme oksigen di dalam tubuh sendiri yang juga dikenal sebagai senyawa *reactive oxygen species (ROS)*. Ion superoksida akan menjadi lebih berbahaya apabila bereaksi dengan *hydrogen peroksida* karena menghasilkan radikal hidroksil yang sangat reaktif, melalui reaksi *Haber-Weiss* berikut ini:



Kerentanan suatu organ maupun sistem organ terhadap stres oksidatif mengandung fungsi keseimbangan antara faktor-faktor yang bersifat pro-oksidan dengan faktor-faktor yang melakukan aktivitas sebagai *scavenger*. Oleh sebab itu

terjadinya kerusakan stres oksidatif dapat merupakan akibat dari meningkatnya produksi radikal bebas dari molekul biologi membran dan jaringan yang dihubungkan dengan sejumlah kejadian patologis sistem kardiovaskuler seperti hipertensi, aterosklerosis, kanker, proses menua maupun diabetes mellitus (Pisoschi & Pop, 2015).

Adapun pengaruh hiperglikemia terhadap peningkatan stres oksidatif yang berkaitan dengan vaskulopati, adalah sebagai berikut:



Gambar 5

Kemungkinan Adanya Kaitan Antara Hiperglikemia, Stres Oksidatif Dan Komplikasi Vaskulopati (Mustapha, dkk., 2020)

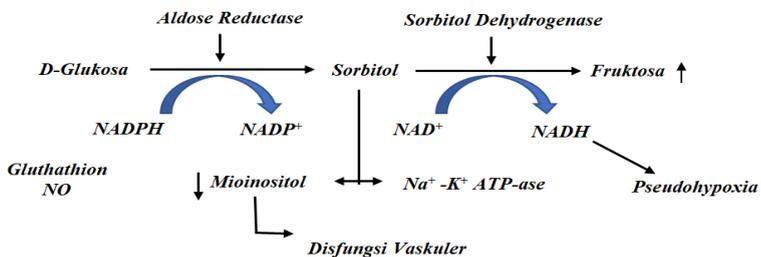
## BAB 5

# MEKANISME KERUSAKAN AKIBAT HIPERGLIKEMIA

Kondisi hiperglikemia dapat menyebabkan kerusakan fungsi dan integritas vaskuler melalui beberapa mekanisme. Mekanisme patogenik yang menimbulkan kerusakan vaskuler akibat kondisi hiperglikemia, adalah:

### A. Peningkatan Aktivitas *Sorbitol-Pathway*

Dalam keadaan normal konsentrasi sorbitol di dalam sel rendah, sedangkan dalam keadaan hiperglikemia konsentrasi sorbitol meningkat. Sorbitol dibentuk dari glukosa di dalam sel dengan bantuan enzim *aldose reductase*. Dengan bantuan enzim *sorbitol dehydrogenase*, sorbitol diubah menjadi fruktosa. Degradasi sorbitol ini berjalan lambat sehingga sorbitol menumpuk di dalam sel dan menyebabkan peningkatan tekanan osmosis intrasel yang dapat merusak sel.



Gambar 6  
Mekanisme Efek *Polyol-Pathway* Terhadap Fungsi Sel  
(Yan, 2018)

Menurunnya rasio *NADPH* terhadap  $NADP^+$  dan meningkatnya rasio *NADH* terhadap  $NAD^+$  serta gangguan cadangan *NADPH* akan menghambat aktivitas enzim yang lain yang memerlukan *NADPH*. Ini akan meningkatkan stres oksidatif (Ogura, Kitada, Xu, Monno, & Koya, 2020).

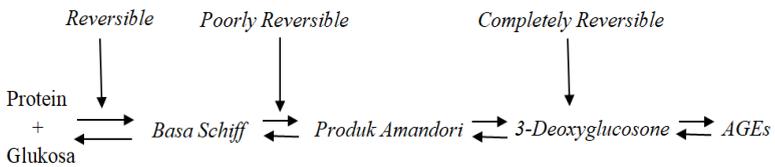
## **B. Peningkatan Gliko-Oksidasi**

Gliko-oksidasi atau oto-oksidasi glukosa merupakan gambaran dari kemampuan molekul glukosa melakukan proses *enolase*, menghasilkan oksigen molekuler yang tereduksi dan selanjutnya menghasilkan oksida *intermediate* yang sangat reaktif. Produk-produk radikal bebas yang dihasilkan reaksi oto-oksidasi glukosa antara lain adalah anion superoksida ( $O_2^{*-}$ ), radikal hidroksil ( $OH^*$ ), hydrogen peroksida (Kalyanaraman, Hardy, Podsiadly, Cheng, & Zielonka, 2017). Molekul-molekul tersebut dapat merusak protein dan lemak melalui mekanisme *cross-linking* dan fragmentasi. Semua proses ini disebut dengan glikosilasi oksidatif (Guyen, Barnouin, Snijders, & Karran, 2016).

## **C. Peningkatan Glikosilasi Non-Enzimatik**

Glukosa mempunyai kemampuan membentuk ikatan kovalen melalui proses non-enzimatik. Produk glikosilasi non-enzimatik terjadi dengan cara adisi glukosa pada kelompok amino protein. Protein yang mengalami glikosilasi menghasilkan *advance glycosylated end products (AGEs)* yang bersifat *irreversible*. Generasi *reactive oxygen species* yang dihasilkan dari proses glikosilasi protein ini adalah pada *membrane basalis* sel pembuluh darah dan

jaringan saraf oleh karena protein dan kolagen di jaringan itu mengalami *turnover* yang sangat lambat (Volpe, Villar-Delfino, Dos Anjos, & Nogueira-Machado, 2018). Efek peningkatan kadar glukosa dan terjadinya perubahan fungsi sel berkaitan dengan kemampuan glukosa yang tinggi tersebut untuk mengikat protein tanpa melalui proses enzimatik dan dikenal sebagai glikosilasi non-enzimatik.



Gambar 7  
Pembentukan Advanced -glycosilated end Product (AGEs)  
(Volpe et al., 2018)

#### D. Aktivitas *Dyacylglycerol-Protein Kinase C (DAG-PKC) Pathway*

Sistem enzim fosfolipid dan aktivitas protein kinase C ini mengatur fungsi vaskuler yang beragam, antara lain: permeabilitas, kontraktilitas, koagulasi, hemoreologi, kerja hormone, pengaruh *growth factor*, dan sintesa serta *turnover* membran basal. Semua parameter tersebut mengalami gangguan pada diabetes mellitus. Diduga bahwa peningkatan kadar *diacylglycerol* jaringan akan meningkatkan aktivitas protein kinase C dan menimbulkan gangguan homeostasis intra sel (Aghadavoud, Nasri, & Amiri, 2017).

\*\*\*\*\*

## **BAB 6**

# **ENDOTEL DAN KONTRAKTILITAS PEMBULUH DARAH**

### **A. Definisi Endotel dan Kontraktilitas Pembuluh Darah**

Menurut Witter, Tonar, and Schöpfer (2017), dinding arteri terdiri atas tiga lapisan atau tunika, yaitu : (1) tunika intima, (2) tunika media, dan (3) tunika advensia. Pada tunika intima terdapat sel endotel pembuluh darah yang berfungsi untuk melindungi otot polos pembuluh darah yang terdapat pada tunika media. Sedangkan tunika advensia terdiri dari jaringan ikat dan saraf (Witter et al., 2017).

Endotel merupakan lapisan sel di bagian dalam pembuluh darah. Pada orang dewasa normal berat keseluruhan endotel pembuluh darah mencapai sekitar 3 kilogram dan bila dibentangkan dapat mencapai luas sekitar 4 lapangan tenis. Pada pembuluh darah sel endotel merupakan satu lapisan penahan yang mencegah terjadinya perpindahan sebagian besar bahan yang terdapat dalam darah keluar dari pembuluh darah. Sekitar tahun 2018 diketahui bahwa berbagai fungsi dari endotel, yakni peranannya dalam mengatur kontraksi dan dilatasi pembuluh darah.

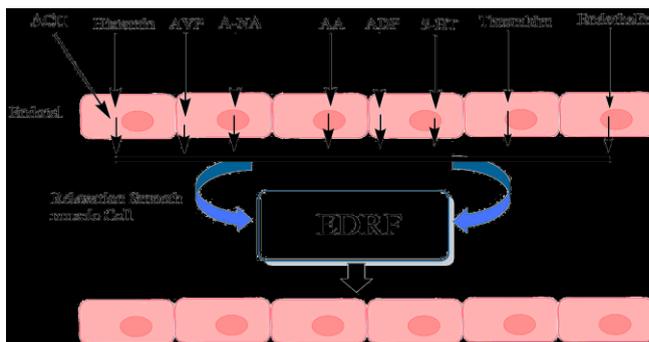
Sel endotel merupakan selapis sel monolayer yang dibentuk oleh sel-sel yang berikatan satu dengan yang lain melalui struktur adhesi. Bentuk sel endotel pipih polygonal dengan ukuran 25-50 x 10-15  $\mu\text{m}$ , dengan ketebalan 1 $\mu\text{m}$

ditepi dan  $3\mu\text{m}$  di tengah, di daerah inti sel. Selama perkembangan embrionik, sel endotel berdiferensiasi dari suatu *precursor* yang dikenal dengan *angioblast* dan berinteraksi dengan lingkungan sel-sel organ sekitarnya (Fernando et al., 2017).

Secara umum sel endotel pembuluh darah berfungsi sebagai *barrier* dan filter untuk mencegah trombosit beragregasi dan mencegah keluarnya makromolekul dari sirkulasi; tempat metabolisme berbagai jenis mediator kimiawi; serta tempat sintesa bahan vasoaktif yang mengendalikan dan memodulasi kontraktilitas pembuluh darah melalui ikatan reseptor spesifik di permukaan membran. Sel endotel vaskuler juga dapat memediasi kemampuan pembuluh darah untuk mengubah bentuknya dalam memberikan respon terhadap perubahan-perubahan hemodinamik (Krüger-Genge, dkk., 2019).

Kontraktilitas pembuluh darah yang normal ternyata melibatkan sistem mikro yang dilakukan oleh bahan vasoaktif yang disintesa oleh sel endotel. Regulasi lokal kontraktilitas pembuluh darah melalui *vascular smooth muscle cells* oleh endotel terjadi dengan *release* produk vasoaktif seperti *nitric oxide* sebagai *endothelium-derived relaxing factor* (Jiang et al., 2016). *Nitric oxide* yang disintesa dari asam amino semi esensial *L-arginine* melalui aktivitas *enzyme-nitric oxide synthase*, dapat menstimulasi relaksasi *vascular smooth muscle cells* melalui aktivasi *soluble guanylate cyclase* dan membentuk *cyclic-guanosine monophosphate* (Feiteiro, dkk, 2016).

Dengan perkembangan kajian farmakologis ternyata ditemukan berbagai jenis reseptor yang terdapat pada permukaan membran sel endotel yang apabila ligannya berikatan dengan reseptornya yang spesifik akan menghasilkan mediator yang menyebabkan kontraktilitas pembuluh darah secara lokal. Berbagai mediator neurohumoral melalui reseptor yang ada di permukaan endotel akan memediasi disintesisnya *endothelium-derived relaxing factor* atau *nitric oxide* dan menyebabkan terjadinya relaksasi pembuluh darah. Reseptor tersebut antara lain adalah untuk *acetilkolin* (M2), *histamin* (H2), *vasopressin* (VP1), *adrenalin* dan *nor-adrenalin* (Alpha 2), *bradikinin* (Beta 2), *arachidonic acid*, *adenosine diphosphate* (P2), *trombin* (T), dan *serotonin* (5-HT1). Adanya vasodilator seperti *nitric oxide* akan diimbangi dengan bahan vasokonstriktor sehingga kontraktilitas pembuluh darah menjadi teratur (Thrombozytenfunktion, und Schlaganfall, & Wolf).



Gambar 8

Berbagai Mediator Neurohumoral Melalui Reseptor Yang Ada Di Permukaan Sel Endotel Pembuluh Darah  
(Khakpour, dkk., 2015)

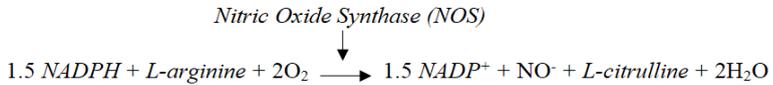
Otot polos pembuluh darah terbentuk dari serabut yang bergaris tengah 2 sampai dengan 5 mikron dengan panjang 50 sampai dengan 200 mikron. Kontraksi otot polos pembuluh darah diaktifkan oleh ion-Ca. ATP akan diubah menjadi ADP untuk memberikan energi pada proses kontraksi. Adanya ion-Ca dan energi ini dapat menyebabkan daya tarik antara filamen *actin* dan *myosin*. Gaya tarik ini akibat gaya mekanik atau elektrostatis yang ditimbulkan oleh interaksi jembatan penyeberangan filamen *actin* dan *myosin* (Woodhead & Craig, 2020).

Di dalam otot polos, potensial aksi menyebabkan sebagian ion-Ca masuk ke dalam serabut otot dari cairan ekstrasel. Potensial aksi ini dapat ditimbulkan melalui kerja *neurotransmitter*. Jika konsentrasi ion-Ca dalam cairan ekstrasel cukup tinggi, potensial aksi dapat juga disebabkan oleh masuknya ion-Ca ke dalam serabut otot. Ion-Ca dapat berdifusi ke semua bagian otot polos dan mengakibatkan kontraksi. Untuk menyebabkan relaksasi elemen kontraktil otot polos perlu mengeluarkan ion-Ca. Pengeluaran dapat dilakukan dengan pompa ion-Ca yang memompa ion-Ca keluar serabut otot polos kembali ke cairan ekstrasel (Grover, 2020).

## **B. Sintesa *Nitric Oxide* dan Relaksasi Pembuluh Darah**

Keterlibatan sel endotel pada relaksasi pembuluh darah diketahui dengan disintesisnya *endothelial-derived relaxing factor (EDRF)* yang belakangan oleh Pirahanchi and Brown (2019) terbukti sebagai makromolekul *nitric oxide* (Pirahanchi & Brown, 2019).

Menurut Kuschman, Palczewski, and Thomas (2021), sintesa *nitric oxide* dilakukan oleh famili *enzyme-nitric oxide synthase*, dimana oleh adanya stimulasi reseptor spesifik pada sel endotel pembuluh darah, maka akan terjadi sintesa *nitric oxide* dari *L-arginine*, suatu asam amino semi esensial. *L-arginine* oleh *enzyme-nitric oxide synthase* diubah menjadi *L-citrulline* dan *nitric oxide*. Pembentukan *nitric oxide* dengan bantuan *enzyme-nitric oxide synthase* terjadi melalui proses reaksi oksidasi sebagai berikut:



Adanya rangsangan yang mengaktifkan reseptor spesifik pada permukaan sel endotel akan menyebabkan terbukanya kanal-Ca yang diikuti dengan masunya ion-Ca ke dalam sitoplasma sel endotel. Hal ini kemudian diikuti dengan timbulnya interaksi ion-Ca dengan calmodulin yang akan merangsang aktivitas *enzyme-nitric oxide synthase*. *Enzyme-nitric oxide synthase* akan mengubah *L-arginine* menjadi *L-citrulline* dan *nitric oxide* melalui proses reaksi oksidasi. Selanjutnya keberadaan *nitric oxide* yang dilepaskan dan masuk ke dalam otot polos, akan merangsang aktivitas enzim *soluble guanylate cyclase* yang akan mengubah *guanosine triphosphate (GTP)* menjadi *cyclic-guanosine monophosphate (c-GMP)*, dan selanjutnya akan menurunkan ion-Ca intrasel serta menghambat protein kontraktile. Keadaan ini akan mengakibatkan tonus

pembuluh darah dapat dipertahankan secara fisiologis (Lim et al., 2018).

### C. Dampak Radikal Bebas terhadap Membran Sel Endotel

Radikal bebas adalah suatu molekul atau fragmen molekuler yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, sehingga bersifat sangat reaktif dan tidak stabil. Beberapa contoh radikal bebas antara lain adalah superoksida ( $O_2^{\cdot-}$ ), radikal hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ) dan hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Radikal bebas merupakan produk metabolisme oksigen yang normal dari suatu sistem biologis yang memerlukan oksigen untuk mempertahankan hidupnya (Ifeanyi, 2018).

Kondisi hiperglikemia, dimana kadar glukosa berlebihan akan dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas yang pada gilirannya dapat menimbulkan stres oksidatif. Hampir semua radikal bebas bersifat reaktif dan tidak stabil sehingga dapat sebagai pengoksidasi dan pereduksi yang potensial. Dampak akumulasinya di dalam sel akan merusak senyawa makromolekul yang penting untuk mempertahankan integritas fungsi sel, yaitu:

1. Asam lemak, terutama molekul fosfolipid, asam lemak tak jenuh *polyunsaturated fatty acid (PUFA)* yang merupakan komponen membran sel. Peroksidasi fosfolipid akan menyebabkan inaktivasi enzim maupun reseptor yang bergantung pada membran fosfolipid.
2. Protein intrinsik dan ekstrinsik membran yang melaksanakan berbagai fungsi penting antara lain seperti enzim dan reseptor.

3. *Deoxyribonucleic acid (DNA)* yang merupakan perangkat genetik sel (McKeague, dkk., 2016).

Paparan kondisi hiperglikemia, dimana kadar glukosa maupun lemak tinggi akan menyebabkan kerusakan sel endotel yang berulang-ulang sehingga terjadi perlekatan *trombosit*, agregasi dan selanjutnya mengakibatkan *thrombus*. Selain itu akumulasi radikal bebas yang meningkat pembentukannya pada kondisi hiperglikemia dapat mengakibatkan perubahan fungsi dan kerusakan reseptor di membran sel endotel, sehingga kadar *endothelium-derived relaxinf factor* akan menurun. Turunnya kadar *endothelium-derived relaxing factor* atau *nitric oxide* akan menyebabkan gangguan vasodilatasi dan meningkatnya vasokonstriksi pembuluh darah (Zhao, dkk, 2015).

#### **D. Sistem Proteksi terhadap Radikal Bebas**

Sel di dalam tubuh, sampai batas tertentu dapat bertahan terhadap kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Hal ini dimungkinkan karena adanya sistem proteksi terhadap keberadaan radikal bebas berupa sistem antioksidan enzimatis seperti *superoxide dismutase (SOD)*, katalase dan *gluthathion peroxidase*, juga dikenal sistem antioksidan non-enzimatis berupa vitamin-vitamin, seperti vitamin C, vitamin E dan *beta-carote* (Bhattacharya, 2015).

\*\*\*\*\*



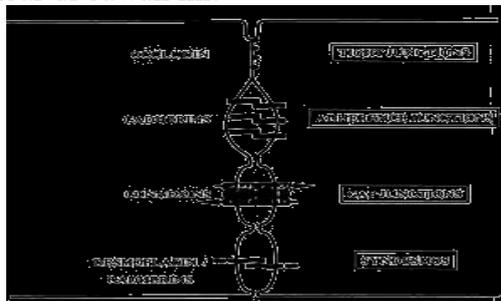
## BAB 7

### MODULASI *VASCULAR ENDOTHELIAL* *CADERIN (VE-CADERIN) DAN VEGF*

#### A. Hubungan antar Sel Endotel

Sel endotel melapisi semua pembuluh darah, pembuluh limfe dan mesotel yang melapisi rongga serosa tubuh (pericardium, pleura dan peritoneum). Secara struktur keduanya merupakan epitel selapis gepeng, tetapi asal dan kemampuannya berbeda, karena mempunyai kemampuan yang tidak dimiliki epitel selapis gepeng biasa. Sel endotel dan mesotel bersifat fagositik aktif, sehingga dapat membentuk fibroblas melalui pembelahan sel dan dapat menyebabkan terjadinya berbagai tumor yang menarik.

Berdasarkan morfologi dan fungsi karakteristik ada 4 hubungan di dalam sel endotelial yaitu *tight junctions*, *adherence junction*, *gap junction* dan *sindeosmos* seperti pada gambar di bawah ini:



Gambar 9

Tipe Hubungan Sel pada Endotel berdasarkan Morfologi  
dan Fungsi Karakteristik

## B. *Tight Junctions* (TJ)

*Tight junctions* umumnya merupakan sabuk melingkar pada dinding lateral sel didekat ujung atau apikal sel dan disebut sebagai sabuk sekap atau *zonula occludens*. Mikroskop elektron tampak struktur lima lapis yaitu tiga garis padat yang dipisahkan oleh kedua garis terang dan tampak bersatunya lapisan luar kedua membran plasma. Sebetulnya bersatunya itu hanya terjadi pada beberapa titik saja dan pada teknik *etsa beku* (*freeze etch*) terlihat jaringan-jaringan penonjolan linear dan lekukan-lekukan serta masing-masing tonjolan dibentuk oleh dua baris partikel dengan ukuran 3-4 nm. Partikel-partikel ini terdiri dari protein membran integral, yang terdiri satu baris dari masing-masing membran dan saling mengikat seperti kaitan kaitan resleting yang secara efektif menutup celah interseluler pada tempat-tempat tertentu. Keadaan ini secara fisis mencegah molekul-molekul lewat, mencegah transpor interseluler dari lumen ke celah ekstraseluler (atau sebaliknya) melalui celah interseluler. Jumlah dan kompleks untaian penyumbat sangat bervariasi dari satu jaringan ke jaringan lain, tautan (*junction*) yang lebih impermeabel biasanya mempunyai banyak untaian. Di dalam interseluler endotelial terdapat banyak protein yang identik dengan protein yang ditemukan di epitel seperti ZO-1 (*zonula occludens-1*), ZO-2, Cigulin dan yang terbaru GTP binding protein, rab 13. Cigulin dan ZO-2 lebih spesifik sebagai pertanda dari *tight junctions*. Terlihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 1 Protein Interseluler Endotel

Junctions	Transmembrane	Cytoplasmic
Tight	Occludin	ZO-1, ZO-2, cingulin, Rab13
Gap	Connexins (Co37, Co40, Co43)	
Adherence	Cadherins (VE, others?)	$\alpha, \beta$ -Catenins, plakoglobin, vinculin, $\alpha$ -actinin, ZO-1, zyxin, moesin
Syndesmos	Cadherin (VE)?	Desmoplakin
Others	PECAM, integrins $\alpha 2\beta 1$ , $\alpha 5\beta 1$	

<sup>a</sup> Only components shown to be present in endothelial cells are considered. See the text for specific comments and references.

### C. Gap Junctions (GJ)

Celah dengan ukuran 2-3 nm yang memisahkan membran plasma. Potongan tangensial gap junction tersusun atas partikel-partikel yang berukuran 7-9 nm yang berbentuk heksagonal atau connexon yang masing-masing partikel berbentuk silindris dengan satu saluran sentral. Sel endotel terdapat 3 *connexins* yaitu: Co37, Co40 dan Co43 ekspresinya berbeda untuk masing-masing pembuluh darah. Gap junction sangat penting di dalam sel endotelial terutama untuk komunikasi *homotypic* (antara sel endotel dengan sel endotel lainnya) atau *heterotypic* (sel endotel dengan otot polos, sel endotel dengan makrofag).

GJ tersebar luas di dalam tubuh, kecuali pada otot polos dan sel darah. Diduga celah ini memungkinkan perpindahan molekul-molekul kecil seperti ion, gula, asam amino dan beberapa hormon. Pada jaringan tertentu, misalnya otot polos dinding usus, otot jantung yang biasanya disebut sebagai neksus GJ ini dapat menghantarkan listrik, hal ini bisa menyinkronkan aktivitas antara satu sel dengan sel lainnya sehingga sel tersebut terangkai secara elektronik.

#### **D. Adherens Junction (AJ) atau Zonula Adherens**

AJ merupakan pita utuh yang mengelilingi sel epitel dekat permukaan bebas tepat disebelah basal zonula occludens. Setiap zonula adherens epitel jaringan berfungsi sebagai pelekat mekanik dan dapat meneruskan daya yang timbul di dalam sel. Dengan terikat pada terminal web secara erat, zonula adherens membantu kontraksi mikrovili pada beberapa epitel.

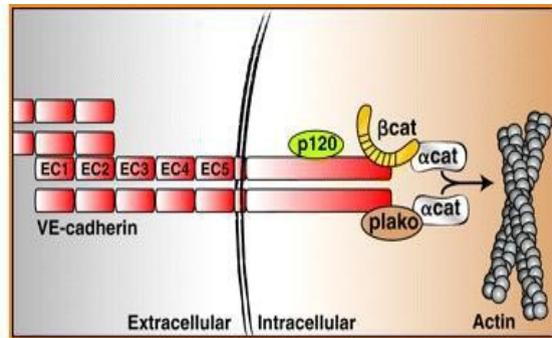
Cadherin adalah salah satu ikatan protein transmembran yang terdiri dari sitoplasma dan ruang ekstraseluler yang mengandung  $Ca^{++}$  binding. Cadherin bersifat homolitik, sehingga  $Ca^{++}$  dapat dikenali oleh sel ke sel. Sel endotel mempunyai cadherin spesifik dan non spesifik. N-cadherin (juga ditemukan disel syaraf dan sel otot) yang jumlahnya relatif banyak di dalam sel endotelium.<sup>7</sup> Pada sel endotelium juga didapatkan caderin spesifik (cadherin-5/VE-cadherin). Molekul ini terletak di interseluler junction, pada dasarnya terdapat disemua jenis endotelium.

#### **E. Sindesmos atau Komplek Adherens**

Sel endotel tidak ada yang mempunyai struktur yang mirip dengan desmosom. Desmosom merupakan tipe *intercellular junction* yang kekuatan adhesinya menengah antara sel epitel dan berasal dari glikoprotein transmembran seperti cadherin (disebut juga desmoglin dan desmocolin). Desmosom terdapat pada banyak sel dan terutama pada sel-sel yang mengalami tarikan atau tekanan.

## F. Jalur Endogen Modulasi Sel Endotel

Sel endotel memiliki mekanisme molekuler dimana permeabilitas pembuluh darah dapat diatur. Mekanisme yang berfokus pada pengaturan AJ dan beberapa target pada VE-cadherin secara spesifik seperti fosforilasi, pembelahan dan internalisasi VE-cadherin yang dianggap mempengaruhi permeabilitas sel endotel. Seperti gambar di bawah ini:



Gambar 10

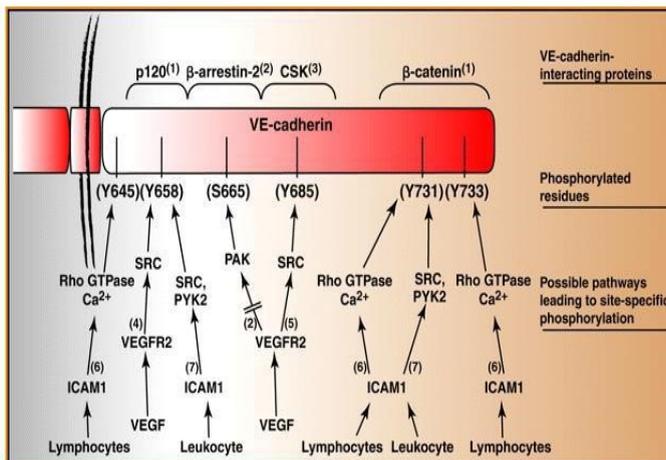
Organisasi Molekuler VE-cadherin dari AJs Sel Endotel

### 1. Fosforilasi Komponen *Adheren Junction* (AJ)

Secara umum fosforilasi tirosin pada VE-cadherin dan komponen AJ lainnya berhubungan dengan kelemahan taut serta gangguan fungsi barrier. Telah dilakukan penelitian zat yang dapat meningkatkan permeabilitas seperti histamin, TNF- $\alpha$ , platelet *activating factor* (PAF), VEGF mengakibatkan fosforilasi dari VE-cadherin dan pasangan ikatannya yaitu:  $\beta$ -catenin, plakoglobin dan p 120. Banyak penelitian yang mendukung antara fosforilasi tirosin dengan mekanisme pembukaan AJ. Penelitian dengan menggunakan ekstrak

organ menunjukkan *VE-cadherin* yang terfosforilasi secara *in vivo* pada kondisi angiogenik dan organ yang iskemik.

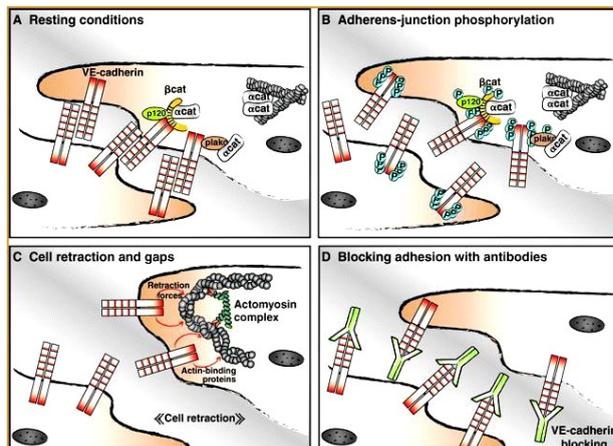
Mekanisme fosforilasi *VE-cadherin* belum sepenuhnya diketahui dengan jelas. Tirosin kinase SRC mungkin memegang peranan pada mekanisme ini, sebab ada hubungan langsung *VE-cadherin* dan VEGF yang dirangsang oleh fosforilasi dari *VE-cadherin* dihambat dengan memberikan inhibitor SRC. Selain itu fosforilasi *VE-cadherin*- $\beta$ -catenin kompleks dapat juga ditimbulkan oleh protein rich kinase 2 (PYK2) dan dihambat oleh *vascular endothel protein tyrosine phosphatase* (VE-PTP), *density enhanced phosphatase-1* (DEP1), *protein tyrosine phosphatase reseptor type M* (PTP $\mu$ ) dan *fosfotyrosine phosphatase* (SHP2) sehingga akan memperkuat fungsi barrier.



Gambar 11 Phosphorilasi VE- cadherine

## 2. Internalisasi *VE-cadherin*

Mekanisme lain dalam pengaturan permeabilitas sel endotel adalah melalui internalisasi *VE-cadherin* dengan proses *clathrin dependent manner*. Yang menarik ikatan antara p120 dengan *VE-cadherin* dapat mencegah terjadinya internalisasi, memunculkan suatu konsep bahwa p120 mungkin berfungsi sebagai sinyal retensi membrane plasma. Beberapa penelitian terbaru ditemukan bahwa VEGF mengganggu fungsi barrier sel endotel dengan cara aktivasi SRC, dimana secara berurutan akan terjadi fosforilasi VAV2, *guanine-nucleotide exchange factor* (GEF) melalui GTP ase rac. Aktivasi (GTP-bound) Rac akan menimbulkan fosforilasi dari *VE-cadherin* dari  $\beta$ -arrestin 2, yang akan meningkatkan *chlattrin-dependent* internalisasi *VE-cadherin*.



Gambar 12

Modifikasi Fungsi AJs Sel Endotel pada Beberapa Kondisi Permeabilitas yang Meningkat

### 3. Produksi cAMP dan Aktivitas RAP 1

Sudah lama diketahui bahwa obat-obatan yang meningkatkan cAMP, menambah fungsi barier vaskuler baik secara *invivo* atau *invitro* dan beberapa jaringan hidup yang mengalami inflamasi. RAP1 berperan sebagai jaringan kompleks sinyal untuk mengontrol organisasi dari sambungan antar sel. Suatu hubungan timbal balik bahwa RAP 1 membutuhkan VE-cadherin untuk aktivitasnya. Untuk itu RAP 1 dan VE-cadherin dapat mempengaruhi satu sama lain untuk bersama-sama mengatur respon endotel dan fungsi barier.

### 4. Hubungan *VE-cadherin* dengan *Reseptor VEGF*

*VE-cadherin* dapat berhubungan dengan reseptor VEGF 2 (juga disebut Flk1 atau KDR) untuk mereduksi sinyal proliferasi yang terinisiasi oleh reseptor. Induksi dari fosfolipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) dan aktivasi dari MAP kinase oleh VEGF, keduanya akan mengurangi ikatan antara VEGF 2 dengan *VE-cadherin*, *VE-cadherin* berfungsi sebagai inhibisi balik fosforilasi dari reseptor dan internalisasi untuk kompartemen sinyal intraseluler. Sebagai tambahan hubungan VEGF 2 dengan VE-cadherin mungkin memfasilitasi fosforilasi komponen AJ oleh SRC dengan demikian akan melemahkan fungsi barier sel endotel. Beberapa penelitian menunjukkan peningkatan VEGF merupakan faktor penting terjadinya perubahan permeabilitas pada penderita DBD dengan melalui ekspresi VEGF reseptor 2 (VEGFR 2/KDR) dan protein transmembran tirosin kinase. Perlekatan VEGF

dengan VEGFR2 pada sel endotel merupakan hasil fosforilasi reseptor tersebut sehingga akan merubah morfologi, peningkatan permeabilitas dan proliferasi sel. Beberapa studi menunjukkan peran VEGF pada regulasi permeabilitas dan aktivitas *control soluble receptor* VEGFR2. Penelitian *in vivo* mekanisme virus dengue dapat merubah permeabilitas vaskuler dengan perubahan produksi *soluble* VEGFR2 dan ekspresi VEGFR2 permukaan sel endotel. Struktur VEGF2 (KDR) hampir mirip dengan struktur dengan VEGFR 1, suatu reseptor matur yang merupakan dengan berat 230 kDa suatu protein glikolasi yang mengikat VEGF. Suatu penelitian pada hewan menunjukkan bahwa VEGFR2 sangat spesifik pada endotelium vaskuler seluruh tubuh.

### **G. Strategi Farmakologi untuk Mengontrol Permeabilitas Sel Endotel**

Jangkauan dari pemahaman terhadap struktur dan fungsi dari adheren junction (AJ) untuk membuat kemungkinan memformulasikan beberapa hipotesis mengenai strategi farmakologi untuk memberikan terapi pada penyakit dengan gangguan permeabilitas vaskuler. Ada beberapa kelas potensial terapi dan kelemahan masing-masing kelas, kemudian penjelasan masing-masing dari mekanisme molekuler dari kelas farmakoterapi.

1. Inhibitor SRC jenis ini sangat potensial untuk diklinik, dengan membatasi induksi VEGF yang meningkat pada gangguan permeabilitas, SRC akan memodulasi beberapa mekanisme sel yang fundamental seperti proliferasi,

pertahanan, pergerakan dan invasi agen yang mungkin mengarah ke efek samping.

2. Inhibitor lain yang bekerja dengan jalan memblokir hubungan VEGFR2 dengan *VE-cadherin*, tetapi sampai saat ini pengetahuan karakteristik dan struktural kompleks *VE-cadherin* dan VEGFR2 serta peptide atau antibodi yang mungkin kompeten masih sangat terbatas.
3. Inhibisi dari internalisasi *VE-cadherin* mungkin akan menurunkan permeabilitas vaskuler. Penghambatan hubungan p120 atau  $\beta$  arrestin 2 dengan *VE-cadherin* dapat mencegah retensi dari protein dipermukaan sel dengan demikian berkontribusi dalam stabilisasi dari fungsi barier sel endotel. Karena fosforilasi dari residu *VE-cadherin* atau catenin dapat berfungsi sebagai satu sisi yang dapat mengikat p120 dan  $\beta$  arrestin. Satu obat telah ditemukan yang mendekati inhibitor spesifik tirosin dan serine kinase.
4. Obat yang berpengaruh pada kebocoran ekstraseluler dari *VE-cadherin* yang mungkin akan mempengaruhi integritas dari tautan pada kondisi inflamasi yang lama akan menyebabkan inhibisi terhadap matrik metaloprotease dan lisis enzim yang mungkin bermanfaat pada kasus ini.
5. Permeabilitas vaskuler mungkin dapat dipengaruhi oleh aktivitas RAP1 atau GTPase lain. Zat kimia yang berpengaruh terhadap aktivasi EPAC 1 dan dilanjutkan RAP1 dapat memperbaiki sel endotel.

\*\*\*\*\*

## BAB 8

### PEMBUATAN KULTUR SEL ENDOTEL DARI *HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS (HUVECs)*

Untuk mempelajari berbagai peran sel endotel pembuluh darah, khususnya yang berkaitan dengan modulasi kontraktilitas pembuluh darah melalui fungsi reseptor dan mekanisme kerusakan yang mungkin terjadi pada kondisi hiperglikemia, maka dikembangkan kajian secara *in vitro* dengan menggunakan kultur sel endotel vena umbilikal. Adapun asal sel endotel yang dipergunakan bersumber dari sel endotel manusia yang lazim digunakan, yaitu sel endotel dari vena umbilikal bayi.

Umbilikus yang digunakan dalam kajian ini adalah umbilikus yang diperoleh dari Rumah Sakit Husada Bunda Malang. Adapun prosedur pengambilan umbilikus dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Umbilikus yang dapat diambil adalah umbilikus bayi kelahiran pagi, siang maupun malam dengan waktu pengerjaan isolasi dan kultur tidak melebihi waktu 24 jam, baik kelahiran secara normal maupun Caesar.
2. Disiapkan botol berisi *cord solution* yang diambil dari *refrigerator*/kulkas suhu 4°C.
3. Setelah kelahiran, tali pusat plasenta (umbilikus) segera dipotong sepanjang 20 sampai dengan 25 cm, dan jangan sampai dicuci.
4. Potongan umbilikus tersebut segera dimasukkan ke dalam botol yang berisi *cord solution* dalam keadaan *fresh*, ditutup

rapat kemudian dimasukkan kembali ke dalam *refrigerator*/kulkas suhu 4°C.

5. Selama dalam perjalanan umbilikus dibawa dalam keadaan dingin dengan menggunakan *ice spet*.

#### **A. Pembuatan Larutan *HEPES***

1. Larutkan 47,6 g *HEPES* ke dalam 200 mL *deionized water*.
2. Sterilisasi dengan cara filtrasi melalui filter 0,2µm.
3. Simpan pada -20°C/6 mo.

#### **B. Pembuatan Larutan *Bicarbonate-phenol red***

1. Larutkan 44 g *sodium hydrogen bicarbonate* dan 30 mg *phenol red* ke dalam 1000 mL *deionized water*.
2. Sterilisasi dalam *autoclave* selama 10 menit pada suhu 115°C.
3. Simpan pada suhu 4°C/6 mo.

#### **C. Pembuatan Larutan *Gentamycine***

1. Larutkan 75 mg *gentamycin sulfate* ke dalam 10 mL *deionized water*.
2. Sterilisasi dalam *autoclave* selama 10 menit pada suhu 115°C.
3. Simpan pada suhu -20°C/6 mo.

#### **D. Pembuatan Medium *Cord Collection***

1. Ambil 10 mL *HBSS* dan tambahkan 90 mL *deionized water*.
2. Masukkan 3,75 mL *sodium hydrogen bicarbonate*.

3. Tambahkan 2,5 mL *HEPES*.
4. Tambahkan 1,25 mL *gentamycine*.
5. Larutkan 200  $\mu$ L dan 2 tetes HCl 10 N sehingga pH 7,87.
6. Simpan dalam almari pendingin ( $-20^{\circ}\text{C}$  atau  $-70^{\circ}\text{C}$ )

#### **E. Pembuatan Larutan *Pen-strep***

1. Larutkan 23,95 mg *penicillin* dan 52,50 mg *streptomycin* ke dalam 10 mL *deionized water*.
2. Sterilisasi dengan cara filtrasi melalui filter 0,2 $\mu$ m setiap 2,5 mL.
3. Simpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ /6 mo.

#### **F. Pembuatan Larutan *Glutamine***

1. Larutkan 0,2 92 g *L-glutamine* dalam 10 mL *deionized water*.
2. Sterilisasi dengan filtrasi melalui prefilter 0,5 $\mu$ m, kemudian filter 0,2 $\mu$ m.
3. Simpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ /6 mo.

#### **G. Pembuatan Medium *Serum Free***

1. Sediakan *MEM* 100 mL, kemudian masukkan 1,25 mL *pen-strep*.
2. Tambahkan 5 mL larutan *bicarbonate-phenol red* dan 1,25 mL *glutamine*.
3. Sterilisasi dengan filter 0,2  $\mu$ m.

#### **H. Pembuatan Medium Kultur**

1. Ambil 20 mL *serum free*, kemudian tambahkan dengan 2,5 mL *FBS*.

2. Masukkan 2,5 mL *NBS*.
3. Sterilisasi dengan filtrasi melalui filter 0,2  $\mu\text{m}$ .
4. Simpan pada suhu 4°C dan gunakan dalam 1 minggu.
5. Tambahkan 300  $\mu\text{L}$  HCL 1 N.

### **I. Pembuatan Larutan *Collagenase***

1. Larutkan 0,005 g *collagenase* dalam 8 mL *serum free*.
2. Tambahkan 100  $\mu\text{L}$  HCl 1 N dan 1 tetes HCl 1 N.
3. Sterilisasi dengan filter 0,2 $\mu\text{m}$ .
4. Untuk perbandingan, 10 mL per 20 cm cord.

### **J. Metode Pembuatan Kultur Sel Endotel Umbilikus**

1. Persiapan Sediaan Umbilikus
  - a. Pengumpulan umbilikus, sebaiknya diambil dari ibu hamil yang sehat dan melahirkan secara normal maupun caesar, panjang 20-25 cm.
  - b. Sesudah persalinan, umbilikus dipisahkan dengan placenta agar umbilikusnya segera dapat dimasukkan pada medium *cord collection* yang sudah dipersiapkan terlebih dahulu.
  - c. Medium *cord collection* yang telah berisi umbilikus tersebut disimpan pada suhu 4°C dan diperlakukan sebelum 48 jam.
2. Isolasi dan pembuatan kultur sel endotel
  - a. Semua bahan yang akan dipergunakan dihangatkan pada suhu 37°C.
  - b. Umbilikus dibersihkan dari jaringan dan *clot* yang ada dengan tissue.

- c. Masing-masing ujung umbilikus dipotong transversal sehingga terlihat dua arteri dan vena. Vena akan terlihat mempunyai dinding yang lebih tebal, lebih besar dan elastis.
- d. Masukkan *cannule* pada satu ujung vena ( $\pm 1$  cm) kemudian ikat dengan erat.
- e. Bersihkan vena dengan *PBSA* melalui *cannule* yang telah terpasang dengan menggunakan spuit 20 mL. Setelah bersih, ikat ujung umbilikus yang tidak bercannule dengan ikatan yang kuat.
- f. Masukkan 8 mL *collagenase* ke dalam vena seperti pada cara poin “e” dan biarkan spuit masih terpasang pada *cannule*, kemudian umbilikus didekap dengan tangan (agar mencapai suhu  $37^{\circ}\text{C}$ ) selama 8 menit.
- g. Keluarkan *collagenase* yang telah mengandung sel endotel dengan cara menyedot menggunakan spuit yang masih terpasang. Dan larutan *collagenase* tersebut di tamping dalam tabung sentrifus yang steril.
- h. Ulangi cara seperti pemberian *collagenase* (cara “g”) tetapi dengan menggunakan *PBSA* sebanyak 20 mL, kemudian sedot kembali dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang telah terisi dengan *collagenase*.
- i. Larutan yang telah mengandung sel endotel tersebut disentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit.
- j. Tuangkan *supernatant*, sedangkan *pellet* yang ada diresuspensi dengan medium kultur sebanyak 4 mL.
- k. Transfer larutan tersebut pada flask  $25\text{ cm}^2$  yang sebelumnya ditambahkan 0,2% gelatin dan dibilas

dengan *serum free*, kemudian dimasukkan ke dalam inkubator.

- l. Pada hari berikutnya medium diambil dan dicuci dengan menggunakan *serum free*, kemudian kembali diisi dengan medium kultur sebanyak 4 mL.
- m. Setiap 2 hari sekali setengah dari medium diambil dan diganti dengan yang baru. Sel endotel akan berbenuk sebagai monolayer kira-kira pada hari ke-3 atau ke-5.

### **K. Pembuatan Larutan *Trypsin***

1. Larutkan 2,5 g trypsin dalam 100 ml *PBSA*.
2. Sterilisasi dengan filtrasi melalui filter 0,22  $\mu\text{m}$ .
3. Simpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **L. Pembuatan Larutan *EDTA***

1. Larutkan 500 mg *EDTA* dalam 50 mL *deionized water*.
2. Sterilisasi dengan filtrasi melalui filter 0,22  $\mu\text{m}$ .
3. Simpan pada suhu ruang.

### **M. Pembuatan *Trypsin-EDTA***

1. Tambahkan 1 mL L-trypsin dan 0,5 mL larutan EDTA pada 25 mL *PBSA*.
2. Simpan pada suhu  $4^{\circ}\text{C}/6$  mo.

### **N. Pembuatan *ECGF-heparin***

1. Larutkan 8 mg *ECGF* dan 36 mg heparin dalam 8 mL medium *serum free*.
2. Sterilisasi dengan filtrasi melalui filter 0,22  $\mu\text{m}$ .

## **O. Pembuatan *Growth Factor Containng Medium***

1. Tambahkan 4 mL ECGF-heparin pada 200 mL *serum-containing culture medium*.
2. Simpan pada suhu 4°C.

## **P. Pembuatan Sub-kultur Sel Endotel Umbilikus**

Apabila sel endotel monolayer akan disub-kultur, maka tahapan kerjanya adalah sebagai berikut:

1. Medium di dalam flask 25 cm<sup>2</sup> yang berisi sel endotel monolayer kemudian dicuci dengan medium *serum free* sebanyak dua kali.
2. Masukkan larutan *EDTA* (0.02%) 10 tetes melalui filter ke dalam flask dan ratakan sampai seluruh bagian flask basah, sampai 1 menit. Kemudian sedot dengan spuit dengan posisi lubang jarum ke bawah.
3. Tambahkan larutan *Trypsin-EDTA* sebanyak 20 tetes melalui filter, kemudian diratakan dan masukkan ke dalam inkubator selama 7 sampai 8 menit.
4. Dilihat di bawah mikroskop, apabila sudah melayang, segera ditambahkan media yang mengandung *FBS* sebanyak 35 sampai dengan 40 tetes melalui filter (dua kali penambahan *Trypsin-EDTA*).
5. Dilakukan pipetting dengan menggunakan *disposable pipet* 5 mL, kemudian masukkan ke dalam tabung *sentrifuge* dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit.
6. Buang supernatannya, kemudian ditambahkan media kultur sebanyak 6 mL (untuk 1 tabung *sentrifuge*) melalui filter dan dilakukan pipeng agar selnya terpisah.

7. Teteskan pada flask 25 cm<sup>2</sup> yang sebelumnya terlebih dahulu ditetesi dengan gelatin 0,2% dan dicuci dengan *serum free* sebanyak dua kali 6 sampai 7 tetes melalui filter. Untuk satu tabung *sentrifuge* dibagi menjadi dua flask 25 cm<sup>2</sup>.
8. Masukkan ke dalam inkubator, dimana sebelumnya dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran  $2 \times 10^5$ .

\*\*\*\*\*

## BAB 9

# KADAR GLUKOSA DAN PENENTUAN EFEK *NITRIC OXIDE* SECARA *BIOASSAY*

### A. Kadar Glukosa Tinggi

Kultur primer sel endotel dalam flask 25 cm<sup>2</sup> yang sudah dalam keadaan monolayer diberikan perlakuan dengan paparan kadar glukosa tinggi (*high glucose*). Untuk melihat pengaruh konsentrasi kadar glukosa tinggi, maka dipergunakan kadar glukosa konsentrasi 22 mM dan 22 mM yang dilakukan secara akut dengan periode inkubasi paparan selama 3 hari. Sebagai upaya untuk menambah informasi, maka dalam hal ini dilakukan eksperimen pelengkap untuk melihat pengaruh lamanya waktu untuk kadar glukosa 22 mM saja. Selanjutnya untuk mengetahui sintesa *nitric oxide*, maka dilakukan dengan teknik *bioassay* menggunakan jaringan aorta marmut terpisah dan induksi neurohumoral adenosin diphosphate dengan konsentrasi 10<sup>-8</sup> M.

### B. Preparasi Aorta Marmut

Pembuluh darah yang digunakan dalam kajian ini adalah *aorta descendens* marmot yang terletak pada *cavum thoracis* sehingga disebut *aorta thoracalis*.

Adapun cara preparasi untuk memperoleh *aorta thoracalis* pada marmut adalah sebagai berikut:

1. Marmut dimatikan dengan cara didislokasi tulang lehernya, kemudian arteri carotis dipotong.

2. Dinding toraks dibuka cukup lebar untuk memudahkan mencari aorta yang terletak dekat jantung.
3. Aorta dipisahkan dari jaringan ikat sekitarnya dan diambil sampai ke bagian distal (kira-kira 5-7 cm), kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi laturan Krebs's dan telah diaerasi dengan karbogen (95% O<sub>2</sub> dan 5% CO<sub>2</sub>).
4. *Aorta thoracalis* dipotong dengan arah bentukan spiral, sehingga diperoleh lembaran aorta dengan lebar 2-2,5 mm, sepanjang 1 cm. Selanjutnya dilakukan *rubbed endothelial* menggunakan kapas dengan tujuan untuk menghilangkan sel endotel pada bagian intima.
5. Lembaran potongan aorta spiral tersebut diikat dengan benang pada masing-masing ujungnya, kemudian dimasukkan ke dalam *organ bath* dengan volume Krebs's 5 mL yang juga diaerasi dengan karbogen (95% O<sub>2</sub> dan 5% CO<sub>2</sub>) dan suhu 37°C.
6. Ujung yang di bawah fiksasi dengan cara dikaitkan pada kawat, sedangkan benang ujung atas dihubungkan dengan *isotonic transducer* "Ugo Bastle" dengan beban seberat 2 gram. Transducer ini dihubungkan dengan recorder (*Mc Lab. Computer*).
7. Di dalam *organ bath* jaringan dibiarkan untuk equilibrasi selama itu di *wash out* dengan Krebs's yang baru setiap 15 menit.
8. Setelah 60 menit equilibrasi, jaringan diprekontraksi dengan *phenylephrine* konsentrasi 10<sup>-6</sup> M untuk mengetahui respon awalnya.

9. Untuk memastikan bahwa sel endotel telah hilang, maka tidak akan terjadi respon relaksasi setelah pemberian/pengujian dengan menggunakan asetilkolin  $10^{-6}$  M.
10. Membuat *dose-response curve* antara konsentrasi isosorbide dinitrate ( $C_6H_{12}N_2O_8$ ) secara bertingkat ( $10^{-9}$  M,  $3 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $3 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $3 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M) dengan respon penurunan kontraksi aorta marmut terpisah yang sebelumnya dikontraksikan dengan *phenylephrine*  $10^{-6}$  M.
11. Mengkuantifikasikan respon kontraksi oleh *phenylephrine*  $10^{-6}$  M dan relaksasi yang ditimbulkan oleh kultur sel endotel umbilikus kondisi normal maupun dengan perlakuan kadar glukosa tinggi setelah diinduksi dengan *adenosine diphosphate*.
12. Besarnya respon kontraksi dengan relaksasi dibandingkan terhadap *dose-response curve* melalui persamaan regresi linear, sehingga didapatkan kadar *nitric oxide* yang sebanding dengan *nitric oxide* pada isosorbide dinitrate konsentrasi tertentu.

### C. Pengukuran Sintesa *Nitric Oxide*

Untuk mengetahui sintesa *nitric oxide* pada kultur sel endotel umbilikus, maka dapat ditempuh melalui prosedur percobaan berikut ini:

1. Kultur sel endotel umbilikus yang telah dalam keadaan monolayer di dalam flask  $25 \text{ cm}^2$ , dicuci dua kali dengan menggunakan medium *serum free* dengan volume setiap pencucian masing-masing adalah 2 mL.

2. Kultur sel endotel umbilikus yang telah dicuci dengan medium *serum free* ditambahkan larutan Krebs's dengan volume 400 mL sebagai larutan fisiologis, kemudian digoyang untuk sebaran yang merata.
3. Ditambahkan dengan 10 $\mu$ L *super oxide dismutase (SOD)* konsentrasi 15 units/mL.
4. Diinduksi dengan neurohumoral adenosin diphosphate (ADP) 10<sup>-8</sup> M /9dalam pelarut Krebs's) dengan volume 600  $\mu$ L untuk mencapai volume akhir 1 mL.
5. Digoyang dan diratakan, kemudian diinkubasi selama 3 menit.
6. Larutan dipipeting dengan pipet volum, kemudian diteteskan secara perlahan ke dalam jaringan aorta marmut terpisah yang sebelumnya dikontraksikan dengan *phenylephrine* 10<sup>-6</sup> M, selanjutnya dicatat responnya.
7. Setelah pipetting larutan dari flask kultur sel endotel, maka kultur sel segera diberikan penambahan medium *serum free* sebanyak 2 mL, kemudian dikembalikan untuk inkubasi selama 25 menit. Selanjutnya langkah percobaan ini diulangi sebanyak 3 kali ulangan.

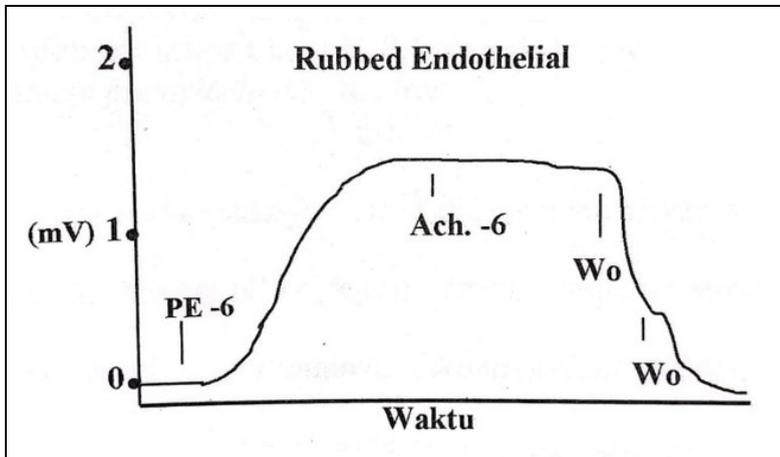
\*\*\*\*\*

## BAB 10

### IMPLEMENTASI *BIOASSAY NITRIC OXIDE* *KULTUR SEL ENDOTEL*

#### A. Hasil Riset

Hilangnya kemampuan respon relaksasi aorta marmut terhadap asetilkolin setelah sel endotel dipermukaan intima dihilangkan (*rubbed endothelial*) tampak pada gambar 7 berikut ini:

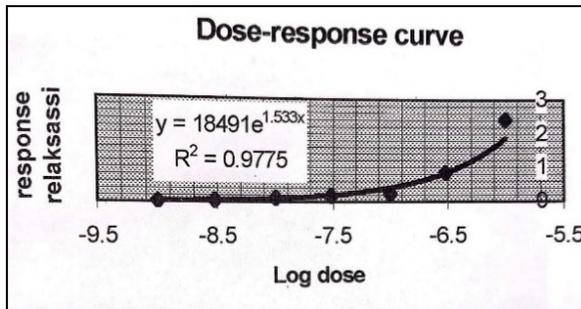


Gambar 13

Hilangnya respon relaksasi aorta marmut tanpa endotel terhadap asetilkolin  $10^{-6}$  M yang diprekontraksikan dengan phenylephrine  $10^{-6}$  M.

Untuk mengetahui dan mengkuantifikasi sintesa *nitric oxide* pada kultur sel endotel umbilikus kondisi normal maupun kultur sel endotel yang diperlakukan dengan

paparan berbagai kadar glukosa tinggi (konsentrasi 22 mM dan 33 mM), maka dilakukan percobaan pendahuluan untuk memperoleh *dose-response curve* antara isosorbide dinitrat dengan *phenylephrine*  $10^{-6}$  M. Salah satu contoh dari pembuatan *dose-response curve* yang digunakan dalam kajian ini dapat dilihat seperti pada gambar berikut ini:



Gambar 14

Dose-response curve antara konsentrasi isosorbid dinitrat dengan respon penurunan kontraksi yang sebelumnya telah dikontraksikan dengan *phenylephrine*  $10^{-6}$  M

*Dose-response curve* pada gambar di atas menyatakan hubungan antara konsentrasi isosorbid dinitrate ( $C_6H_{12}N_2O_8$ ) dengan respon penurunan kontraksi aorta marmut terpisah yang sebelumnya dikontraksikan dengan *phenylephrine*  $10^{-6}$  M. Sedangkan respon kontraksi aorta marmut terpisah yang dimaksudkan di sini adalah selisih antara peningkatan kontraksi oleh *phenylephrine*  $10^{-6}$  M terhadap besarnya relaksasi yang ditimbulkan dengan penambahan suatu konsentrasi [M] isosorbid dinitrate tertentu secara bertingkat, yang dalam eksperimen ini

dipergunakan  $10^{-9}$  M,  $3 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $3 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $3 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M.

Adapun contoh cara pengukuran sintesa *nitric oxide* pada kultur sel endotel dalam kondisi normal maupun kultur sel endotel yang diperlakukan dengan paparan kadar glukosa tinggi, adalah sebagai berikut:

### 1. Kultur Sel Endotel Kondisi Normal



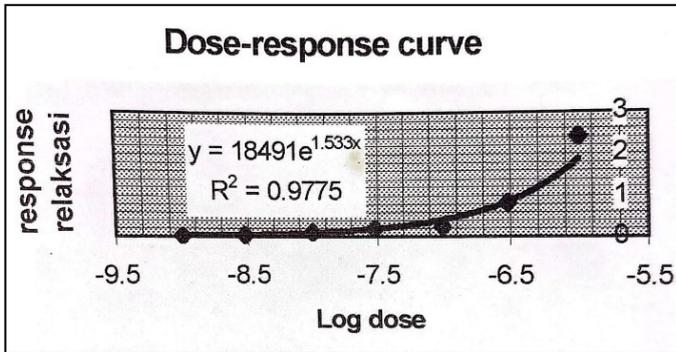
Gambar 11

Kultur Sel Endotel Normal (Perbesaran : 400)

Kultur sel endotel dalam kondisi normal menunjukkan ciri-ciri antara lain: bentuk sel *cobble stone* dengan spesifitas sel pada bagian tengah tampak bulat dan jelas. Bentuk sel pipih, jarak antar sel teratur dan permukaan sel *smooth* ditandai oleh kejelasan inti sel, membrane plasma, sitoplasma dan *extra cellular matrix (ECM)*. Dijelaskan Ren et al. (2019) bahwa terdapat hubungan antara bentuk yang dalam hal ini adalah struktur sel dan fungsi, artinya setiap perubahan ke arah perbedaan struktur dapat diterjemahkan sebagai

perubahan sifat dan fungsi sel. Hal ini berkaitan dengan struktur dan fungsi sel endotel normal.

Sintesa *nitric oxide* dari kultur sel endotel dalam kondisi ormal dapat diukur dengan *dose-response curve* pada gambar di bawah ini:



Gambar 12

*Dose-response Curve* untuk Kultur Sel Endotel Normal

Dari *dose-response curve* di atas dapat diperoleh suatu persamaan regresi  $Y=18491.e^{1.5330X}$ . Sedangkan salah satu selisih antara peningkatan kontraksi oleh *phenylephrine*  $10^{-6}$  M dengan besarnya relaksasi yang ditimbulkan kultur sel endotel kondisi normal, adalah **0,630 mV**. Dengan demikian maka kuantifikasi sintesa *nitric oxide* yang dapat diukur adalah sebagai berikut:

$$Y=18491.e^{1.5330X}$$

$$e^{1.5330X} = Y/18491$$

$$1.5330X = \ln Y/18491$$

$$1.5330X = \ln Y/18491 \sim 1.5330X = \ln 0.630/18491$$

$$X = -10.2871/1.5330 \sim X = -6.7104$$

Besarnya sintesa *nitric oxide* pada kultur sel endotel normal adalah invers Log -6.7104 yaitu  $1,95 \times 10^{-7}$  M.

## 2. Kultur Sel Endotel Kondisi Kadar Glukosa 22 mM selama 3 hari



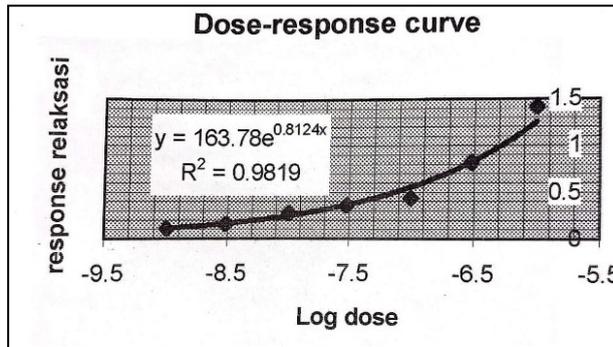
Gambar 13

Sel Endotel Kondisi Glukosa 22 mM selama 3 hari.  
(Pembesaran : 400)

Pada kultur sel endotel kondisi kadar glukosa 22 mM selama 3 hari menunjukkan adanya *extra cellular matrix (ECM)* dan sitoplasmanya yang jelas, permukaan sel mulai kurang rata, sitoskeleton nampak memendek dan sel menjadi memadat dan rapat. Disamping itu juga tampak terjadi beberapa membrane *blebbing* dan *shrinkage*. Sepintas terlihat tidak jauh berbeda dengan kultur sel endotel kondisi normal.

Sintesa *nitric oxide* dari kultur sel endotel dalam kondisi kadar glukosa tinggi (22mM) selama 3 hari dapat

diukur dengan *dose-response curve* pada gambar 12 berikut:



Gambar 14

Dose-response curve untuk kultur sel endotel dengan glukosa 22 mM selama 3 hari

Dari *dose-response curve* di atas dapat diperoleh suatu persamaan regresi samaan regresi  $Y = 163.78.e^{0.8124X}$ . Sedangkan salah satu selisih antara peningkatan kontraksi oleh *phenylephrine*  $10^{-6}$  M dengan besarnya relaksasi yang ditimbulkan oleh kultur sel endotel kondisi kadar glukosa tinggi (22 mM) selama 3 hari, adalah **0.820 mV**. Dengan demikian, maka kuantifikasi sintesa *nitric oxide* yang dapat diukur adalah sebagai berikut:

$$Y = 163.78.e^{0.8124X}$$

$$e^{0.8124X} = Y/163.78$$

$$0.8124X = \ln Y/163.78$$

$$0.8124X = \ln Y/163.78 \sim 0.8124X = \ln 0.820/163.78$$

$$X = -5.2970/0.8124 \sim X = -6.5202$$

Besarnya sintesa *nitric oxide* pada kultur sel endotel dengan kadar glukosa tinggi (22 mM) selama 3 hari adalah invers Log -6.5202, yaitu  $3.01 \times 10^{-7}$  M.

### 3. Kultur Sel Endotel Kondisi Kadar Glukosa 33 mM selama 3 hari

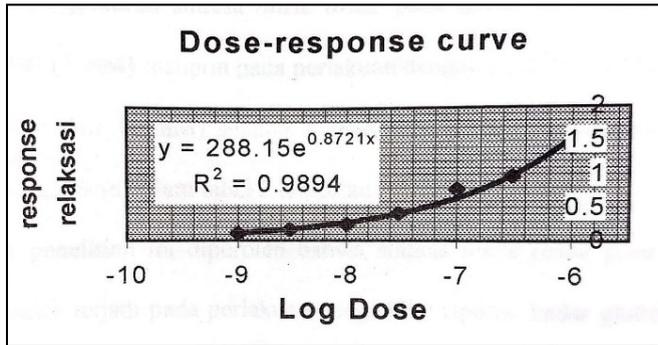


Gambar 15

Sel Endotel Kondisi Glukosa 33 mM selama 3 hari.  
(Perbesaran : 400)

Pada kultur sel endotel dalam kondisi kadar glukosa 33 mM selama 3 hari tampak ditandai dengan adanya kerusakan pada struktur membran plasma yang diawali dengan membrane *blebbing* yang semakin banyak, peningkatan *shrinkage* dan permukaan sel yang menjadi semakin besar (tidak rata). Disamping itu juga terjadi pemendekan sitoskeleton dan kerusakan pada *extra cellular matrix (ECM)* sehingga nampak menjadi sangat kasar.

Sintesa *nitric oxide* dari kultur sel dalam kondisi kadar glukosa tinggi (33 mM) selama 3 hari dapat diukur dengan *dose-response curve* pada gambar 14 berikut ini:



Gambar 6

Dose-Response Curve Untuk Kultur Sel Endotel Dengan Glukosa 33 Mm Selama 3 Hari

Dari *dose-response curve* di atas dapat diperoleh suatu persamaan regresi samaan regresi  $Y = 288.15.e^{0.8721X}$ . Sedangkan salah satu selisih antara peningkatan kontraksi oleh *phenylephrine*  $10^{-6}$  M dengan besarnya relaksasi yang ditimbulkan oleh kultur sel endotel kondisi kadar glukosa tinggi (33 mM) selama 3 hari, adalah **0.245 mV**. Dengan demikian, maka kuantifikasi sintesa *nitric oxide* yang dapat diukur adalah sebagai berikut:

$$Y = 288.15.e^{0.8721X}$$

$$e^{0.8721X} = Y/288.15$$

$$0.8721X = \ln Y/288.15$$

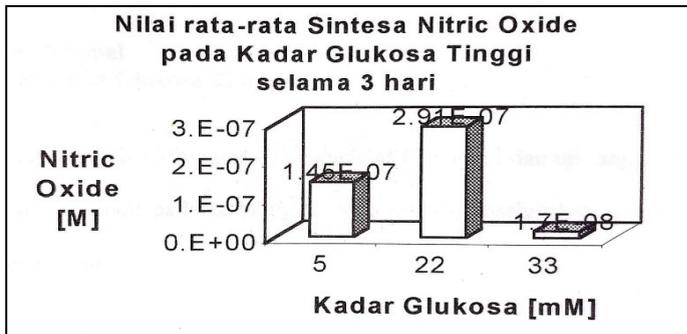
$$0.8721X = \ln Y/288.15 \sim 0.8721X = \ln 0.245/288.15$$

$$X = -7.0700/0.8721 \sim X = -8.1068$$

Besarnya sintesa *nitric oxide* pada kultur sel endotel dengan kadar glukosa tinggi (33 mM) selama 3 hari adalah invers Log -8.1068, yaitu  $0,08 \times 10^{-7}$  M.

Hasil pengukuran sintesa *nitric oxide* pada kultur sel endotel baik pada kondisi normal (5 mM) maupun pada perlakuan dengan pemaparan kadar glukosa itinggi (22 mM dan 33 mM) selama 3 hari (akut), dan 22 mM selama 9 hari (kronis), dicantumkan dalam tabel 2 lampiran 1.

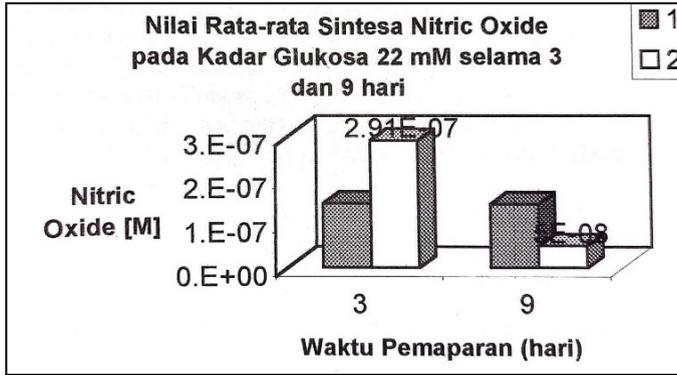
Pada kajian ini diperoleh bahwa sintesa nitric oxide pada kultur sel endotel terendah terjadi pada perlakuan dengan pemaparan kadar glukosa 33 mM dengan nilai rata-rata  $0,17 \times 10^{-7} \pm 0,09 \times 10^{-7}$  dan tertinggi pada perlakuan dengan pemaparan kadar glukosa 22 mM selama 3 hari, dengan nilai rata-rata  $2,91 \times 10^{-7} \pm 0,20 \times 10^{-7}$ . Sedangkan nilai rata-rata sintesa *nitric oxide* pada kondisi normal adalah  $1,45 \times 10^{-7} \pm 0,30 \times 10^{-7}$  (gambar 15)



Gambar 7

Grafik nilai rata-rata sintesa nitric oxide pada kultur sel endotel kondisi normal dan perlakuan dengan pemaparan kadar glukosa tinggi selama 3 hari.

Hasil pengukuran sintesa *nitrix oxide* pada kultur sel endotel yang diperlakukan dengan kadar glukosa 22 mM selama 9 hari (kronis), diperoleh dengan nilai rata-rata  $0.50 \times 10^{-7} \pm 0.10 \times 10^{-7}$  (gambar 16)



Gambar 8

Grafik nilai rata-rata sintesa nitric oxide pada kultur sel endotel kondisi normal dan perlakuan dengan pemaparan kadar glukosa 22 mM selama 3 dan 9 hari.

Keterangan:

1. Kondisi Normal
2. Kondisi Kadar Glukosa 22 mM

Hasil analisis sidik ragam (*Analysis of Variance*) dan uji lanjut dengan Uji Beda Nyata Terkecil pada taraf nyata 5%, secara keseluruhan tercantum pada tabel 1 berikut ini:

Tabel 2  
 Analisis Sidik Ragam dan Uji Beda Nyata Terkecil pada  
 Taraf Nyata 5%.

Perlakuan*	Rata-rata**	Notasi ***	Nilai BNT 5%
G333	$0.17 \times 10^{-7} \pm 0.09$ $\times 10^{-7}$	a	$0,59 \times 10^{-7}$
G229	$0.50 \times 10^{-7} \pm 0.10$ $\times 10^{-7}$	b	$0,59 \times 10^{-7}$
N000	$1.45 \times 10^{-7} \pm$ $0.30 \times 10^{-7}$	c	$0,59 \times 10^{-7}$
G223	$2.91 \times 10^{-7} \pm 0.20$ $\times 10^{-7}$	d	$0,69 \times 10^{-7}$

Keterangan:

\* : Kode Perlakuan

G333 : Pemaparan Kadar Glukosa 33 mM selama 3 hari

G229 : Pemaparan Kadar Glukosa 22 mM selama 9 hari

N000 : Perlakuan Kadar Glukosa Normal (5 mM)

G223 : Pemaparan Kadar Glukosa 22 mM selama 3 hari

\*\* : Sintesa *nitric oxide* yang telah dikuantifikasi berdasarkan kurva baku

\*\*\* : Setiap notasi yang berbeda menunjukkan bahwa setiap perlakuan berbeda nyata pada taraf nyata 5%.

## B. Indikasi Hasil Kajian

Teknik *bioassay* merupakan suatu cara pengukuran bahan kimiawi yang dapat mempengaruhi elemen biologis. Oleh karena konsentrasi bahan yang diukur sangat kecil,

maka teknik pengukuran dilakukan secara tidak langsung dengan mengamati respon yang ditimbulkan terhadap jaringan ataupun organ tertentu yang diisolasi. Jaringan maupun organ yang umum digunakan dapat berupa ileum, colon, vas deferens, arteri, trachea ataupun aorta yang berasal dari kelinci, tikus maupun marmut (Patra, dkk., 2019).

Kajian ini dilakukan dengan teknik *bioassay* menggunakan organ aorta marmut terisolasi. Adapun keuntungan eksperimen dengan organ terisolasi ini adalah tidak dipengaruhi oleh faktor farmakokinetik (absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi) dan bahan atau obat yang digunakan relatif lebih rendah dosisnya dibandingkan percobaan dengan binatang utuh. Semula kajian ini direncanakan menggunakan organ arteri tikus terisolasi, namun karena kesulitan pada proses canulasi dalam preparasi arteri, gangguan pada *perfusi pump* dan kerusakan transduser spesifik untuk arteri terisolasi, maka penggunaan aorta marmut menjadi alternatif pilihan dengan pertimbangan bahwa tingkat sensitifitasnya cukup tinggi (relatif hampir sama dengan arteri), memudahkan dalam preparasi (ukurannya relatif lebih besar) murah serta mudah diperoleh di laboratorium.

Pemberian *phenylephrine*  $10^{-6}$  M pada aorta marmut yang telah dihilangkan enoteliumnya mengakibatkan terjadinya kontraksi sel otot polos. Kontraksi otot polos aorta oleh rangsangan *phenylephrine* dapat dijelaskan melalui mekanisme berikut ini:

*Phenylephrine* merupakan neurohumoral yang dapat merangsang reseptor  $\alpha$ -1 yang sangat kuat dan sangat selektif. Ikatan *phenylephrine* dengan reseptor  $\alpha$ -1 pada sel otot polos akan membuka kanal ion-Ca sehingga ion-Ca masuk ke intraseluler. Pada sisi lain ikatan ini akan mengaktifkan *G-protein* yang ada pada membrane sel. Aktivasi *G-protein* akan menyebabkan aktivitas enzim fosfolipase C dengan menghidrolisis *guanosine triphosphate (GTP)* menjadi *guanosine diphosphate (GDP)*. Aktivitas enzim fosfolipase C akan mengakibatkan pembentukan *diacylglycerol (DAG)* dan inositol triphosphate ( $IP_3$ ) dari phosphatidil inositol diphosphate ( $PIP_2$ ). Keberadaan  $IP_3$  akan memicu pelepasan ion-Ca dari retikulum sarkoplasma (sebagai depot ion-Ca) sehingga konsentrasi ion-Ca sitosol meningkat. Peningkatan konsentrasi ion-Ca di sitosol akan mengakibatkan diaktifkannya protein kinase C dan selanjutnya akan memicu respon seluler berupa kontraksi akibat aktifnya protein kontraktile di dalam sel. Hal ini didasarkan pada teori tentang kontraktilitas sel otot polos oleh (Xu et al., 2018).

Hilangnya kemampuan respon relaksasi aorta marmut terhadap asetilkolin  $10^{-6}$  M setelah sel endotel yang ada di permukaan intima dihilangkan (gambar 7) terjadi karena tidak ada sintesa dan *release endothelium derived relaxing factor* yang dapat dilakukan oleh sel endotel. Sebagaimana diketahui bahwa sel endotel juga berperan dalam mensintesa bahan vasoaktif yang salah satu diantaranya adalah molekul *nitric oxide* yang berfungsi dalam mengatur dilatasi pembuluh darah. Dengan demikian otot polos aorta marmut

yang endotelnya dihilangkan (*rubbed endothelial*) tidak mempunyai kemampuan relaksasi terhadap rangsangan neurohumoral asetilkolin. Hal ini diperkuat dengan hasil kajian Matsumoto et al. (2019) yang menemukan bahwa terjadi kehilangan respon relaksasi pada aorta kelinci yang dihilangkan endotelnya setelah dirangsang dengan asetilkolin. Kenyataan ini membuktikan bahwa sel endotel memang berperan di dalam kontrol lokal tonus vasomotor pembuluh darah, disamping sistem makro yang dilakukan oleh saraf simpatis dan hormonal, dengan mensintesa dan *release endothelium-derived relaxing factor* yang berfungsi sebagai vasodilator (Matsumoto et al., 2019).

Berdasarkan Analisa statistic dengan menggunakan analisis sidik ragam (*Analysis of Variance*) dan uji lanjut dengan Uji Beda Nyata Terkecil pada taraf nyata 5% (lampiran 1), didapatkan bahwa kondisi kadar glukosa tinggi pada kultur sel endotel yang diperlakukan dengan pemaparan glukosa konsentrasi tinggi, baik secara akut maupun kronis ternyata menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap sintesa *nitric oxide* dengan  $p < 0,05$ . Hal ini membuktikan bahwa ada keterkaitan antara tingginya kadar glukosa dengan kemampuan sintesa *nitric oxide* pada *human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) culture*.

Dalam kondisi ormal, apabila sel endotel distimulasi oleh *neurotransmitter* atau hormone tertentu maupun zat-zat tertentu yang diproduksi platelet dan sistem koagulasi, maka akan menimbulkan relaksasi otot polos pembuluh darah. Adapun yang bertindak sebagai mediator dalam merespon rangsangan tersebut adalah suatu molekul anorganik

sederhana yang mudah berdifusi dengan waktu paruh hanya beberapa detik yang tidak lain adalah *endothelium-derived relaxing factor*, dan kemudian diidentifikasi sebagai *free radical nitric oxide* (McCarron et al., 2019).

Pada kajian ini kultur sel endotel kondisi normal distimulasi dengan menggunakan neurohumoral adenosin diphosphate (ADP) untuk mengetahui sintesa *nitric oxide* yang secara teknik *bioassay* dapat merelaksasikan aorta marmut terpisah. Sintesa *nitric oxide* yang diperoleh dapat dilihat seperti pada gambar 10. Penggunaan adenosin diphosphate untuk menginduksi sintesa *nitric oxide* dari *HUVECs* didasarkan pada pertimbangan ketersediaan di laboratorium serta relatif murah dan mudah diperoleh. Di samping itu kemampuan untuk merangsang sintesis *nitric oxide* dengan kandungan substansi p-nya juga relatif tidak berbeda dengan mediator neurohumoral lainnya.

Keterlibatan kultur sel endotel kondisi normal pada relaksasi aorta marmut terpisah dapat diketahui melalui mekanisme fisiologis sebagai berikut: Pada saat kultur sel endotel umbilikus normal distimulasi dengan ADP, maka terjadi rangsangan yang mengaktifkan reseptor P2 yang spesifik terhadap ADP. Keadaan ini akan menyebabkan terbukanya kanal ion-Ca yang diikuti dengan masuknya ion-Ca ke dalam sitoplasma sel endotel, sehingga terjadi peningkatan ion-Ca intraseluler. Hal ini kemudian akan menimbulkan interaksi ion-Ca dengan *calmodulin* yang akan merangsang aktivitas enzim *endothelial-nitric oxide synthase (e-NOS)* sebagai katalisator dalam reaksi pembentukan *nitric oxide*. *Nitric oxide* ini dibentuk dari

oksidasi atom *guanidine* terminal dari *L-arginine*. Dalam reaksi pembentukan *nitric oxide* dibutuhkan oksigen ( $O_2$ ) dan *NADPH* sebagai ko-substrat. Selanjutnya *nitric oxide* yang dilepas sangat mudah menembus masuk ke dalam membrane otot polos pembuluh darah (dalam kajian ini adalah aorta) dan bekerjanya tanpa membutuhkan reseptor melainkan melalui kecepatan *release* dan sintesanya. Untuk memperpanjang waktu paruh *nitric oxide* telah dipergunakan *super oxide dismutase* (Rubanyi and Vanhoutte, 1994). *Super oxide dismutase* bekerja dengan cara mereduksi superoksida menjadi hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Hidrogen peroksida yang terbentuk akan di-scavenger dan diuraikan menjadi molekul air dan oksigen oleh aktivitas secara sinergis antara *gluthathion peroxidase* dengan katalase (Widodo, 1996). Keberadaan *nitric oxide* di dalam otot polos akan merangsang aktivitas pembentukan *cyclic-Guanosine Mono Phosphat (c-GMP)* dari *Guanosine Tri Phosphat (GTP)* yang akan diikuti dengan menurunnya ion-Ca. Penurunan konsentrasi ion-Ca intraseluler otot polos akan menghambat protein kontraktile melalui hambatan terhadap enzim protein kinase-C dan keadaan ini selanjutnya mengakibatkan relaksasi otot polos pembuluh darah aorta (Lee, dkk, 2018).

Dalam kondisi kadar glukosa normal, kultur sel endotel memperlihatkan bentuk sel *cable stone* dengan membrane sel yang nampak nyata, *smooth* dan teratur, yang menunjukkan bahwa belum terjadi kerusakan struktur maupun fungsinya secara fisiologis.

Pada kondisi kadar glukosa tinggi yang memicu proses stres oksidatif melalui jalur reaksi glukosa autooksidasi, *sorbitol-myoinositol* dan glikasi non-enzimatik, ternyata memberikan pengaruh nyata terhadap sintesa dan *release nitric oxide* pada kultur sel endotel vena umbilikalis manusia. Hal ini nampak pada perlakuan dengan pemaparan glukosa konsentrasi 33mM selama 3hari dan 22mM selama 9 hari. Menurunnya sintesa *nitric oxide* diduga dapat terjadi melalui mekanisme sebagai berikut:

Proses stres oksidatif yang dipicu oleh meningkatnya generasi radikal bebas pada keadaan kadar glukosa tinggi, khususnya melalui *polyol-pathway* dan glukosa autooksidasi, diduga menyebabkan rusaknya molekul reseptor membrane sel endotel yang tidak lain merupakan molekul protein. Hal ini tampak pada kultur sel endotel dengan kondisi kadar glukosa 33 mM selama 3 hari, yang menunjukkan bahwa terjadi kerusakan struktur membrane sel berupa peningkatan membrane *blebbing* dan *shrinkage* pada sel. Keadaan ini akan mengakibatkan berubahnya struktur konformasi reseptor  $P_2$  yang spesifik terhadap adenosin diphosphate. Berubahnya struktur konformasi reseptor ini menyebabkan tidak dikenalnya molekul adenosin diphosphate, sehingga tidak terjadi ikatan antara ligan dengan reseptornya. Selanjutnya kanal ion-Ca yang semestinya membuka akibat ikatan ADP- $P_2$  tidak terjadi sehingga *signalling* sebagai *second messenger* pada sel endotel tidak dapat berlangsung. Dan untuk selanjutnya reseptor seluler yang menyebabkan sintesa *nitric oxide* melalui rangsangan terhadap enzim *endothelium- nitric oxide synthase* tidak dapat terjadi. Hal

ini didukung oleh Valko, Jomova, Rhodes, Kuča, and Musílek (2016) yang menyatakan bahwa radikal bebas dapat merusak struktur konformasi dan fungsi reseptor yang ada di permukaan sel endotel. Perubahan fungsi reseptor ini mengakibatkan gangguan kontraktilitas pembuluh darah disamping penebalan otot polos seperti pada aterosklerosis. Namun dari data yang diperoleh ternyata sintesa *nitric oxide* masih dapat berlangsung, tetapi mengalami penurunan. Hal ini diduga bahwa pada pemaparan dengan glukosa 33 mM selama 3 hari maupun 22 mM selama 9 hari, belum seluruh reseptor yang spesifik terhadap adenosin diphosphate yang ada di permukaan sel mengalami propagasi oleh aktivitas radikal bebas dan mungkin pada batas ini peran dari antioksidan vitamin maupun antioksidan enzimatis masih memungkinkan. Kenyataan ini diperkuat oleh pendapat Aicardo, Mastrogiovanni, Cassina, and Radi (2018) yang menyatakan bahwa jenis *chain breaking antioxidant (CBA)* dapat menghambat reaksi lanjutan (propagasi) terhadap radikal bebas dengan membentuk senyawa yang relatif lebih stabil. Di sisi lain proses stres oksidatif yang meningkatkan generasi radikal bebas dan menurunnya kemampuan antioksidan dapat mengakibatkan terjadinya deaktivasi *nitric oxide* oleh radikal superoksida. Interaksi antara *nitric oxide* dengan radikal superoksida membentuk peroksinitrit yang ada pada konsentrasi rendah masih menyebabkan sintesa *nitric oxide*, tetapi pada konsentrasi tinggi merupakan oksida yang sangat potensial (Aicardo et al., 2018).

Mekanisme lain yang memungkinkan juga adalah terjadinya peningkatan jalur reaksi *sorbitol-myoinositol*, dimana tingginya kadar glukosa akan segera diubah menjadi sorbitol dengan bantuan aktivitas enzim aldose reductase dan membutuhkan *NADPH* yang akan diubah menjadi *NADP*. Menurunnya rasio antara *NADPH* dengan *NADP* akibat meningkatnya jalur reaksi ini akan mempengaruhi aktivitas enzim *endothelium- nitric oxide synthase* (Jamwal & Sharma, 2018). Sebagaimana telah diketahui bahwa dalam reaksi pembentukan *nitric oxide* melalui oksidasi *L-arginine*, dibutuhkan juga keberadaan *NADPH* disamping molekul oksigen. Dengan demikian menurunnya rasio antara *NADPH* dengan *NADP* akan mengganggu efektivitas dan aktivitas enzim *endothelium- nitric oxide synthase*, sehingga mengakibatkan penurunan sintesa *nitric oxide*.

Dari data didapatkan bahwa sintesa *nitric oxide* pada perlakuan dengan pemaparan kadar glukosa 33 mM selama 3 hari, ternyata secara bermakna lebih rendah bila dibandingkan dengan pemaparan dengan kadar glukosa 22 mM selama 9 hari. Hal ini diduga terjadi karena kadar glukosa yang lebih tinggi akan memungkinkan berlangsungnya reaksi autooksidasi glukosa yang lebih cepat dan memicu peningkatan pembentukan generasi radikal bebas yang lebih cepat pula, sehingga akan mendeaktivasi *nitric oxide* maupun secara langsung menghambat aktivitas *endothelial- nitric oxide synthase*. Sedangkan waktu pemaparan yang lebih lama dengan kadar glukosa yang lebih rendah (dalam hal ini 22 mM dibandingkan dengan 33 mM) hanya memungkinkan

pembentukan generasi radikal bebas yang relatif lebih rendah pula. Di lain pihak mengingat pembentukan *advanced-glycosilated end products (AGEs)* membutuhkan waktu yang relatif jauh lebih lama, maka kemungkinan peran *AGEs* dalam meredam *nitric oxide* sedikit sekali (Zhu, Cai, Long, Chen, & Mo, 2020). Hasil kajian ini didukung dengan kajian Farrell et al. (2019) yang membuktikan bahwa pemaparan dengan konsentrasi glukosa 44 mM selama 3 hari, dapat menghambat aktivitas enzim *endothelium- nitric oxide synthase* secara langsung yang nampak dari berkurangnya konversi *L-arginine* menjadi *L-citrulline* sebesar 40% sampai dengan 60%. Hal ini juga diperkuat dengan perlakuan dengan pemaparan kadar glukosa 22 mM selama 3 hari. Perlakuan pemaparan glukosa dengan kadar 22 mM pada *HUVECs* selama 3 hari ternyata justru menimbulkan peningkatan sintesa *nitric oxide* yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan keadaan glukosa normal (5 mM). Meningkatnya sintesa *nitric oxide* pada *HUVECs* yang diperlakukan dengan pemaparan kadar glukosa 22 mM selama 3 hari diduga terjadi sebagai proses kompensasi atas terjadinya deaktivasi *nitric oxide* oleh meningkatnya pembentukan generasi radikal superoksida (Farrell et al., 2019).

Berdasarkan pengamatan struktur pada kondisi kadar glukosa 22 mM selama 3 hari (gambar 11), sepintas tampak relatif tidak jauh berbeda dengan kultur sel endotel kondisi normal. Namun pada perlakuan ini terjadi pemendekan sitoskeleton, jarak antar sel semakin rapat, beberapa *shrinkage* dan sedikit membrane *blebbing*. Terbentuknya

radikal superoksida pada perlakuan ini akan dapat berinteraksi dengan *nitric oxide* membentuk peroksinitrit (*ONOO*). Pada konsentrasi rendah peroksinitrit dapat bersifat dan berfungsi seperti *nitric oxide*, sehingga tampak terjadi peningkatan sintesa *nitric oxide* akibat vasodilatasi yang ditimbulkannya (Ganzarolli de Oliveira, 2016). Di samping itu, peningkatan sintesa *nitric oxide* diduga pula sebagai akibat meningkatnya aktivitas protein kinase C. Kenyataan ini sesuai dan didukung oleh hasil kajian Consentino (1997) yang menyatakan bahwa peningkatan sintesa *nitric oxide* pada pemaparan sel endotel dengan glukosa 22,2 mM selama 5 hari terjadi akibat meningkatnya ekspresi mRNA eNOS hingga 200%.

\*\*\*\*\*



## DAFTAR PUSTAKA

- Aghadavoud, E., Nasri, H., & Amiri, M. (2017). Molecular Signaling Pathways Of Diabetic Kidney Disease; New Concepts. *Journal Of Preventive Epidemiology*, 2(2), E09-E09.
- Aicardo, A., Mastrogiovanni, M., Cassina, A., & Radi, R. (2018). Propagation Of Free-Radical Reactions In Concentrated Protein Solutions. *Free Radical Research*, 52(2), 159-170.
- Al-Suhaimi, E. A. (2022). Biological Synthesis Of Hormones In Endocrine Cell. In *Emerging Concepts In Endocrine Structure And Functions* (Pp. 25-46): Springer.
- Amalia, D., Syari, W., & Anggraini, S. (2021). Gambaran Implementasi Penatalaksanaan Penyakit Diabetes Melitus Di Puskesmas Sindang Barang Kota Bogor Tahun 2019-2020. *Promotor*, 4(2), 97-105.
- Arjita, I., Widodo, M., & Widjajanto, E. (2002). Pengaruh Kadar Glukosa Tinggi Terhadap Sintesis Nitric Oxide Dari Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Huvecs) Culture Dengan Tehnik Bioassay. *Biosain*, 2.
- Arjita, I. P. D. (2015). Distribusi Tingkat Kecemasan Penderita Diabetes Mellitus Laki-Laki Dan Perempuan. *Jurnal Kedokteran*, 1(1), 63-73.
- Arjita, I. P. D. (2022). Penurunan Sintesis Nitric Oxide Pada Kultur Huvecs Dalam Kondisi Hiperglikemia Akut. *Biomedika*, 14(1), 1-9.

- Behl, T., & Kotwani, A. (2015). Exploring The Various Aspects Of The Pathological Role Of Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) In Diabetic Retinopathy. *Pharmacological Research*, 99, 137-148.
- Bhattacharya, S. (2015). Reactive Oxygen Species And Cellular Defense System. In *Free Radicals In Human Health And Disease* (Pp. 17-29): Springer.
- Das, T. K., Wati, M. R., & Fatima-Shad, K. (2015). Oxidative Stress Gated By Fenton And Haber Weiss Reactions And Its Association With Alzheimer's Disease. *Archives Of Neuroscience*, 2(2).
- Farrell, K., Simmers, P., Mahajan, G., Boytard, L., Camardo, A., Joshi, J., . . . Kothapalli, C. R. (2019). Alterations In Phenotype And Gene Expression Of Adult Human Aneurysmal Smooth Muscle Cells By Exogenous Nitric Oxide. *Experimental Cell Research*, 384(1), 111589.
- Feiteiro, J., Verde, I., & Cairrão, E. (2016). Cyclic Guanosine Monophosphate Compartmentation In Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Cellular Signalling*, 28(3), 109-116.
- Fernando, E. H., Dicay, M., Stahl, M., Gordon, M. H., Vegso, A., Baggio, C., . . . Hirota, S. (2017). A Simple, Cost-Effective Method For Generating Murine Colonic 3d Enteroids And 2d Monolayers For Studies Of Primary Epithelial Cell Function. *American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology*, 313(5), G467-G475.
- Ganzarolli De Oliveira, M. (2016). S-Nitrosothiols As Platforms For Topical Nitric Oxide Delivery. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 119, 49-56.

- Grover, A. (2020). Role Of Cellular Organelles In Calcium-Mobilization Of Uterine Smooth Muscle. In *The Physiology And Biochemistry Of The Uterus In Pregnancy And Labor* (Pp. 93-106): Crc Press.
- Guyen, M., Barnouin, K., Snijders, A. P., & Karran, P. (2016). Photosensitized Uva-Induced Cross-Linking Between Human Dna Repair And Replication Proteins And Dna Revealed By Proteomic Analysis. *Journal Of Proteome Research*, 15(12), 4612-4623.
- Ifeanyi, O. E. (2018). A Review On Free Radicals And Antioxidants. *Int. J. Curr. Res. Med. Sci*, 4(2), 123-133.
- Jamwal, S., & Sharma, S. (2018). Vascular Endothelium Dysfunction: A Conservative Target In Metabolic Disorders. *Inflammation Research*, 67(5), 391-405.
- Jiang, J., Zheng, J.-P., Li, Y., Gan, Z., Jiang, Y., Huang, D., . . . Ke, Y. (2016). Differential Contribution Of Endothelium-Derived Relaxing Factors To Vascular Reactivity In Conduit And Resistance Arteries From Normotensive And Hypertensive Rats. *Clinical And Experimental Hypertension*, 38(4), 393-398.
- Julca, C., Rocha, P. K., Tomazoni, A., Manzo, B. F., Souza, S., & Anders, J. C. (2018). Use Of Safety Barriers In The Preparation Of Vasoactive Drugs And Sedatives/Analgesics In Pediatric Intensive Care. *Cogitare Enferm*, 23(4), E54247.
- Kalyanaraman, B., Hardy, M., Podsiadly, R., Cheng, G., & Zielonka, J. (2017). Recent Developments In Detection Of Superoxide Radical Anion And Hydrogen Peroxide: Opportunities, Challenges, And Implications In Redox Signaling. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 617, 38-47.

- Khakpour, S., Wilhelmsen, K., & Hellman, J. (2015). Vascular Endothelial Cell Toll-Like Receptor Pathways In Sepsis. *Innate Immunity*, 21(8), 827-846.
- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R.-P., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(18), 4411.
- Kuschman, H. P., Palczewski, M. B., & Thomas, D. D. (2021). Nitric Oxide And Hydrogen Sulfide: Sibling Rivalry In The Family Of Epigenetic Regulators. *Free Radical Biology And Medicine*, 170, 34-43.
- Lee, S. R., Nilius, B., & Han, J. (2018). Gaseous Signaling Molecules In Cardiovascular Function: From Mechanisms To Clinical Translation. *Reviews Of Physiology, Biochemistry And Pharmacology Vol. 174*, 81-156.
- Lim, H. Y., Lim, S. Y., Tan, C. K., Thiam, C. H., Goh, C. C., Carbajo, D., . . . Wang, X. N. (2018). Hyaluronan Receptor Lyve-1-Expressing Macrophages Maintain Arterial Tone Through Hyaluronan-Mediated Regulation Of Smooth Muscle Cell Collagen. *Immunity*, 49(2), 326-341. E327.
- Liu, Y.-C., Setiawan, M., Ang, M., Yam, G. H. F., & Mehta, J. S. (2019). Changes In Aqueous Oxidative Stress, Prostaglandins, And Cytokines: Comparisons Of Low-Energy Femtosecond Laser-Assisted Cataract Surgery Versus Conventional Phacoemulsification. *Journal Of Cataract & Refractive Surgery*, 45(2), 196-203.

- Loh, Y. C., Oo, C. W., Tew, W. Y., Wen, X., Wei, X., & Yam, M. F. (2022). The Predominance Of Endothelium-Derived Relaxing Factors And Beta-Adrenergic Receptor Pathways In Strong Vasorelaxation Induced By 4-Hydroxybenzaldehyde In The Rat Aorta. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 112905.
- Matsumoto, T., Takayanagi, K., Kojima, M., Katome, T., Taguchi, K., & Kobayashi, T. (2019). Direct Impairment Of The Endothelial Function By Acute Indoxyl Sulfate Through Declined Nitric Oxide And Not Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Or Vasodilator Prostaglandins In The Rat Superior Mesenteric Artery. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, 42(7), 1236-1242.
- Mccarron, J. G., Wilson, C., Heathcote, H. R., Zhang, X., Buckley, C., & Lee, M. D. (2019). Heterogeneity And Emergent Behaviour In The Vascular Endothelium. *Current Opinion In Pharmacology*, 45, 23-32.
- Mckeague, M., Wong, R. S., & Smolke, C. D. (2016). Opportunities In The Design And Application Of Rna For Gene Expression Control. *Nucleic Acids Research*, 44(7), 2987-2999.
- Mustapha, S., Mohammed, M., Yunusa, I., Rasool, A. H. G., & Mokhtar, S. S. (2020). Potential Risks Of Endoplasmic Reticulum Stress On Vasculopathy In Diabetes. *Obesity Medicine*, 19, 100274.
- Nuraeni, N., & Arjita, I. P. D. (2019). Pengaruh Senam Kaki Diabet Terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Pada Penderita Diabetes Mellitus Type Ii. *Jurnal Kedokteran*, 3(2), 618-627.

- Ogura, Y., Kitada, M., Xu, J., Monno, I., & Koya, D. (2020). Cd38 Inhibition By Apigenin Ameliorates Mitochondrial Oxidative Stress Through Restoration Of The Intracellular Nad<sup>+</sup>/Nadh Ratio And Sirt3 Activity In Renal Tubular Cells In Diabetic Rats. *Aging (Albany Ny)*, 12(12), 11325.
- Patra, J. K., Das, S. K., Das, G., & Thatoi, H. (2019). Isolated Tissues And Organs. In *A Practical Guide To Pharmacological Biotechnology* (Pp. 19-28): Springer.
- Pirahanchi, Y., & Brown, K. (2019). Physiology, Endothelial Derived Relaxation Factor (Edrf).
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The Role Of Antioxidants In The Chemistry Of Oxidative Stress: A Review. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Radhakrishnan, R., & Kowluru, R. A. (2021). Long Noncoding Rna Malat1 And Regulation Of The Antioxidant Defense System In Diabetic Retinopathy. *Diabetes*, 70(1), 227-239.
- Ren, K.-F., Hu, M., Zhang, H., Li, B.-C., Lei, W.-X., Chen, J.-Y., . . . Ji, J. (2019). Layer-By-Layer Assembly As A Robust Method To Construct Extracellular Matrix Mimic Surfaces To Modulate Cell Behavior. *Progress In Polymer Science*, 92, 1-34.
- Saghiri, M. A., Nath, D., Rahmani, B., Amini, S., Karamifar, K., & Peters, O. A. (2021). The Effect Of Diabetes On Fracture Resistance Of Teeth: An In Vitro Study. *Australian Endodontic Journal*, 47(3), 499-505.

- Salahshoor, M. R., Mohammadi, M. M., Roshankhah, S., Najari, N., & Jalili, C. (2019). Effect Of *Falcaria Vulgaris* On Oxidative Damage Of Liver In Diabetic Rats. *Journal Of Diabetes & Metabolic Disorders*, 18(1), 15-23.
- Samaddar, S., & Koneri, R. (2019). Polyphenols Of Marine Red Macroalga *Symphyclocladia Laticuscula* Ameliorate Diabetic Peripheral Neuropathy In Experimental Animals. *Heliyon*, 5(5), E01781.
- Sirangelo, I., & Iannuzzi, C. (2021). Understanding The Role Of Protein Glycation In The Amyloid Aggregation Process. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(12), 6609.
- Thrombozytenfunktion, H., Und Schlaganfall, T., & Wolf, K. Studies On The Role Of Platelet Serotonin In Platelet Function, Hemostasis, Thrombosis And Stroke.
- Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuča, K., & Musílek, K. (2016). Redox-And Non-Redox-Metal-Induced Formation Of Free Radicals And Their Role In Human Disease. *Archives Of Toxicology*, 90(1), 1-37.
- Volpe, C. M. O., Villar-Delfino, P. H., Dos Anjos, P. M. F., & Nogueira-Machado, J. A. (2018). Cellular Death, Reactive Oxygen Species (Ros) And Diabetic Complications. *Cell Death & Disease*, 9(2), 1-9.
- Wang, F., Zhao, L., Shan, Y., Li, R., & Qin, G. (2019). Ctrp3 Protects Against High Glucose-Induced Cell Injury In Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Analytical Cellular Pathology*, 2019.

- Witter, K., Tonar, Z., & Schöpfer, H. (2017). How Many Layers Has The Adventitia?—Structure Of The Arterial Tunica Externa Revisited. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 46(2), 110-120.
- Woodhead, J. L., & Craig, R. (2020). The Mesa Trail And The Interacting Heads Motif Of Myosin Ii. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 680, 108228.
- Xu, J., Yan, S., Tan, H., Ma, L., Feng, H., Han, H., . . . Fang, C. (2018). The Mir-143/145 Cluster Reverses The Regulation Effect Of Klf5 In Smooth Muscle Cells With Proliferation And Contractility In Intracranial Aneurysm. *Gene*, 679, 266-273.
- Yan, L. J. (2018). Redox Imbalance Stress In Diabetes Mellitus: Role Of The Polyol Pathway. *Animal Models And Experimental Medicine*, 1(1), 7-13.
- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. (2015). Vascular Nitric Oxide: Beyond Enos. *Journal Of Pharmacological Sciences*, 129(2), 83-94.
- Zhu, J.-L., Cai, Y.-Q., Long, S.-L., Chen, Z., & Mo, Z.-C. (2020). The Role Of Advanced Glycation End Products In Human Infertility. *Life Sciences*, 255, 117830.

## TENTANG PENULIS

### **I Putu Dedy Arjita, S.Pd., M.Kes.**



Lahir di Karang Desa, Tanjung Kabupaten Lombok Utara pada tanggal 15 Maret 1970. Penulis dianugerahi keluarga yang hangat yang terdiri atas satu orang istri dan tiga orang anak (dua putri dan satu putra). Penulis menempuh pendidikan di Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan (FKIP) Jurusan Biologi Universitas Mataram, Nusa Tenggara Barat dan berhasil mendapatkan gelar Sarjana Pendidikan (S.Pd.) tahun 1993. Penulis diangkat sebagai Dosen PNS Unit Kerja Kopertis Wilayah VIII (sekarang LLDIKTI Wil. VIII) Denpasar dpk. pada Universitas Nahdlatul Wathan Mataram (1994-2014). Sejak tahun 2015 - sekarang, penulis berpindah homebased sebagai Dosen PNS dpk. di Progam Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Islam Al-Azhar.

Memiliki semangat belajar dan mimpi yang besar membuat seorang **I Putu Dedy Arjita** melanjutkan pendidikannya di Program Pascasarjana dan lulus dari Program Studi Ilmu Biomedik Pascasarjana Universitas Brawijaya Malang dan mendapatkan gelar Magister Kesehatan (bidang Biomedik) pada tahun 2001.

**I Putu Dedy Arjita** telah mengabdikan dirinya sebagai dosen sejak tahun 1994. Penulis merupakan sosok yang gigih dalam melangkah demi melakukan perubahan yang lebih baik. Saat dalam penulisan buku ini, penulis sedang menjabat

sebagai Wakil Dekan III Bidang Riset, Pengabdian kepada Masyarakat dan Humnaira Fakultas Kedokteran selama dua periode (2016-2020 dan 2020-2024) di Universitas Islam Al-Azhar, Mataram, Nusa Tenggara Barat. Sebelumnya penulis juga pernah menjadi Ketua Lembaga Penelitian STIKES Mataram (2007-2012). Penulis hingga saat ini aktif dalam Tri Dharma Perguruan Tinggi dengan menjunjung tinggi nilai logika, etika, dan estetika. Sudah banyak menghasilkan publikasi ilmiah yang diterbitkan pada jurnal ilmiah, baik yang terakreditasi nasional maupun internasional. Dalam beberapa kesempatan, penulis juga telah dipercaya menjadi pembicara untuk kegiatan nasional maupun kegiatan internasional.

**I Putu Dedy Arjita** selain merupakan sosok seorang ayah, guru, dan pemimpin yang hangat, juga memiliki komitmen dan konsistensi. Penulis percaya bahwa seorang akademisi harus senantiasa mengupdate ilmu pengetahuan melalui penelitian. Prinsip kerja keras, kerja cerdas dan kerja tuntas dapat tercermin dalam kutipan berikut :

*“The only true wisdom is knowing that you know nothing”*

— **Socrates.**

*“Masa depan adalah milik mereka yang percaya tentang keindahan mimpi-mimpi mereka, dan pergilah dengan keyakinan menuju cita-citamu”* — **Eleanor Roosevelt-Henry David Thoreau**