

EFEK PROTEKTIF BAWANG PUTIH TUNGGAL TERHADAP VASCULAR CELL ADHESION MOLECULES-1 (VCAM-1) PADA MENCIT DIET LEMAK TINGGI

The Protective Role of Single Bulb Garlic Towards Vascular Cell Adhesion Molecules-1 (VCAM-1) on Mice With High-Fat Diet

Isfatun Chasanah¹, Abdul Gofur², dan Sri Rahayu Lestari^{2*}

¹Program Sarjana Biologi, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Malang, Jalan Semarang No. 5, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia

²Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Malang, Jalan Semarang No. 5, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia

Received 03 December 2016, Revised 08 January 2017, Accepted 14 February 2018

doi: 10.22487/j24775185.2017.v6.i1.xxxx

Abstract

Atherosclerosis is initiated by inflammatory response characterized by the accumulation of lipids in the arteries, causing blockage of blood vessels. The excessive of Low-Density Lipoprotein (LDL) in the blood is a major factor in endothelial dysfunction and results in an inflammatory process. The inflammatory process in atherosclerosis is due to the expression of adhesion molecules Vascular Cell Adhesion Molecules-1 (VCAM-1). This research aims to evaluate the effect of single bulb garlic oil extract (SGBOE) against VCAM-1 expression high-fat diet mice. Male mice strain Balb/C were acclimatized for one week. Mice were divided into 6 groups (n=5): normal, high-fat diet (HFD), HFD + simvastatin, and HFD + SGBOE 12.5, 25, and 50 mg/kg BW respectively. HFD was given for 45 days. Single garlic extract was given for four weeks orally. The aortic VCAM-1 expression was assayed using the Immunohistochemical-Flouresence (IHK-F) method. The result of One-Way ANOVA showed that the treatment influenced significantly ($p < 0.05$). The foam cells increase in the high-fat diet group compared than normal mice. Dose 12,5 mg/kg BW reduces VCAM-1 expression near the normal group. Allicin and S-allyl cysteine (SAC) compounds in single bulb garlic are antioxidant compounds that act to prevent oxidative stress and prevention mechanisms against lipoprotein modification.

Keywords: Atherosclerosis, single bulb garlic oil extract, VCAM-1

Pendahuluan

Penyakit jantung merupakan penyebab utama kematian di beberapa negara di dunia. Tingkat kematian akibat serangan jantung dan stroke dilaporkan mengalami peningkatan tiap tahunnya mulai dari 16,7 juta jiwa di tahun 2010 hingga 17,7 juta jiwa di tahun 2015 (Dahlöf, 2010). Kematian akibat penyakit jantung koroner diprediksi sebanyak 7,4 juta jiwa sedangkan 6,7 juta jiwa disebabkan oleh stroke (WHO, 2017). Kematian akibat penyakit jantung di Indonesia, khususnya akibat penyakit jantung koroner dan strok diperkirakan akan meningkat hingga 23,3 juta jiwa di tahun 2030 (Kementerian Kesehatan RI, 2014).

Aterosklerosis merupakan faktor utama dalam perkembangan penyakit jantung (Bentzon, Otsuka, Virmani, & Falk, 2014). Aterosklerosis disebabkan oleh respon inflamasi yang diperantarai oleh akumulasi lipid dalam pembuluh darah (De Winther, Kanters, Kraal, & Hofker, 2005; Jamkhane et al., 2014). Hiperkolesterolemia akibat perubahan gaya hidup merupakan faktor risiko utama yang menyebabkan penyempitan pembuluh darah. Hiperkolesterolemia merupakan peningkatan kadar kolesterol dalam darah, terutama *Low-Density Lipoprotein* (LDL) dalam tubuh (Singh, Kumar, & Dhakal, 2015). LDL dalam tubuh mengalami oksidasi untuk membentuk LDL teroksidasi (oxLDL) LDL teroksidasi merupakan pemicu utama pembentukan *foam cell* oleh makrofag. *Foam cell* yang terbentuk menjadi karakteristik utama pada aterosklerosis (Hansson & Hermansson, 2011; Singh et al., 2015).

*Correspondence

Author: Sri Rahayu Lestari
Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Malang
e-mail: sriahayulestari@um.ac.id
Published by Universitas Tadulako 2019

Aterosklerosis terjadi akibat disfungsi endotel yang disebabkan oleh akumulasi LDL pada pembuluh darah, sehingga menyebabkan stress oksidatif pada endotel arteri dan memicu respon inflamasi. Respon inflamasi selanjutnya akan memproduksi molekul adhesi seperti *Vascular Cell Adhesion Molecules-1* (VCAM-1) dan akan terekspresi pada dinding endotel arteri (Hansson & Hermansson, 2011).

VCAM-1 menstimulasi perlekatan monosit di dinding endotel arteri selama inflamasi dan memicu differensiasi menjadi makrofag. Akumulasi makrofag untuk fagositosis oxLDL menyebabkan terbentuknya *foam cells*. Selanjutnya, sitokin proinflamasi akan disekresikan dalam jumlah besar dan memicu proliferasi sel otot, sehingga terjadi penyempitan pembuluh arteri. Proses akhir yang terjadi adalah formasi *fibrous cap*, yang sesekali dapat pecah dan menyebabkan penyumbatan pada pembuluh darah (Preiss & Sattar, 2007; Esenwa & Elkind, 2016).

Pengobatan untuk aterosklerosis pada saat ini didasarkan pada obat yang mampu menjaga kadar lipid maupun kombinasi dengan obat anti-inflamasi. Sintesis lipid yang berkurang diharapkan mencegah modifikasi LDL menjadi oxLDL (Farmawati, Kusuma, Iswara, & Utami, 2016), sehingga kecil kemungkinan terjadi disfungsi endotel arteri. Sel endotel arteri yang normal menyebabkan molekul adhesi seperti VCAM-1 terekspresi dalam kuantitas yang rendah (Dalal, Sengupta, Paul, & Mishra, 2013). Pencarian bahan alami sebagai kandidat penurun kadar kolesterol mulai banyak diteliti karena kandungan antioksidannya yang tinggi (Mufida, Rahman, & Supriadi, 2018; Nurliana, Rahman, & Ratman, 2018).

Aktivitas antioksidan memainkan peran penting dalam melindungi sel dari stress oksidatif dan mencegah modifikasi lipoprotein. Bawang putih (*Allium sativum*) merupakan bumbu masak yang banyak digunakan di dunia. Bawang putih tinggi antioksidan karena mengandung senyawa allicin dan S-allyl cysteine (SAC) (Colín-González et al., 2012; Molina-Calle, de Medina, Priego-Capote, & de Castro, 2017). Namun, masih sedikit informasi tentang peran bawang putih tunggal terhadap aterosklerosis. Bawang putih tunggal merupakan tanaman obat tradisional yang tumbuh pada kondisi ekstrim. Berdasarkan uraian yang telah dijabarkan, maka perlu dilakukan penelitian mengenai peran ekstrak bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) terhadap ekspresi VCAM-1 pada mencit model aterosklerosis.

Metode

Persiapan ekstrak minyak bawang putih tunggal

Bawang putih tunggal diperoleh dari Desa Ngadas, Kabupaten Malang. Ekstrak minyak bawang putih tunggal (EMBPT) diproses di UPT Materia Medika, Batu. Satu kg bawang putih tunggal segar dilarutkan dalam 4,5 L n-heksana. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya dievaporasi menggunakan rotary evaporator. Volume ekstrak yang diperoleh sebagai stok berikutnya dibuat dosis 12,5mg/Kg BB, 25 mg/Kg BB, dan 50 mg/Kg BB. EMBPT kemudian disimpan pada suhu -4°C hingga siap untuk digunakan.

Perlakuan hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan strain *Balb-C* usia 3 bulan dengan berat 30 ± 5 g. Mencit diperoleh dari CV. Galaxy Science, Jember. Mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama satu minggu kemudian dipelihara di kandang secara individual. Mencit diberikan akses bebas untuk makan dan minum. Mencit selanjutnya dibagi ke dalam dua kelompok besar: (1) diet normal (DN) dan diet lemak tinggi (DLT). Kelompok diet normal diberikan pakan standar pellet susu A (PT. Comfeed, Indonesia). Diet lemak tinggi terdiri atas Hi-Gro 551 (300 g), tepung jagung (200 g), minyak jelantah (150 g), kuning telur bebek (100 g), tepung (50 g), dan asam kolat (0,1 g) Diet lemak tinggi diberikan selama 45 hari pada kelompok DLT saja, untuk kelompok normal diberikan pakan standar pellet susu A (Murwani, Ali, & Muliarta, 2006; Pujiastuti, Lestari, & Gofur, 2017). Pada hari ke-46, mencit yang diberi diet lemak tinggi dibagi ke dalam enam kelompok secara acak ($n=5$): DLT, DLT + Simvastatin 1,04 mg/kg (Pujiastuti et al., 2017), DLT + EMBPT 12,5 mg/kg BB, EMBPT 25 mg/kg BB, dan EMBPT 50 mg/kg BB. Perlakuan EMBPT dan simvastatin diberikan secara oral tiap dua hari sekali selama empat minggu. Prosedur pemeliharaan dan perlakuan telah disetujui oleh Komisi Etik Universitas Brawijaya dengan nomor persetujuan nomer 880-KEP-UB.

Analisis histopatologi aorta

Pada akhir perlakuan, mencit dibedah menggunakan isoflurane 4%. Aorta diambil kemudian dicuci sebanyak tiga kali menggunakan phosphate buffer saline (PBS). Aorta selanjutnya difiksasi dalam larutan formalin 10%. Aorta selanjutnya diproses dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) dan diamati

menggunakan mikroskop Olympus CX21. Potongan aorta diamati pada perbesaran 400x

foam cell yang menjadi karakteristik aterosklerosis bila dibandingkan kelompok diet

Gambar 1. Keberadaan *foam cell* pada aorta mencit yang diwarnai HE (perbesaran 100x). Panah warna hitam menunjukkan keberadaan *The foam cell*. **DN** = Diet normal, **DLT** = Diet lemak tinggi, **Simv** = Simvastatin 1,04 mg/kg BW, **EMBPT1** = EMBPT dosis 12,5 mg/kg BB, **EMBPT2** = EMBPT dosis 25 mg/kg BB, and **EMBPT3** = EMBPT dosis 50 mg/kg BB

untuk melihat keberadaan *foam cell* sebagai ciri aterosklerosis. Preparat aorta lainnya diproses dengan teknik immunohistokimia-fluoresen (IHK-F) dengan label isothiocyanate (FITC). Aorta hasil IHK-F selanjutnya diamati menggunakan Mikroskop fluoresen (FSX-100) yang terhubung dengan program Olympus Fluoview untuk menghitung ekspresi VCAM-1 (intensitas/mm²).

Analisis Data

Ekspresi VCAM-1 disajikan dalam bentuk grafik notasi huruf dalam gravik menunjukkan notasi hasil uji lanjut Duncan ($p < 0,05$). VCAM-1 yang diperoleh dianalisa menggunakan ANAVA satu jalur ($p < 0,05$) diikuti dengan uji lanjut Duncan ($p < 0,05$). ANAVA satu jalur dikerjakan dengan bantuan program SPSS 16.0 untuk Windows.

Hasil dan Pembahasan

Perbandingan Keberadaan Foam Cell pada Aorta Kelompok Mencit Normal dan Perlakuan

Hasil penelitian menunjukkan pada kelompok diet lemak tinggi memiliki lebih banyak *foam cell* dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Keberadaan *foam cell* ditunjukkan dengan warna putih/tidak terwarnai oleh HE karena mengandung lemak (Gambar 1). Diet normal, , EMBP dosis 25 dan 50 mg/kg BB menunjukkan keberadaan *foam cell* dalam jumlah sedikit. Jumlah *foam cell* yang menurun pada kelompok perlakuan diduga karena penurunan kadar kolesterol dan inflamasi. Perlakuan EMBPT menurunkan keberadaan

lemak tinggi.

Bawang putih tunggal mengandung senyawa allicin, S-allyl cysteine (SAC), dan allyl disulfide pada bawang putih tunggal yang berperan sebagai antioksidan (Chung, 2006; Colín-González et al., 2012; Rahman, 2012). Allicin sebagai antioksidan berperan untuk mencegah stress oksidatif dan modifikasi LDL (Gonen et al., 2006). SAC mencegah aktivasi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NFK β), faktor transkripsi utama dalam inisiasi proses inflamasi. Aktivitas antioksidan mencegah pembentukan radikal bebas, seperti anion superoksida ($O_2^{\bullet-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal hidroksil (OH), radikal peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$) atau (LOO), sehingga mencegah stress oksidatif meningkat (Colín-González et al., 2012).

Antioksidan berperan sebagai penghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas untuk membentuk senyawa baru yang relatif stabil dan tidak reaktif, sehingga efek berbahaya radikal bebas bagi sel berkurang (Gutowski & Kowalczyk, 2013). Allicin dan SAC dalam bawang putih tunggal merupakan antioksidan eksogen yang diperoleh dari luar tubuh melalui makanan. Antioksidan eksogen bekerja dengan cara memotong reaksi berantai oksidasi dari radikal bebas atau dapat berperan sebagai peredam, sehingga radikal bebas tidak dapat bereaksi dengan komponen seluler (Gutowski & Kowalczyk, 2013).

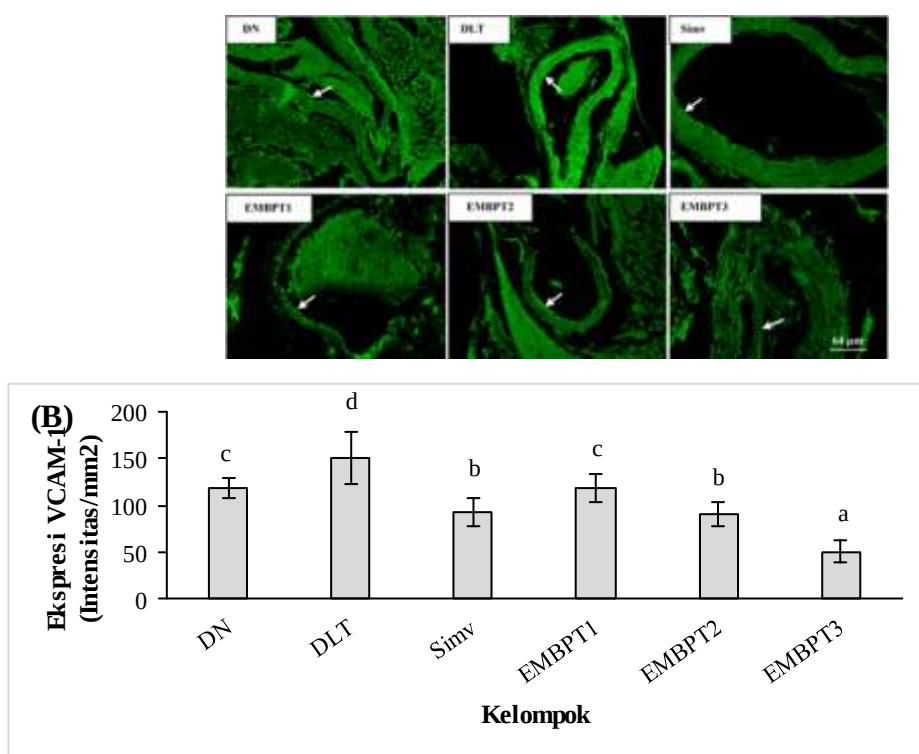
Perbandingan ekspresi VCAM-1 pada aorta mencit kontrol dan perlakuan



Hasil penelitian menunjukkan ekspresi VCAM-1 meningkat secara signifikan pada kelompok diet lemak tinggi bila dibandingkan dengan diet normal ($p < 0.05$). Perlakuan EMBPT menurunkan ekspresi VCAM-1 pada mencit yang diberi diet lemak tinggi. Ekspresi VCAM-1 menurun secara signifikan pada perlakuan EMBPT dosis 25 dan 50 mg/kg BW di bawah kelompok normal.

Respon inflamasi yang terjadi pada aterosklerosis menyebabkan ekspresi molekul adhesi seperti VCAM-1 meningkat. VCAM-1 berperan dalam perlekatan monosit pada dinding endotel arteri. Reseptor pada monosit akan melekat pada VCAM-1 dan masuk ke lapisan sub-endotel atau tunika intima arteri.

Monosit kemudian berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag pada lesi aterosklerosis memproduksi radikal bebas dalam jumlah besar (seperti O_2^-), kemudian menginduksi oksidasi LDL menjadi LDL teroksidasi. Makrofag memfagosit LDL melalui *scavenger receptors* dan dalam jangka waktu lama makrofag akan berubah menjadi *foam cell* (Ross, 1999; Rader & Daugherty, 2008). Foam cells selanjutnya akan membentuk *fatty streaks* diikuti dengan proliferasi sel otot tunika media arteri ke tunika intima untuk membentuk plak fibrosis, sehingga menyebabkan pengerasan dinding pembuluh darah (Esenwa & Elkind, 2016).



seperti malat,

Gambar 2. Ekspresi VCAM-1 pada aorta mencit setelah empat minggu perlakuan. (A). IHC-Fluoresen aorta mencit dengan label FITC pada perbesaran 100x. Ekspresi VCAM-1 pada dinding endotel arteri ditunjukkan oleh panah putih. (B) Histogram ekspresi VCAM-1. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan diantara kelompok perlakuan berdasarkan uji lanjut Duncan ($p < 0.05$). DN = Diet normal, DLT = Diet lemak tinggi, Simv = Simvastatin 1,04 mg/kg BW, EMBPT1 = EMBPT dosis 12,5 mg/kg BB, EMBPT2 = EMBPT dosis 25 mg/kg BB, and EMBPT3

EMBPT menurunkan ekspresi VCAM-1 sesuai dengan dosis yang diberikan. Hasil penelitian menunjukkan ekspresi VCAM-1 yang menurun diikuti dengan menurunnya inflamasi. Ekspresi VCAM-1 yang turun mencegah LDL berubah menjadi LDL teroksidasi. Hal tersebut ditunjukkan oleh keberadaan *foam cells* yang menurun. Pencegahan formasi kolesterol juga menyebabkan penurunan pada VCAM-1. Senyawa aktif pada bawang putih tunggal diduga menekan enzim lipogenik dan kolesterologenik,

fatty acid synthase, glukosa 6-fosfat dehidrogenase dan *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA* (HMG CoA) reductase (Amal & Sanaa, 2012).

Enzim HMG CoA berperan dalam mengubah *3-hydroxy-3-metil-glutaryl-CoA* (HMG CoA) menjadi mevalonat. Penghambatan formasi tersebut dapat terjadi karena bawang putih tunggal mengandung Allicin sebagai inhibitor kompetitif enzim tersebut. Allicin berperan dalam penghambatan enzim thiolase.

Enzim tiolase merupakan enzim yang berperan dalam konversi 2-asetil-KoA menjadi into asetoasetil-KoA (Al-Numair, 2009). Penghambatan formasi asetil-KoA sebagai sumber semua asam karbon pada kolesterol menyebabkan sintesis kolesterol menurun. Sintesis kolesterol yang menurun mencegah akumulasi LDL yang dapat menyebabkan disfungsi endotel (Amal & Sanaa, 2012; Al-Numair, 2009).

Kesimpulan

EMBPT menurunkan ekspresi VCAM-1 pada mencit yang diberi diet lemak tinggi. EMBPT dosis 12,5 mg/kg menurunkan ekspresi VCAM-1 mendekati kelompok normal. EMBPT memiliki efek protektif untuk mencegah peningkatan ekspresi VCAM-1 pada mencit yang diberi diet lemak tinggi.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian. Sri Rahayu Lestari, dan didanai oleh KEMENRISTEKDIKTI (nomor kontrak penelitian 3.4.8/UN.32.14.LT/2017). Kami berterima kasih kepada laboratorium jurusan Biologi, Universitas Negeri Malang untuk fasilitas yang diberikan.

References

- Al-Numair, K. S. (2009). Hypocholesteremic and antioxidant effect of garlic (*Allium sativum* L.) extract in rats fed high cholesterol diet. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(2), 161–166.
- Amal, A. F., & Sanaa, T. E.-S. (2012). Effect of allium sativum extract on serum lipid and antioxidant status in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sciences Journal*, 9(3), 187–196.
- Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R., & Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation Research*, 114(12), 1852–1866.
- Chung, L. Y. (2006). The Antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *Journal of Medicinal Food*, 9(2), 205–213.
- Colín-González, A. L., Santana, R. A., Silva-Islas, C. A., Cháñez-Cárdenas, M. E., Santamaría, A., & Maldonado, P. D. (2012). The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract- and S-allylcysteine-induced protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012(1).
- Dahlöf, B. (2010). Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *American Journal of Cardiology*.
- Dalal, I., Sengupta, M., Paul, S., & Mishra, a. (2013). Comparative study of the effect of atorvastatin and garlic extract in experimentally induced hypercholesterolemia in rabbits. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 2(4), 397.
- De Winther, M. P. J., Kanters, E., Kraal, G., & Hofker, M. H. (2005). Nuclear factor κ B signaling in atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(5), 904–914.
- Esenwa, C. C., & Elkind, M. S. (2016). Inflammatory risk factors, biomarkers and associated therapy in ischaemic stroke. *Nature Reviews Neurology*, 12(10), 594–604.
- Farmawati, A., Kusuma, R. J., Iswara, B. S., & Utami, K. D. (2016). Addition of conjugated linoleic acid in whole milk improves lipid profile in high fat diet induced hypercholesterolemia of rats. *J. Med. Sci.*, 48(4), 185–192.
- Gonen, A., Harats, D., Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., ... Shaish, A. (2006). The antiatherogenic effect of allicin: Possible mode of action. *Pathobiology*, 72(6), 325–334.
- Gutowski, M., & Kowalczyk, S. (2013). A study of free radical chemistry: Their role and pathophysiological significance. *Acta Biochimica Polonica*, 60(1), 1–16.
- Hansson, G. K., & Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology*, 12(3), 204–212.
- Jamkhande, P. G., Chandak, P. G., Dhawale, S. C., Barde, S. R., Tidke, P. S., & Sakhare, R. S. (2014). Therapeutic approaches to drug targets in atherosclerosis. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22(3), 179–190.
- Kementerian Kesehatan RI, P. D. dan I. (2014). Situasi kesehatan jantung; mari menuju masa muda sehat, hari tua nikmat tanpa ptm dengan perilaku cerdas, 8.
- Molina-Calle, M., de Medina, V. S., Priego-Capote, F., & de Castro, M. D. L. (2017). Establishing compositional differences between fresh and black garlic by a

- metabolomics approach based on LC-QTOF MS/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62(May), 155–163.
- Mufida, Rahman, N., & Supriadi. (2018). Efek ekstrak daun alpukat (*persea americana* mill.) Dalam menurunkan kadar kolesterol darah pada mencit (*Mus musculus*). *Jurnal. Akademika Kimia.*, 7(1), 11–18.
- Murwani, S., Ali, M., & Muliarta, K. (2006). Atherogenic diet of white-rat (*rattus novergicus* strain wistar) as atherosclerotic animal model. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 22(1), 6–9.
- Nurliana, Rahman, N., & Ratman. (2018). Skrining fitokimia dan uji efektivitas tepung biji kelor (*Moringa oleifera* L..) dalam menurunkan kadarkolesterol total darah mencit jantan. *Jurnal. Akademika Kimia*, 7(3), 122–129.
- Preiss, D. J., & Sattar, N. (2007). Vascular cell adhesion molecule-1: A viable therapeutic target for atherosclerosis? *International Journal of Clinical Practice*, 61(4), 697–701.
- Pujiastuti, I. N. E., Lestari, S. R., & Gofur, A. (2017). Gambaran hematologi mencit (*mus musculus*) model toksisitas Subkronis. *Scripta Biologica*, 4(2), 75.
- Rader, D. J., & Daugherty, A. (2008). Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*, 451(7181), 904–913.
- Rahman. (2012). antioxydant proprietés of Garlic, 19(2), 589–591.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis — an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, 340(2), 115–126.
- Singh, U., Kumar, S., & Dhakal, S. (2015). Future prospect of garlic usage in clinical practice of hyperlipidemia: A review. *International Journal of Herbal Medicine*, 3(2), 38–43.
- WHO. (2017). Cardiovascular diseases (CVDs). Diakses pada November 7, 2018.