

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Aterosklerosis

2.1.1 Definisi

Aterosklerosis merupakan penyakit vaskuler yang ditandai dengan timbulnya ateroma, yaitu suatu tungkulan pada dinding arteri. Timbulnya ateroma ini menimbulkan penyempitan lumen arteri, dan apabila tungkulan tersebut lepas, akan menimbulkan emboli yang selanjutnya mengakibatkan penyumbatan lumen (Sidartawan *et al.*, 2007). Aterosklerosis adalah penyakit kronis yang ditandai dengan penebalan dan pengerasan dinding arteri. Lesi mengandung deposit lemak dan mengalami kalsifikasi, mengakibatkan obstruksi pembuluh darah, agregasi trombosit dan vasokonstriksi abnormal (Brashers, 2008). Aterosklerosis adalah penumpukan endapan jaringan lemak (*atheroma*) dalam nadi. Pengendapan lemak seperti ini disebut *plaque* (plak), terutama terdiri atas kolesterol dan esternya dan cenderung terjadi di titik-titik percabangan nadi (*bifurcation*) sehingga mengganggu aliran darah di tempat-tempat yang memiliki aliran darah tidak begitu keras (Silalahi, 2006).

2.1.2 Faktor Risiko

Banyak faktor kemungkinan berinteraksi untuk mempercepat proses aterogenik. Faktor ini telah diidentifikasi sebagai faktor risiko dalam studi epidemiologis, karena faktor ini tampak menunjukkan peningkatan dalam kemungkinan individu mengalami aterosklerosis. Kemungkinan terjadinya

aterosklerosis ditentukan oleh faktor risiko tertentu. Faktor ini dibagi menjadi faktor yang tidak dapat diubah dan faktor yang dapat diubah melalui perubahan gaya hidup. Faktor yang tidak dapat diubah meliputi umur, jenis kelamin, ras, faktor herediter. Semakin tua umur seseorang semakin mudah terkena aterosklerosis. Perempuan dalam masa reproduksi jarang terkena namun sesudah menopause menjadi mempunyai risiko yang sama dengan jenis kelamin pria. Sedangkan faktor risiko yang dapat diubah adalah hipertensi, merokok, makan banyak lemak, kurang berolahraga, stres dan obesitas (Tambayong, 2000).

Tabel 2.1. Faktor Risiko untuk Penyakit Aterosklerosis

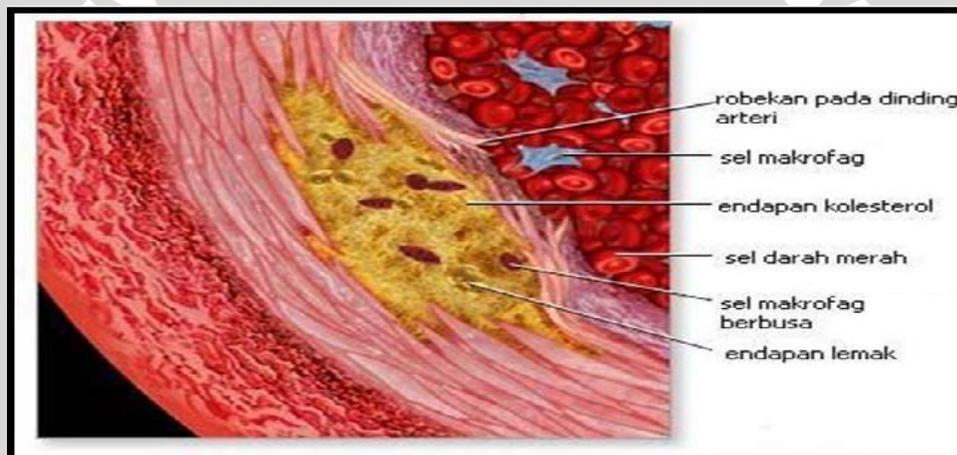
Dapat Diubah	Tidak Dapat Diubah
Diet	Usia
Merokok	Jenis Kelamin
Hipertensi	Ras
Stress	Faktor herediter
Pola hidup monoton	
Diabetes mellitus	
Alkohol	

(Tambayong, 2000)

Faktor risiko lain yang dapat menimbulkan aterosklerosis yaitu dislipidemia. Pada dislipidemia dapat terjadi hiperkolesterolemia yaitu peningkatan kolesterol total atau kolesterol *Low Density Lipoprotein* (LDL), penurunan *High Density Lipoprotein* (HDL), peningkatan trigliserida (TG), dan peningkatan lipoprotein (Brashers, 2008). Hiperkolesterolemia juga merupakan salah satu faktor risiko aterosklerosis yang tergolong dapat dirubah (Tambayong, 2000).

2.1.3 Patofisiologi Aterosklerosis

Proses terjadinya aterosklerosis membutuhkan banyak faktor, salah satunya adalah kolesterol. Kolesterol merupakan salah satu hasil metabolisme lemak yang bisa berada dalam bentuk bebas maupun kolesterol terikat bersama trigliserida, fosfolipid, protein dalam bentuk LDL, *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL), maupun HDL. LDL merupakan sumber kolesterol terbesar bagi jaringan tubuh (Voet, 1995 dalam Romah 2010).



Gambar 2.1 Potongan melintang arteri yang mengalami aterosklerosis (Robbins and Cotran 2007 dalam Marizal 2010)

Di dalam plasma, kolesterol diangkut di dalam lipoprotein, proporsi tertinggi terdapat pada LDL. Kolesterol dari makanan mencapai keseimbangan dengan kolesterol plasma dalam beberapa hari dan dengan kolesterol jaringan dalam beberapa minggu. Ester kolesteril dalam makanan dihidrolisis menjadi kolesterol yang kemudian diserap oleh usus bersama dengan kolesterol tak teresterifikasi dan *lipid* lain dalam makanan. Kolesterol kemudian dimasukkan ke dalam kilomikron. Sembilan puluh lima persen kolesterol kilomikron disalurkan ke hati dalam bentuk sisa kilomikron (*chylomicron remnants*). Kemudian kolesterol

disekresikan oleh hati dalam bentuk HDL dan sebagian besar VLDL (Murray *et al.*, 2009). Selanjutnya VLDL dirubah menjadi *Intermediate Density Lipoprotein* (IDL) dan kemudian LDL untuk mengedarkan kolesterol ke sel-sel jaringan. Kelebihan kolesterol akan dibawa kembali oleh HDL ke hepar untuk disekresikan menjadi asam empedu. Tingginya asupan kolesterol memicu peningkatan kadar kolesterol total dan peningkatan LDL akibat tidak terkompensasi oleh HDL untuk dibawa kembali menuju hepar (Murray *et al.*, 2003). LDL akan mengalami oksidasi menjadi LDL-oks yang mudah sekali menempel dan menumpuk pada dinding pembuluh darah, penumpukan ini menyebabkan cedera pada endotel. Proses aterosklerosis selanjutnya yaitu (Marks *et al.*, 2000):

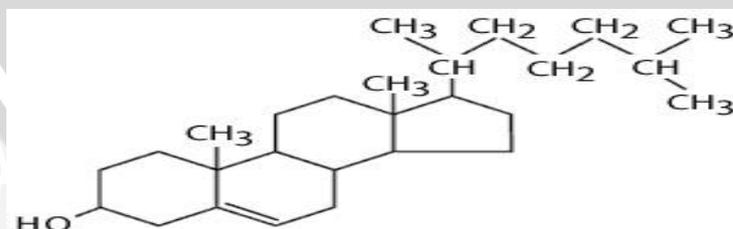
- 1) Daerah yang terluka menarik monosit, kemudian menjadi makrofag dan memakan bahan-bahan disekitarnya (termasuk LDL teroksidasi). Sel makrofag berubah menjadi sel busa yang tertimbun dan menimbulkan *fatty streak* di dalam pembuluh darah.
- 2) Sel endotel yang rusak mengakibatkan trombosit menggumpal dan melepaskan tromboksan A₂ yaitu suatu zat yang mendorong penggumpalan trombosit yang lebih lanjut. Sel tersebut juga melepaskan platelet-platelet *growth factor*. Makrofag menghasilkan pertumbuhan yang mengakibatkan proliferasi sel otot polos, yang berintegrasi dari lapisan medial ke intimal dinding arteri
- 3) Sel di dalam lapisan intimal melepaskan lemak (triasilgliserol + kolesterol) yang menumpuk di dalam plak yang sedang tumbuh. LDL terus masuk ke lesi dan ikut berperan menambah timbunan lemak.

- 4) Sel yang lesi mensekresi kolagen, elastin dan glikosaminoglikan membentuk tudung fibrosa dan muncul kristal kolesterol di bagian tengah plak. Sel terperangkap dan mati sehingga terbentuk kotoran plak, dan juga terjadi kalsifikasi. Ruptur dan pendarahan plak berkapsul tersebut di pembuluh koroner dapat menyebabkan pembentukan akut bekuan darah (trombus), yang semakin lama semakin menyumbat.

2.2 Kolesterol

2.2.1 Definisi

Kolesterol adalah salah satu sterol yang termasuk dalam kelompok lemak yang terdapat dari luar tubuh berupa bahan makan (*cholesterol eksogen*) dan dibentuk di dalam tubuh (*cholesterol endogen*). Pada tubuh manusia kolesterol banyak dijumpai dalam darah, empedu, bagian luar kelenjar adrenal, dan jaringan saraf (Lubis, 2009). Kolesterol diperlukan oleh tubuh antara lain untuk: (a) sintesis asam/garam empedu yang diperlukan untuk proses pencernaan lemak atau minyak, (b) sintesis vitamin D dan hormon steroid, (c) sebagai komponen membran sel (Prangdimurti *et al*, 2007).



Gambar 2.2 Struktur Molekul Kolesterol (Sampaio *et al.*, 2006)

Kolesterol diangkut oleh darah dalam bentuk terikat dalam lipoprotein plasma. Lipoprotein adalah gabungan molekul lemak (*lipid*) dan protein

yang disintesis di dalam hati. Lipoprotein adalah kompleks makromolekul yang membawa lemak plasma hidrofobik, yaitu kolesterol dan trigliserida dalam darah. Lipoprotein akan membawa kolesterol ke seluruh sel tubuh, setelah lemak berikatan dengan apoprotein, akan membentuk lipoprotein, sehingga lemak dapat larut di dalam darah (Soebroto, 2010).

Kolesterol terdapat pada semua jaringan dan lipoprotein plasma, terdapat dalam bentuk kolesterol bebas atau gabungan asam lemak rantai panjang sebagai ester kolestril. Unsur ini disintesis dari Asetil-Ko A dan akhirnya dikeluarkan dari tubuh lewat empedu sebagai garam kolesterol (Harini dan Astirin, 2009).

Kisaran normal kadar kolesterol pada hewan coba tikus adalah antara 40-130 mg/dL (Delaney *et al.*, 2008). Sedangkan klasifikasi kadar kolesterol total pada manusia terdapat pada tabel berikut :

Tabel 2.2. Klasifikasi Kadar Kolesterol Total Manusia dalam mg/dL

Kadar Kolesterol Total	Klasifikasi
< 200	<i>Desirable</i>
200 - 239	<i>Borderline high</i>
≥ 240	<i>High</i>

(U.S. Department Of Health And Human Services, 2001)

Faktor-faktor yang mempengaruhi peningkatan konsentrasi kolesterol yaitu :

- 1) Diet lemak yang sangat jenuh meningkatkan konsentrasi kolesterol darah 15 sampai 25 persen. Keadaan ini akibat peningkatan penimbunan lemak dalam hati, yang kemudian menyebabkan peningkatan jumlah Asetil-KoA di dalam sel hati untuk menghasilkan kolesterol (Adam, 2006).

- 2) Kekurangan insulin atau hormon tiroid meningkatkan konsentrasi kolesterol darah, sedangkan kelebihan hormon tiroid menurunkan konsentrasinya. Efek ini kemungkinan disebabkan terutama oleh perubahan derajat aktivitas enzim – enzim khusus yang bertanggung jawab terhadap metabolisme zat lipid (Adam, 2006).
- 3) Stres telah diketahui termasuk etiologi dari penyakit jantung koroner. Stres ini bisa emosional, berkaitan dengan pekerjaan, sosial, kultural, herediter, dan stressor fisik. Selama stres, kadar kolesterol serum meningkat. Terdapat penelitian yang menunjukkan hubungan antara stres menahun dengan tekanan darah. Stres meningkatkan tekanan darah, yang pada gilirannya melemahkan dan merusak pelapis pembuluh darah, menyediakan tempat bagi mengendapnya *lipid* sehingga terbentuk plak kolesterol (Tambayong, 2000).

2.2.2 Lipoprotein

Lipoprotein adalah partikel yang berbentuk *spherical* (berbentuk bola) dimana didalamnya dibedakan menjadi bagian inti yang bersifat *hydrophobic* dan bagian permukaan yang bersifat *amphiphilic*. Pada bagian permukaan terdapat kandungan *phospholipid* pada layer pertama serta protein dan kolesterol bebas. Sedangkan pada bagian inti yang *hydrophobic* terdapat kandungan trigliserida dan kolesterol ester (McPherson dan Pincus, 2011). Lipoprotein dapat dibagi menjadi kilomikron, IDL, VLDL, LDL, dan HDL.

1) Kilomikron

Kilomikron merupakan lipoprotein densitas rendah paling banyak berisi trigliserida yang berasal dari makanan. Kilomikron yang

dihasilkan dalam usus, masuk ke sirkulasi sistemik melalui saluran limfatik, trigliseridanya dihidrolisis oleh lipoprotein lipase, suatu enzim yang berlokasi di permukaan endotel pembuluh kapiler. Kilomikron *remnant* merupakan produk akhir dari degradasi kilomikron dalam sirkulasi (Staf Pengajar Departemen Farmakologi, 2009).

2) IDL

Partikel IDL memiliki densitas 1.006-1.019 kg/L. Partikel ini terbentuk melalui metabolisme VLDL. IDL hanya terdapat sementara dan dapat dihilangkan dari peredaran dalam waktu yang singkat. Kandungan *lipid*, ukuran, dan densitas dari LDL ialah antara VLDL dan LDL (McPherson dan Pincus, 2011).

3) VLDL

VLDL adalah golongan lipoprotein densitas terendah kedua. VLDL terutama berasal dari hepar dan memiliki fungsi untuk mentranspor trigliserida yang dibuat dalam jaringan. VLDL juga mentranspor kolesterol dalam jumlah yang nyata (bermakna). Seperti halnya dengan kilomikron, trigliserida dari VLDL didegradasi oleh lipoprotein lipase. VLDL *remnant* (sisa) masih tetap ada setelah banyak trigliserida yang keluar (Staf Pengajar Departemen Farmakologi, 2009).

4) LDL

Kolesterol LDL merupakan alat transport kolesterol yang utama mengangkut 70-80% kolesterol total dari hepar ke jaringan perifer. Konsentrasinya bergantung pada banyak faktor, tetapi terutama pada

faktor asupan makanan yang mengandung kolesterol dan lemak jenuh (Sloane, 2004).

5) HDL

HDL berfungsi sebagai pembawa kolesterol dari jaringan perifer ke hati untuk metabolisme (katabolisme) yang selanjutnya dikeluarkan dari tubuh. Tingkat kolesterol HDL plasma dianggap rendah bila kadarnya di bawah 35 mg/dL (Staf Pengajar Departemen Farmakologi, 2009).

2.2.3 Metabolisme Kolesterol pada Manusia

Kolesterol diserap dari usus dan menjadi satu dengan kilomikron yang dibentuk dalam mukosa. Setelah kilomikron melepaskan trigliserida dalam jaringan adiposa, sisa kilomikron akan membawa kolesterol ke hati. Hati juga membentuk kolesterol. Sebagian kolesterol hati diekskresikan dalam empedu, baik dalam bentuk bebas maupun sebagai asam empedu (Murray *et al.*, 2003).

Sisa kolesterol akan menjadi satu dengan *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL). Kolesterol mengadakan umpan balik untuk menghambat pembentukannya sendiri. Jadi bila intake kolesterol dalam makanan tinggi maka sintesis kolesterol dalam makanan tinggi tetapi sintesis kolesterol hati menurun dan sebaliknya. Akan tetapi, pengaruh umpan balik ini tidaklah tetap, dan diet rendah kolesterol akan sedikit menurunkan kolesterol darah (Muhaimin, 2008 dalam Wulandari 2011).

VLDL yang mengandung kolesterol yang dibentuk dalam hati dimetabolisme menjadi IDL dan LDL. LDL kemudian masuk ke dalam sel jaringan ekstrahepatik dengan cara endositosis dan menyediakan

kolesterol bagi sel-sel yang penting agar berfungsi normal. Sebagian LDL juga masuk *scavenger cell*. Molekul-molekul LDL berikatan dengan reseptor-reseptor pada membran sel, interaksi ini memicu endositosis LDL. Vesikel - vesikel yang mengandung LDL bergabung dengan lisosom, dan enzim-enzim lisosom menghidrolisis ester-ester kolesterol yang terdapat pada inti LDL. Kolesterol bebas yang terbentuk masuk sitoplasma, di mana ia sebagian dirubah kemudian ester-ester kolesterol dalam alat Golgi, dan berdifusi ke dalam membran sel. Dari membran sel diambil oleh HDL. Di dalam plasma kolesterol tersebut diubah menjadi ester-ester kolesterol dan bergerak ke inti HDL. HDL mentransport kolesterol kembali ke hati. Sebagian kolesterol ini bersiklus kembali ke dalam VLDL, tetapi sebagian besar masuk ke dalam empedu dan dieksresi dalam feses (Muhaimin,2008).

2.3 Penelitian Kesehatan

Penelitian adalah kegiatan yang dilakukan berdasarkan kaidah dan metode ilmiah secara sistematis untuk memperoleh informasi, data, dan keterangan dari subjek terkait, dengan pemahaman teori dan pembuktian asumsi dan/atau hipotesis. Hasil yang didapat merupakan kesimpulan yang dapat diaplikasikan atau menjadi tambahan pengetahuan bagi kemajuan ilmu pengetahuan. Walaupun demikian, kegiatan penelitian harus tetap menghormati hak dan martabat subjek penelitian (Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbangkes, 2007).

Penelitian kesehatan meliputi penelitian biomedik, epidemiologi, sosial, serta perilaku. Sebagian penelitian kesehatan dapat dilakukan secara *in vitro*, memakai model matematik, atau simulasi komputer. Jika

hasil penelitian akan dimanfaatkan untuk manusia, diperlukan penelitian lanjutan dengan menggunakan bahan hidup (*in vivo*) seperti galur sel dan biakan jaringan. Walaupun demikian, untuk mengamati, mempelajari, dan menyimpulkan seluruh kejadian pada makhluk hidup secara utuh diperlukan hewan percobaan karena hewan percobaan mempunyai nilai pada setiap bagian tubuh dan terdapat interaksi antara bagian tubuh tersebut. Hewan percobaan dalam penelitian disebut sebagai *semi final test tube* (Ridwan, 2013). Hewan coba yang sering digunakan dalam penelitian adalah mencit, tikus, hamster, *guinea pig*, kelinci, babi, kucing dan anjing (Szegeed, 2007). Salah satu contoh hewan coba dalam penelitian kesehatan adalah tikus. Tikus merupakan hewan kedua yang paling banyak digunakan dalam kegiatan biomedik setelah mencit (Szegeed, 2007).

2.4 Tikus sebagai Hewan Coba

Hewan percobaan adalah setiap hewan yang dipergunakan pada sebuah penelitian biologis dan biomedis yang dipilih berdasarkan syarat atau standar dasar yang diperlukan dalam penelitian tersebut (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988 dalam Ridwan, 2013). Alasan digunakannya hewan coba pada suatu penelitian kesehatan secara umum ialah: (1) keragaman dari subjek penelitian dapat diminimalisasi, (2) variabel penelitian lebih mudah dikontrol, (3) daur hidup relatif pendek sehingga dapat dilakukan penelitian yang bersifat multigenerasi, (4) pemilihan jenis hewan dapat disesuaikan dengan kepekaan hewan terhadap materi penelitian yang dilakukan, (5) biaya relatif murah, (6) dapat dilakukan pada penelitian yang berisiko tinggi, (7) mendapatkan informasi lebih

mendalam dari penelitian yang dilakukan karena kita dapat membuat sediaan biologi dari organ hewan yang digunakan, dan (8) dapat digunakan untuk uji keamanan, diagnostik, dan toksisitas (Rustiawan, 1990 dalam Ridwan, 2013).

Tikus merupakan hewan mamalia yang mempunyai peranan penting bagi manusia untuk tujuan ilmiah karena memiliki daya adaptasi baik. Tikus yang banyak digunakan sebagai hewan model laboratorium dan peliharaan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Tikus putih memiliki beberapa keunggulan antara lain penanganan dan pemeliharaan yang mudah karena tubuhnya kecil, sehat dan bersih, kemampuan reproduksi tinggi dengan masa kebuntingan singkat, serta memiliki karakteristik produksi dan reproduksi yang mirip dengan mamalia lainnya. Percobaan-percobaan tentang makanan dan defisiensi zat makanan pada semua jenis hewan termasuk manusia, kebanyakan menggunakan tikus daripada hewan percobaan lain (Pribadi, 2008). Tetapi penggunaan tikus untuk penelitian perlu memperhatikan faktor jenis kelamin terutama untuk yang berjenis kelamin betina. Hal ini karena pada tikus betina terdapat estrogen yang dapat mempengaruhi metabolisme lemak dan kolesterol. Hormon estrogen memiliki sifat hipolipidemik (Marinis *et al.*, 2008). Hormon ini memiliki efek metabolik yang dapat menurunkan kadar kolesterol dan lipoprotein densitas rendah dalam darah (Sloane, 2004). Sehingga adanya produksi hormon estrogen dalam tikus betina bisa berpengaruh terhadap data hasil penelitian, oleh karena itu perlu dipertimbangkan lagi ketika akan memilih hewan coba tikus betina untuk penelitian (Conn, 2008).

Strain tikus yang paling sering digunakan dalam penelitian adalah strain Wistar dan Sprague Dawley (Harkness dan Wagner, 1989 dalam Simbolon *et al.*, 2012). Aplikasi utama dalam bidang penelitian tikus Wistar diantaranya adalah di bidang metabolisme, *nutrition*, penuaan, penyakit infeksi, dan farmakologi (Janvier Labs, 2013). Di antara strain yang lain, Wistar adalah yang paling lincah sehingga efeknya akan lebih terlihat saat dilakukan intervensi (Kram dan Keller, 2001 dalam Fridintya, 2011). Sedangkan pada tikus Sprague Dawley mempunyai efek *hyperresponders* dibandingkan dengan Wistar ketika diberi makan diet tinggi kolesterol 1% (Doucet *et al.*, 1987). Penelitian Zutphen dan Bieman (1981) mengklasifikasikan strain tikus yang *hyperresponding* berdasarkan peningkatan kadar kolesterol plasma ketika diberi diet hiperkolesterolemia (2% kolesterol, 0,5% asam kolat dan 5% *olive oil*) selama tiga minggu. Strain tikus dikatakan *hyperresponding* jika mengalami peningkatan kadar kolesterol plasma lebih dari 300 mg/100 ml plasma. Berikut ini adalah tabel klasifikasi dari tikus putih:

Tabel 2.3 Klasifikasi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Klasifikasi	Tikus
Kerajaan	Hewan
Filum	Chordata
Sub-Filum	Vertebrata
Kelas	Mamalia
Ordo	Rodentia
Famili	Muridae
Genus	<i>Rattus</i>
Spesies	<i>Rattus norvegicus</i>

(Priambodo, 1995)

2.5 Etika Penggunaan Tikus sebagai Hewan Coba

Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba, juga harus diterapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu :

replacement, reduction, dan refinement. *Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal (Shaw *et al.*, 2002). *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakiti sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Pada dasarnya prinsip *refinement* berarti membebaskan hewan coba dari beberapa kondisi. Pertama adalah bebas dari rasa lapar dan haus dengan memberikan akses makanan dan air minum yang sesuai dengan jumlah yang memadai baik jumlah dan komposisi zat gizi untuk kesehatannya (Ridwan, 2013).

2.6 Diet pada Hewan Coba

Menurut Priambodo (1995), kebutuhan makanan bagi seekor tikus putih setiap harinya kurang lebih sebanyak 10% dari bobot tubuhnya, jika makanan tersebut merupakan makanan kering. Hal ini dapat meningkat sampai 15% dari bobot tubuhnya, jika makanan yang dikonsumsi berupa makanan basah. Makanan yang diberikan pada tikus umumnya tersusun dari komposisi alami dan mudah diperoleh dari sumber daya komersial (Smith dan Magkoewidjojo, 1988).

Seekor hewan memerlukan makanan dan air bukan hanya karena adanya rasa lapar dan haus, tetapi juga karena hewan akan belajar dan

berusaha untuk memenuhi kebutuhannya tersebut dan menyesuaikan dengan lingkungan dimana hewan itu hidup. Jika tidak tersedia makanan dan minuman dalam jangka waktu yang lama, maka dapat berefek pada metabolisme hewan, status hidrasi, dan kesejahteraan hewan (Norecopa, 2009).

Kehati-hatian dalam memilih sebuah intervensi diet bersamaan dengan adanya kontrol lingkungan akan menjadi sangat penting dalam menghasilkan data dari diet untuk menginduksi hewan coba. Diet hewan coba laboratorium yang dapat memberi efek signifikan pada variabel yang diukur dalam protokol penelitian, dikategorikan dalam tiga kategori utama yaitu *chows*, *semipurified*, dan kimia (Sasidharan *et al.*, 2013). Diet *chow* telah digunakan sejak tahun 1940 sebagai diet kontrol dalam penelitian. Diet *chow* mempunyai harga yang murah dan biasanya mengandung bahan-bahan seperti jagung, gandum, dan tepung kedelai. Formula *chow* umumnya adalah formula tertutup yang berarti bahwa jumlah yang tepat dari masing-masing bahan ditambahkan secara rahasia oleh produsen (Resource Center, 2008). Sementara itu, *semipurified* diet adalah diet yang dapat diformulasikan dengan bahan-bahan olahan dan dapat sengaja dimodifikasi untuk memenuhi kebutuhan peneliti dan bahan-bahan yang tidak relevan bisa diabaikan. Sedangkan diet dengan rumus kimia adalah diet yang terbuat dari sumber kimia murni yang terdiri dari asam amino, mono atau disakarida, asam lemak murni, mineral dan vitamin yang dikontrol secara ketat pada konsentrasi zat gizinya. Kekurangan diet kimia ini adalah tidak mudah dikonsumsi oleh sebagian besar spesies hewan coba penelitian dan biasanya terlalu mahal untuk

penggunaan umum. Dari ketiga diet yang sudah diterangkan sebelumnya *semipurified* diet lebih dapat dipertimbangkan untuk digunakan pada penelitian tentang penyakit gangguan metabolisme (Sasidharan *et al.*, 2013).

Karena semakin meningkatnya kesadaran akan kebutuhan *semipurified* diet dengan zat gizi yang cukup, American Institute of Nutrition (AIN) mengidentifikasi standar diet untuk zat gizi berbasis studi penelitian dengan tikus laboratorium dengan menerbitkan formula diet tikus AIN-93. Diet normal dan diet aterogenik dapat diformulasikan berdasarkan diet AIN-93. Namun setiap intervensi diet perlu dilakukan standarisasi yang tepat supaya diet yang dimodifikasi tersebut memiliki kejelasan di setiap desain penelitian yang berbeda (Sasidharan *et al.*, 2013).

2.7 Perkembangan Penelitian Standar Diet Normal untuk Hewan Coba Tikus

Pada tahun 1973, sebuah komisi yang dibentuk oleh American Institute of Nutrition (AIN) mengidentifikasi standar diet atau standar makanan pada hewan coba penelitian yaitu tikus. Pengidentifikasi ini dilakukan karena adanya peningkatan kesadaran terhadap kebutuhan gizi yang tepat dalam standar diet penelitian di laboratorium. Hasil dari komisi tersebut adalah ditetapkannya AIN-76 sebagai standar diet hewan coba tikus. Pada tahun 1982, di sebuah workshop, Nutritional Standards for Laboratory Animal Diets yang disponsori oleh International Committee for Laboratory Animal Science, menghasilkan revisi diet tikus yang selanjutnya disebut AIN-76A. Revisi ini dikarenakan adanya

ketidakadekuatan formula diet jika diterapkan pada penelitian jangka panjang. Kemudian pada tahun 1989 dilakukan lagi pertemuan oleh *Federation of American Societies for Experimental Biology* (FASEB) untuk mendiskusikan apakah dibutuhkan modifikasi atau perbaruan dari standar diet AIN-76A. Pada pertemuan tersebut terbentuklah standar diet terbaru untuk hewan coba tikus yaitu AIN-93 (Reeves *et al.*, 1993).

Diet AIN-93 diklasifikasikan menjadi dua golongan yaitu AIN-93G dan AIN-93M. AIN-93G direkomendasikan untuk tikus yang sedang dalam masa pertumbuhan hamil dan menyusui sedangkan AIN-93M direkomendasikan untuk pemeliharaan kondisi tubuh tikus dewasa. Perbedaan antara diet AIN-93G dan AIN-93M terlihat pada jumlah komposisi bahan-bahan yang digunakan (Reeves *et al.*, 1993).. Berikut adalah tabel jumlah komposisi bahan diet AIN-93M :

Tabel 2.4 Formulasi Diet AIN-93M untuk Pemeliharaan Kondisi Tubuh Tikus Dewasa.

Nama Bahan	(AIN-93M) g/kg diet
Cornstarch	465,692
Casein (85%)	140
Dextrinized cornstarch (90-94% tetrasaccharides)	155
Sucrose	100
Soy bean oil (no additives)	40
Fiber	50
Mineral Mix (AIN-93M-MX)	35
Vitamin Mix (AIN-93-VX)	10
L-Cystine	1,8
Choline bitartrate (41.1% choline)	2,5
Tert-butylhydroquinone	0,008

(Reeves *et al.*, 1993)

Tabel 2.5 Kontribusi Vitamin untuk Diet AIN-93M Menggunakan Vitamin Mix AIN-93-VX (10 g/kg diet)

Vitamin	Jumlah
<i>Nicotinic acid</i>	30 mg
<i>Pantothenate</i>	15 mg
<i>Pyridoxine</i>	6 mg
<i>Thiamin</i>	5 mg
Riboflavin	6 mg
<i>Folic acid</i>	2 mg
Vitamin K	750 µg
D-Biotin	200 µg
Vitamin B-12	25 µg
Vitamin A	4000 IU
Vitamin D3	1000 IU
Vitamin E	75 IU

(Reeves et al., 1993)

Tabel 2.6 Kontribusi Mineral untuk Diet AIN-93M Menggunakan Mineral Mix AIN-93M-MX (35 g/kg diet)

Mineral	mg/kg diet
Essential mineral element	
<i>Calcium</i>	5000
<i>Phosphorus</i>	1992
<i>Potassium</i>	3600
<i>Sulfur</i>	300
Sodium	1019
<i>Chloride</i>	1571
Magnesium	507
<i>Iron</i>	35
Zinc	30
<i>Manganese</i>	10
<i>Copper</i>	6
<i>Iodine</i>	0,2
<i>Molybdenum</i>	0,15
Selenium	0,15
Potentially beneficial mineral element	
<i>Silicon</i>	5
<i>Chromium</i>	1
<i>Fluoride</i>	1
<i>Nickel</i>	0,5
Boron	0,5
<i>Lithium</i>	0,1
<i>Vanadium</i>	0,1

(Reeves et al., 1993)

AIN-93M memiliki kadar protein dan lemak yang rendah dan diberikan pada tikus yang tidak dalam kondisi khusus tertentu. AIN-93M dapat dibuat dari bahan-bahan yang tersedia dengan biaya yang wajar dan dapat diproduksi untuk berbagai aplikasi penelitian (Reeves *et al.*, 1993). Berikut ini adalah modifikasi diet Normal AIN-93M:

Tabel 2.7. Komposisi Diet Normal Modifikasi AIN-93M

Nama bahan	g/kg
Pati jagung	660
Sukrosa	80
Minyak kedelai	50
Gelatin	80
Kasein	80
Mineral mix	35
Vitamin mix	10
Nilai gizi	
Karbohidrat : 77,6% total energi	
Lemak : 11,21% total energi	
Protein : 8,06% total energi	
Densitas energi : 3,2 kkal/g	

(Hasil Analisa Uji Proksimat di THP FTP Universitas Brawijaya, 2014)

2.8 Diet Aterogenik

Diet aterogenik adalah diet yang digunakan untuk menginduksi terjadinya aterosklerosis pada hewan coba sehingga dapat digunakan sebagai model untuk memperoleh pemahaman yang lebih dalam mengenai penyakit aterosklerosis dan pengujian alternatif terapi untuk menyembuhkan penyakit tersebut (Pellizzon, 2008). Diet aterogenik terdiri dari *high fat diet* dengan ditambahkan kolesterol serta asam kolat. *High fat diet* yang digunakan dalam penelitian laboratorium umumnya mengandung sekitar 32-60% kalori dari lemak. Dari sudut pandang nutrisi, diet manusia 60% kilokalori dari lemak bisa dianggap sangat tinggi. Jenis lemak harus dipertimbangkan ketika memilih *high fat diet* selama

penelitian hewan coba. *High fat diet* yang digunakan dalam penelitian hewan coba laboratorium mengandung lebih banyak lemak jenuh seperti lemak babi, lemak sapi atau minyak kelapa (Gajda, 2008). Komposisi *high fat diet* dapat mengacu pada diet normal standar AIN-93M seperti dalam penelitian Handayani (2012). Modifikasi dilakukan dengan meningkatkan kandungan lemak dan mengurangi kandungan karbohidrat (Picchi *et al*, 2011). Komposisi diet aterogenik modifikasi AIN-93M dapat dilihat pada tabel 2.8 sebagai berikut :

Tabel 2.8. Komposisi Diet Aterogenik Modifikasi AIN-93M

Nama bahan	g/kg	Nilai gizi
Karbohidrat		Karbohidrat: 55,9 % total energi
Pati jagung	205	Lemak: 33,72 % total energi
Tepung terigu	205	Protein: 7,96 % total energi
Sukrosa	140	Densitas energi: 4,18 kkal/g
Lemak		
Korsvet	80	
Minyak Kelapa Murni	80	
Minyak kedelai	40	
Protein		
Gelatin	100	
Kasein	100	
Lainnya		
Mineral	35	
Vitamin	15	
Kolesterol	10	
Asam Kolat	3	

(Hasil Analisa Uji Proksimat di THP FTP Universitas Brawijaya, 2014)

Faktor makanan dengan mengkonsumsi terus menerus lemak jenuh dan kolesterol dalam jumlah tinggi, diyakini secara langsung berhubungan dengan hiperkolesterolemia dan kerentanan aterosklerosis (Asashina *et al.*, 2005 dalam Otunola *et al.*, 2010). Diet untuk menginduksi aterosklerosis tidak cukup dengan tinggi lemak dan kolesterol saja, tetapi harus ditambahkan dengan asam kolat. Jika hanya dengan diet tinggi

lemak dan kolesterol saja yang terjadi adalah peningkatan LDL dan juga HDL, hal ini kemungkinan asam kolat bertanggung jawab terhadap penurunan HDL (Srivastava *et al.*, 2000).

Komposisi kolesterol dan asam kolat dapat menggunakan penelitian yang dilakukan oleh Elbandy dan Ashoush (2007) yaitu masing-masing sebesar 1% dan 0,3% dari berat total diet. Dari penelitian tersebut secara signifikan dapat meningkatkan kadar kolesterol total dan LDL serta signifikan menurunkan HDL tikus yang diberi diet aterogenik dibandingkan dengan tikus diet normal.

Diet aterogenik yang mengandung tinggi lemak dan tinggi kolesterol akan menyebabkan peningkatan *saturated fatty acid*, selanjutnya akan menyebabkan peningkatan kolesterol, trigliserida (TG), VLDL, IDL dan LDL (Basit, 2007). Peningkatan kadar kolesterol juga dipicu karena adanya asam kolat dalam diet. Penambahan asam kolat menyebabkan terjadinya hiperkolesterolemia. Hal ini karena asam kolat memiliki efek memudahkan penyerapan lemak yang terkandung dalam *high fat diet* dan penyerapan kolesterol serta menghambat enzim kolesterol 7 - hydroxylase. Enzim kolesterol 7 -hydroxylase merupakan enzim yang berperan dalam merubah kolesterol menjadi asam empedu. Jika enzim ini dihambat maka yang terjadi adalah konversi kolesterol menjadi asam empedu menjadi terganggu sehingga terjadi peningkatan kadar kolesterol (Getz dan Reardon, 2005). Di dalam plasma kolesterol diangkut oleh LDL, sehingga jika kolesterol semakin tinggi maka kadar LDL juga akan tinggi selanjutnya terjadi penumpukan LDL. Penumpukan LDL dapat

membuatnya terjebak dalam intima yang semakin lama akan membentuk sel busa (Price dan Wilson, 2005).

