

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Penelitian

Penelitian merupakan suatu proses penyelidikan yang dilakukan secara sistematis yang ditujukan pada penyediaan informasi untuk menyelesaikan masalah-masalah (Cooper dan Emory, 1996). Sebagian penelitian kesehatan dapat dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo* (Komisi Nasional Etik Penelitian Kesehatan Departemen Kesehatan RI, 2006 dalam Ridwan, 2013).

Penelitian "*in vitro*" yaitu suatu penelitian yang dilakukan dengan bantuan mikroorganisme dalam lingkungan buatan misalnya seperti tabung reaksi dan cawan petri (Dorland, 2012). Tujuan dari penelitian *in vitro* yaitu penelitian yang dilakukan untuk menguji suatu penelitian yang belum pernah dilakukan/ penelitian awal (Komisi Nasional Etik Penelitian Kesehatan Departemen Kesehatan RI, 2006 dalam Ridwan, 2013). Kelebihan dari penelitian "*in vitro*" adalah pengujian secara *in vitro* menggunakan biakan sel memberikan kelebihan dibandingkan pengujian *in vivo* yaitu lebih ekonomis karena bahan uji yang dibutuhkan lebih sedikit, lebih aman, dan waktu pengujian relatif lebih singkat (Harahap dkk., 2006).

Penelitian "*in vivo*" yaitu suatu penelitian yang dilakukan dengan bantuan makhluk hidup atau biasanya disebut dengan hewan coba dalam lingkungan alami yang telah dikondisikan sesuai dengan tujuan penelitian (Dorland, 2012). Tujuan dari penelitian *in vivo* yaitu penelitian lanjutan yang dilakukan ketika hasil penelitian sebelumnya akan diaplikasikan atau dimanfaatkan untuk manusia sehingga harus diuji cobakan dengan menggunakan bahan hidup terlebih dahulu terhadap hewan coba (Komisi

Nasional Etik Penelitian Kesehatan Departemen Kesehatan RI, 2006 dalam Ridwan, 2013).

## 2.2 Hewan coba

Peneliti kesehatan harus melakukan penelitian secara “*in vivo*” (memanfaatkan hewan percobaan) terlebih dahulu sebelum diaplikasikan terhadap manusia (Komisi etik penelitian kesehatan, 2011 dalam Ridwan, 2013). Hal ini dikarenakan untuk mengevaluasi prosedur medis sebelum digunakan pada manusia.

Beberapa hewan coba yang biasanya digunakan sebagai hewan percobaan antara lain tikus, hamster, anjing, kucing, kelinci, domba, babi, ikan, katak, burung, dan primata lain yang bukan manusia. Hewan yang lebih dari 90% digunakan sebagai percobaan pada penelitian adalah tikus dan hewan pengerat lainnya. Hal ini dikarenakan hewan tersebut memiliki ukuran yang kecil, mudah penanganan dan perawatannya serta harganya tidak terlalu mahal selain itu tikus dan hewan pengerat lainnya juga memiliki sistem kerja tubuh yang menyerupai manusia (American Association for Laboratory Animal Science, 2003).

Menurut Robinson (1979) taksonomi dari tikus laboratorium sebagai berikut : kingdom : animal, filum : chordata, subfilum : vertebrata (craniata), kelas : mamalia, subkelas : theria, infrakelas : eutheria, ordo : rodentia, subordo : myomorpha, superfamili : muroidea, famili : muridae, subfamili : murinae, genus : *rattus*, spesies : *rattus sp* (Rita, 2001). Tikus yang banyak digunakan pada beberapa penelitian adalah tikus galur wistar. Hal ini dikarenakan tikus galur wistar lebih lincah daripada tikus galur yang lain sehingga efeknya akan lebih terlihat saat dilakukan intervensi. Di samping itu tikus yang berkelamin jantan tidak terpengaruh secara hormonal

dibandingkan dengan tikus betina. Hal ini terjadi karena pada tikus betina memiliki hormon esterogen yang memicu dalam kehamilan (Fridintya, 2011). Hewan coba yang akan digunakan dalam penelitian harus diperhatikan sesuai dengan prinsip etika pemanfaatan hewan coba (Bousfield, 2010 dalam Ridwan, 2013). Adapun data biologis dasar dari tikus wistar dapat dilihat pada tabel 2.1 dibawah ini

**Tabel 2.1 Data Biologis Dasar Tikus Wistar**

	Parameter nilai normal
<b>Jumlah kromosom</b>	42
<b>Umur (tahun)</b>	2 - 4
<b>Berat badan saat lahir (g)</b>	4,5-6
<b>Asupan makanan sehari-hari (g/100 g BB)</b>	10
<b>Asupan air harian (ml/100 g BB)</b>	10-15
<b>Buang air besar (g/24 jam)</b>	9-13
<b>Produksi urin (ml/24 jam)</b>	10-15
<b>Berat organ (dalam % Berat tubuh)</b>	
<b>Adrenal (single)</b>	0.02
<b>Darah</b>	5 - 7
<b>Otak</b>	1
<b>Jantung</b>	0.5
<b>Ginjal (single)</b>	0.5
<b>Hati</b>	3
<b>Paru-paru</b>	1
<b>Ovarium (single)</b>	0.05
<b>Limpa</b>	0.2
<b>Testis (single)</b>	0.5
<b>Kelenjar gondok</b>	0,005

(Koolhaas, 2010)

### 2.3 Prinsip etika

Pada setiap penelitian yang menggunakan hewan coba harus diperlakukan secara layak yaitu dengan menerapkan prinsip umum etika penelitian kesehatan dan prinsip 3R (Ridwan, 2013). Prinsip umum etika penelitian tercantum dalam *World Medical Association* yaitu *respect* (menghormati hak dan martabat makhluk hidup, kebebasan memilih dan berkeinginan, serta bertanggung jawab terhadap dirinya dan hewan coba), *beneficiary* (bermanfaat bagi manusia dan makhluk lain, manfaat yang didapatkan harus lebih besar dibandingkan dengan risiko yang diterima), dan *justice* (bersikap adil dalam memanfaatkan hewan percobaan) (World medical association declaration of helsinki, 2008 dalam Ridwan, 2013).

Prinsip 3R dalam protokol penelitian yaitu : *Replacement* (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), *Reduction* (pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal), dan *Refinement* (memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (*human*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian). Pada dasarnya prinsip *refinement* berarti membebaskan hewan coba dari beberapa kondisi (Bousfield, 2010 dalam Ridwan, 2013). Salah satunya yaitu bebas dari rasa lapar dan haus, dengan memberikan akses makanan dan air minum yang sesuai dengan jumlah yang memadai baik jumlah dan komposisi nutrisi untuk kesehatannya (Horwitz, 2000 dalam Ridwan, 2013).

## 2.4 Diet Normal Standar

*National Research Council* (1978) dan Weihe (1989) menyatakan bahwa ada dua jenis diet yang umum diberikan untuk tikus laboratorium yaitu diet untuk perkembangbiakan dan diet untuk pemeliharaan. Diet untuk perkembangbiakan yaitu diet yang mengandung protein dan energi dalam jumlah cukup untuk fetus selama kehamilan dan untuk produksi susu selama laktasi. Diet untuk pemeliharaan adalah diet yang distandarisasi sesuai dengan kondisi dan kebutuhan tikus (Rita, 2001).

Diet normal merupakan diet yang diberikan pada hewan coba secara homogen yang digunakan agar penelitian hewan coba tidak menimbulkan bias dan dapat berdampak sesuai dengan parameter penelitian yang akan diukur (Reeves *et al.*, 1993). Fungsi dari diet normal yaitu untuk menjaga organ pada tikus dalam keadaan sehat baik secara klinis, patologi anatomi, histopatologi, dan terhindar dari parasit. Sehingga hasil penelitian atau validitas penelitian tidak diragukan (Berata *dkk.*, 2010). Diet normal standar yang biasanya digunakan dalam penelitian antara lain berbahan dasar PAR-S (Widodo *dkk.*, 2006) dan AIN – 93 (Reeves *et al.*, 1993).

### 2.4.1 Diet Normal Standar PAR-S

PAR-S merupakan bahan pakan utama yang digunakan sebagai diet normal standar PAR-S. Hal ini dapat dilihat pada penelitian Widodo *dkk.*, 2006 yang menggunakan PAR-S sebagai bahan diet normal pada tabel 2.2 sebagai berikut

**Tabel 2.2 Komposisi diet normal standar PARS beserta nilai gizi (per 30 g)**

Nama bahan	Berat	Nilai gizi
Comfeed PAR-S	10,5 g	Karbohidrat 77,97%
Tepung terigu	19,5 g	Protein 15,68%
Air	40 ml	Lemak 6,33%
		Densitas energi sebesar 3,57 (1 g)

Sumber : Widodo *dkk.*, 2006

Adapun komposisi *Comfeed* PAR-S beserta bahan baku dapat dilihat pada tabel 2.3 sebagai berikut

**Tabel 2.3 Komposisi *Comfeed* PAR-S dalam berat bersih 50 kg**

Komposisi PAR-S	Persentase (%)	Bahan baku
Air	max 12%	Jagung, katul, pollard, DDGS,
Protein kasar	12-14%	rapeseed, copra meal, CPO,
Lemak kasar	Min 4%	biji batu, vitamin dan mineral
Serat kasar	Max 6%	
Abu	Max 7,5%	
Calcium	0,9 – 1,2%	
Phosphor	0,6 – 0,8%	

Sumber : PT. Wonokoyo Jaya Corporindo, Surabaya

Sumber karbohidrat yang terkandung dalam PAR-S yaitu jagung dan katul serta CPO. Jagung digunakan sebagai sumber energi dengan istilah energi metabolis. Kandungan energi metabolismenya tinggi yaitu sebesar 3430 kkal/ Kg. Kandungan lemak dalam jagung sekitar 3,5% yaitu tinggi kadar asam lemak linoleat, lemak umumnya mengandung energi 9 kalori/ g. Meskipun kandungan lemak relatif rendah, jenis asam lemak jagung berupa asam lemak tidak jenuh, terutama asam linoleat (C18:2). Disamping itu jagung mengandung kalsium dan fospor yang relatif rendah (Azrai, 2004). Jagung juga mengandung protein, namun protein tersebut agak rendah yaitu sekitar 9,4% dan mengandung serat kasar yang tergolong rendah yaitu sekitar 2%. Pada jagung kuning mengandung pigmen karoten yang disebut "xanthophyl". Pigmen ini memberikan warna kuning pada telur sehingga didapatkan telur yang bagus dan daging yang menarik, tidak pucat (Ash Shi Diqi, 2011).

Katul juga disebut bekatul merupakan hasil dari penggilingan padi selain itu dapat diperoleh dari jagung dan gandum. Bekatul adalah bagian terluar dari bagian bulir yang terbungkus oleh sekam. Bekatul memiliki kadar selulosa dan hemiselulosa yang tinggi. Kandungan karbohidrat bekatul

cukup tinggi yaitu 51 – 55 g/ 100 g, kandungan protein sebesar 11 – 13 g/ 100 g, kandungan lemak sebesar 10 – 20 g/ 100 g, bekatul juga kaya akan vitamin B kompleks dan vitamin E. Disamping itu, bekatul juga sebagai sumber mineral yaitu kalsium sebesar 500 – 700 mg dan fosfor 1.000 – 2.220 mg (Nugrahawati, 2011).

CPO merupakan bahan baku yang memiliki energi yang cukup tinggi yaitu berupa minyak. Jenis minyak sawit ini umumnya digunakan untuk pakan. Kandungan energi CPO mencapai 7800 Kkal (untuk ayam dewasa) (Tangendjaja, 2007).

Sumber lemak yang terdapat dalam PAR-S yaitu rapeseed. Rapeseed merupakan salah satu komposisi yang terdapat dalam formula pakan ayam broiler sebesar 2%. Kandungan gizi rapeseed meal terdiri dari protein kasar 42,8%, lemak kasar 12,1%, abu 7%, ekstrak ether 4,1%, ekstrak nitrogen-free 34% dan memiliki total energi 4300 kkal/kg (Bell, 1984).

Rapeseed merupakan lobak, minyak yang biasanya diperdagangkan dengan nama minyak kanola (*canola oil*). Minyak lobak telah diolah lebih lanjut untuk memperbaiki keseimbangan atau kondisi tingkat sterol dan ikatan jenuh yang lebih seimbang daripada minyak lainnya. Komposisi dasar *rapeseed* yaitu asam lemak jenuh 7%, asam lemak tak jenuh dengan satu ikatan rangkat 63%, asam lemak tak jenuh dengan banyak ikatan rangkap 30%. Kandungan lemak dalam *rapeseed oil* dalam 100 g yaitu sebesar 100 g. kandungan gizi rapeseed meal terdiri dari protein kasar 42,8%, lemak kasar 12,1%, abu 7%, ekstrak ether 4,1%, ekstrak nitrogen-free 34% dan memiliki total energi 4300 kkal/kg (Bell, 1984).

Sumber protein yang terdapat dalam PAR-S yaitu *copra meal* dan pollard. *Copra meal* merupakan produk yang dihasilkan oleh buah kelapa matang. Kandungan gizi *copra meal* meliputi protein minimal 18%, lemak

7%, serat 12%, kalsium 0,1% dan fosfor 0,5%. Kandungan protein di dalam copra meal memiliki kandungan lisin dan histidin yang rendah (Riverina, 2013).

Pollard merupakan limbah tepung terigu yang mempunyai potensi cukup besar sebagai pakan ternak yang mengandung tinggi protein. Di samping itu pollard juga memiliki kandungan nutrisi yang cukup tinggi yaitu 88,4% bahan kering, dan dalam 100% bahan kering nilai gizi yang terdapat dalam pollard adalah 17,0% protein kasar, 8,8% serat kasar, 5,1% lemak kasar, 45% bahan ekstrak tanpa nitrogen, dan 24,1% abu. Manfaat pollard yaitu meningkatkan kecukupan kebutuhan protein pada ternak (Siregar, 1994 dalam Arifin *et al.*, 2005).

Vitamin dan mineral yang terdapat dalam komposisi PAR-S berupa feed additive yang salah satu bahan utamanya adalah antibiotika. Antibiotika yang ditambahkan kedalam pakan memiliki tujuan tersendiri yaitu berperan dalam penambahan berat badan. Hal ini terjadi karena antibiotika dapat merangsang pembentukan vitamin B kompleks dalam saluran pencernaan oleh mikroba (Chopra dan Robert, 2001). Adapun dampak yang ditimbulkan akibat penggunaan antibiotika dalam pakan yaitu tertinggalnya residu antibiotika yang tinggi sehingga menyebabkan beresiko terhadap karsinogenik (Agustina *et al.*, 2009).

DDGS (*Distiller's Dried Grains with Solubles*) merupakan produk ikutan dari penggilingan kering dan industri etanol setelah etanol dan CO<sub>2</sub> dihilangkan. DDGS digunakan terutama untuk ruminan, namun sekarang lebih banyak digunakan untuk babi dan unggas. DDGS mengandung protein dan lemak relatif tinggi, masing-masing 27 % dan 9%, sehingga bisa dimanfaatkan sebagai sumber energi dan protein. Di samping itu, kandungan



fosfor tersedia juga relatif tinggi sehingga dapat menggantikan sebagian sumber fosfor untuk ternak (Tangendjaja, 2008).

PAR-S berfungsi sebagai pakan yang digunakan dalam fase *grower*. Di mana fase *grower* merupakan masa remaja atau fase yang dominan dalam pembentukan otot – otot tulang yang akan membentuk “*frame*” pada ayam yang mengandung protein sebesar 16 – 18% dengan level energi sebesar 2750 – 2800 Kkal. Pada fase *grower* diharapkan adanya peningkatan density asam amino (Ash Shi Diqi, 2011).

#### 2.4.2 Diet Normal Standar AIN - 93 M

AIN - 93 M direkomendasikan oleh *American Institute of Nutrition* (AIN). Perkembangan diet standart AIN (diet yang telah *distandardisas*) antara lain untuk tikus laboratorium yang diidentifikasi oleh *Ad Hoc Commitee* dengan membentuk *American Institute of Nutrition* (AIN) pada tahun 1973. Kemudian *committe* mengeluarkan AIN-76 untuk diet tikus pada tahun 1977. Tahun 1980 terdapat revisi menjadi AIN-76A, kemudian diadakan pertemuan dengan FASEB (*Federation of American Societies for Experimental Biology*) dan mendiskusikan tentang pedoman diet atau modifikasinya. Tahun 1987 terdapat dua formulasi diet yang terbaru, yang pertama adalah AIN-93 G yaitu merupakan suatu rekomendasi diet yang digunakan untuk mendukung pertumbuhan, kehamilan, dan fase menyusui, sedangkan yang kedua adalah AIN-93M mengandung diet rendah protein dan lemak yaitu suatu rekomendasi diet yang digunakan untuk perawatan/pemeliharaan tikus hingga dewasa. Lalu dikembangkan lagi menjadi formula AIN-93G-MX mengandung campuran mineral dan formula sedangkan AIN-93-VX mengandung campuran vitamin (Reeves *et al.*, 1993).

Komposisi diet normal standar AIN – 93 G dan AIN – 93 M beserta perkembangannya dengan nilai yang telah dibulatkan dapat dilihat pada tabel 2.4 sebagai berikut

**Tabel 2.4 Komposisi diet normal standar AIN – 93 G dan AIN – 93 M**

Komposisi	AIN – 93 G g/kg diet	AIN – 93 M g/kg diet
Cornstarch	397,5	465,7
Casein (>75% protein)	200,0	140,0
Dextrinized cornstarh (90-94% tetrasaccharides)	132,0	155,0
Sucrose	100,0	100,0
Soybean oil (no additive)	70,0	40,0
Fiber	50,0	50,0
Mineral mix (AIN – 93 G - MX)	35,0	35,0
Vitamin mix (AIN – 93 - VX)	10,0	10,0
L-Cystein	3,0	1,8
Choline Bitartrate (4,1 % choline)	2,5	2,5
Tert-butylhydroquinone	0,014	0,01

**Sumber :** Reeves *et al.*, 1993

Salah satu bahan yang digunakan pada komposisi AIN – 93 G dan AIN – 93 M antara lain Mineral mix (AIN – 93 G - MX) dan Vitamin mix (AIN – 93 VX). Komposisi yang terkandung dalam AIN – 93 G – MX dapat dilihat pada tabel 2.5 dan vitamin yang terkandung dalam AIN – 93 (AIN – 93 – VX) dapat dilihat pada tabel 2.6 sebagai berikut

**Tabel 2.5 Komposisi AIN – 93 G – MX**

Komposisi	Diet	
	AIN - 93 G mg/ Kg diet	AIN – 93 M mg/ Kg diet
<b>Essential mineral element</b>		
Calcium	5000,0	5000,0
Phosphorus	1561,0	1992,0
Potassium	3600,0	3600,0
Sulfur	300,0	300,0
Sodium	1019,0	1019,0
Chloride	1571,0	1571,0
Magnesium	507,0	507,0
Iron	35,0	35,0
Zinc	30,0	30,0
Manganese	10,0	10,0
Copper	6,0	6,0
Iodine	0,2	0,2
Molybdenum	0,15	0,15

Selenium	0,15	0,15
<b>Potentially beneficial mineral element</b>		
Silicon	5,0	5,0
Chromium	1,0	1,0
Fluoride	1,0	1,0
Nickel	0,5	0,5
Boron	0,5	0,5
Lithium	0,1	0,1
Vanadium	0,1	0,1

Sumber : Reeves *et al.*, 1993

**Tabel 2.6 Komposisi vitamin yang terkandung dalam AIN – 93**

Vitamin	10 g/ Kg diet
Nicotinic acid, mg	30
Pantothenate, mg	15
Pyridoxine, mg	6
Thiamin, mg	5
Riboflavin, mg	6
Folic acid, mg	2
Vitamin K, µg	750
D- Biotin, µg	200
Vitamin B 12, µg	25
Vitamin A, IU	4000
Vitamin D <sub>3</sub> , IU	1000
Vitamin E, IU	75

Sumber : Reeves *et al.*, 1993

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Handayani *et al* (2011) serta Handayani *et al* (2012) komposisi diet normal standar AIN – 93 M beserta nilai gizi tanpa mengubah anjuran persen makro nutrien per gram pakan dapat dilihat pada tabel 2.7 dibawah ini

**Tabel 2.7 Komposisi diet normal modifikasi standar AIN – 93 M beserta nilai gizi**

Nama bahan	g/Kg	Energi (Kkal)	Nilai gizi
Tepung jagung	620	72,4	KH 74% total energi
Sucrose	100	11,6	Lemak 9% total energi
Soybean oil	40	17,7	Protein 15% total
Gelatine	65	6,9	Densitas energi 3,9
Casein	80		Kkal/g
Bran (CMC)	50		
Mineral mix AIN	35		
Vitamin mix AIN	10		
Air			

Sumber : Handayani *et al*, 2011 ; Handayani *et al*, 2012

Sumber karbohidrat yang terkandung dalam AIN-93M adalah *cornstrach* dan sukrosa. Sebagian besar karbohidrat yang digunakan adalah dalam bentuk serat larut air (Reeves, 1997).

Sumber protein yang terkandung dalam AIN-93M adalah *casein*, *isolated soybean protein*, *egg white solid*, *lactalbumin* dan *wheat gluten*. Casein yang terdapat dalam AIN - 93 M memiliki kandungan *sulfur amino acid* yang terbatas khususnya *cystine/cysteine*. Untuk melengkapi komposisi asam amino, penambahan *L-cystein* sangat direkomendasikan (Reeves, 1997). Komposisi protein yang direkomendasikan adalah 140 g/kg *casein* dan 1,8 g/kg *L-cystein* dalam pakan (Reeves *et al.*, 1993).

Sumber lemak yang terkandung dalam AIN - 93 M adalah lemak esensial yaitu linoleic [18:2 (n-6)] dan linolenic [18:3 (n-3)]. Sumber lemak yang digunakan dalam AIN-93M yaitu minyak kedelai. Minyak kedelai mengandung sekitar 14% asam lemak jenuh, 23% asam lemak tak jenuh tunggal, 51% asam linoleic dan 7% asam linolenic. Dalam pembuatan pakan AIN - 93 M jumlah yang direkomendasikan pada minyak kedelai sebesar 40 gram per kg pakan. Minyak kedelai memiliki rasio (n-6) : (n-3) 7 dan rasio untuk PUFA : SAFA adalah 4 (Reeves, 1997). Penggunaan sumber lemak PUFA dalam AIN-93M direkomendasikan karena mengandung antioksidan. PUFA mengandung *Tertiary-butylhydroquinone (TBHQ)* yang berfungsi untuk mencegah terjadinya oksidasi. Rekomendasi penggunaan *Tertiary-butylhydroquinone (TBHQ)* dalam diet AIN-93M adalah 200 mg/kg minyak kedelai (Reeves, 1997).

Serat bermanfaat untuk mengatur mikroflora yang ada di dalam usus. Dalam AIN - 93 M mengandung 50 gr serat per kg diet (Reeves, 1997). *Mineral Mix* yang terdapat pada diet AIN - 93 M memiliki kandungan fosfor dan kandungan mangan yang rendah sehingga diberikan penambahan *trace*

dan *ultratrace elemen* seperti *molybdenum*, *boron*, *flouride*, *lithium*, *nikel*, *silikon*, dan *vanadium* (Reeves, 1997).

Pada AIN - 76 A rasio Ca : P sebesar 3 : 4, beberapa penelitian menduga bahwa rendahnya rasio kalsium (Ca) terhadap fosfor (P) merupakan salah satu penyebab terjadinya masalah kalsifikasi ginjal, sehingga pada AIN-93 rasio Ca : P ditingkatkan menjadi 1,3 : 1, untuk memecahkan masalah kalsifikasi ginjal, dilakukan beberapa perubahan pada diet AIN - 93 meliputi bentuk kalsium dan fosfor, serta jumlah fosfor. Jumlah garam kalsium dan fosfor dalam diet ditetapkan 5 g Ca/ Kg diet dan 1,56g P/ Kg diet. Dengan kasein 200 g/ Kg diet, konsentrasi fosfor meningkat menjadi 1,44 g/ kg diet, sehingga total konsentrasi fosfor dalam diet AIN-93M adalah 1992 mg per kg diet (Reeves, 1997).

Jumlah manganese yang terkandung dalam AIN - 93 adalah sebesar 10 mg per kg diet. Pada diet AIN – 76 A jumlah mangan yang terkandung lebih tinggi dari AIN - 93 yaitu 50 mg Mn/ kg diet. Pada AIN - 93 komposisi mangan diturunkan karena kurang dari 1/ 10 jumlah 50 mg Mn/ Kg memberikan efek yang baik untuk pertumbuhan serta tidak menyebabkan defisiensi mangan pada tikus (Reeves, 1997).

Selenium yang ditambahkan pada AIN – 76 A adalah 0,1 mg/kg dalam bentuk selenite. Kebutuhan minimal selenium berdasarkan dari kedua hasil pengukuran tersebut adalah 0.1 mg/ Kg diet. Berdasarkan penelitian, 0,15 mg Se/ Kg diet adalah jumlah yang direkomendasikan untuk AIN-93. Namun, karena *casein* dan *L-Cystein* juga mengandung selenium, maka total selenium yang terkandung dalam AIN-93 adalah 0,18 mg Se/ Kg. Sedangkan bentuk selenium yang direkomendasikan adalah selenate (NRC, 1978).

Molybdenum merupakan komponen utama dari *xantin/dehidrogenase*, *aldehid oksidase*, dan *sulfinit oksidase*. Dalam AIN-93, Molybdenum yang direkomendasikan adalah 0,15 mg/kg (Reeves, 1997).

Penambahan beberapa *ultratrace element* antara lain *chromium*, *flouride*, *boron*, *vanadium*, *arsenic*, *nickel*, *lithium*, dan *tin* serta *silicon* direkomendasikan pada formulasi diet yang baru. Konsumsi yang terlampau rendah pada beberapa *ultratrace element* tersebut menyebabkan efek negatif terhadap pertumbuhan, kemampuan bereproduksi dan beberapa karakteristik psikologis lainnya dalam beberapa jenis hewan (Reeves, 1997).

## 2.5 Jaringan lemak (*Adipose Tissue*) secara umum

Jaringan adiposa diklasifikasikan menjadi dua tipe yaitu : jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) atau dikenal dengan BAT dan jaringan lemak putih (*White Adipose Tissue*) atau dikenal dengan WAT. Jaringan tersebut memiliki perbedaan karakteristik antara lain letak anatomi, struktur morfologi fungsi dan regulasi. Disebut jaringan karena dapat menyimpan jumlah lemak di kedua tipe tersebut (Casteilla *et al.*, 2012). Pembentukan jaringan *adiposa* dan *secret "adipokines"* misalnya seperti *leptin*, *adiponectin*, *resistin*, *proinflammator cytokines* (contohnya : *Tumor Necrosis Factor* (TNF  $\alpha$ ) dan interleukin) akan melibatkan koagulasi protein dan fungsi vaskular (Fantuzzi dan Mazzone, 2007). Manfaat dari jaringan lemak yaitu berperan aktif pada *homeostasis energy*, mengontrol *neuroendocrin*, *autonomic*, serta fungsi imun (Fantuzzi dan Mazzone, 2007). Perbedaan antara *White Adipose Tissue* (WAT) dan *Brown Adipose Tissue* (BAT) dapat dilihat pada tabel 2.8 dibawah ini.

Tabel 2.8 Perbedaan *Adipose Tissue* (WAT dan BAT)

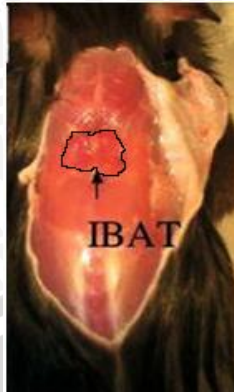
Perbedaan	WAT	BAT
<b>Sumber lokasi</b>	Inguinal, retroperitoneal, gonadal	Interscapular, perirenal, axillary
<b>Warna</b>	Kuning	Coklat
<b>Sistem vaskular</b>	++	+++
<b>Innervation</b>	Sympathetic (++)	Sympathetic (+++)
<b>Sel lemak</b>	Sel unilocular	Sel multilocular
<b>Fungsi</b>	Menyimpan energi dalam bentuk trigliserida Pelepasan asam lemak dan glyserol di jaringan	Menyimpan energi dalam bentuk trigliserida Produksi panas
<b>Mitochondria</b>	+	+++

Sumber : Casteilla *et al.*, 2012

## 2.6 Jaringan Lemak Coklat (*Brown Adipose Tissue*)

### 2.6.1 Letak Anatomi Jaringan Lemak Coklat (*Brown Adipose Tissue*)

Pada tikus, jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) ditemukan di beberapa lokasi anatomi yang berbeda, termasuk subkutan, intraperitoneal dan intrathoracic. Sumber subkutan dapat ditemukan di interscapular dan subscapular, dorsal serviks, suprasternal, dan daerah aksilaris. Jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) bersama-sama mengelilingi bagian tubuh yang berfungsi memanaskan tubuh (Heldmaier dan Neuweiler, 2004 dalam Klingenspor dan Toblas, 2012). Sumber Intraperitoneal terutama ditemukan di sekitar ginjal dan adrenal (perirenal dan suprarenalis), dan sumber intrathoracic sebagian besar/utama mengelilingi mediastinum pembuluh darah, jantung, trakea, esofagus, dan aorta (Klingenspor dan Toblas, 2012). Namun sumber utama jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) yang paling banyak dan mudah untuk dilihat pada tikus *Rattus Novergicus galur Wistar* jantan yaitu terdapat di daerah interscapular (lihat gambar 2.1).



**Gambar 2.1 Interscapular Brown Adipose Tissue (BAT)**

**(Kyparos et al., 2006)**

### **2.6.2 Ciri Khas Jaringan Lemak Coklat (*Brown Adipose Tissue*)**

Ciri khas jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) yaitu warna coklat yang khas pada jaringan lemak tersebut. Pengembangan dan kuantitas jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) berhubungan dengan tingkat pembentukan suhu panas yang dibutuhkan oleh organisme untuk mempertahankan suhu tubuh. Hal ini terjadi dikarenakan keseimbangan antara panas yang dihasilkan oleh massa tubuh metabolik dan kehilangan panas, yang berkorelasi dengan permukaan tubuh dan kecukupan isolasi. Dengan bertambahnya usia, tingkat kehilangan panas per unit dapat menurun karena berat badan, sehingga jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) menjadi tidak bisa dibedakan dari jaringan lemak putih (*White Adipose Tissue*) (Klingenspor dan Toblas, 2012). Jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) banyak terkandung mitokondria yang memberikan warna coklat pada jaringan. Hal ini ditandai oleh jumlah lipid yang kecil (*multilocular cell*). Tipe *cross-sections* pada jaringan lemak sering terjadi secara bertahap yaitu memudar dari coklat berubah menjadi putih. Pada jumlah jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) lebih sedikit dibandingkan dengan jaringan lemak putih



(*White Adipose Tissue*). Hal ini sulit untuk menggambarkan sebuah perbatasan yang jelas antara keduanya. Beberapa sumber yang biasanya dianggap sebagai jaringan lemak putih (*White Adipose Tissue*) mengandung beberapa hasil jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) dan sebaliknya, jaringan lemak putih dapat ditemukan dalam sumber jaringan lemak coklat. Selain itu, sebagian kecil sel BAT memiliki sifat yang tidak stabil dan dapat diubah oleh suhu atau selama proses pembangunan. Misalnya pada tikus, sumber lemak retroperitoneal terjadi perubahan penampilan dari jaringan lemak putih (*White Adipose Tissue*) menjadi jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) dan menjadi jaringan lemak putih kembali selama minggu pertama kehidupan (Xue *et al.*, 2007 dalam Klingenspor *et al.*, 2012). Disamping itu apabila selama terpapar dingin serat parenkim noradrenergik akan meningkatkan jumlah jaringan lemak coklat pada beberapa organ (Fantuzzi dan Mazzone, 2007).

### 2.6.3 Manfaat Jaringan Lemak Coklat (*Brown Adipose Tissue*)

Manfaat jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) yaitu memainkan peranan penting dalam regulasi suhu tubuh saat berhibernasi pada mamalia kecil dan bayi baru lahir (Casteilla *et al.*, 2012). Prinsip sederhana *thermophysiological* pada jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) menyatakan bahwa suhu tubuh hanya dapat dipertahankan pada tingkat konstan (tingkat disipasi/ penyerapan panas sama dengan tingkat kehilangan panas). Tingkat kehilangan panas tergantung pada dua variabel tubuh yaitu (1) *konduktansi termal* (penghantaran panas) dan (2) perbedaan antara tubuh dan suhu ruangan (Klingenspor dan Toblas, 2012). Di zona suhu netral dapat dipengaruhi oleh laju metabolisme basal (panas cukup untuk mempertahankan suhu tubuh). Di zona ini yaitu sekitar 30<sup>0</sup> C untuk

tikus dan laki-laki, penyesuaian fisik pada penghantaran panas yang cukup dan tingkat kehilangan panas agak rendah. Ketika pindah ke lingkungan yang dingin, maka kehilangan panas menjadi meningkat sehingga mengakibatkan penurunan suhu tubuh. Dua strategi yang terjadi dalam tubuh secara teratur yaitu menghilangkan panas dan penyerapan panas digunakan untuk mencegah penurunan suhu secara berkelanjutan (hipotermia pada suhu rendah/ keadaan dingin yang mengancam kehidupan). Jika penghantaran suhu tubuh menurun dan menjadi minimum, maka mekanisme kimia dalam pengaturan suhu tubuh diaktifkan (Scholander *et al.*, 1950 dalam Klingenspor *et al.*, 2012). Mekanisme yang mendasari suhu pada umumnya dikategorikan sebagai pembentukan suhu dingin dan panas. Pada saat suhu dingin, serat otot antagonis berkontraksi kuat tanpa kerja yang efisien secara berkelanjutan sehingga menyebabkan peningkatan omset ATP myofibrilar dan dengan demikian panas dihasilkan. Pembentukan suhu panas terjadi di jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*), organ pemanas unik yang hanya ditemukan pada mamalia (Klingenspor dan Toblas, 2012).

#### **2.6.4 Sifat Jaringan Lemak Coklat (*Brown Adipose Tissue*)**

Sifat jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) tidak stabil dan dapat diubah oleh suhu (Klingenspor dan Toblas, 2012). Selain itu jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) juga memiliki sifat plastisitas. Plastisitas adalah istilah yang digunakan untuk menunjukkan bahwa beberapa sumber jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) mampu mengkonversi dari satu jenis *Adipose Tissue* ke jenis *Adipose Tissue* yang lain yaitu perubahan atau transformasi jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue*) ke jaringan lemak putih (*White Adipose Tissue*) (Casteilla *et al.*, 2012). Ketika BAT tidak dirangsang, maka BAT akan berubah menjadi WAT,

dimana jaringan lemak putih (WAT) disusun oleh *unilocular cell*. Mekanisme perubahan tersebut terjadi secara bertahap yaitu dari karakteristik coklat (BAT) menjadi karakteristik putih (WAT), termasuk transformasi khas mitokondria coklat (UCP 1 yaitu protein mitokondria yang memiliki fungsi sebagai ekspresi sel secara spesifik yang berada di membran dalam mitokondria) menjadi mitokondria putih. Fenomena ini disertai dengan perubahan pasokan pembuluh darah dan saraf. *Transdifferentiation* morfologi ini (perubahan konversi BAT menjadi WAT) disertai dengan penghambatan gen UCP1 dan aktivasi gen leptin. *Transdifferentiation* bersifat *reversible* (dapat kembali) (Klingenspor dan Toblas, 2012).

Persentase relatif variabel lemak putih dan coklat pada organ adalah tergantung pada ketegangan/tingkat stres, usia, jenis kelamin dan kondisi lingkungan serta gizi. Plastisitas dapat terlihat jelas ketika membandingkan organ hewan dewasa yang dipertahankan pada suhu kamar (20 – 25 °C) dan pada hewan yang menyesuaikan diri dari dingin. Dengan pengamatan terlihat jelas bahwa daerah organ putih pada suhu kamar berubah menjadi area kecoklatan pada hewan yang menyesuaikan diri dari lingkungan yang dingin (Cinti, 2006). Berikut ini adalah perbedaan *Brown Adipose Tissue* (BAT) pada *rat/ mice* dan manusia dapat dilihat pada tabel 2.9 dibawah ini.

**Tabel 2.9 Perbedaan *Brown Adipose Tissue* (BAT) pada *rat/ mice* dan manusia**

	Rats and mice	Humans
Location of fat pad :		
Interscapular	+	-
Periovarian	+	-
Epididymal	+	-
Persistence of brown fat in adults	+++	+/-
Convertible features	Mice > rats	
BAT → WAT	+	+++
WAT → BAT	+++	?

ADSC plasticity	Ing > PO > RP > Ep	
Main site of lipogenesis	AT	Liver
Glucose transport sensitive to insulin	+++	+

Ing, inguinal; PO, periovarian; RP retroperitoneal; Ep epididymal

Sumber : Casteilla *et al.*, 2012

### 2.6.5 Faktor- Faktor yang Mempengaruhi Jaringan Lemak Coklat (*Brown Adipose Tissue*)

Faktor – faktor yang mempengaruhi sel *Brown Adiposa Tissue* (BAT) yaitu fisiologis (paparan dingin, pengembangan, siklus laktasi gestation), kondisi patofisiologi dan latar belakang genetik (Casteilla *et al.*, 2012), usia (Klingenspor dan Toblas, 2012), berat badan (Lowel dan Flier, 1997), obesitas, jenis kelamin, temperatur lingkungan (pada suhu 20-25<sup>0</sup>C), status gizi (Cinti, 2006).

