

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Aterosklerosis

##### 2.1.1 Definisi

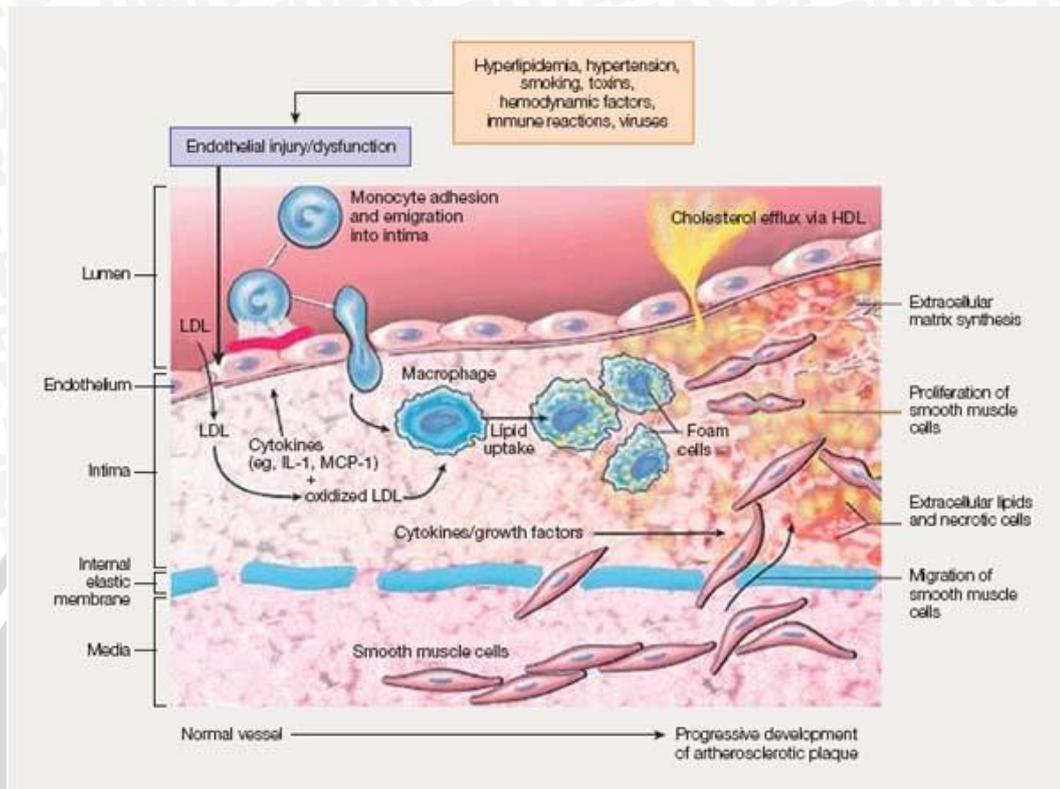
Aterosklerosis merupakan penyakit kronis progresif dengan karakteristik berupa penebalan dan kekakuan dinding pembuluh darah akibat penumpukan lemak intraseluler dan ekstraseluler, serta akumulasi jaringan fibrosa di dalam arteri yang menimbulkan respon inflamasi (Hidayat, 2013). Plak aterosklerosis yang terbentuk akan berkembang menjadi lesi yang semakin progresif sehingga merangsang terjadinya penyumbatan pembuluh darah dan menyebabkan infark pada bagian organ yang disuplai arteri yang bersangkutan (Kumar, 2012). Bila aterosklerosis ini terjadi pada arteri yang mensuplai darah ke otak maka dapat menimbulkan stroke, dan bila terjadi pada coronaria dapat menimbulkan penyakit jantung iskemia yang dapat menyebabkan kematian (Lumongga, 2007)

##### 2.1.2 Patofisiologi Aterosklerosis

Patogenesis aterosklerosis diawali dari disfungsi endotel pembuluh darah akibat hiperlipidemia, hipertensi, paparan radikal bebas, infeksi dan hiperkolesterolemia yang akan menyebabkan peningkatan permeabilitas, adhesi leukosit dan trombosis dari pembuluh darah (Kumar, 2012). Proses tersebut akan menyebabkan akumulasi dari lipoprotein, yang kemudian diikuti oleh oksidasi LDL dilapisan intima pembuluh darah (Hidayat, 2013).

Peningkatan oksidasi LDL akan diikuti disfungsi endotel dan respon inflamasi dan akan mengalami beberapa tahapan yaitu (1) terjadi peradangan dan penurunan kemampuan sintesis antitrombotik dan vasodilator dalam jumlah normal, (2) pengeluaran sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-1(IL-1), *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan lain-lain, (3) pengeluaran faktor pertumbuhan seperti Angiotensin II, *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), yang menstimulasi migrasi dan proliferasi otot polos dipembuluh darah yang terpapar, (4) penempelan monosit di endotel yang terpapar yang selanjutnya akan bermigrasi ke dalam lapisan intima dan bertransformasi menjadi makrofag dan *foam cell* (Su, 2009).

LDL yang mengalami oksidasi akan terfagositosis oleh makrofag dan selanjutnya akan berkembang menjadi sel foam. Sel foam yang terbentuk akan memicu inflamasi lebih lanjut, stres oksidatif, produksi sitokin, kemokin dan faktor pertumbuhan yang mempengaruhi keseimbangan endotel yang dapat menyebabkan disfungsi pembuluh darah lebih lanjut (Hidayat, 2013). Faktor pertumbuhan yang dihasilkan akan menginduksi proliferasi dari sel otot polos ke dalam tunika intima yang akan mensekresikan matriks ekstraseluler berupa proteoglikan dan kolagen yang akan merangkap oksidasi LDL dan sel makrofag sehingga terdeposisi di dalam jaringan (Kumar, 2005). Patogenesis aterosklerosis dapat digambarkan dalam diagram skematik berikut (Gambar 2.1)



**Gambar 2.1 Diagram Skematik Patogenesis Aterosklerosis**  
(Kumar, 2005)

Patogenesis aterosklerosis yang digambarkan pada Gambar 2.1 menjelaskan bahwa hiperlipidemia dan faktor risiko lain yang diduga menyebabkan kerusakan endotel, mengakibatkan adhesi pada trombosit dan monosit serta pelepasan faktor pertumbuhan yang termasuk PDGF yang menyebabkan lancarnya migrasi sel otot dan proliferasi. Plak sel busa dari atheroma didapatkan dari kedua makrofag dan sel otot polos dari makrofag melalui reseptor *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) dan perubahan LDL dikenali oleh reseptor *scavenger* (LDL teroksidasi), dan untuk mekanisme dari sel otot polos masih belum jelas. Lipid ekstraseluler berasal dari akumulasi lipid dari lumen pembuluh darah, terutama pada hiperkolesterolemia dan juga dari degenerasi sel busa. Akumulasi kolesterol

pada plak menggambarkan adanya ketidak seimbangan antara pemasukan dan pengeluarannya, dan HDL cenderung membantu menghapuskan kolesterol dari akumulasi tersebut. Sel otot polos bermigrasi ke intima, berkembang biak dan menghasilkan matriks ekstraseluler termasuk kolagen dan proteoglikan (Kumar, 2005).

### 2.1.3 Faktor Risiko Aterosklerosis

Faktor risiko yang dapat menimbulkan aterosklerosis, sebagai berikut:

#### 1) Genetik

Riwayat keluarga merupakan faktor risiko dari aterosklerosis. Gangguan genetik yang berhubungan erat dengan aterosklerosis seperti hiperkolesterolemia pada beberapa kasus, sedangkan kebanyakan risiko aterosklerosis timbul akibat dari hipertensi dan diabetes (Kumar, 2012).

#### 2) Usia

Aterosklerosis biasanya akan tetap stabil sampai lesi berkembang secara progresif pada usia pertengahan atau akhir. Kejadian infark miokard meningkat lima kali lipat pada usia 40 sampai 60 tahun (Kumar, 2012).

#### 3) Gender

Wanita premenopause relatif jarang mengalami risiko terjadinya aterosklerosis dibandingkan laki-laki seusianya. Hal ini dikarenakan pada wanita premenopause tidak memiliki faktor predisposisi lain seperti diabetes, hiperlipidemia atau hipertensi berat. Tetapi ketika sudah mengalami menopause, risiko dari aterosklerosis ini dapat meningkat bahkan melebihi laki-laki (Kumar, 2012).

#### 4) Hiperkolesterolemia

Hiperkolesterolemia dihubungkan dengan adanya plak aterosklerosis yang mengandung lemak yang kaya kolesterol dan ester kolesterol yang telah terbukti berasal dari kolesterol darah dan diet yang banyak mengandung kolesterol dapat meningkatkan level kolesterol plasma (Lumongga, 2007).

#### 5) Hipertensi

Dalam sebuah penelitian dibuktikan bahwa peningkatan darah sistolik ( $>140$  mmHg) dan diastolik ( $>90$  mmHg) merangsang peningkatan risiko aterosklerosis. Risiko dapat meningkat sejalan dengan derajat keparahan dari hipertensi (Lumongga, 2007). Selain itu, hipertensi dipengaruhi oleh usia dan aktivitas fisik. Pada individu usia 45-62 tahun dengan tekanan darah  $> 169/95$  mmHg mempunyai risiko 5 kali lebih besar menderita *Ischemic Heart Disease* (IHD) (Kumar, 2003).

#### 6) Merokok

Terdapat hubungan antara merokok dengan terjadinya komplikasi aterosklerosis yaitu *ischemic heart disease*. Risiko dapat menurun setelah melakukan penghentian merokok (Lumongga, 2007).

#### 7) Diabetes Mellitus

Kelainan Diabetes mellitus ini dapat menimbulkan kelainan aterosklerosis pada umur dini dan mempercepat progresivitasnya. Diabetes dapat mengakibatkan peningkatan kadar lemak darah yang selanjutnya akan menimbulkan aterosklerosis (Lumongga, 2007).

#### 8) Aktifitas fisik

Orang yang tidak aktif sedikitnya dua kali lebih besar ditemukannya penyakit jantung koroner dari pada orang yang aktif. Sedikit aktifitas fisik dapat memperburuk faktor risiko lainnya seperti tinggi kolesterol dalam darah dan trigliserida, hipertensi, diabetes mellitus dan obesitas (Rahman, 2012).

#### 9) Obesitas

Lebih dari dua per tiga orang Amerika dewasa mengalami *overweight* dan hampir sepertiga tersebut obesitas. Hasil penelitian membuktikan bahwa terdapat hubungan erat antara obesitas dengan risiko terjadinya penyakit kardiovaskuler yang tergolong dalam sindroma metabolik yaitu diabetes mellitus, toleransi glukosa terganggu, hipertensi, dan dislipidemia (Rahman, 2012).

### 2.2. Obesitas

Obesitas merupakan akumulasi lemak yang berlebihan atau abnormal yang dapat mengganggu kesehatan (WHO, 2006). Obesitas merupakan faktor risiko terjadinya diabetes, hipertensi dan aterosklerosis (Djati *et al.*, 2010). Keadaan ini terjadi akibat perilaku makan yang kurang tepat, aktifitas fisik yang kurang dan faktor genetik. Pada orang yang mengkonsumsi makanan tinggi lemak dan kurang melakukan aktifitas fisik atau jarang berolahraga maka akan cenderung mengalami obesitas karena tidak adanya keseimbangan antara asupan yang masuk dan energi yang keluar (Sudiarto, 2012). Selain itu, faktor genetik dalam kejadian obesitas

telah terbukti dari adanya risiko obesitas sebesar dua sampai tiga kali lebih tinggi pada orang dengan riwayat keluarga obesitas (Hidayat, 2013).

Dengan adanya hubungan genetik dengan obesitas ditemukan adanya hormon leptin, yang dikenal sebagai pengontrol nafsu makan serta pengatur proses pembakaran lemak pada tubuh (Hidayat, 2013). Dari hasil penelitian dijelaskan bahwa penderita obesitas memiliki kadar plasma leptin yang tinggi dalam darah yang disebabkan oleh penumpukan sel adiposit penghasil leptin. Jaringan adiposit ini bertindak sebagai pemicu proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6, leptin resisten, dan CRP yang dapat menginduksi terjadinya disfungsi endotel, resistensi insulin dan aterosklerosis (Djati *et al.*, 2010).

Selain itu, obesitas dapat mempercepat terjadinya penyakit jantung koroner dengan beberapa mekanisme seperti (1) mengakibatkan terjadinya perubahan lipid darah yaitu peningkatan kadar kolesterol darah, peningkatan LDL dan penurunan kadar HDL, (2) mengakibatkan terjadinya hipertensi yang terjadi akibat penambahan volume darah, peningkatan renin, peningkatan kadar aldosteron, meningkatkan tekanan pembuluh darah sistemik dan penekanan mekanisme oleh lemak pada dinding pembuluh darah, (3) menjadi salah satu pemicu aterosklerosis dengan meningkatkan ukuran plak yang dapat menyebabkan penyempitan lumen pembuluh darah sehingga menghambat aliran darah (Hidayat, 2013).

### 2.3. Leptin

#### 2.3.1 Definisi Leptin

Leptin berasal dari bahasa Yunani, *leptos* yang artinya kurus. Definisi secara ilmiah, leptin merupakan hormon atau protein yang memiliki berat 16kDa yang berpengaruh terhadap regulasi berat badan, metabolisme dan reproduksi. Leptin diproduksi oleh sel adiposit yang dikodekan oleh gen *Ob*, yang mana sel adiposit dapat menunjukkan total sel lemak dalam tubuh (Sudiarto, 2012). Reseptor leptin banyak terdapat di area hipotalamus yang diketahui berperan penting dalam regulasi berat badan (Sudiarto, 2012). Selain itu, reseptor leptin dapat ditemukan di jaringan adipose, jantung dan testis (Indra, 2006).

Leptin disekresikan oleh sel lemak sesuai dengan jumlah trigliserida yang disimpan. Dalam jangka panjang kelebihan asupan energi akan menyebabkan peningkatan deposit lemak yang akan merangsang peningkatan sekresi leptin (Sulastri, 2010). Leptin disekresikan secara berkala dan memiliki variasi diurnal, konsentrasi leptin tinggi pada malam hari hingga pagi hari, hal ini dikaitkan dengan adanya penekanan nafsu makan saat tidur (Sinha *et al.*, 1996). Jumlah leptin yang tersirkulasi dalam darah sekitar 5-15 ng/mL pada orang normal atau kurus (Limanan *et al.*, 2013), sedangkan kadar leptin yang tersirkulasi pada serum tikus bervariasi dalam kisaran 1-75 ng/mL (Stromgren *et al.*, 2004). Pada penelitian Leibowitz *et al.* (2006), kadar leptin serum tikus sebelum diberikan *High Fat Meal* (HFM) memiliki kisaran 2,6 -3,4 ng/mL, sedangkan setelah diberikan HFM memiliki kadar leptin rendah dengan kisaran 2-5 ng/mL yang diprediksi memiliki jumlah akumulasi lemak tubuh yang rendah

(16-26 g) dan kadar leptin tinggi dengan kisaran 6-9 ng/mL yang diprediksi memiliki jumlah akumulasi lemak tubuh yang besar (30-44 g) pada diet tinggi lemak kronis sebesar 50%. Pada penelitian lain, kadar leptin serum tikus laki-laki *Zucker Fatty Rats* (ZFR) adalah 20-40 ng/mL dengan usia 10-36 minggu (Wang *et al.*, 2014). Ekspresi leptin meningkat terjadi setelah makan dan adanya insulin, glukokortikoid, endotoksin dan sitokin. Jika ekspresi leptin menurun terjadi ketika keadaan lapar dan adanya testosteron, hormon tiroid dan suhu rendah (Limanan, 2013).

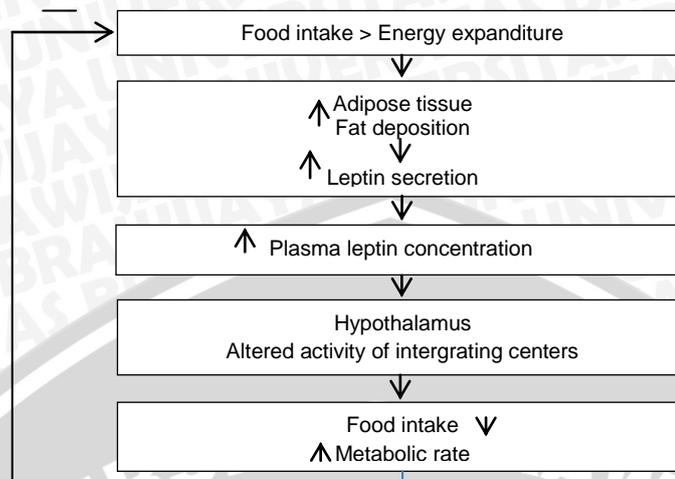
Asupan kronis diet tinggi lemak dapat menyebabkan leptin resisten dan menjadi obesitas pada tikus. Hal ini dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh kelompok *Flier* yang memberi makan tikus normal dengan diet *Western type* yang mengandung 40% kalori sebagai lemak selama 12 minggu, dimana tikus betina yang diberikan diet tinggi lemak mengalami peningkatan massa lemak tubuh dari 2,3 gram menjadi 6,1 gram dan kadar leptin plasma meningkat 2,6 kali (Sulastrri, 2010). Efek tersebut bahkan terlihat lebih jelas pada tikus dengan transgene yang menginduksi kerusakan *brown adipose tissue* (BAT). Tikus yang defisiensi BAT menjadi obesitas dan memiliki kadar leptin tinggi, yang akan meningkat sangat tinggi oleh diet tinggi lemak. Salah satu kerja leptin adalah termogenesis, yang terganggu pada tikus defisiensi BAT sehingga tikus tidak sensitif terhadap leptin dan produksi hormon tersebut berlebihan, ini merupakan efek buruk yang ditimbulkan oleh diet tinggi lemak (Sulastrri, 2010).

Peran leptin pada *white adipose tissue* (WAT) juga penting dalam modulasi metabolisme adiposit, mengatur oksidasi lemak dan penurunan lipolisis. Pada hasil penelitian Priego *et al.* (2009), menunjukkan bahwa

asupan kronis dari diet tinggi lemak mengakibatkan perubahan tingkat ekspresi OB-R (reseptor transmembran) di WAT yang berbeda tergantung letak simpanan lemak (*retroperitoneal*, *mesenteric*, dan *inguinal*) dan jenis kelamin. Pada *retroperitoneal*, diet tinggi lemak mengakibatkan penurunan yang signifikan terhadap tingkat ekspresi OB-R sehingga mengakibatkan terjadinya resistensi leptin, hal ini terlihat jelas pada tikus jantan dibandingkan tikus betina. Pada simpanan *mesenteric*, dampak pemberian diet tinggi lemak mengalami penurunan tingkat ekspresi OB-R (penurunan sensitivitas leptin) pada tikus jantan, sedangkan pada tikus betina mengalami peningkatan tingkat ekspresi OB-R. Pada *inguinal*, tingkat ekspresi OB-R tidak dipengaruhi oleh diet tinggi lemak. Penurunan tingkat ekspresi OB-R pada simpanan lemak internal tikus jantan dengan diet tinggi lemak, dapat mengakibatkan penurunan sensitivitas pada reseptor leptin (Priego *et al.*, 2009).

### 2.3.2 Mekanisme Kerja Leptin

Leptin yang dihasilkan oleh adiposit bekerja di hipotalamus untuk menurunkan nafsu makan dengan cara menghambat pengeluaran neuropeptide Y (neurotransmitter hipotalamus yang menstimulasi nafsu makan). Leptin juga menstimulasi *metabolic rate* yang berperan penting dalam pengaturan pengeluaran energi, kemudian terjadi *negative feedback* untuk menjaga agar total energi tubuh tetap konstan dengan cara memberikan informasi ke otak berapa jumlah lemak yang harus disimpan (Widmaier *et al.*, 2006), yang digambarkan pada Gambar 2.2.



**Gambar 2.2 Mekanisme Leptin dalam Mengatur Penyimpanan Energi Total Tubuh**

*(Widmaier et al., 2006)*

Leptin memberi banyak efek pada hipotalamus seperti terjadi penurunan sekresi steroid dan hormon tiroid dan juga peningkatan sekresi adrenal glucocorticoid selama puasa. Dari uraian tersebut, leptin berpengaruh terhadap sistem reproduksi, efek terhadap hormon tiroid menunjukkan bahwa leptin meningkatkan penggunaan energi dan dapat menstimulasi *gluconeogenesis* (Widmaier et al., 2006).

Meskipun leptin berefek mengurangi nafsu makan, pada orang obesitas efek tersebut tidak ditemukan karena telah terjadi resistensi terhadap leptin. Selain itu, tidak adanya keseimbangan antara pemasukan dan pengeluaran energi dapat meningkatkan obesitas. Dimana pemakaian energi jauh lebih rendah dibandingkan dengan pemasukannya. Adanya konsentrasi leptin yang tinggi pada lemak yang berlebihan menjadikan pengurangan sensitifitas pada leptin (resistensi leptin) (Sudiarto, 2012).

### 2.3.3 Faktor yang Mempengaruhi Kadar Leptin

Kadar leptin di dalam tubuh dapat dipengaruhi dari berbagai faktor. Faktor yang mempengaruhi peningkatan produksi leptin yaitu jumlah diet yang berlebihan, insulin, glucocorticoid, endotoksin dan sitokin. Sedangkan yang mempengaruhi penurunan produksi leptin yaitu testosteron, puasa, hormon tiroid dan paparan suhu rendah atau dingin (Sudiarto, 2012). Semakin besar energi yang disimpan semakin besar jumlah leptin yang dikeluarkan (Galland, 2011).

Pada sebuah hasil penelitian menunjukkan terdapat interaksi antara insulin dan leptin yang dibuktikan pada sel beta pankreas memiliki reseptor untuk leptin, yang mana administrasi leptin secara eksogen dapat menurunkan sekresi insulin (Fehmann *et al.*, 1997), sedangkan administrasi insulin secara eksogen dapat merangsang sekresi leptin (Nakagawa *et al.*, 2002). Namun, dalam proses penelitian lebih lanjut ternyata respon insulin dan glukosa berbeda terhadap leptin. Penelitian ini menunjukkan bahwa kadar leptin menunjukkan peningkatan yang signifikan selama 120 menit setelah pengobatan dengan insulin, tapi tidak ada perubahan signifikan setelah diberikan glukosa. Oleh karena itu, peningkatan yang signifikan dari leptin dipengaruhi oleh injeksi langsung dari insulin atau *insulin-induced hypoglycemia* (Nakahara *et al.*, 2010)

### 2.3.4 Hubungan Diet Tinggi Lemak, Obesitas, Leptin dan Aterosklerosis

Obesitas umumnya disebabkan karena masukan energi melebihi penggunaan energi oleh tubuh untuk kepentingan metabolisme basal, aktivitas fisik, pembuangan sisa makanan dan pertumbuhan. Kelebihan

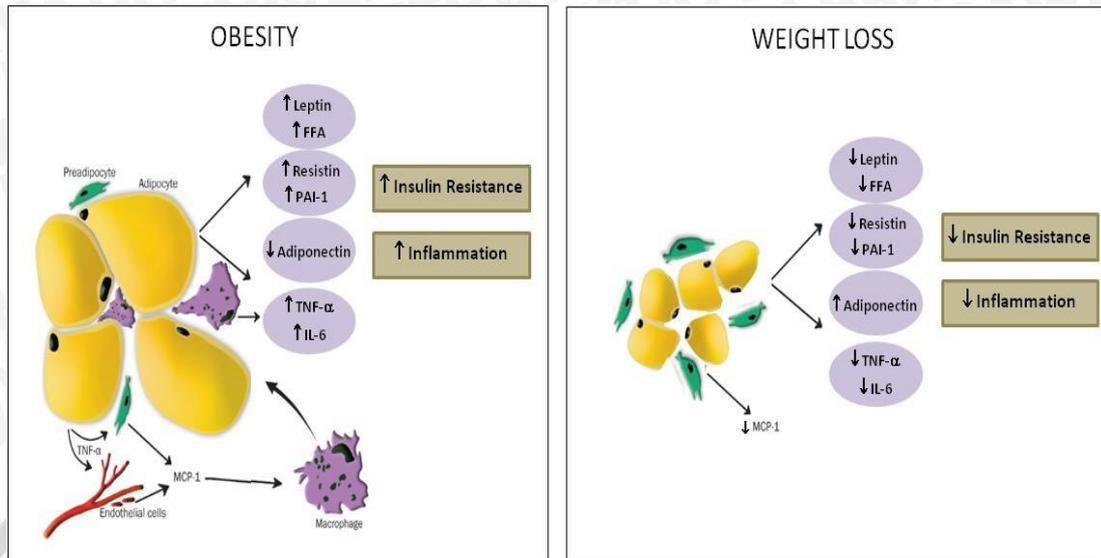
energi yang dikonsumsi tanpa disertai penggunaan energi yang memadai akan menyebabkan peningkatan penyimpanan energi dalam sel lemak yang berakibat meningkatnya jumlah dan ukuran sel lemak, sehingga keadaan ini mengakibatkan obesitas (Sargowo, 2011). Diet tinggi lemak berkontribusi dalam meningkatkan total asupan energi dan meningkatkan kemungkinan terjadi obesitas. Diet tinggi kalori merangsang VLDL di hepar untuk menghasilkan peningkatan trigliserida, LDL dan penurunan HDL. Selain itu, diet lemak jenuh dan kolesterol akan mengaktifkan reseptor LDL yang dapat meningkatkan LDL dan trigliserida (Sargowo, 2011). Diet tinggi lemak berkontribusi dalam peningkatan energi, dimana lemak merupakan cadangan terbesar tubuh, tingginya densitas energi yang dimiliki lemak mengakibatkan kelebihan lemak akan disimpan dalam jaringan adiposa. Peningkatan jaringan adiposa ini akan meningkatkan kadar leptin sehingga memiliki pengaruh terhadap pengaturan keseimbangan energi dan pada akhirnya terjadi obesitas (Burhan *et al.*, 2013).

Pada orang obesitas terjadi hiperleptinemia dengan efek sistemik dalam sistem nervous sentral yang menghasilkan pelepasan asam lemak bebas dalam jaringan adipose yang berlebihan sehingga mempengaruhi proses gluconeogenesis dan peningkatan fibrinogen, *Low Density Lipoprotein-C* (LDL-C), *Apoprotein B* (Apo B), Trigliserida dan C-reactive protein di hepar (Sudiarto, 2012). Leptin mempengaruhi proses pembentukan aterosklerosis dengan merangsang berbagai sel imunitas dan mengatur produksi sitokin pro dan anti inflamasi seperti Interleukin-2 (IL-2), IL-6, Interleukin-12 (IL-12), dan Interleukin-18 (IL-18), TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  yang berpotensi menyebabkan proses aterogenik dan sitokin lain

seperti Interleukin-10 (IL-10) dan Interleukin-14 (IL-4) berperan protektif terhadap perkembangan kejadian kardiovaskuler (Hidayat, 2013).

Selain itu, leptin dapat meningkatkan stres oksidatif dan meningkatkan *protein kinase C* yang mana membantu proses adhesi monosit pada endotel dan merangsang transformasi makrofag menjadi sel busa serta meningkatkan produksi dan akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Leptin juga berhubungan dengan CRP, dimana memberikan kontribusi pada penyakit vaskuler dengan merusak langsung endothelium dengan fungsi vasodilatasi pada endothelium oleh oksida sintase ekspresi menghambat sintesis dari *Nitrous Oxide* (NO) dan memainkan peran dalam kemotaksis monosit dan pembentukan sel busa yang menyebabkan plak aterosklerosis (Hidayat, 2013)

Pada obesitas, terjadi ketidakseimbangan dalam produksi adiposit. Hal ini menyebabkan terjadinya ketidakmampuan untuk menyimpan lemak dalam adiposit dan akhirnya akan berdampak pada disfungsi jaringan adipose yang mana diketahui meningkatkan risiko terjadinya gangguan metabolisme pada obesitas. Dengan mekanisme yang digambarkan pada Gambar 2.3, adiposit mengalami *hypertrophic* dan *hyperactive* yang memicu produksi dari *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), yang menarik makrofag ke dalam jaringan adipose, meningkatkan produksi proinflamasi adipokine terutama TNF- $\alpha$  dan penurunan produksi adiponektin serta peningkatan leptin yang menyebabkan resistensi insulin dan inflamasi. Sebaliknya, proses penurunan berat badan akan mengalami normalisasi perubahan adipokine dengan terjadinya penurunan resistensi insulin dan inflamasi serta penurunan proinflamasi (Luvizotto *et al.*, 2012)



Gambar 2.3 Hubungan Obesitas, Leptin, dan Aterosklerosis (Luvizotto *et al.*, 2012)

#### 2.4. 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/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, 2007).

Penelitian kesehatan meliputi penelitian biomedik, epidemiologi, sosial, serta perilaku. Sebagian penelitian kesehatan dapat dilakukan secara *in vitro* dengan memakai model matematik atau simulasi komputer. Jika hasil penelitian akan dimanfaatkan untuk penelitian lanjutan makadapatmenggunakan bahan hidup (*in vivo*) seperti galur sel dan biakan

jaringan (Ridwan, 2013). Maka dari itu, 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 (Ridwan, 2013).

## 2.5. Hewan Percobaan

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 (Ridwan, 2013). Hewan percobaan tetap diperlukan dalam beberapa penelitian khususnya kesehatan didasari oleh beberapa alasan yaitu (1) keragaman dari subjek penelitian dapat diminimalisasi, (2) variabel penelitian lebih mudah terkontrol, (3) daur hidup relatif pendek sehingga dapat dilakukan penelitian yang bersifat multigenerasi, (4) pemilihan jenis hewan dapat disesuaikan dengan tujuan penelitian, (5) biaya murah, (6) dapat dilakukan penelitian yang berisiko tinggi, (7) mendapatkan informasi yang mendalam, (8) memperoleh data yang maksimum dari hasil penelitian, dan (9) dapat digunakan untuk uji keamanan, diagnostik, dan toksisitas (Ridwan, 2013).

Beberapa macam hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian antara lain mencit (*Mus musculus*), tikus (*Rattus norvegicus*), marmot (*Cavia porcellus L.*), kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), domba (*Ovis aries*), ayam (*Gallus domesticus*), anjing (*Canis familiaris*), angsa, hamster (*Mesocricetus auratus*), gerbil (*Meriones unguiculatus*), kucing (*Felis catus*), kera (*Macaca fascicularis*), unggas lain dan hewan lain (Sulaksono,

1986). Menurut informasi dari *Office of Technology Assessment* diperkirakan bahwa ada 17-23 juta hewan yang digunakan dalam penelitian setiap tahunnya. Sekitar 95% hewan yang digunakan pada penelitian yaitu tikus dan mencit; 4,25% menggunakan kelinci, marmut, domba, ikan, katak, serangga, dan hewan lain; dan yang paling rendah yaitu menggunakan hewan seperti kucing, anjing dan kera yang hanya digunakan sebesar 0,75% (CBRA, 2008).

Berdasarkan prinsipnya semua hewan dapat dimanfaatkan untuk hewan laboratorium tetapi hanya beberapa spesies yang telah digunakan karena faktor praktis seperti ukuran hewan, kondisi pemeliharannya dan ekonomis (Hau dan Gerald, 2003). Berbagai hewan kecil memiliki karakteristik tertentu yang menyerupai manusia, sementara hewan lain mempunyai kesamaan pada aspek fisiologis metabolisme manusia. Pada penelitian, tikus putih sering digunakan dalam penilaian mutu protein, toksisitas, karsinogenik dan kandungan pestisida dari suatu produk (Ridwan, 2013). Saat ini, beberapa tikus *strain* digunakan dalam penelitian di laboratorium hewan coba di Indonesia, antara lain: *Wistar* dan *Sprague-Dawley* (tikus albino yang dihasilkan di tanah pertanian *Sprague-Dawley*)(Ridwan, 2013).

### 2.5.1 Tikus Sebagai Hewan Coba

Lebih dari 90% penelitian menggunakan tikus dan hewan pengerat lainnya. Selain memiliki sistem kerja tubuh yang menyerupai manusia, hewan pengerat banyak dipilih karena ukurannya yang kecil dan mudah dalam penanganan dan perawatannya serta harga yang tidak terlalu mahal

(American Association for Laboratory Animal Science, 2003). Menurut *American Association for Laboratory Science* (2003), hewan coba berupa tikus dan mencit merupakan *gold standart* yang dapat digunakan. Hal ini dikarenakan hewan tersebut dapat direkayasa genetiknya sesuai dengan keadaan penyakit yang akan diteliti dan hewan coba ini secara biologis struktur organnya menyerupai dengan manusia. Tidak menutup kemungkinan menggunakan hewan coba lain, namun penggunaan tikus lebih efektif karena tidak memakan banyak tempat dan pemeliharaannya mudah (ILAR, 2008).

Tikus lebih mudah dikontrol dalam asupan makanan dan aktifitas fisik daripada manusia sehingga dapat memperkecil terjadinya bias saat penelitian (Fridintya, 2011). Salah satu hewan coba yang banyak digunakan dalam penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Hewan coba ini digunakan karena dapat digunakan dalam penelitian toksikologi, metabolisme lemak, obat-obatan maupun mekanisme penyakit infeksius (Berata *et al.*, 2010). Selain itu, pemilihan tikus jantan galur wistar didasarkan pada perilaku tikus galur wistar lebih lincah dibandingkan dengan tikus galur lainnya sehingga efek lebih terlihat (Fridintya, 2011). Tikus jantan dan betina memiliki perbedaan respon terhadap induksi kolesterol, pemilihan sampel tikus jantan bertujuan agar sampel bersifat homogen dan tidak menimbulkan bias dan terhindar dari pengaruh hormon esterogen (Fridiantya, 2011).

Umur hewan coba juga perlu diperhatikan, umur mempunyai pengaruh penting dalam penelitian. Tikus dengan umur 6 minggu memiliki kadar kolesterol yang belum stabil, dimana pada umur 6 minggu kadar

serum kolesterol akan meningkat dan kemudian menurun dalam beberapa minggu. Kadar serum kolesterol mencapai kadar minimum terjadi pada usia 12 minggu. Oleh karena itu, tikus jenis *Rattus norvegicus* galur wistar yang digunakan pada penelitian yaitu umur 3 bulan atau 12 minggu (Wibowo, 2009).

## 2.6. Etika Penelitian

Pada penelitian kesehatan dengan menggunakan hewan coba untuk kepentingan manusia perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlakukan secara manusiawi. Berdasarkan hal tersebut, penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba perlu menerapkan prinsip 3 R dalam protokol penelitian yaitu *replacement*, *reduction*, dan *refinement* (Bousfield dan Brown, 2010). *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 (Ridwan, 2013). *Reduction* adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Sedangkan *refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian (Ridwan, 2013).

Pada dasarnya prinsip *refinement* memiliki arti membebaskan hewan coba dari beberapa kondisi (Ridwan, 2013). Kondisi tersebut yaitu *freedom from hungry and thirsty* (bebas dari rasa lapar dan haus), *freedom*

*from comfort* (bebas dari ketidaknyaman), *freedom from pain, injury, and disease* (bebas dari rasa sakit, trauma, dan penyakit), *freedom from fear and distress* (bebas rasa ketakutan dan stress jangka panjang), dan *freedom to express natural behavior* (bebas mengekspresikan tingkah laku alami) (BATAN, 2011)

Berdasarkan prinsip *refinement*, hewan coba akan diberikan akses makanan atau air minum untuk membebaskan dari rasa lapar dan haus. Pemberian makanan dan air minum harus sesuai dan memadai untuk kesehatan hewan mencakup jumlah dan komposisi nutrisi untuk kesehatannya (Ridwan, 2013). Makanan yang diberikan pada hewan coba harus disimpan dengan baik yaitu terhindar dari lingkungan yang lembab dan bebas dari serangga atau hewan lain. Bentuk makanan yang diberikan hewan coba sebaiknya berbentuk pil atau silinder dengan diameter tertentu tergantung hewan yang digunakan karena dapat disimpan lama, makanan mudah dihabiskan, dan kontrol terhadap makanan yang dimakan lebih mudah. Sedangkan untuk kebutuhan air dapat diperoleh dengan mudah dan bersih (BATAN, 2011).

## 2.7. Diet Standar pada Hewan Coba

Diet standar 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. Selain itu, diet yang terstandar dapat digunakan sebagai acuan perlakuan untuk setiap hewan coba (Reeves *et al.*, 1993). Salah satu dari diet normal standar yang digunakan untuk hewan coba laboratorium yaitu

diet AIN. Diet AIN ini dikembangkan oleh *American Institute of Nutrition* dengan diet standar normal pertama yang dibentuk yaitu AIN-76. Diet AIN-76 tidak bertahan lama karena menimbulkan berbagai masalah kesehatan yang muncul dan kemudian dibentuklah diet standar yang terbaru yaitu AIN-93 (Reeves *et al.*, 1993).

### 2.7.1 Diet Standar Normal AIN-93M

Diet normal standar AIN-93M merupakan diet normal yang direkomendasikan oleh *American Institute of Nutrition* sebagai pakan untuk hewan coba. Diet normal standar AIN-93 ini dibagi menjadi 2 macam yaitu AIN-93G yang digunakan untuk pertumbuhan pada fase awal, selama hamil dan menyusui pada hewan coba dan AIN-93M digunakan untuk menjaga pertumbuhan hewan coba hingga dewasa (Reeves, 1997). Komposisi pada diet normal AIN-93M dapat dilihat pada tabel 2.1

**Tabel 2.1 Komposisi Diet AIN-93M**

Bahan	Komposisi (g/kg) AIN-93M
<i>Cornstarch</i>	465,692
<i>Casein (≥ 35% protein)</i>	140
<i>Dextrinized cornstarch(90-94% tetrasaccharides)</i>	155
<i>Sucrose</i>	100
<i>Soybean oil (no additives)</i>	40
<i>Fiber</i>	50
<i>Mineral mix (AIN-93M-MX)</i>	35
<i>Vitamin mix (AIN-93VX)</i>	10
<i>L-cystine</i>	1,8
<i>Choline bitartrate (4,1% choline)</i>	2,5
<i>Tert-butylhydroquinone, mg</i>	8

(Reeves, 1997)

Selain memperhatikan komposisi zat makro, perlu juga diperhatikan zat mikro seperti vitamin dan mineral yang dibutuhkan oleh hewan coba. Hal ini karena dapat mempengaruhi daya tahan tubuh hewan

coba lebih terjaga. Berikut ini adalah komposisi vitamin (Tabel 2.2) dan mineral (Tabel 2.3) yang terkandung dalam diet AIN-93M, sebagai berikut:

**Tabel 2.2 Komposisi Vitamin pada Diet AIN-93M**

<b>Vitamin</b>	<b>Jumlah g/kg mix</b>
Nicotinic acid	3
Ca panthothenate	1,6
Pyridoxine-HCl	0,7
Thiamin-HCl	0,6
Riboflavin	0,6
Folic acid	0,2
Biotin	0,02
Vitamin B12	2,5
Vitamin E	15
Vitamin A	0,8
Vitamin D	0,25
Vitamin K	0,075
Powdered sucrose	974,655

(Reeves, 1997)

**Tabel 2.3 Komposisi Mineral pada Diet AIN-93M**

<b>Bahan</b>	<b>Berat ( g/kg mix)</b>
Calcium carbonate, anhydrous, 40.04% Ca	357.00
Potassium phosphate, monobasic, 22.76% P 28.73% K <sup>1</sup>	250.00
Potassium citrate, tri-potassium, monohydrate, 36.16% K	28.00
Sodium chloride, 39.34% Na, 60.66% Cl	74.00
Potassium sulfate, 44.87% K; 18.39% S	46.60
Magnesium oxide, 60.32% Mg	24.00
Ferrie citrate, 16.5% Fe	6.06
Zinc carbonate, 52.14% Zn	1.65
Manganous carbonate, 47.79% Mn	0.63
Cupric carbonate, 57.47% Cu	0.30
Potassium iodate, 59.3% I,mg	10.0
Sodium selenate, anhydrous, 41.79% Se, mg	10.25
Ammonium paramolybdate, 4 hydrate, 54.34% Mo	7.95
Sodium meta-silicate, 9 hydrate, 9.88% Si	1.45
Chromium potassium sulfate, 12 hydrate, 10.42% Cr	0.275
Lithium chloride, 16.38% Li	17.4
Boric acid, 17.5% B	8.15
Sodium fluoride, 45.24% F	63.5
Nickel carbonate, 45% Ni	3.18
Ammonium vanadate, 43.55% V	6.6
Powdered sucrose	209.806

(Reeves, 1997)

### 2.7.2 Diet Aterogenik Modifikasi Standar AIN-93M

Diet aterogenik merupakan komposisi diet yang digunakan untuk membuat model hewan coba menjadi aterosklerosis. Untuk membuat aterosklerosis, bisa dilakukan dengan berbagai cara yaitu dengan induksi langsung pada hewan coba dan menggunakan diet modifikasi. Untuk diet modifikasi itu sendiri, diperlukan *high fat diet* ditambah asam kolat dan kolesterol berdasarkan penelitian Murwani *et al.* (2012). Diberikan penambahan asam kolat dan kolesterol karena pada penelitian Handayani *et al.* (2011), *high fat diet* dengan standar AIN-93M yang digunakan hanya bisa menginduksi hewan coba mengalami keadaan obesitas. Data penelitian dari Handayani *et al.* (2012) menunjukkan komposisi yang dihasilkan dari diet tinggi lemak modifikasi AIN-93M adalah sebagai berikut:

**Tabel 2.4 Komposisi Diet Tinggi Lemak (Handayani *et al.*, 2012)**

Nama bahan	g/kg	Nilai gizi
Pati jagung	220	Karbohidrat : 32 % total energi
Sukrosa	183	Protein : 16 % total energi
Minyak Kelapa Murni	110	Lemak : 50 % total energi
Kurvet	110	Fiber : 2% total energi
Minyak kedelai	52	Densitas energi : 18,8 kJ/g : 4,18 kkal/g
Gelatin	67	
Kasein	119	
CMC	53	
<i>Mineral mix</i>	70	
<i>Vitamin mix</i>	14	

Selain itu, diet tinggi lemak mengakibatkan terjadinya peningkatan kadar HDL dan LDL secara bersamaan (Handayani *et al.*, 2012). Seharusnya pada kondisi aterosklerosis, kadar HDL akan menurun dan LDL akan meningkat (Murwani *et al.*, 2012), sehingga untuk membuat model tikus aterogenik tidak bisa hanya menggunakan diet tinggi lemak

modifikasi AIN-93M, perlu dilakukan penambahan bahan lain yang dapat menjadikan kondisi aterosklerosis.

Bahan tambahan yang digunakan yaitu asam kolat dan kolesterol (Shatanovi, 2012). Asam kolat dan kolesterol berfungsi untuk menginduksi peningkatan LDL dalam darah. Selain itu, diet yang menggunakan asam kolat dapat merubah gambaran lipoprotein menjadi lebih aterogenik yaitu menurunkan HDL dan meningkatkan LDL plasma (Srivastava *et al.*, 2000). Hal ini diperkuat dengan adanya penelitian yang memberikan diet aterogenik tanpa asam kolat selama 8 minggu tidak dapat meningkatkan kadar kolesterol dan sel busa yang bermakna (Muwarni *et al.*, 2006).

Berdasarkan penelitian telah dilakukan oleh Shatanovi (2012), penambahan asam kolat dan kolesterol sebesar 0,3% dan 1% pada *high fat diet* dapat mengakibatkan terjadinya peningkatan kolesterol total dan LDL serta kadar HDL yang lebih rendah. Begitu pula, dengan penelitian yang dilakukan oleh Elbandy (2012) penggunaan asam kolat dan kolesterol sebesar 0,3% dan 1% dapat berdampak pada peningkatan kolesterol total, trigliserida dan LDL pada tikus wistar jantan serta penurunan kadar HDL yang signifikan, sehingga dapat disimpulkan penggunaan asam kolat 0,3% dan kolesterol 1% dapat menghasilkan peningkatan indeks aterogenik yang signifikan untuk mencapai kondisi aterosklerosis.