

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Sampel

Pemilihan hewan coba pada awal penelitian dilakukan sesuai dengan kriteria inklusi untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Karakteristik sampel yang digunakan adalah tikus jantan jenis *Rattus norvegicus* Strain Wistar dengan rata-rata umur 2 bulan, berat badan antara 150-200 gram dan dalam keadaan sehat selama penelitian. Pemilihan jenis kelamin jantan untuk meminimalkan faktor pengganggu metabolisme lipid misalnya adanya hormon estrogen. Dalam penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok dengan perlakuan berbeda dengan teknik randomisasi yang memungkinkan setiap tikus memiliki peluang yang sama untuk menjadi sampel dalam kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol (Setiawan, 2009). Keadaan umum tikus pada masa adaptasi nampak aktif dengan warna bulu putih bersih.

Hasil uji statistik karakteristik sampel berdasarkan berat badan setelah adaptasi diperoleh nilai yang homogen dengan nilai $p > 0,05$ yaitu $p=0,734$. Dengan homogenitas ini maka diharapkan segala perubahan yang terjadi pada tikus percobaan disebabkan oleh perlakuan yang diberikan selama penelitian.

6.2 Peningkatan Berat Badan Tikus

Selama penelitian dilakukan penimbangan berat badan tikus setiap minggu untuk mengetahui perubahan berat badan yang terjadi. Berdasarkan hasil analisa terdapat peningkatan berat badan pada semua kelompok

perlakuan. Kisaran rata-rata peningkatan berat badan pada hewan coba adalah 88,7-171,3 gram. Peningkatan rata-rata berat badan tikus pada penelitian ini serupa dengan penelitian Rahmah (2012) dan Anggraini (2012) yang menunjukkan terdapat kenaikan rata-rata berat badan pada tikus wistar jantan pada semua kelompok perlakuan setelah 60 hari masa perlakuan. Hal ini dimungkinkan karena pemberian diet normal pada kelompok K (-) dan diet aterogenik pada kelompok K (+) dan kelompok perlakuan. Menurut Wahyu (1992) dalam Adnan (2007) peningkatan berat badan yang terjadi sebagai respon terhadap diet yang diberikan.

Namun jika dilihat rata-rata peningkatan berat badan tikus paling tinggi terdapat pada kelompok diet normal K (-) yaitu sebesar 171,33 gram, hal tersebut sebanding dengan rata-rata asupannya yang paling tinggi di antara kelompok perlakuan lain yaitu 30,158 gram. Sedangkan rata-rata peningkatan berat badan tikus paling rendah terdapat pada kelompok P3 yaitu sebesar 88,67 gram, hal tersebut sebanding dengan rata-rata asupannya yang paling rendah di antara kelompok perlakuan lain yaitu 19,962 gram. Rendahnya asupan tikus pada kelompok diet tinggi lemak K (+) dan kelompok P1 (2,4 gr tepung daun katuk), P2 (3,6 gr tepung daun katuk), P3 (4,8 gr tepung daun katuk) dibandingkan dengan kelompok diet normal K (-) disebabkan adanya kandungan asam kolat pada komposisi diet tinggi lemak. Asam kolat selain dapat memberikan efek hiperlipidemia pada tikus juga dapat memberikan efek pahit pada pakan (National Center for Biotechnology Information, tanpa tahun). Rasa pahit tersebut dapat menyebabkan asupan tikus kelompok K (+) dan kelompok P1, P2, P3 lebih rendah dibandingkan kelompok diet normal K (-).

6.3 Pengaruh Diet Tinggi Lemak Terhadap Jumlah *Foam Cell*

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah *foam cell*, kelompok diet normal K (-) memiliki jumlah *foam cell* yang lebih rendah yakni sebesar 7,96 sel/ lapang pandang jika dibandingkan dengan kelompok diet tinggi lemak K (+) sebesar 15,08 sel/ lapang pandang. Hal ini sebanding dengan rata-rata asupan lemak pada kedua perlakuan. Rata-rata asupan lemak kelompok diet normal K (-) sebesar 0,7 gram. Sedangkan pada perlakuan kelompok diet tinggi lemak K (+) sebesar 5,26 gram. Rendahnya asupan lemak pada kelompok diet normal K (-) disebabkan kandungan lemak pada diet normal K (-) sebesar 0,93 gr/40gr pakan dibandingkan dengan kandungan lemak diet atherogenik K (+) sebesar 9,59gram/40gram pakan. Sehingga semakin tinggi rata-rata asupan lemak yang dikonsumsi, maka semakin tinggi rata-rata jumlah *foam cell* yang terbentuk. Hal ini sebanding dengan penelitian Handayani (2007), pemberian diet tinggi lemak pada tikus *Rattus norvegicus* Strain Wistar dapat meningkatkan jumlah *foam cell* jika dibandingkan dengan kelompok diet normal (K-), dengan rata-rata jumlah *foam cell* pada kelompok diet tinggi lemak K (+) sebanyak 12,92 per lapang pandang dan kelompok diet normal K (-) sebanyak 0,96 per lapang pandang. Paparan diet tinggi lemak yang memperoleh tambahan asam kolat, kolesterol dan minyak babi mampu meningkatkan jumlah *Saturated Fatty Acid* (SAFA) yang cukup bagi tikus wistar sampel, sehingga pada akhir pengamatan dapat terbentuk *foam cell*.

6.4 Pengaruh Tepung Daun Katuk Terhadap Jumlah *Foam Cell* di Aorta Tikus dengan Diet Tinggi Lemak

Berdasarkan analisis uji statistik ANOVA, dapat diketahui bahwa tidak ada perbedaan signifikan jumlah *foam cell* pada masing-masing kelompok percobaan. Rata-rata jumlah *foam cell* pada kelompok kontrol negatif (K-), yaitu kelompok yang mendapatkan diet normal selama 60 hari, sebanyak 7,96 per lapang pandang dengan standar deviasi (SD) $\pm 4,84$. Kelompok kontrol positif (K+), yaitu kelompok yang mendapatkan diet tinggi lemak selama 60 hari, memiliki jumlah rata-rata *foam cell* 15,08 per lapang pandang dengan standar deviasi 8,55. Sedangkan untuk kelompok perlakuan dosis P1 (2,4 gr tepung daun katuk), P2 (3,6 gr tepung daun katuk) dan P3 (4,8 gr tepung daun katuk) masing-masing menunjukkan jumlah *foam cell* secara berurutan sebanyak $14,35 \pm 8,45$; $10,95 \pm 3,95$ dan $12,03 \pm 7,53$ per lapang pandang.

Tabel 6.1 Perbandingan Antar Kelompok Perlakuan

Kelompok perlakuan	Rata- Rata			
	Energi (kkal)	Lemak (gram)	Katuk (gram)	<i>Foam Cell</i> (per lapang pandang)
P1	105,2	5,508	1,37	14,35
P2	104	5,449	2,024	10,95
P3	92,8	4,851	2,395	12,03

Namun demikian, dengan membandingkan hasil rerata jumlah *foam cell* dari kelompok kontrol positif (K+) dengan masing-masing kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3), secara keseluruhan dapat diketahui bahwa pemberian daun katuk dapat menurunkan jumlah rerata *foam cell*. Dalam penelitian ini diketahui bahwa jumlah dosis daun katuk yang diberikan dalam pakan tidak selalu berbanding terbalik dengan jumlah *foam cell*. Kelompok perlakuan P2 diketahui sebagai dosis optimal karena dianggap mampu menurunkan rerata jumlah *foam*

cell yang paling banyak (10,95 per lapang pandang) walaupun secara statistik tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain. Ketidakkonsistenan jumlah *foam cell* dalam kelompok perlakuan menunjukkan bahwa *intake* tepung daun katuk tidak sesuai yang diharapkan.

Adapun penjelasan yang dapat diberikan sehubungan dengan hasil uji statistik yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan dalam jumlah rerata *foam cell* antara masing-masing kelompok percobaan tersebut diduga berkaitan dengan standart deviasi yang tinggi di dalam tiap-tiap kelompok percobaan. Standar deviasi tersebut menunjukkan adanya variasi jumlah *foam cell* yang tinggi dalam tiap-tiap individu hewan coba dalam suatu kelompok percobaan. Hal tersebut dapat mempengaruhi keseluruhan hasil uji statistik yang dilakukan.

Variasi jumlah *foam cell* diduga muncul oleh karena dosis daun katuk yang diberikan untuk tiap-tiap individu kelompok perlakuan tidak dapat disesuaikan dengan berat badan masing-masing individu hewan coba. Perbedaan berat badan dan kemampuan *intake* makanan masing-masing hewan coba tersebut tentu saja akan mempengaruhi jumlah dosis daun katuk yang masuk ke dalam tubuh, dan pada akhirnya akan berpengaruh terhadap jumlah *foam cell* yang terbentuk. Pemberian tepung daun katuk yang dicampurkan pakan dan diberikan secara *ad libitum* dapat menjadi salah satu faktor yang menyebabkan dosis yang dikonsumsi tikus tidak sesuai dengan berat badan. Semakin tinggi dosis yang dicampurkan ke dalam pakan maka akan semakin mempengaruhi rasa, aroma dan tekstur pakan tikus yang dicampur bubuk daun katuk sehingga menyebabkan asupan pakan tikus semakin rendah pada kelompok perlakuan dosis tertinggi.

Dalam penelitian ini juga diketahui bahwa dosis yang dikonsumsi oleh masing-masing kelompok perlakuan tidak sesuai dengan yang diharapkan karena diberikan melalui pakan (*ad libitum*). Rata-rata asupan pakan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 secara berurutan yaitu sebanyak 22,83 gram; 22,49 gram dan 19,96 gram (lihat Gambar 5.2).

Dalam penelitian ini dosis tepung daun katuk diberikan dalam jumlah yang sama pada setiap kelompok perlakuan hingga akhir penelitian. Padahal berat badan tikus meningkat setiap minggunya, peningkatan berat badan tersebut seharusnya juga diimbangi dengan peningkatan dosis yang diberikan agar efek kerja fitosterol dan flavonoid dapat bekerja optimal sesuai dengan yang diharapkan sehingga dapat menekan jumlah *foam cell* akibat pemberian diet tinggi lemak.

6.5 Peran Fitosterol dan Flavonoid dalam Penurunan Jumlah *Foam Cell*

Berdasarkan uji zat gizi yang dilakukan pada tepung daun katuk, diketahui bahwa kandungan fitosterol rata-rata adalah 45.85 mg/kg, jumlah tersebut berbeda jauh dengan hasil penelitian sebelumnya yang digunakan sebagai penentuan dosis awal, menurut Subekti (2006) bahwa kandungan fitosterol dari daun katuk yang didapat dengan mengekstrak bubuk daun katuk dengan etanol 70% adalah sebesar 2433,4mg/100g. Fitosterol dapat menurunkan kadar kolesterol dengan cara menurunkan absorpsi kolesterol dalam sistem gastrointestinal.

Kandungan fitosterol dalam tepung daun katuk sebelumnya diduga berperan penting dalam menghambat kejadian arterosklerosis. Menurut Trautwein *et al.*, (2003), mekanisme utama yang bertanggung jawab untuk efek penurunan kolesterol oleh fitosterol adalah menghambat penyerapan kolesterol di

usus. Beberapa sub-mekanisme yang berbeda, seperti persaingan dengan kolesterol untuk solubilisasi dalam misel campuran makanan sehingga kolesterol tidak dapat diserap, co-kristalisasi dengan kolesterol untuk membentuk kristal campuran yang tidak terlarut untuk selanjutnya dikeluarkan bersama-sama dalam bentuk feses, dan peran fitosterol sebagai gangguan pada proses hidrolisis kolesterol oleh lipase dan esterase sehingga kolesterol tidak dapat dipecah dan diserap oleh usus. Semua mekanisme tersebut dipercaya juga memberikan kontribusi pada penurunan konsentrasi kolesterol serum oleh fitosterol.

Lebih jauh lagi ditemukan bukti bahwa fitosterol juga mengganggu proses transportasi penyerapan kolesterol. Fitosterol mengurangi penyerapan kolesterol di epitel usus melalui persaingan dengan transporter kolesterol. Fitosterol juga menurunkan penyerapan kolesterol dengan menghambat aktifitas *Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase* (ACAT). ACAT telah diketahui memiliki peran penting dalam regulasi penyerapan kolesterol. Studi *in-vitro* telah menunjukkan bahwa esterifikasi usus kurang efisien untuk fitosterol dibandingkan kolesterol. Oleh karena itu diduga fitosterol secara kompetitif menekan aktifitas ACAT dan akibatnya mengurangi penyerapan kolesterol di usus. Dengan demikian semua mekanisme tersebut, meskipun kontribusinya masing-masing pada efek keseluruhan masih harus ditetapkan, mengakibatkan penyerapan kolesterol usus berkurang, sementara lebih banyak kolesterol diekskresikan dalam feses (Trautwein *et al.*,2003).

Selain fitosterol, juga dilakukan uji kadar flavonoid dan didapatkan hasil rata-rata kandungan flavonoid yang terdapat pada daun katuk yang digunakan yaitu sebesar 9.477,159 mg/kg. Hasil tersebut jauh lebih tinggi jika dibandingkan

dengan dengan penelitian yang dilakukan oleh Andarwulan (2010) bahwa kandungan flavonoid yang terdapat pada daun katuk sebesar 143 mg/100 g. Flavonoid berfungsi sebagai antioksidan dan terbukti dapat melindungi tubuh dari beberapa jenis penyakit degeneratif dengan cara mencegah terjadinya peroksidasi lipid dengan cara menangkap radikal bebas.

Sementara itu kandungan flavonoid di dalam daun katuk diduga memiliki peran penting untuk menghambat oksidasi LDL. Komponen flavonoid seperti quersetin dilaporkan mampu mengurangi internalisasi ox-LDL dan akumulasi kolesterol intraseluler pada makrofag yang berasal dari sumsum tulang belakang. Penurunan jumlah pembentukan *foam cell* berkorelasi dengan penurunan ekspresi reseptor membrane ekstraseluler CD36 ox-LDL. Quersetin juga menghambat jalur *lipopolysaccharide-dependent* dan *oxLDL-independent* pembentukan droplet lipid dalam makrofag. Pada makrofag yang distimulasi dengan ox-LDL diketahui bahwa quersetin juga menghambat produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan interleukin-6 (IL-6) yang merupakan faktor penting proaterogenik. Dalam studi lebih lanjut dengan mencit *dislipidemic apolipoprotein E-deficient apoE (-/-)* yang mendapat perlakuan kronis dosis non-toksin quersetin intraperitoneal menunjukkan penurunan signifikan segala indikator perkembangan aterosklerosis, termasuk ukuran lesi, akumulasi *foam cell*, stress oksidatif dan respon inflammasi *in situ* (Lara-Guzman *et al.*, 2012).

Menurut Xie (2007), dosis flavonoid yang dapat dikonsumsi orang dewasa adalah 50-1000 mg/hari. Apabila dikonversikan ke berat badan tikus kebutuhan optimal flavonoid tikus adalah :

$$50 \text{ mg/hari} \times 0,018 = 0,9 \text{ mg/hari}$$

$$1000 \text{ mg/hari} \times 0,018 = 18 \text{ mg/hari}$$

Artinya kebutuhan optimal flavonoid untuk tikus adalah sebesar 0,9 – 18 mg/hari. Dari hasil perhitungan diketahui bahwa asupan flavonoid pada kelompok P1 adalah sebesar 12,98 mg, P2 sebesar 19,1 mg dan P3 sebesar 22,74 mg. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pada kelompok P1 asupan flavonoidnya masih dalam batas yang aman untuk dikonsumsi yang dapat memberikan efek positif bagi tubuh, Sementara pada kelompok P2 asupan flavonoid tikus sudah melebihi batas optimal untuk dikonsumsi namun jumlah tersebut tidak melebihi 10% dari batas optimal. Sedangkan pada kelompok P3 asupan flavonoidnya 26% lebih tinggi dari batas optimal konsumsi flavonoid.

Dalam penelitian ini diketahui pada kelompok P2 jumlah *foam cell* cenderung menurun jika dibandingkan dengan kelompok P1, namun pada kelompok P3 jumlah *foam cell* cenderung meningkat kembali, hal ini dapat disebabkan karena dosis flavonoid yang paling tinggi berada pada kelompok P3 yakni 26% lebih tinggi dari batas optimal yang dianjurkan. Menurut Bouayed dan Bohn (2010) antioksidan seperti flavonoid, dalam jumlah tertentu memiliki kemampuan menangkap radikal bebas akibat proses inflamasi, namun apabila dikonsumsi dalam dosis berlebih justru akan bertindak sebagai prooksidan yang efeknya berkebalikan dengan antioksidan yaitu meningkatkan oksidasi LDL yang menjadi awal terbentuknya *foam cell*.