

**PENGARUH SARI SEDUH TEH HITAM (*Camellia sinensis*)
TERHADAP PENGHAMBATAN PPAR γ SEL ADIPOSA
JARINGAN LEMAK VISERA *Rattus norvegicus* strain Wistar**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang biologi

oleh:

Elan Herlina
0310910017-91

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH SARI SEDUH TEH HITAM (*Camellia sinensis*)
TERHADAP PENGHAMBATAN PPAR γ SEL ADIPOSA
JARINGAN LEMAK VISERA *Rattus norvegicus* strain Wistar

Oleh:
ELAN HERLINA
0310910017-91

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 8 Januari 2008
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Fatchiyah, M.Kes.PhD.
NIP. 131 837 970

DR. Dr. M. Rasjad Indra, MS
NIP. 130 809 092

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Agung Pramana. W. M, M.Si
NIP. 131 970 480

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Elan Herlina

NIM : 0310910017-91

Program Studi : Biologi

Penulis Skripsi Berjudul : Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam
(*Camellia sinensis*) terhadap Penghambatan PPAR γ Sel Adiposa
Jaringan Lemak Visera *Rattus norvegicus* strain wistar

Dengan ini menyatakan bahwa:

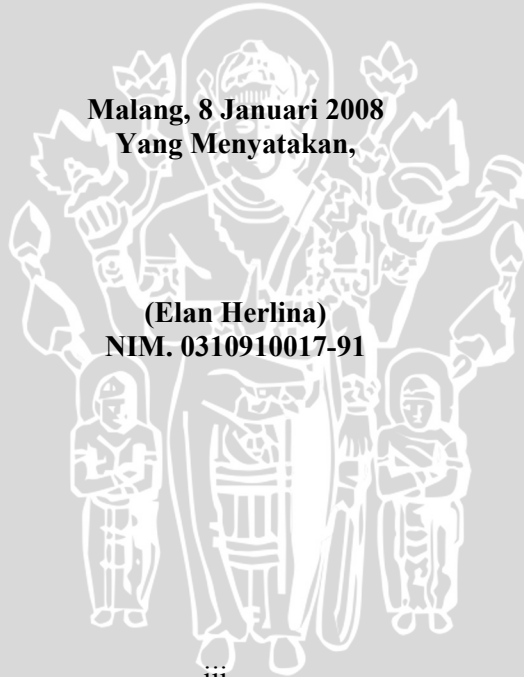
1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
 2. Apabila dikemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.
- Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 8 Januari 2008

Yang Menyatakan,

(Elan Herlina)

NIM. 0310910017-91



PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



**PENGARUH SARI SEDUH TEH HITAM (*Camelia sinensis*)
TERHADAP PENGHAMBATAN PPAR γ SEL ADIPOSA
JARINGAN LEMAK VISERA *Rattus norvegicus* strain Wistar**

Elan Herlina¹, Fatchiyah¹, Rasjad Indra²

¹ Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya

² Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

Abstrak

Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh sari seduh teh hitam terhadap pengekspresian PPAR γ sel adiposa jaringan lemak visera *Rattus norvegicus* strain Wistar. Duabelas ekor tikus (*Rattus norvegicus* strain Wistar) jantan umur 6-8 minggu, berat 200 gram, diberi 4 macam perlakuan, yaitu A (diet tinggi lemak + SSTH 0 g/hari), B (diet tinggi lemak + SSTH 0,015 g/hari), C (diet tinggi lemak + SSTH 0,030 g/hari) dan D (diet tinggi lemak + SSTH 0,045 g/hari) selama 90 hari. Setelah masa perlakuan, tikus dibedah dan diambil lemak viseranya. Jaringan tersebut kemudian dibuat preparat dengan metode parafin. Jumlah sel yang mengekspresikan PPAR γ dianalisis dengan menggunakan pewarnaan immunohistokimia dan untuk mengkonfirmasi bentuk sel adiposa digunakan pewarnaan *Hematoxyline&Eosin*. Antibodi primer yang digunakan adalah *anti PPAR γ poliklonal antibody rabbit IgG* dan antibodi sekunder *biotin-goat-anti rabbit IgG*. Hasil penelitian menunjukkan jumlah sel adiposa yang mengekspresikan PPAR γ mengalami penurunan seiring dengan penambahan dosis SSTH. Hal tersebut mengindikasikan SSTH dapat menurunkan pengekspresian PPAR γ pada sel adiposa jaringan lemak visera.

Kata kunci : jaringan lemak visera, PPAR γ , diet tinggi lemak, sari seduh teh hitam



**THE EFFECT OF BLACK TEA SOLUTION (*Camellia sinensis*)
TO PPAR γ ADIPOSE CELL INHIBITING IN VISCERA
ADIPOSE TISSUE *Rattus norvegicus* strain wistar**

Elan Herlina¹, Fatchiyah¹, Rasjad Indra²

¹ Biology Departement, Mathematic and Life Science Faculty,
Brawijaya University

² Medical Student Departement, Medical Faculty, Brawijaya University

Abstract

The objective of this research is elucidate the effect of the black tea solution to PPAR γ adipose cell expression in viscera adipose tissue *Rattus norvegicus* strain wistar. This research is used 12 *Rattus norvegicus* strain wistar (6-8 weeks old, weight 200 grams) which grouping into four groups : group A with high fat diet, group B with high fat diet and BTS 0,015 g/day, group C with high fat diet and BTS 0,030 g/day and group D with high fat diet and BTS 0,045 g/day. After 90 days treatment, the adipose tissues are picked them up from viscera each experimental animal, and then the adipose tissues were embedded by parrafin. The parrafin sections are determined by immunohistochemistry with anti PPAR γ polyclonal antibody Rabbit IgG (primary antibody) and biotin-goat-anti rabbit IgG (secondary antibody) and also the cells form was confirmed by Hematoxyline&Eosin. The data showed that PPAR γ expression of adipose cells is reduced at groups with BTS adding. We concluded that the BTS can decrease PPAR γ expression of adipose cell in viscera adipose tissue.

Key word : black tea solution, high fat diet, PPAR γ , viscera adipose tissue

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbilalamin, hanya karena kuasa Allah-lah Tugas Akhir dengan judul “Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam (*Camellia sinensis*) Terhadap Penghambatan PPAR γ Sel Adiposa Jaringan Lemak Visera *Rattus norvegicus* strain Wistar” ini dapat diselesaikan. Tulisan ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi di Jurusan Biologi Universitas Brawijaya.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Ibu Dra. Fatchiyah, M. Kes. Ph.D dan Bapak DR. Dr. M. Rasjad Indra, MS. selaku pembimbing atas segala arahan dan bantuannya dalam menyusun tugas akhir ini.
2. Ibu Dr. Dra. Sri Widayarti, M.Si., Bapak Dr. Agung Pramana W. M. MS. dan Ibu Dr. Dra. Sri Rahayu, M. Kes yang telah berkenan menjadi penguji dan untuk saran yang telah diberikan.
3. Bapak Harjono atas bantuannya dalam pengujian statistik.
4. Ibu Dra. Catur Retnaningdyah, MSi. dan Ibu Dr. Endang Arisoesiloningsih atas motivasi dan inspirasi yang telah diberikan.

Meskipun telah diusahakan dengan maksimal, tetapi karena keterbatasan kemampuan penulis, maka saran dari berbagai pihak masih sangat diharapkan untuk penyempurnaan tulisan ini.

Malang, Januari 2008
Penulis



DAFTAR ISI

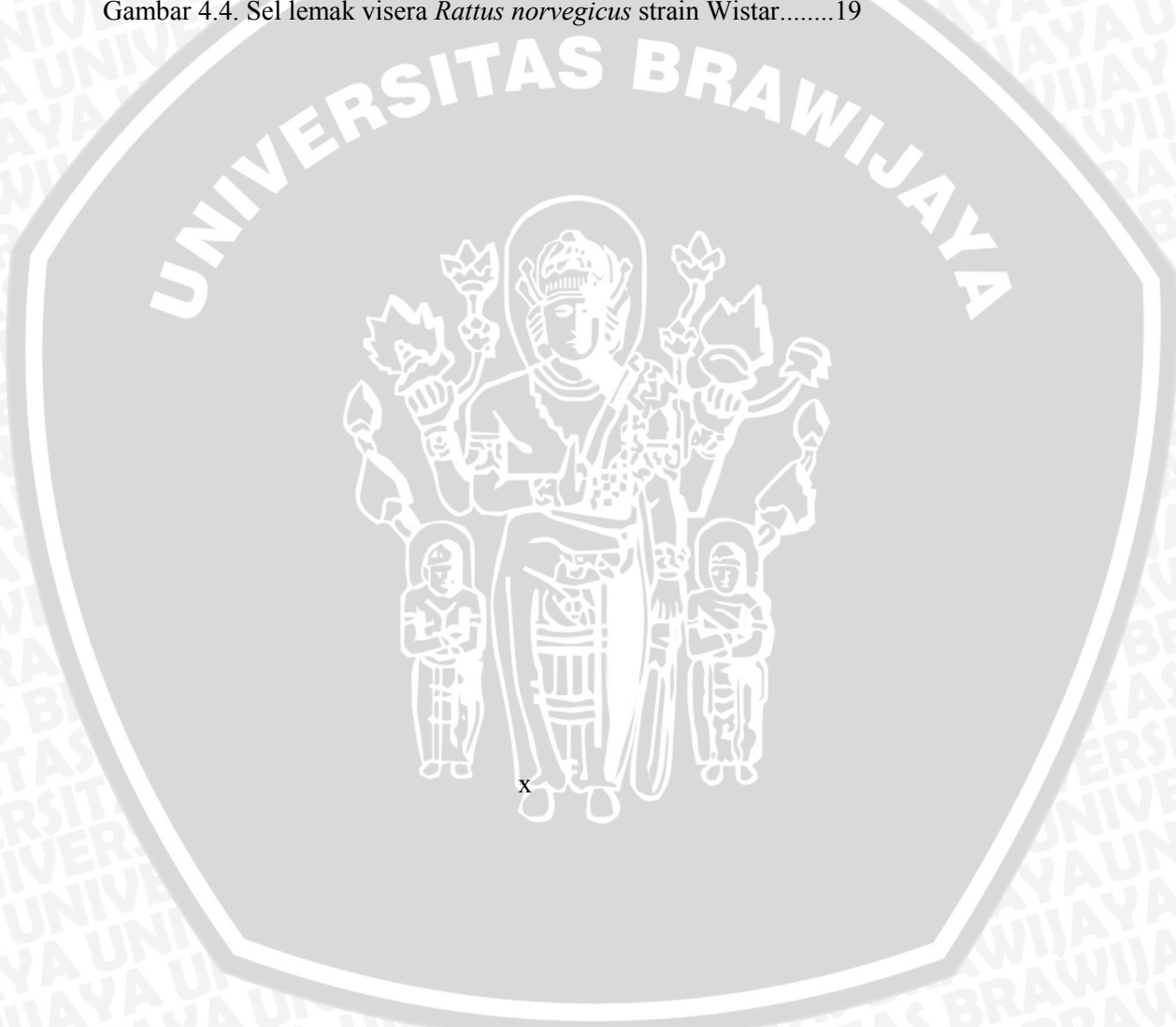
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR ISTILAH	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	2
1.3. Tujuan.....	2
1.4. Manfaat.....	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Obesitas.....	3
2.2. Jaringan Lemak Viscera.....	3
2.3. <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ</i>	5
2.4. Sari Seduh Teh Hitam.....	8
2.5. Immunohistokimia.....	9
BAB III METODE PENELITIAN	10
3.1. Waktu dan Tempat.....	10
3.2. Alat dan Bahan.....	10
3.2. Perlakuan Hewan Coba.....	11
3.3. Pewarnaan H&E dan Immunohistokimia Jaringan Adiposa Hewan Coba.....	12
3.4. Penghitungan Persentase Sel Adiposa Jaringan Lemak Viscera yang Mengekspresikan PPAR γ	14
3.5. Analisis Data.....	14

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	15
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	20
5.1. Kesimpulan.....	20
5.2. Saran.....	20
DAFTAR PUSTAKA.....	21
LAMPIRAN.....	26



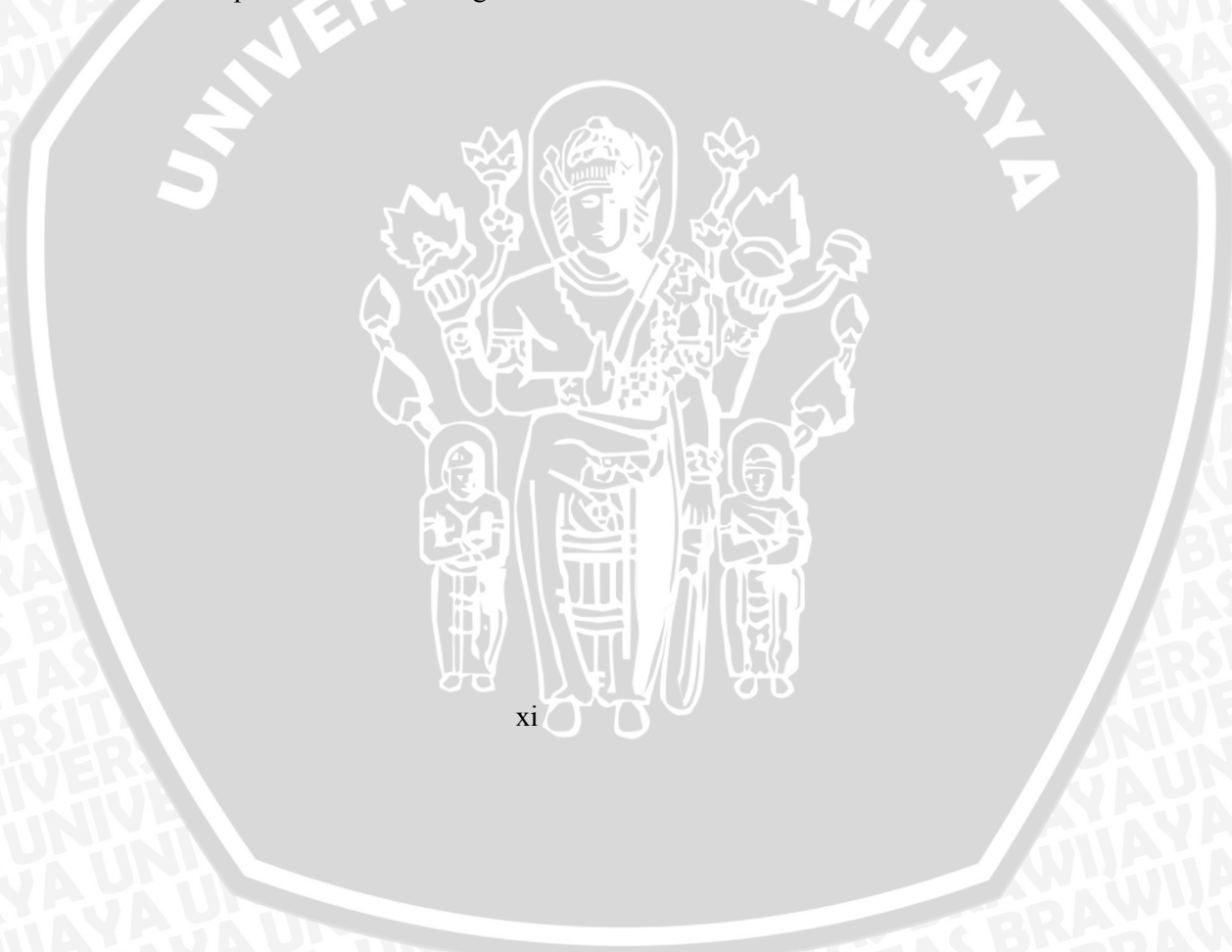
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Sintesis prostaglandin dan leukotrin.....	6
Gambar 2.2. Mekanisme dasar PPAR α , PPAR β dan PPAR γ serta efeknya terhadap ekspresi gen.....	7
Gambar 4.1 Rasio sel lemak visera yang mengekspresikan PPAR γ pada tiap perlakuan ($P < 0,05$).....	15
Gambar 4.2 Hasil pewarnaan immunohistokimia dengan antibodi anti PPAR γ	17
Gambar 4.3 Jalur penghambatan SSTH terhadap pengekspresian PPAR γ pada sel adiposa.....	18
Gambar 4.4. Sel lemak visera <i>Rattus norvegicus</i> strain Wistar.....	19



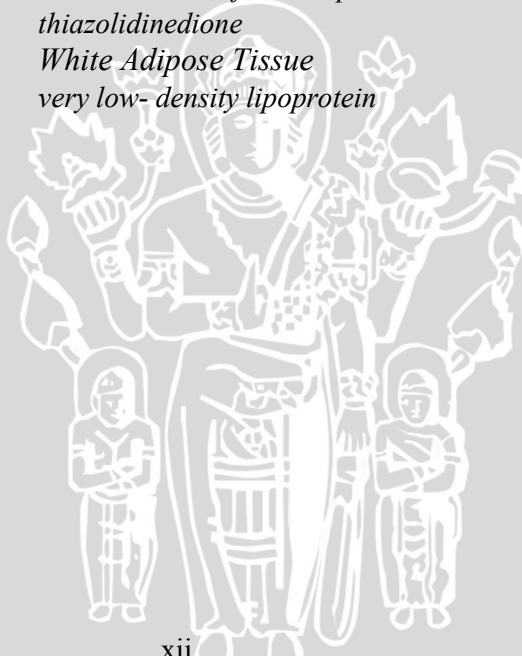
DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Alur Penelitian.....	26
Lampiran 2. Alur Pembuatan Pakan Diet Tinggi Lemak.....	27
Lampiran 3. Alur Pewarnaan Immunohistokimia.....	28
Lampiran 4. Alur Pewarnaan Hematoxylene&Eosin.....	31
Lampiran 5. Komposisi Bahan.....	33
Lampiran 6. Hasil Perhitungan Persentase Sel yang Mengekspresikan PPAR γ	35
Lampiran 7. Merk Dagang Teh Hitam yang Digunakan dalam Penelitian.....	41
Lampiran 8. Komposisi Diet Normal dan Diet Tinggi Lemak.....	42
Lampiran 9. Hasil Uji Statistik Persentase Sel yang Mengekspresikan PPAR γ	44
Lampiran 10. Asupan Pakan Tikus.....	48
Lampiran 11. Perkembangan Berat Badan Tikus.....	53



DAFTAR SINGKATAN

Simbol/singkatan	Keterangan
BAT	<i>Brown Adipose Tissue</i>
FFA	<i>Free Fatty Acid</i>
G	<i>Gliserol</i>
GP	<i>Glycerolphospat</i>
IκB	<i>Inhibitor κB</i>
iNOS	<i>inducible nitrit oxide</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor κB</i>
NO	<i>nitrit oxide</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PPRE	<i>Peroxysome Proliferator Responce Element</i>
SSTH	<i>Sari Seduh Teh Hitam</i>
TG	<i>Trigliserida</i>
TNF α	<i>tumour necrosis factor-alpha</i>
TZD	<i>thiazolidinedione</i>
WAT	<i>White Adipose Tissue</i>
VLDL	<i>very low- density lipoprotein</i>



DAFTAR ISTILAH

Abdomen adalah perut; tubuh bagian belakang.

Faktor transkripsi adalah protein yang berfungsi meregulasi proses transkripsi gen tertentu (gen target).

Intraperitoneal adalah istilah untuk menunjukkan di dalam rongga perut.

Mesenterika adalah lipatan selaput perut dalam terletak bulu-buluh darah dan buluh getah bening usus dan yang menjadikan hubungan antar dinding belakang rongga perut.

Omentum adalah selaput perut yang membentang dari lambung ke organ lain yang dekat dengan rongga perut.

Subkutan adalah lapisan jaringan ikat di bawah kulit.

Resistensi insulin adalah ketidakmampuan insulin memberi efek biologik yang normal pada kadar gula darah tertentu.

Retroperitoneal adalah istilah untuk menunjukkan di belakang selaput perut.

Visera adalah bagian yang dekat dengan organ dalam perut.





BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Jaringan adiposa merupakan salah satu jaringan penyambung yang terdiri dari sel-sel adiposa dan tersebar di seluruh tubuh. Sel-sel adiposa tersebut berperan sebagai mediator penting pada berbagai proses fisiologi dan pathologi yang berkaitan dengan metabolisme energi (Morrison dan Farmer, 2000). Distribusi sel-sel adiposa dalam tubuh dapat digunakan untuk memprediksi resiko kesehatan, terutama timbunan lemak di bagian intraabdominal atau visera. Jumlah lemak yang terdapat pada daerah tersebut sangat penting untuk menentukan gangguan yang terjadi pada metabolisme lemak dan glukosa (Elbers,dkk, 1997). Gangguan terhadap metabolisme tersebut menyebabkan berbagai penyakit, terutama obesitas (Morrison dan Farmer, 2000). Obesitas saat ini menjadi masalah kesehatan masyarakat di seluruh dunia, termasuk Indonesia. Obesitas telah menjadi suatu penyakit epidemi yang bersifat patogenik yang dapat memicu timbulnya penyakit kronis yang berkaitan dengan diet, seperti diabetes, penyakit kardiovaskular, hipertensi, *stroke* dan bentuk kanker tertentu (WHO, 2003).

Regulasi metabolisme lemak dan glukosa berperan penting dalam homeostatis energi dalam tubuh. Menurut Soeatmadji (2005) regulasi metabolisme lemak dan glukosa dalam tubuh melibatkan modulasi aktifitas berbagai protein. Hal itu dapat terlaksana dengan memodulasi kecepatan transkripsi oleh berbagai faktor transkripsi. Salah satu faktor transkripsi tersebut adalah *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR). Faktor transkripsi ini memegang peranan penting dalam berbagai fungsi selular termasuk metabolisme lemak, proliferasi sel, diferensiasi adipogenesis dan pensinyalan inflamatori (Sigma-aldrich, 2006). PPAR terdiri dari tiga subtipe, yaitu PPAR α , PPAR β dan PPAR γ . Subtipe PPAR yang berhubungan dengan regulasi perkembangan sel lemak adalah PPAR γ (Medterms, 2006). Diet tinggi lemak memicu peningkatan jumlah asam lemak bebas dan peningkatan aktivasi PPAR γ , sehingga menstimulasi penyimpanan lemak, adipogenesis dan obesitas (Croston, 2007).

Pada saat ini banyak dilakukan penelitian mengenai bioaktif yang terkandung dalam tanaman. Menurut Ostaszewski (2002), senyawa yang termasuk dalam bioaktif adalah polifenol, fitoestrogen,

fitosterol, *phytates* dan *polyunsaturated fatty acids*. Sebagian besar senyawa tersebut merupakan antioksidan. Salah satu bahan alami alternatif yang berpotensi dalam terapi obesitas adalah penggunaan teh hitam (*Camellia sinensis*). Hal ini disebabkan oleh adanya komponen polifenolik, seperti teaflavin yang telah dilaporkan memiliki peranan dalam aktivitas biologi (Lee, 2004). Aktivitas antioksidan teaflavin yang terkandung dalam teh hitam lebih tinggi daripada senyawa polifenolik yang terkandung dalam teh hijau, yaitu catesin. Teaflavin banyak diteliti sebagai agen pelindung penyakit kardiovaskular dan kanker karena kemampuannya dalam bidang farmakimia, termasuk antihipertensi, antioksidatif, dan aktivitas hipolipidemik (Leung, dkk, 2001). Oleh karena itu, kemampuan komponen polifenolik yang terkandung dalam teh hitam diduga dapat mempengaruhi jumlah sel adiposa yang mengekspresikan pengekspresian PPAR γ .

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, permasalahan yang perlu dipecahkan dalam penelitian ini adalah apakah sari seduh teh hitam berpengaruh terhadap jumlah sel adiposa yang mengekspresikan PPAR γ pada jaringan lemak visera *Rattus norvegicus* strain Wistar.

1.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh sari seduh teh hitam terhadap jumlah sel adiposa yang mengekspresikan PPAR γ pada jaringan lemak visera *Rattus norvegicus* strain Wistar.

1.4 Manfaat

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk mendukung usaha Departemen Kesehatan dalam rangka usaha meningkatkan kesehatan masyarakat. Selain itu, hasil penelitian ini juga dapat digunakan sebagai dasar penelitian untuk menentukan dosis ekstrak teh hitam yang efektif dalam mencegah terjadinya obesitas.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Obesitas

Obesitas didefinisikan sebagai *Body Mass Index* (BMI) lebih besar dari 30 kg/m² (National Institutes of Health, 2006). Obesitas pada hakikatnya merupakan timbunan triasilgliserol berlebih pada jaringan lemak akibat asupan energi berlebih dibanding penggunaannya (Indra, 2005), yang dicirikan dengan penambahan jumlah atau ukuran sel adiposit. Sel adiposit secara normal berfungsi sebagai tempat penyimpanan dan penghasil asam lemak serta berperan dalam regulasi makanan dan keseimbangan energi (Fuller dan Shield, 1998). Obesitas dapat bersifat patogenik. Dua hal yang mempengaruhi mekanisme patogenesis obesitas adalah keseimbangan energi, gen dan lingkungan (Soeatmadji, 2005).

Obesitas disebabkan oleh beberapa hal, yaitu peningkatan asupan kalori, penurunan pengeluaran energi, retensi fluida dan hereditas (Collins, 2007). Obesitas lemak visera adalah obesitas atau resistensi insulin yang diinduksi oleh akumulasi lemak visera dan berlanjut pada perkembangan hyperlipidemia, diabetes atau hipertensi (Yashushi, 2005).

2.2 Jaringan Lemak Visera

Jaringan adiposa yang dikenal sebagai lemak merupakan jaringan ikat longgar yang terdiri dari sel-sel yang terisi lemak (*lipid-filled cells*), dikelilingi oleh matriks serat kolagen, pembuluh darah, fibroblast dan sel-sel imun. Jaringan ini terorganisasi dalam struktur-struktur lobuler di daerah *subkutan* dan *mesenterium* (Ahima dan Filer, 2000). Menurut Patton dan Thibodeu (2000), lemak memiliki beberapa fungsi, antara lain sebagai sumber energi yang jumlahnya lebih besar daripada energi dari karbohidrat atau protein. Energi yang berasal dari lemak tersebut dapat disimpan dan diuraikan kembali menjadi energi. Fungsi lemak lainnya adalah sebagai komponen penyusun membran sel (fosfolipid dan gliserol), selain itu, jaringan ini juga berfungsi sebagai pelindung organ serta sebagai isolator panas, terutama lemak yang berada di bawah kulit sehingga dapat meminimalisasi hilangnya panas tubuh. Lemak merupakan pelarut vitamin sehingga vitamin dalam tubuh dapat memberikan manfaatnya secara optimal.

Jaringan lemak terdiri dari dua macam, yaitu jaringan lemak putih (*White Adipose Tissue/ WAT*) dan jaringan lemak coklat (*Brown Adipose Tissue/ BAT*). Jaringan lemak putih tersusun atas sel adiposa unilokuler yang mengandung satu droplet lemak yang berukuran besar, sehingga sitoplasma dan nukleus terdesak hingga ke tepian sel, sedangkan jaringan lemak coklat terdiri dari sel-sel lemak multilokuler yang mengandung droplet lemak yang berukuran kecil dan nukleus terletak di tengah (Gartner, dkk, 2003).

Lipid yang ditimbun di dalam sel lemak sebagian besar adalah trigliserida (TG). TG diangkut dalam darah dari usus dan hati oleh lipoprotein yang dikenal sebagai kilomikron (*Chylo*) dan VLDL (*very low- density lipoprotein*). Dalam kapiler jaringan lemak, lipoprotein tersebut sebagian dirombak oleh lipase lipoprotein, membebaskan asam lemak bebas (*Free Fatty Acid/ FFA*) dan gliserol (G). Asam lemak bebas berdifusi dari kapiler masuk ke dalam sel lemak, tempat esterifikasi ulang pada gliserol fosfat (GP) membentuk TG. TG yang dihasilkan selanjutnya disimpan dan digunakan apabila dibutuhkan oleh tubuh. Norepinefrin (NE) dari ujung-ujung saraf merangsang sistem AMP siklik (cAMP) yang mengaktifkan *lipase sensitive- hormon* (HSL) sehingga HSL menghidrolisis TG menjadi asam lemak bebas dan G. Substansi tersebut kemudian berdifusi ke dalam kapiler, tempat penggabungan asam lemak bebas dengan albumin (A) menuju tempat-tempat yang membutuhkan energi (Junqueira, dkk, 1997).

Distribusi lemak dalam tubuh dapat memprediksi resiko obesitas pada seseorang. Distribusi lemak regional berbeda antara pria dan wanita. Pada pria, lemak lebih banyak disimpan pada daerah *abdomen*, sedangkan pada wanita lemak tersimpan pada daerah *subkutan* (Elbers, dkk, 1997). Lemak perut terdiri dari lemak *subkutan* perut dan lemak dalam rongga perut (Marin, dkk, 1992). Jaringan lemak dalam rongga perut meliputi lemak viseral atau *intraperitoneal* terutama terdiri dari *omentum* dan lemak *mesenterika* serta massa lemak *retro peritoneal*. Jumlah lemak viseral sangat penting untuk mendeterminasi gangguan pada metabolisme lemak (Elbers, dkk, 1997).

Lemak visera berhubungan erat dengan sindrom metabolik, seperti glukosa intoleran, hipertensi, dyslipidemia, dan resistensi insulin. Jumlah lemak visera meningkat seiring usia, baik pada pria maupun wanita. Akan tetapi, pria memiliki massa lemak visera yang lebih besar daripada wanita (Wajchenberg, 2000).

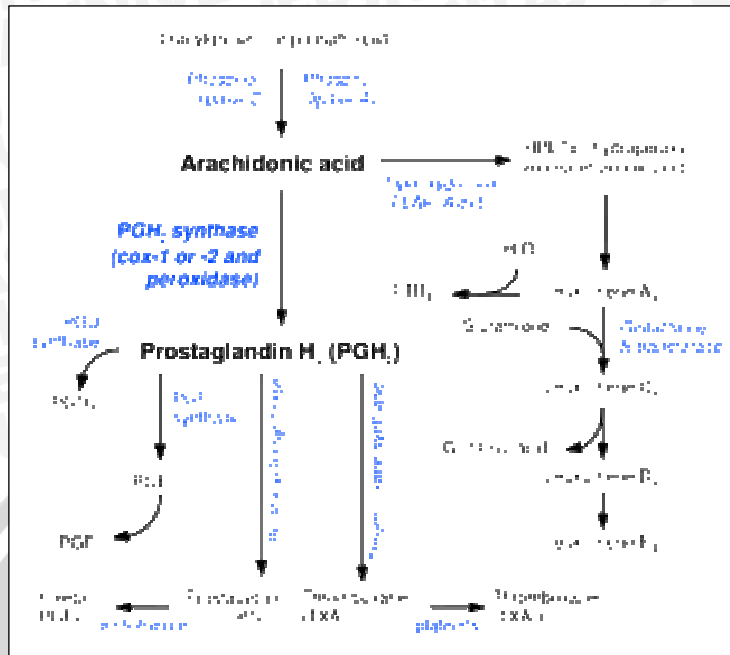
2.3 Peroxysome Proliferator-Activated Receptor γ

PPAR merupakan anggota dari superfamili reseptor inti yang berperan penting dalam diferensiasi adiposit dan regulasi metabolik (Camp, dkk, 1999). PPAR γ adalah anggota dari famili reseptor hormon inti. PPAR γ terdiri dari dua isoform, yaitu PPAR γ 1 dan PPAR γ 2. PPAR γ 1 terdapat di berbagai jaringan mamalia, sedangkan PPAR γ 2 sebagian tereksresi di jaringan lemak. Delesi satu alel dari PPAR γ tikus menyebabkan pencegahan hipertrofi adiposit dan perkembangan resistensi insulin pada respon untuk diet tinggi lemak. Selain itu, inaktivasi mutasi dari PPAR γ 2 menyebabkan terjadinya polimorfisme pada genom manusia meningkatkan sensitivitas insulin dan penurunan resiko diabetes type 2 (Parton, dkk, 2004).

PPAR γ diekspresikan di jaringan adiposa, *spleen*, adrenal dan *colon* (Anonymous, 2007). Ligan PPAR γ alamiah adalah beberapa asam lemak tidak jenuh seperti asam oleat, linoleat, *eicosapentanoic*, *arachidonic acid*, serta suatu prostanoid yang disebut sebagai 15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J₂ (Soeatmadji, 2005). Pembentukan ligan tersebut melibatkan aktivitas enzim lipoxigenase dan cyclooxygenase. Asam *arachidonic* dapat diubah menjadi prostaglandin H₂ (PGH₂) melalui jalur cyclooxygenase 1 dan 2. Selanjutnya, Prostaglandin H₂ (PGH₂) tersebut diubah menjadi PGD₂ dengan PGD *synthase*. Selain dapat diubah menjadi prostaglandin, asam *arachidonic* dapat diubah menjadi leukotrin dengan enzim 5-lipoxygenase (Gambar 2.1) (Wikipedia, 2007). PPAR γ diaktivasi oleh prostaglandin, leukotrin dan anti diabetik thiazolidinediones dan mempengaruhi ekspresi gen yang terlibat dalam penyimpanan asam lemak (Gambar 2.2) (Heuvel, 2000).

Peristiwa awal yang terjadi dalam diferensiasi sel adiposit adalah tereksresinya PPAR γ yang berlokasi di nukleus. PPAR γ adalah anggota dari subfamili reseptor inti yang termasuk didalamnya reseptor untuk steroid, tiroid dan hormon retinoid. PPAR γ mengandung *central DNA binding domain* yang mengikat *cis-acting element* (*Hormone Response Element*) di promoter gen PPAR. Untuk mengenali *Peroxisome Proliferator Response Element* (PPRE), PPAR γ harus membentuk heterodimer dengan reseptor asam retinoid (*Retinoic Acid Receptor*). Jika PPAR γ tereksresi berlebih di fibroblas, maka hal tersebut menginisiasi *cascade* dari

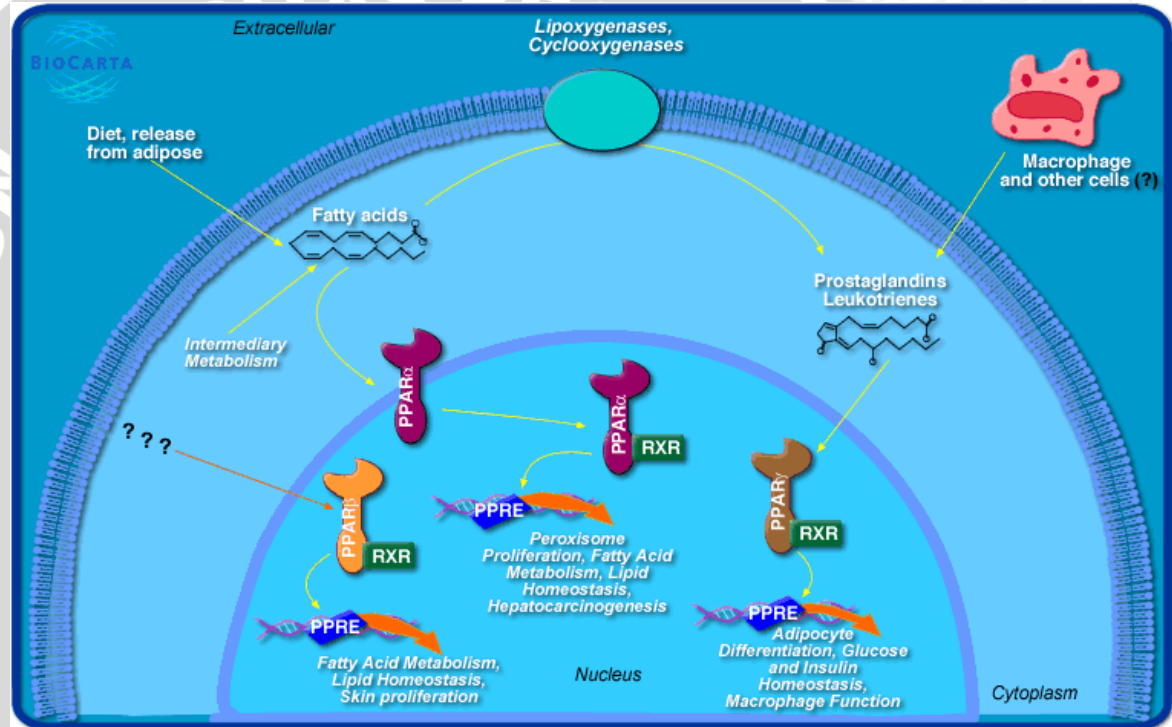
peristiwa yang mengawali diferensiasi fibroblas menjadi adiposit (Fuller dan Shields, 1998).



Gambar 2.1 Sintesis prostaglandin dan leukotrin (Wikipedia, 2007)

Resistensi insulin merupakan faktor utama penyebab penyakit diabetes tipe dua, hipertensi dan arteri koroner. Resistensi ini seringkali berasosiasi dengan obesitas, walaupun hingga saat ini hubungan secara molekuler antara peningkatan jumlah adiposit dan reduksi sensitifitas jaringan target terhadap insulin belum diketahui secara jelas. Hingga saat ini yang dapat diketahui adalah faktor-faktor yang diduga dapat mempengaruhi sensitifitas insulin, seperti *leptin*, *angiotensin 2*, *plasminogen-activator inhibitor-1*, *resistin* dan *tumour necrosis factor-alpha* (Kochan, 2003).

PPAR γ dapat meningkatkan sensitifitas insulin. Diabetes tipe 2 terjadi akibat berkurangnya sekresi insulin yang diinduksi oleh glukosa dan berkurangnya efisiensi kerja insulin (resistensi insulin). Resistensi insulin juga merupakan gambaran khas obesitas dan lipodistrofi. Pada individu dan hewan coba diabetes mellitus (DM) 2, *thiazolidinedione* (TZDs), ligan spesifik isoform PPAR γ merupakan



Gambar 2.2 Mekanisme dasar PPAR α , PPAR β dan PPAR γ serta efeknya terhadap ekspresi gen (Heuvel, 2000)

komponen antidiabetik yang dapat menurunkan hiperglikemi dan hiperinsulinemi, serta hipertrigliseridemia. TZD meningkatkan sensitifitas insulin terutama di otot rangka. Dalam hal *insulin dependent glucose utilization*, secara kuantitatif otot rangka merupakan jaringan paling penting. PPAR γ memperbaiki kondisi hiperglikemi pada model hewan coba (*rodent*) diabetes yang lipodistrofi. Hal tersebut menunjukkan bahwa kapasitasnya pengaruh TZDs berlangsung dengan cara mengaktifkan PPAR γ di jaringan lemak. Karena PPAR γ terutama didapatkan di jaringan lemak dan hampir tidak dijumpai di otot rangka (jaringan insulin sensitif yang utama), menimbulkan pertanyaan tentang hubungan antar jaringan adiposa dengan sensitifitas insulin. Penjelasan yang mungkin adalah aktivasi PPAR γ meningkatkan masuknya asam lemak ke dalam jaringan adiposa, dan oleh sebab itu menurunkan konsentrasi asam lemak di plasma. Berkurangnya ketersediaan asam lemak untuk otot mengurangi resistensi insulin (Soeatmadji, 2005).

2.4 Sari Seduh Teh Hitam

Teh hijau dan teh hitam berasal dari daun *Camellia sinensis* (famili theaceae) dan telah dikenal luas di seluruh dunia. Teh hijau merupakan bentuk segar dari daun *Camellia sinensis* yang dikeringkan, sedangkan teh hitam merupakan hasil fermentasi daun tanaman ini. Ciri khas dari teh hijau adalah keberadaan senyawa catesin polifenolik, seperti (-)-*epigallocatechin-3-gallate* (EGCG), (-)-*epigallocatechin* (EGC), (-)-*epicatechin-3-gallate* (ECG) dan (-)-*epicatechin* (EC) (Lee, 2004).

Teh hitam merupakan teh yang difermentasi. Pada teh ini catesin yang terkandung dalam teh hijau teroksidasi dan terdimerisasi selama proses fermentasi menjadi teaflavin dan *thearubigin*. Kadar teaflavin dalam teh hitam sekitar $\sim 2\text{g}/100\text{g}$ berat kering dari ekstrak teh hitam. Teaflavin terdiri dari tiga macam, yakni teaflavin (TF₁), teaflavin-3-galat (TF_{2A}), teaflavin-3'-galat (TF_{2B}) dan teaflavin-3,3'-digalat (TF₃). Beberapa studi, baik *in vitro* maupun *in vivo*, telah menunjukkan bahwa catesin dan teaflavin memiliki potensi antioksidan, sehingga dapat dipakai sebagai agen protektif. Berdasarkan hasil analisis reaksi substansi asam *thiobarbituric* (TBARS) dan *conjugated dienes* yang dihasilkan selama oksidasi LDL (*Low Density Lipid*) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan

dari teaflavin dan catesin adalah $TF_3 > ECG > EGCG > TF_2B > TF_1 \geq EC > EGC$ (Leung, 2001).

2.5 Imunohistokimia

Imunohistokimia adalah prosedur pewarnaan yang berdasarkan antibodi (Young dan Heath, 2000). Teknik ini melibatkan lokalisasi antigen pada potongan jaringan dengan menggunakan antibodi terlabel sebagai reagen spesifik melalui interaksi antigen-antibodi yang tervisualisasi oleh sebuah marker seperti pewarna fluoresen, enzim, elemen radioaktif atau emas koloidal (Anonymous, 2007). Imunohistokimia (IHK) berkenaan dengan proses pelokasian protein di dalam sel atau potongan jaringan, menggunakan prinsip antibodi yang berikatan secara spesifik terhadap antigen pada jaringan hidup (Ramos, 2005). Selama inkubasi larutan antibodi primer (1Ab) pada permukaan spesimen, antibodi akan berikatan dengan protein target. Inkubasi selanjutnya adalah dengan antibodi sekunder (2Ab), yang dapat secara spesifik mengenali antibodi pertama (Young dan Heath, 2000). Penggunaan set antibodi kedua atau antibodi sekunder dapat menghasilkan label yang jelas (Sidwell, 2006).

Imunohistokimia dapat secara spesifik mendeteksi epitop individual dan dapat memisahkan tipe sel dan tahapan diferensiasinya dengan keakurasian yang unik. Aplikasi dari teknik ini adalah untuk histogenesis dan diagnosis diferensial dari neoplasma, menentukan letak asal adenokarsinoma, penjaminan kualitas pada biopsi *lymph node*, mendefinisikan jalur transformasi, mendeteksi mikroorganisme dan memprediksi marker (Hayat, 2005).

Pewarnaan jaringan secara imunohistokimia terdiri dari beberapa metode. Metode langsung (*direct method*) adalah metode pewarnaan satu langkah dan melibatkan antibodi terlabel bereaksi secara langsung dengan antigen pada potongan jaringan. Metode tidak langsung (*indirect method*) menggunakan antibodi primer yang tidak terlabel, yang bereaksi dengan antigen jaringan dan antibodi sekunder yang terlabel yang bereaksi dengan antibodi primer. Pada prosedur ini antibodi sekunder yang terbiotinasi berikatan dengan streptavidin-horseradish peroxidase. Ikatan tersebut bereaksi dengan 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) untuk menghasilkan warna coklat ketika antibodi primer dan sekunder berikatan. (Ramos, 2005).

BAB III METODE PENELITIAN

9

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2006 – November 2007. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan kepada hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, sedangkan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (H&E) dan Imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Faal Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Biologi Molekuler, Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan dan nampan untuk pembuatan ransum makanan tikus, bak plastik berukuran 45cm x 35,5 cm x 14,5 cm, kandang tikus dari kawat dengan ukuran 36,5 cm x 28 cm x 15,5 cm, botol air dan sekam untuk pemeliharaan tikus dan alat yang dibutuhkan dalam pembuatan sari seduh teh hitam (SSTH) adalah cangkir, saringan, pemanas dan spuit. Selain alat-alat tersebut di atas, dalam penelitian ini juga digunakan gunting, pisau sayat dan pinset untuk pengambilan jaringan adiposa visera hewan coba, serta *backer glass*, microwive, refrigerator, oven, stirer, pipet tetes, *microsection*, obyek gelas, kover gelas, aluminium foil dan kotak perendam preparat untuk pewarnaan Hematoksilin-Eosin (H&E) dan Imunohistokimia. Untuk penghitungan persentase sel yang mengekspresikan PPAR γ , pengamatan dan pengambilan foto preparat, alat yang digunakan antara lain mikroskop NIKON optiphot 21, mikroskop Olympus BX 2, kamera digital, mikrometer obyektif, seperangkat komputer yang dilengkapi program AverTV dan *handtaly counter*.

3.2.2 Bahan

Hewan coba yang digunakan adalah tikus jantan jenis *Rattus norvegicus* strain Wistar yang sehat, tampak aktif, berumur 6-8

minggu dengan berat badan kurang lebih 200 gram sebanyak 12 ekor. Bahan yang digunakan untuk perlakuan hewan coba adalah *confeed* PARS, tepung terigu "Cap Gunung Bromo", air, kolesterol, asam *cholot*, minyak babi dan teh hitam dengan merk dagang Teh Hitam (Natural Exclusive Taste Black Tea), produksi PT. Medical Herb Center, Yogyakarta, Indonesia (Lampiran 7). Bahan untuk pewarnaan H&E dan Imunohistokimia adalah 4% *paraformaldehyde* (PFA), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), etanol, parafin, es batu, xylen, pewarna Hematoksilin, pewarna Eosin, Peroksida, etanol, anti PPAR γ antibodi poliklonal rabbit IgG (Bio Vision), susu skim, *biotin-goat-anti rabbit IgG* dan *streptavidin peroxidase*.

3.2 Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba yang berjumlah 12 ekor dibagi menjadi empat kelompok perlakuan dan pembagian tersebut menggunakan rancangan acak lengkap. Rancangan ini memberikan peluang dalam mengukur pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol. Empat kelompok perlakuan meliputi Kelompok A (hanya diberikan diet tinggi lemak), Kelompok B (diet tinggi lemak + SSTH 0,015 gr/hari), Kelompok C (diet tinggi lemak + SSTH 0,03 gr/hari), Kelompok D (diet tinggi lemak+ SSTH 0,045 gr/hari). Ulangan yang dilakukan untuk masing-masing kelompok adalah tiga kali. Sebelum perlakuan, dilakukan pengadaptasian tikus di laboratorium selama 7 hari dengan pemberian diet normal sebanyak 30,5 g/hari. Pembuatan pakan untuk diet normal ialah dengan mencampurkan PAR-S dan tepung terigu cap "Gunung Bromo" dengan total kadar lemak 9,73 % (Lampiran 8). Selanjutnya, tikus-tikus tersebut diberi perlakuan sesuai dengan kelompok perlakuan selama 90 hari. SSTH dibuat dengan cara menyeduh teh hitam sesuai dosis dengan air mendidih lalu didiamkan selama kurang lebih 15 menit, kemudian disaring dan diambil filtratnya. Dosis SSTH untuk kelompok perlakuan B adalah 0,015 gram/hari diseduh dalam 1,5 mL air, kelompok perlakuan C adalah 0,03 gram/hari diseduh dalam 3 mL air, dan kelompok perlakuan D adalah 0,045 gram/hari diseduh dalam 4,5 mL air. Pembuatan pakan tinggi lemak terdiri dari pencampuran PAR-S, tepung terigu cap "Gunung Bromo", kolesterol, asam *cholot* dan minyak babi dengan kadar lemak sebesar 30,10% (Lampiran 8). Asupan pakan tikus untuk diet tinggi lemak kurang lebih 15,26 g/

hari (Lampiran 10) dengan kenaikan berat badan seperti tercantum pada Lampiran 11. Pada akhir perlakuan, dilakukan pengambilan jaringan adiposa di bagian visera tikus perlakuan.

3.3. Pewarnaan Hematoxyline&Eosin dan Imunohistokimia Jaringan Adiposa Hewan Coba

Jaringan adiposa tikus yang diperoleh kemudian direndam dalam PFA (*paraformaldehyde*) 4% dalam suhu 4°C. Setelah itu, jaringan tersebut dicuci sebanyak dua kali menggunakan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) masing-masing selama 15 menit dan dicuci kembali dengan PBS selama 30 menit. Selanjutnya, dilakukan perendaman dengan seri etanol 70 % dan 90% di suhu ruang dengan waktu 1 jam untuk setiap larutan. Untuk perendaman dengan etanol 100% dilakukan dua kali dengan waktu perendaman masing-masing 1 jam. Kemudian, jaringan tersebut direndam dalam xylol I dan xylol II. Lama perendaman setiap larutan xylol tersebut adalah 1 jam. Langkah berikutnya adalah melakukan perendaman dalam parafin cair I selama 1 jam dan kemudian dilanjutkan dalam parafin cair II yang telah diisikan ke dalam kubus aluminium foil selama 1 jam pula. Perendaman dalam parafin I dan II dilakukan di dalam oven yang bersuhu 62°C. Aluminium foil yang telah berisi parafin dan jaringan adiposa tersebut kemudian diletakkan di atas wadah yang telah berisi air dan es batu. Setelah parafin memadat, dilakukan pemotongan untuk mendapatkan sayatan parafin yang berukuran 4-5 µm.

Sayatan parafin yang didapatkan dari perlakuan sebelumnya diletakkan dalam obyek gelas. Obyek gelas tersebut kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu 40°C selama 10-12 jam. Selanjutnya, obyek gelas tersebut direndam dalam xylene I selama 10 menit dan xylene II selama 5 menit. Preparat tersebut kemudian dicuci dengan etanol 100 %, 90 % dan 70 %, masing-masing selama 5 menit. Pencucian selanjutnya ialah dengan PBS selama 5 menit sebanyak tiga kali dan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Preparat tersebut kemudian diberi pewarna hematoksilin selama 2 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 2 menit. Setelah itu dilanjutkan dengan pewarnaan eosin selama 10 menit dan dicuci dengan air mengalir kembali selama 5 menit. Setelah itu dilakukan pencucian dengan etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% dan xylol.

Selanjutnya preparat ditutup kover gelas dengan menggunakan *enthelan*. Preparat hasil pewarnaan ini digunakan sebagai kontrol.

Selain diwarnai dengan pewarna H&E, sayatan parafin dari jaringan adiposa hewan coba dibuat preparat dengan metode pewarnaan imunohistokimia. Sayatan parafin diletakkan dalam obyek gelas yang kemudian direndam dalam xylene I selama 10 menit, dalam xylene II selama 5 menit, etanol 100 % selama 5 menit, etanol 90 % selama 5 menit dan etanol 70 % selama 5 menit. Setelah itu dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak tiga kali, dengan waktu 5 menit untuk setiap pencucian. Selanjutnya preparat tersebut direndam dalam 10 mM buffer sitrat pH 7,2-7,4 yang telah dipanaskan dalam suhu 70°C selama 5 menit dan dimasukkan dalam oven bersuhu 90°C. Setelah 15 menit, dilakukan pendinginan dengan cara memberikan air dingin di luar wadah preparat. Kemudian dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu, preparat dimasukkan ke dalam 0,3% H₂O₂ di suhu ruang selama 15 menit. Kemudian dilakukan pencucian dengan PBS selama 10 menit hingga 3 kali pencucian. Selanjutnya, dilakukan *bloking* dengan 2% susu skim selama 30 menit di suhu ruang dan diberi antibodi pertama yaitu anti PPAR γ antibodi poliklonal rabbit IgG (Bio Vision) (1:200). Setelah semalam, preparat dicuci dengan PBS selama 5 menit dengan frekuensi pencucian sebanyak 3 kali. Kemudian, dilakukan pemberian antibodi kedua yaitu *biotin-goat-antirabbit IgG* (1:500) selama 1 jam di suhu ruang. Setelah itu, dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Langkah berikutnya adalah melakukan perendaman dengan *streptavidin peroksidase* selama 20 menit dalam suhu ruang. Selanjutnya, dilakukan pencucian kembali dengan PBS selama 5 menit, sebanyak 2 kali dan 1 kali selama 10 menit. Perlakuan selanjutnya ialah pewarnaan DAB (3,3 *diaminobenzidine tetrahydrochloride*) di bawah mikroskop Olympus BX2. Setelah dilakukan pewarnaan DAB, dilakukan pencucian PBS kembali sebanyak tiga kali selama 10 menit. Kemudian, preparat tersebut diberi *counter stain* dengan Meyer Hematoxyline selama 2 menit dan dilanjutkan dengan pencucian air mengalir selama 2 menit. Langkah selanjutnya ialah dilakukan perendaman dalam etanol 70 % selama 2 menit, etanol 90 % selama 2 menit, 100% etanol dua kali masing-masing selama 2 menit,

xylene I selama 2 menit dan xylene II selama 2 menit. Selanjutnya, preparat diberi *enthelan* dan ditutup dengan kover gelas.

Preparat hasil pewarnaan H&E dan imunohistokimia, selanjutnya diamati dengan menggunakan mikroskop NIKON optiphot 21 dengan sistem *Difference Interference Contrast* yang dilengkapi dengan kamera digital yang telah terhubung dengan program AverTV sehingga dapat tervisualisasi melalui layar komputer.

3.4 Penghitungan Persentase Sel Adiposa Jaringan Lemak Visera yang Mengekspresikan PPAR γ

Pada penelitian ini dilakukan penghitungan persentase sel adiposa dari jaringan lemak visera yang mengekspresikan PPAR γ (Hansen, dkk, 1998). Setiap perlakuan dilakukan dengan tiga kali ulangan. Dalam setiap ulangan dilakukan penghitungan sel adiposa yang mengekspresikan PPAR γ pada tiga potongan jaringan. Di setiap jaringan ditentukan tiga lapang pandang, yaitu bagian atas, tengah dan bawah. Penghitungan sel tersebut dilakukan pada perbesaran 200x dengan mikroskop cahaya Olympus BX2. Hasil perhitungan sel tersebut kemudian dipersentasekan dengan jumlah sel keseluruhan yang terdapat dalam setiap lapang pandang. Hasil rata-rata persentase sel yang didapatkan kemudian ditabulasi dan dianalisis.

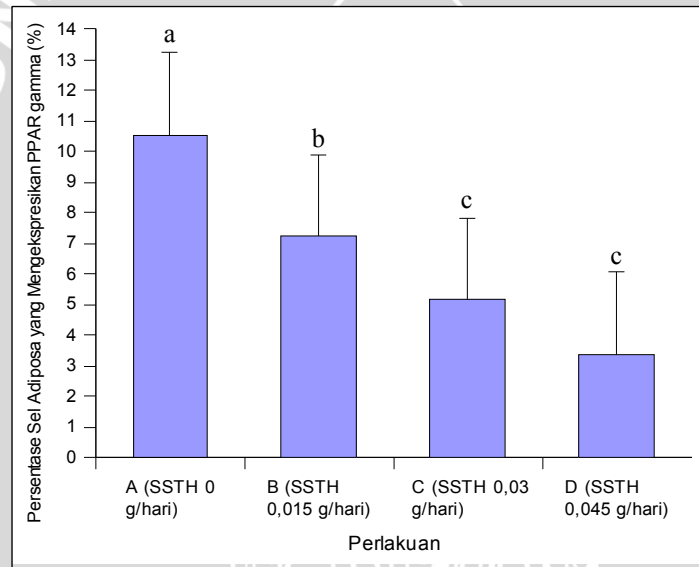
3.5 Analisis Data

Persentase sel adiposa visera yang mengekspresikan PPAR γ pada setiap kelompok perlakuan dianalisis dengan *one way* ANNOVA dan dilanjutkan dengan uji Tukey dalam program SPSS 12 untuk mendapatkan informasi mengenai beda nyata antar variasi dosis sari seduh teh hitam pada perlakuan.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase sel adiposa yang mengekspresikan PPAR γ mengalami penurunan seiring dengan penambahan dosis SSTH (Gambar 4.1). Perhitungan tersebut diperoleh melalui perhitungan inti sel adiposa yang berwarna coklat dari hasil pewarnaan immunohistokimia (Gambar 4.2).

Pemberian SSTH 0,015 g/hari dapat menurunkan jumlah sel yang mengekspresikan PPAR γ , akan tetapi dosis yang dapat memberikan efek penurunan secara maksimal adalah SSTH 0,030 g/hari. Sebab, pada penambahan dosis SSTH di atas 0,030 g/hari memberikan efek yang hampir sama dengan SSTH 0,030 g/hari. Hal ini ditunjukkan dengan hasil uji statistik yang sama untuk SSTH 0,030 g/hari dengan SSTH 0,045 g/ hari. Penurunan persentase sel yang mengekspresikan PPAR γ tersebut menunjukkan bahwa SSTH dapat menurunkan jumlah sel adiposa yang mengekspresikan PPAR γ pada jaringan lemak visera *Rattus norvegicus* strain Wistar.



Gambar 4.1 Rasio sel lemak visera yang mengekspresikan PPAR γ pada tiap perlakuan ($P < 0,05$)

Penurunan jumlah sel adiposa yang mengekspresikan PPAR γ kemungkinan disebabkan oleh senyawa polifenolik yang terkandung dalam SSTH, sebab menurut Zang, dkk (2006) polifenol dapat menstimulasi regulasi gen yang mengekspresikan PPAR. Dugaan tersebut didukung oleh hasil penelitian Frei dan Higdon (2003) yang menyebutkan bahwa senyawa polifenolik yang terkandung dalam teh hitam, yakni teaflavin dan tearubigin dapat menghambat pembentukan enzim cyclooxygenase, lipoxxygenase dan iNOS (*inducible nitrit oxide*).

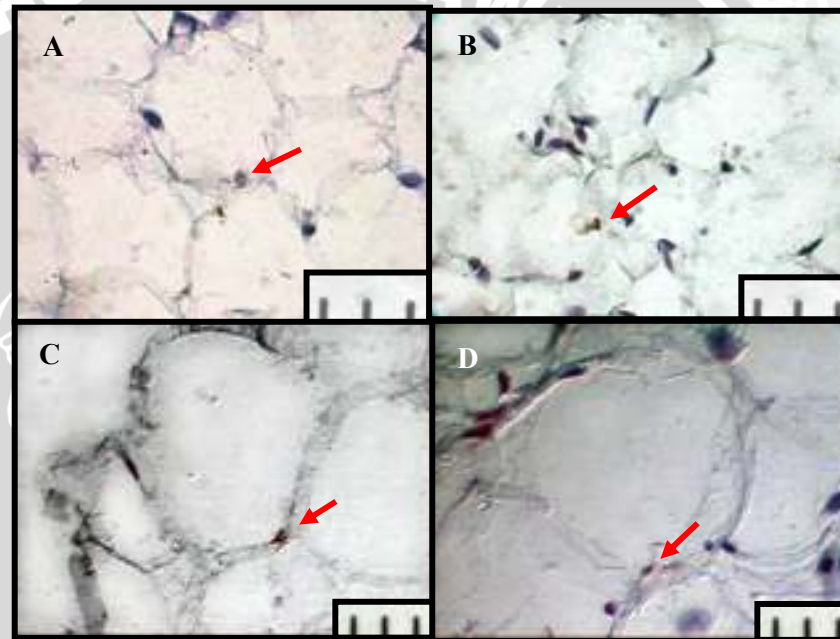
Enzim cyclooxygenase dan lipoxxygenase merupakan enzim yang mengkatalisasi pembentukan prostaglandin (Ncl, 2000) dan leukotrin (Levers, 2004), yaitu ligan alami yang mengaktifkan PPAR γ (Heuvel, 2000). Apabila kedua enzim tersebut di atas dihambat, maka ligan alami yang terbentuk mengalami penurunan sehingga PPAR γ yang teraktifkan juga mengalami penurunan (Gambar 4.3).

Selain menghambat enzim cyclooxygenase dan lipoxxygenase, SSTH juga menghambat enzim iNOS. Hal ini dibuktikan dengan kemampuan teaflavin dalam menghambat lipopolisakarida penginduksi ekspresi gen iNOS dan aktivitas iNOS dalam kultur makrofag (Frei dan Higdon 2003). Secara tidak langsung, pengekspresian PPAR γ di regulasi oleh enzim tersebut. Pada keadaan asam lemak bebas yang tinggi di dalam sel, terjadi peningkatan Fatty acyl CoA yang dapat meningkatkan aktivitas protein kinase C (PKC). Peningkatan aktivitas PKC memicu fosforilasi Inhibitor κ B (IkB) yang dapat mengakibatkan pelepasan Nuclear Factor κ B (NF κ B). NF κ B akan memicu proses transkripsi beberapa gen yang mengkode proinflamasi, seperti TNF α . Dengan demikian dapat diketahui bahwa peningkatan asam lemak bebas dapat memicu proses inflamasi (Indriyanti, 2005).

TNF α dapat menginduksi pembentukan iNOS. Peningkatan iNOS menyebabkan peningkatan produksi NO yang dapat memicu kegagalan insulin dalam menstimulasi transport glukosa sehingga terjadi resistensi insulin. Resistensi insulin berarti ketidakmampuan insulin memberi efek biologik yang normal pada kadar gula darah tertentu sehingga dibutuhkan kadar insulin yang lebih banyak untuk mencapai kadar glukosa darah yang normal (Merentek, 2006). PPAR γ berperan dalam penyimpanan asam lemak di dalam sel

adiposa sehingga resistensi insulin menyebabkan peningkatan pengekspresian PPAR γ .

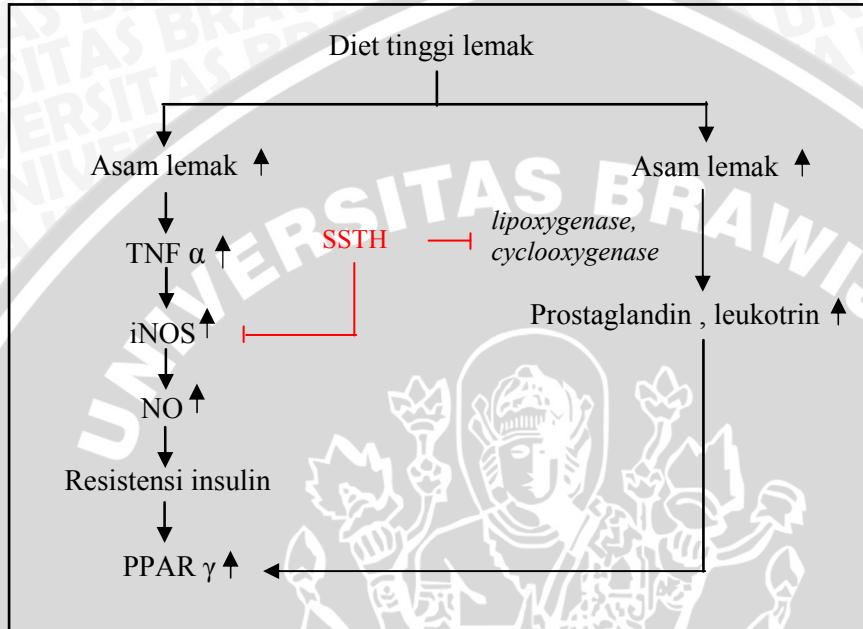




Gambar 4.2 Hasil pewarnaan immunohistokimia dengan antibodi anti PPAR γ
A : SSTH 0 g/hari; B : SSTH 0,015 g/hari; C : SSTH 0,030 g/hari; D : SSTH 0,045 g/hari;
→ : sel yang mengekspresikan PPAR γ ; 1 skala : 0,01 mm (Perbesaran 400 x)



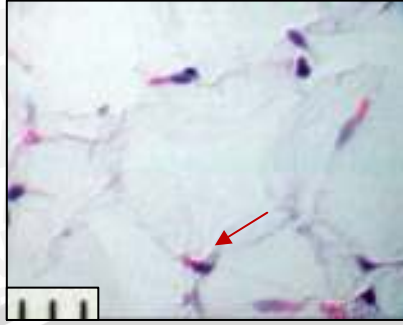
Semakin banyak PPAR γ yang teraktivasi, maka asam lemak yang berlimpah di plasma dapat disimpan di dalam jaringan adiposa sehingga konsentrasi asam lemak di plasma berkurang (Soeatmadji, 2005). Oleh karena itu, apabila enzim iNOS dihambat, maka produksi NO akan menurun dan resistensi insulin akan menurun juga, sehingga pengekspresian PPAR γ mengalami penurunan pula. Hal ini bersesuaian dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa persentase sel yang mengekspresikan PPAR γ pada perlakuan tanpa SSTH lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lain yang menggunakan SSTH (Gambar 4.3).



Gambar 4. 3 Jalur penghambatan SSTH terhadap pengekspresian PPAR γ pada sel adiposa
 —| : Penghambatan oleh SSTH

Sel lemak dari hasil visualisasi preparat yang diwarnai dengan Hematoxyline&Eosin (Gambar 4.4) berbentuk bulat dengan inti yang terletak di tepi sehingga dapat diketahui jenis lemak tersebut, yaitu termasuk dalam golongan lemak unilokular. Pada bagian tengah sel berupa lumen yang merupakan vakuola lemak yang telah

kosong, karena tetes lipid telah terlarut oleh alkohol dan xylol pada proses pembuatan preparat (Junqueira, dkk, 1998).



Gambar 4.4. Sel lemak visera *Rattus norvegicus* strain Wistar (Pewarnaan Hematoxylene&Eosin); 1 skala : 0,01 mm (Perbesaran 400x)

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

Persentase sel adiposa yang mengekspresikan PPAR γ mengalami penurunan seiring peningkatan dosis SSTH. Hasil penelitian tersebut menunjukkan SSTH dapat menurunkan pengekspresian PPAR γ sel adiposa jaringan lemak visera *Rattus norvegicus* strain Wistar.

5.2 SARAN

Penelitian lanjutan diperlukan untuk mengetahui jenis dan dosis senyawa polifenolik yang terkandung dalam teh hitam yang dapat mempengaruhi pengekspresian PPAR γ secara spesifik. Selain itu, perlu dilakukan pula pengkajian lebih lanjut mengenai mekanisme penghambatan senyawa polifenolik teh hitam terhadap penghambatan pengekspresian PPAR γ pada sel adiposa jaringan lemak visera sehingga dapat diketahui secara pasti letak penghambatannya, terutama pada mekanisme yang melibatkan enzim prooksidan iNOS, lipoxigenase dan cyclooxygenase.



DAFTAR PUSTAKA

- Ahima RS and J.S. Filer. 2000. *Adipose Tissue as An Endocrine Organ*, Trends in Endocrine and Metab. 11:327-332.
- Anonimous. 2007. Introduction to Immunohistochemistry. <http://www.ihcworld.com/>. Tanggal Akses 6 Desember 2007.
- Anonimous. 2007. The PPAR subfamily of nuclear receptors.<http://www.jlr.org/>. Tanggal Akses 30 November 2007.
- Camp, H.S., Tafuri, S.R., dan Leff, T. 1999. c-Jun N-Terminal Kinase Phosphorylates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 1 and Negatively Regulates Its Transcriptional Activity. *Endocrinology* Vol. 140, No. 1 392-397.
- Collins, R.D. 2007. *Differential Diagnosis in Primary Care*. Lippincott Williams & Wilkins. ISBN: 0-7817-6812-8.
- Croston, G. 2007. Role of PPAR γ Coactivators in Obesity and Thermogenesis. <http://www.biocarta.com/>. Tanggal Akses 28 November 2007.
- Elbers, J. M.H., H. Asscheman., J.C. Seidell., J. A.J. Megens dan L.J.G. Gooren. 1997. Long- Term Testosterone Administration Increases Viseral fat in Female to Male Transsexuals. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <http://jcem.endojournals.org>. Tanggal Akses 14 November 2006.
- Frei, B dan J. V. Higdon. 2003. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies1. *The Journal of Nutrition*. American Society for Nutrition Sciences.
- Fuller, G.M, dan D. Shields. 1998. *Molecular Basis of Medical Cell Biology*. Appleton & Lange A Simon & Schuster Company. Stamford. hal 176-177.

- Gartner, L. P., J. L. Hiatt., dan J.M. Strum. 2003. Cell Biology and Histology. 4 th Edition. Lippincott Williams&Wilkins. Baltimore.
- Gregoire, F.M. C.M. Smas, H.S. Sul. 1998. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews* Vol. 78, USA. Hal 783-799.
- Hansen, L.H., B. Madsen., B. Teisner., J.H. Nielsen., dan N. Billestrup. 1998. Characterization of the Inhibitory Effect of Growth Hormone on Primary Preadipocyte Differentiation. *Molecular Endokrinology*. 0888-8809
- Hayat, MA. 2005. Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas, Volume 3. Molecular Genetics, Liver carcinoma and Pancreatic Carcinoma. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 432 hal.
- Harmon, A.W. dan J. B. Harp. 2001. Differential effects of Flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C807–C813.
- Heuvel, J.V. 2000. Basic Mechanism of Action of PPARa, PPARb(d) and PPARg and Effects on Gene Expression. <http://www.biocarta.com/>. Tanggal akses 28 November 2007
- Indra, M. R. 2005, Dasar Genetik Obesitas Viseral, dalam Buku Kumpulan Makalah Fourth Basic Molecular Biology Course in Pathophysiology of Obesity. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya, Malang.
- Indriyanti, R. S. 2005. Peran Asam Lemak Bebas, Stres Oksidatif dan Keadaan Inflamasi terhadap Kejadian Resistensi Insulin. *Forum Diagnosticum* edisi khusus 6/05. ISSN : 0854-7173.
- Junqueira, L.C., J. Carneiro dan R.O. Kelley. 1997. Histologi Dasar. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Halaman 123.
- Kochan, Z. 2003. Adiponectin - the molecular link between obesity and diabetes, <http://www.actabp.pl/pdf/Supl03/Session13.pdf>. Tanggal akses 10 Juni 2006.

Lee M. J, J. D. Lambert, S. Prabhu, X. Meng, H. Lu, P. Maliakal, C.T. Ho dan C. S. Yang, 2004, Delivery of Tea Polyphenols to the Oral Cavity by Green Tea Leaves and Black Tea Extract, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention Journal* Vol. 13.

Leung L. K, Y. Su, R. Chen, Z. Zhang, Y. Huang dan Z.Y. Chen, 2001, Theaflavins in Black Tea and Catechins in Green Tea Are Equally Effective Antioxidants, *Biochemical and Molecular Action of Nutrients Research Communication Journal*.

Leyers, M. 2004. Lipoxygenase. <http://www.biochem.northwestern.edu/holmgren/glossary/Definitions/Def-L/lipoxygenase.html>. Tanggal akses 30 November 2007.

Marin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, Holm G, Sjostrom L, Bjorntorp, 1992, *The Morphology and Metabolism of Intraabdominal Adipose Tissue in Men* Metabolism. 41: 1242-1248.

Medterms,2006,Definition of PPAR, <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=15502>, Tanggal akses 10 Juni 2006.

Merentek, E. 2006. Resistensi Insulin pada Diabetes Melitus Type II. *Cermin Dunia Kedokteran* No. 150.

Morrison, R.F. dan R.S. Farmer. 2000. Hormonal Signaling and Transcriptional Control of Adipocyte Differentiation. *American Society for Nutritional Sciences*. 130: 3116S-3121S.

Mutalib, P.K.S. 2003. Tinjauan Pustaka : Sintesis NO dan Sindrom CHAOS. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.

Ncl. 2000. Cyclooxygenase. <http://cancerweb.ncl.ac.uk/cgi-bin/omd?lipoxygenase>. Tanggal akses 30 November 2007.

- Ostaszewski, P. 2002. Bioactive Substances of Plant Origin in Food - Impact on Genomics. <http://www.edpsciences.org/articles/rnd/pdf/2002/06/05.pdf>. Tanggal Akses 14 Juli 2006.
- Parton, L.E., F. Diraison., S.E. Neil., S.K. Ghosh., M. A. Rubino., J. E. Bisis., C. P. Briscoe dan G. A. Rutteri. 2004. Impact of PPAR γ Overexpression and Activation on Pancreatic Islet Gene Expression Profile Analyzed with Oligonucleotida Microarrays. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E390–E404.
- Patton, K.T. dan G.A. Thibodeu. 2000. *Mosby's Handbook of Anatomy and Physiology*. Mosby, Inc. Missouri. hal 30.
- Ramos, V. 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42:405-426.
- Rotondo, D. dan J. Davidson. 2002. Prostaglandin And PPAR Control of Immune Cell Function. *Immunology Journal*. Blackwell Science Ltd. 105(1): 20–22.
- Sidwell. 2006. Immunocytochemistry. http://www.sidwell.edu/us/science/21bio/new/thigmo_immuno.htm. Tanggal akses 26 Juni 2006.
- Sigma-aldrich. 2006. PPAR Agonists. http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Scientific_Resources/PPARagonists. Tanggal akses 10 Juni 2006.
- Soeatmadji, D. W, 2005. The Role of PPARs in The Homeostasis of Energy Balance, dalam Buku Kumpulan Makalah Fourth Basic Molecular Biology Course in Pathophysiology of Obesity. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya, Malang.
- Wacjenberg, B.L. 2000. Subcutaneous and Viseral Adipose Tissue: Their Relation to The Metabolic Syndrome. *Endocrine*

Reviews 21(6)=697-738. <http://edrv.endojournals.org/>.
Tanggal Akses 22 Desember 2005.

WHO.2003.Obesity and Overweight. www.who.int/hpr/NPH/docs/gsobesity.pdf,
Tanggal akses 10 Juni 2006

Wikipedia. 2007. Prostaglandin. <http://en.wikipedia.org/wiki/Prostaglandin>.
Tanggal akses 30 November 2007.

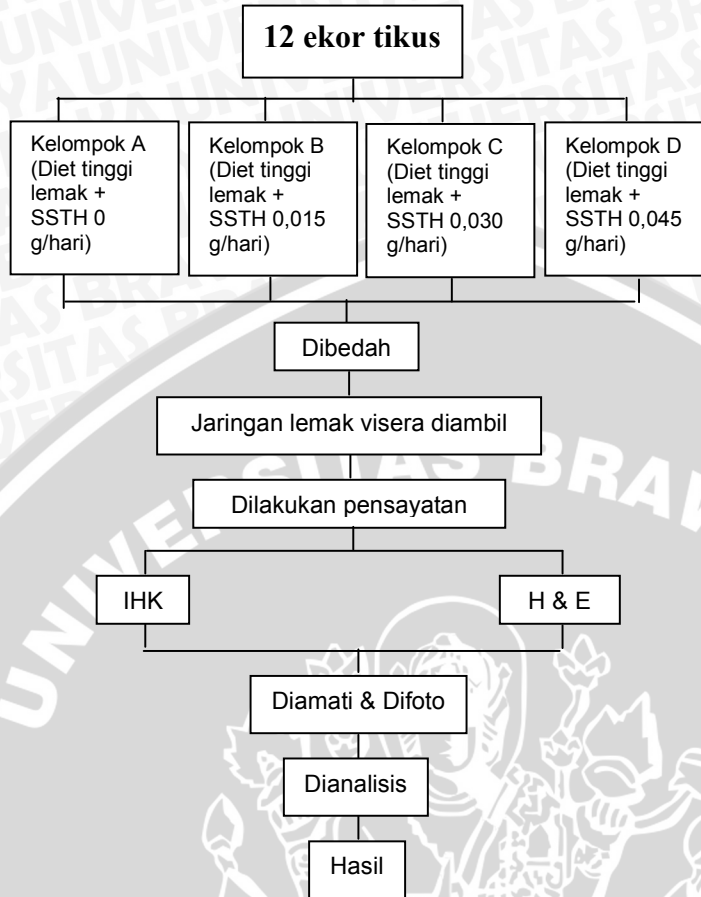
Yashushi, S. 2005. Treatment of Obesity With Viscera Fat Accumulation. Clinic All Round Journal. Z0697A. ISSN:0371-1900. vol.54, no.4, Halaman 1378-1382.

Young, B. and J.W. Heath. 2000. Lab 2: Characterization of skin using immunohistochemistry, [http://outreach.mcb.harvard.edu/downloads/Summer03/lab_2.pdf#search=%22immunohistochemistry%20filetype%3Apdf%22](http://outreach.mcb.harvard.edu/downloads/Summer03/lab_2.pdf#search=%22immunohistochemistry%20 filetype%3Apdf%22). Tanggal akses 9 Oktober 2006.

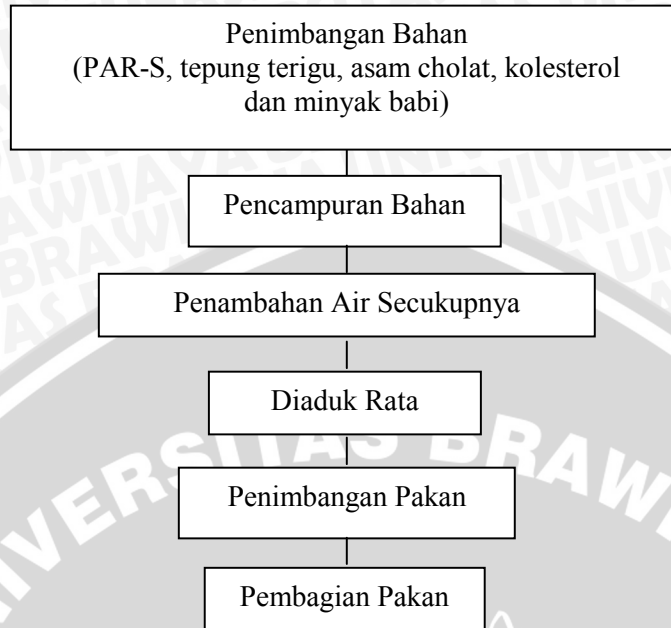
Zang, M., S. Xu., K.A.M. Toolan., A. Zuccalo., X. Hou., B. Jiang., M.Wierzbicki., T.J. Verbeuren dan R.A. Cohen. 2006. The American Diabetes Association. Vol 5. DOI : 10.2337/db05-1188.



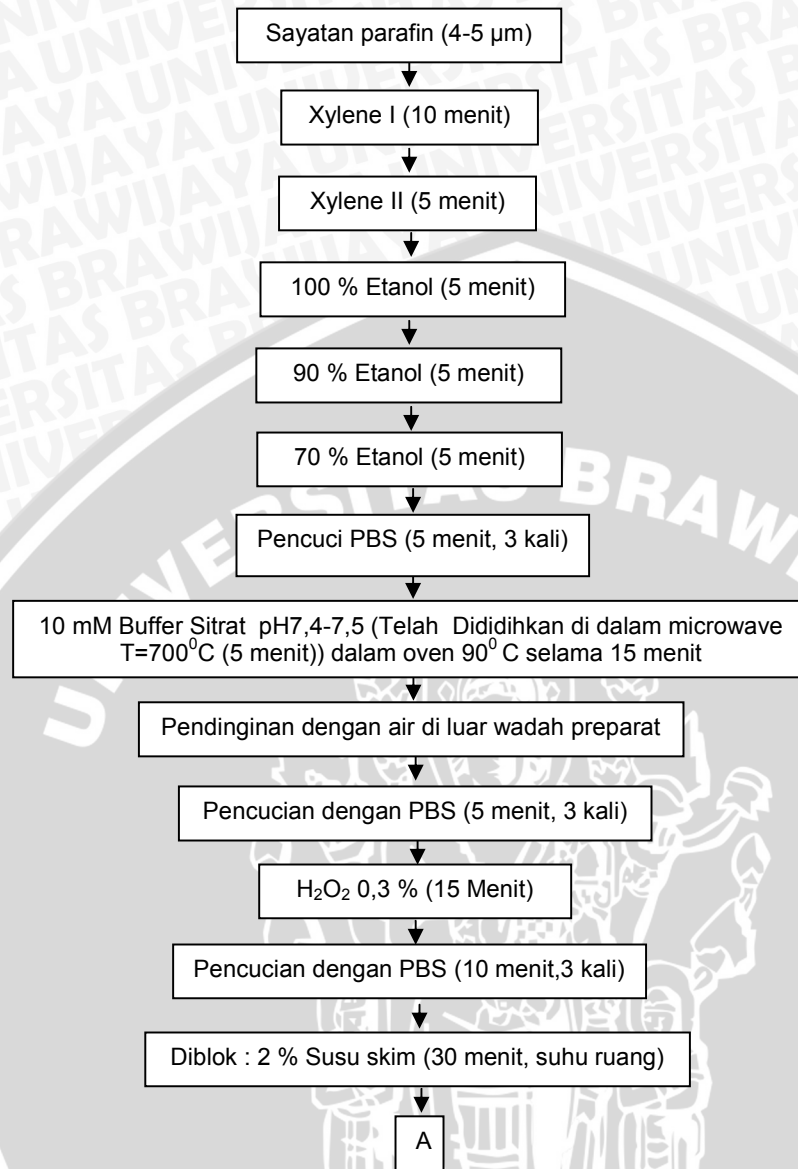
Lampiran 1. Alur Penelitian

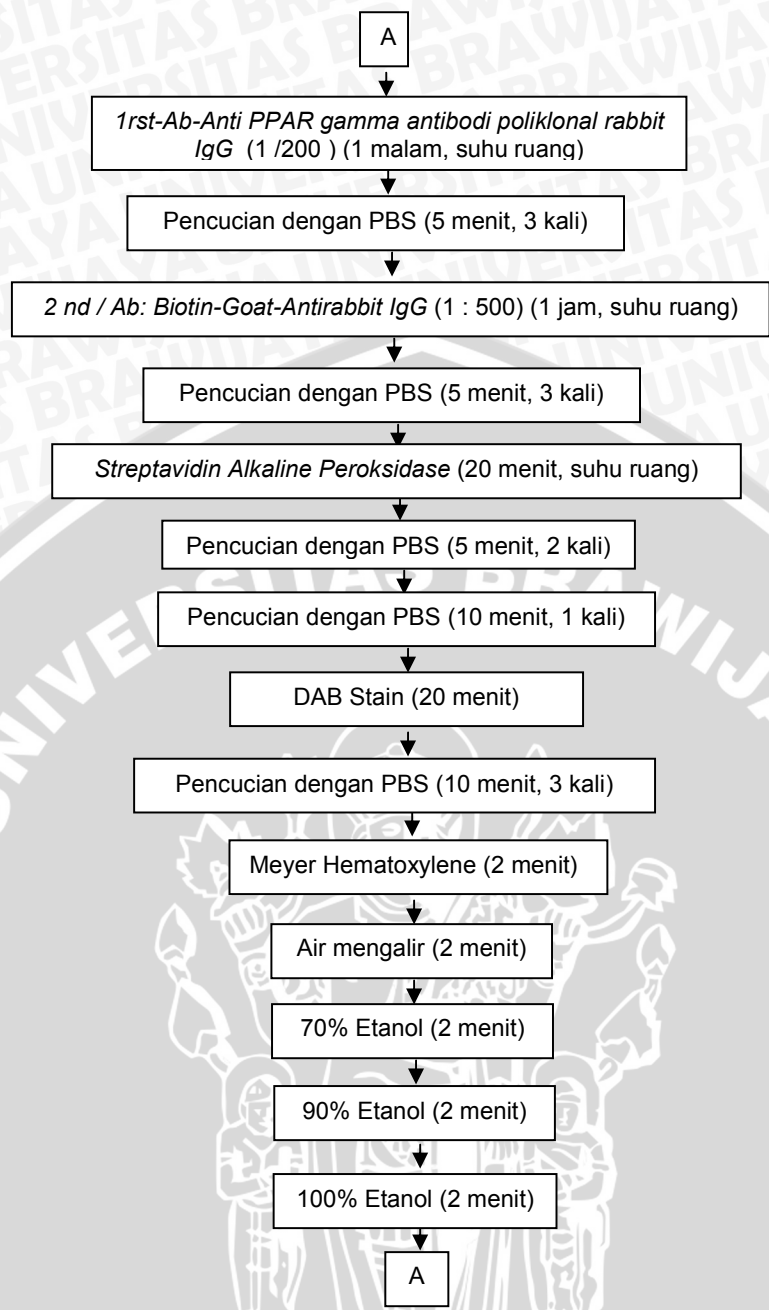
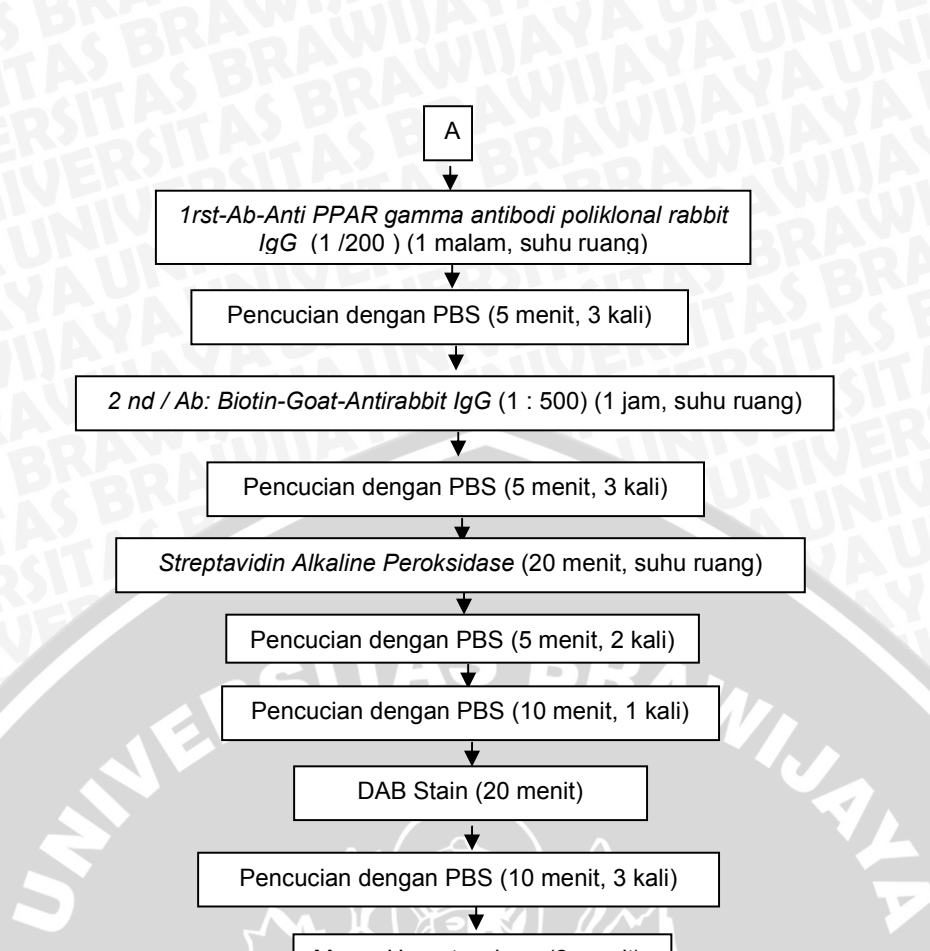


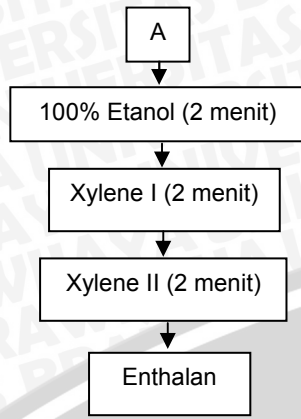
Lampiran 2 Alur Pembuatan Pakan Diet Tinggi Lemak



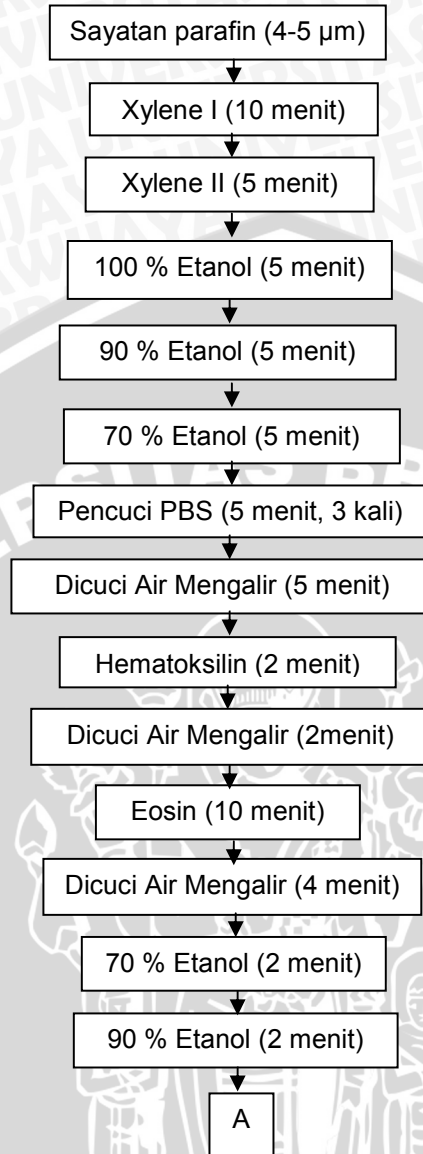
Lampiran 3. Alur Pewarnaan Imunohistokimia

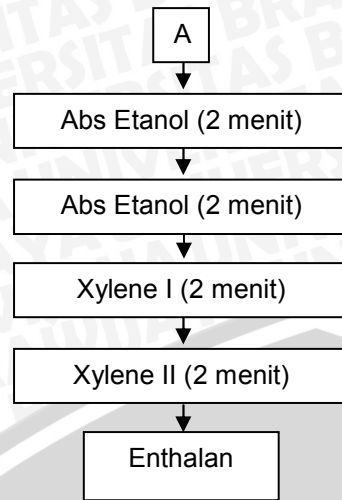






Lampiran 4. Alur Pewarnaan Hematoxylene&Eosin





Lampiran 5. Komposisi Bahan

1. Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,4 (untuk 1 L)
 - 8,473 g NaCl
 - 1,7799 g Na_2HPO_4
 - 1,3799 g NaH_2PO_4
2. Buffer Sitrat 10 mM (untuk 1 L)
 - 1,3 g asam sitrat
 - 1,1 g Na sitrat
 - Akuades hingga 1 L
3. Pelarut kromogen DAB
 - a. Tris Buffer, 0,05 mol/L, pH 7,6
 - 6,1 g Tris (hydroxymethyl amino methane) dalam 50 mL *distilled water*
 - 1N *hydrochloric acid*
 - Dilarutkan dengan *distilled water* hingga 1 L
 - pH $7,6 \pm 0,2$ pada suhu 25 °C
 - b. Phosphate Buffer Saline, 0,03 mol/L pH 7
 - 1 L *distilled water*
 - 1,92 g Na_2HPO_4
 - 0,92 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 - 5,90 NaCl
4. Paraformaldehide 4%
 - Formalin 4% dari volume PBS
 - PBS
 - NaOH
5. Eosin
 - Phloxine B 1% : 1 mL
 - Eosin Y 1% : 1 mL
 - Alkohol 95% : 780 mL
 - *Glacial Acetic Acid* : 4 mL

6. Meyer Hematoxylene

- Hematoxylene
- *Distiled water* 1000 mL
- Potassium atau ammonium alum 50 g
- Sodium iodate 0,2 g
- Citric Acid 1 g
- Chloral hydrate SLR 50 g
- Chloral hydrate AR 30 g



Lampiran 6. Hasil Perhitungan Persentase Sel yang Mengekspresikan PPAR γ

Perlakuan	Ulangan	Potongan	Lpg pndg	A	B	C	D	E	
A (diet tinggi lemak + SSTH 0 g/hari)	A1	a	1	52	7	13.46	12.56		
			2	61	8	13.11			
			3	54	6	11.11			
		b		1	46	5	10.87	10.44	11.90
				2	55	5	9.09		
				3	44	5	11.36		
		c		1	40	4	10.00	12.71	
				2	64	10	15.63		
				3	56	7	12.50		
	A2	a	1	76	10	13.16	12.38		
			2	73	10	13.70			
			3	68	7	10.29			
		b		1	69	5	7.25	9.37	10.42
				2	71	8	11.27		
				3	73	7	9.59		
		c		1	70	8	11.43	9.50	
				2	72	5	6.94		
				3	79	8	10.13		
	A3	a	1	85	8	9.41	10.14		

			2	79	7	8.86		
			3	74	9	12.16		
		b	1	82	5	6.10	8.41	9.34
			2	79	6	7.59		
			3	78	9	11.54		
		c	1	82	9	10.98	9.46	
			2	84	6	7.14		
			3	78	8	10.26		
B (diet tinggi lemak + SSTH 0,015 g/hari)	B1	a	1	88	7	7.95	6.89	
			2	94	7	7.45		
			3	95	5	5.26		
		b	1	84	6	7.14	8.44	7.31
			2	100	10	10.00		
			3	98	8	8.16		
		c	1	85	8	9.41	6.61	
			2	85	5	5.88		
			3	88	4	4.55		
	B2	a	1	102	6	5.88	7.66	
			2	88	6	6.82		
			3	107	11	10.28		
		b	1	110	10	9.09	7.25	6.94

			2	96	6	6.25		
			3	109	7	6.42		
		c	1	94	5	5.32	5.91	
			2	86	5	5.81		
			3	106	7	6.60		
	B3	a	1	103	10	9.71	8.66	
			2	91	9	9.89		
			3	94	6	6.38		
		b	1	105	7	6.67	7.37	7.43
			2	100	8	8.00		
			3	94	7	7.45		
		c	1	90	6	6.67	6.25	
			2	91	6	6.59		
			3	91	5	5.49		
C (diet tinggi lemak + SSTH 0,030 g/hari)	C1	a	1	55	2	3.64	4.48	
			2	61	3	4.92		
			3	82	4	4.88		
		b	1	56	2	3.57	4.38	4.99
			2	48	2	4.17		
			3	74	4	5.41		
		c	1	52	3	5.77	6.12	

			2	53	3	5.66		
			3	72	5	6.94		
	C2	a	1	77	5	6.49	6.28	
			2	75	4	5.33		
			3	57	4	7.02		
		b	1	75	5	6.67	6.10	5.97
			2	65	3	4.62		
			3	57	4	7.02		
		c	1	52	3	5.77	5.53	
			2	58	3	5.17		
			3	53	3	5.66		
	C3	a	1	58	3	5.17	4.57	
			2	66	3	4.55		
			3	75	3	4.00		
		b	1	71	3	4.23	5.33	4.50
			2	78	5	6.41		
			3	56	3	5.36		
		c	1	75	2	2.67	3.61	
			2	80	2	2.50		
			3	53	3	5.66		
	D (diet tinggi lemak + SSTH 0,45 g/hari)	D1	a	1	51	2	3.92	4.50

			2	54	2	3.70		
			3	68	4	5.88		
		b	1	64	2	3.13	2.26	3.69
			2	51	1	1.96		
			3	59	1	1.69		
		c	1	54	2	3.70	4.31	
			2	60	2	3.33		
			3	51	3	5.88		
	D2	a	1	87	2	2.30	2.26	
			2	68	2	2.94		
			3	65	1	1.54		
		b	1	106	5	4.72	3.85	3.47
			2	63	2	3.17		
			3	82	3	3.66		
		c	1	90	5	5.56	4.31	
			2	69	3	4.35		
			3	66	2	3.03		
	D3	a	1	56	2	3.57	3.96	
			2	66	3	4.55		
			3	53	2	3.77		
		b	1	52	1	1.92	3.02	2.96
			2	61	2	3.28		

			3	52	2	3.85	
		c	1	51	1	1.96	1.89
			2	56	1	1.79	
			3	52	1	1.92	

Keterangan :

- A Jumlah sel dalam 1 lapang pandang
- B Jumlah sel yang mengekspresikan PPAR γ dalam 1 lapang pandang
- C Persentase Sel yang mengekspresikan PPAR γ dari tiap lapang pandang(X1)
- D Rata-rata X1 dalam 1 potongan (X2)
- E Persentase rata-rata X2 dalam 1 ulangan

Perlakuan	Persentase rata-rata X2 dalam 1 perlakuan
A (SSTH 0 g/hari)	10.55297412
B (SSTH 0,015 g/hari)	7.227436998
C (SSTH 0,03 g/hari)	5.15680233
D (SSTH 0,045 g/hari)	3.373258215

Lampiran 7. Merk Dagang Teh Hitam yang Digunakan dalam Penelitian

Merk Dagang : Teh Hitam (Natural Exclusive Taste Black Tea)
Produksi : PT. Medical Herb Center Yogyakarta Indonesia
Pembelian : Toko Kalimosodo Sawojajar Malang



Lampiran 8. Komposisi Diet Normal dan Diet Tinggi Lemak

1. Diet Normal adalah perlakuan terhadap tikus *Rattus novergicus strain Wistar* jantan umur 6-8 minggu yang diberi pakan diet normal tikus dengan total energi 104,6 Kal dengan komposisi sebagai berikut :

Diet Normal :

PAR-S	Tepung terigu "Gunung Bromo" (100 gram)
Energi = $(1000:100) \times 344 = 3400$ Kal. Protein = $(1000:100) \times 19 = 190$ gram Lemak = $(1000:100) \times 4 = 40$ gram KH = $(1000:100) \times 58 = 580$ gram	Energi (340 Kalori) Protein (11 gram) Lemak (0,9 gram) Karbohidrat (72 gram).

Total Diet Normal :

Protein = 190 gram + 11 gram = 201 gram
 = 804 Kalori
 = 21,26 %

Lemak = 40 gram + 0,9 gram = 40,9 gram
 = 368,1 Kalori
 = 9,73%

Karbohidrat = 580 gram + 72 gram = 652 gram
 = 2608 Kalori
 = 68,99%

Energi = 3780,1 Kalori
 Berat pakan = 1000 gram (PAR-S) + 100 gram (Tepung terigu)
 = 1100 gram

Jumlah Kalori dalam 1 gram pakan = $3780,1 : 1100 = 3,43$ Kalori

Pakan yang diberikan tiap hari = 30,5 gram.

2. Diet tinggi lemak adalah perlakuan terhadap tikus *Rattus novergicus strain Wistar* jantan 6-8 minggu yang diberi pakan diet aterogenik dengan total energi 104,7 Kal, energi dari lemak diperoleh dari total kolesterol + As. Cholat + minyak babi dengan komposisi sebagai berikut :

Diet Aterogenik (Tinggi Lemak) :

PAR-S (900 gram)	Tep.terigu "Gunung Bromo" (500 gram)	Kolesterol (30 gram)	Asam Cholat (2 gram)	Minyak Babi (150 ml)
E = $(900/100) \times 344$ = 3096 Kalori P = $(900/100) \times 19$ = 171 Kalori L = $(900/100) \times 4$ = 36 gram KH = $(900/100) \times 58$ = 522 gram	E = $(500/100) \times 340$ = 1700,5 Kalori P = $(500/100) \times 11$ = 55 Kalori L = $(500/100) \times 0,9$ = 4,5 gram KH = $(500/100) \times 72$ = 360 gram	Total Kalori dari Kolesterol + As. Cholat + Minyak babi = $(30 + 2 + 139,65) \times 9$ = 1544,85 Kalori.		

Total Energi Diet Aterogenik :

Protein = 171 gram + 55 gram = 226 gram
= 904 Kalori (14,25%)

Lemak = 36 gr + 4,5 gr + 30 gr + 2 gr + 139,65 gr
= 1909,35 Kalori
= 30,10%

Karbohidrat = 522 gram + 360 gram = 882 gram
= 3528 Kalori
= 55,63%

Energi = 6341,35 Kalori

Berat pakan = 900 gr (PAR-S) + 500 gr (terigu) + 182 gr (Lmk)
= 1582 gram

Jumlah Kalori dalam 1 gram pakan = $6341,53 : 1582$
= 4,03 Kalori

Pakan yang diberikan tiap hari = 26 gram

Lampiran 9. Hasil Uji Statistik Persentase Sel yang Mengekspresikan PPAR γ **Oneway
ANOVA
Persentase**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	85.571	3	28.524	47.197	.000
Within Groups	4.835	8	.604		
Total	90.406	11			

Post Hoc Tests
Multiple Comparisons
 Dependent Variable: Persentase
 Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
SSTH 0 g/ hari	SSTH 0,015 g/hari	3.32667(*)	.63475	.003	1.2940	5.3594
	SSTH 0,030 g/hari	5.40000(*)	.63475	.000	3.3673	7.4327
	SSTH 0,045 g/hari	7.18000(*)	.63475	.000	5.1473	9.2127
SSTH 0,015 g/hari	SSTH 0 g/ hari	-3.32667(*)	.63475	.003	-5.3594	-1.2940

	SSTH 0,030 g/hari	2.07333(*)	.63475	.046	.0406	4.1060
	SSTH 0,045 g/hari	3.85333(*)	.63475	.001	1.8206	5.8860
SSTH 0,030 g/hari	SSTH 0 g/ hari	-5.40000(*)	.63475	.000	-7.4327	-3.3673
	SSTH 0,015 g/hari	-2.07333(*)	.63475	.046	-4.1060	-.0406
	SSTH 0,045 g/hari	1.78000	.63475	.088	-.2527	3.8127
SSTH 0,045 g/hari	SSTH 0 g/ hari	-7.18000(*)	.63475	.000	-9.2127	-5.1473
	SSTH 0,015 g/hari	-3.85333(*)	.63475	.001	-5.8860	-1.8206
	SSTH 0,030 g/hari	-1.78000	.63475	.088	-3.8127	-.2527

* The mean difference is significant at the .05 level.

**Homogeneous Subsets
Persentase**

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
SSTH 0,045 g/hari	3	3.3733		
SSTH 0,030 g/hari	3	5.1533		
SSTH 0,015 g/hari	3		7.2267	
SSTH 0 g/ hari	3			10.5533
Sig.		.088	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 10. Asupan Pakan Tikus

Hari	Tanggal	A			B			C			D		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	20-Jul-06	15	10	15	6	11	9	15	18	21	7	6	28,5
2	21	3	5	11	2	5	6	8	11	18	10,5	0	6,5
3	22	3,5	9	6,5	6	7	7	4,5	6,5	19	5	6,5	7,5
4	23	10	8	16,5	11	12,5	14	9	12,5	25,5	16	11	10
5	24	9,5	7	12,5	11,5	14,5	15	12,5	11	21,5	16	11	7,5
6	25	9	8	18,5	15,5	13	11	15	9	20,5	2,5	13	11
7	26	11	7,5	13,5	10,5	11,5	9	11,5	10	21	4,5	12	10,5
8	27	7,5	4	2,5	1	3	5	1,5	2,5	6,5	1,5	1	6,5
9	28	8	5	8,5	6,5	6	8	8,5	8,5	13	4	4	7,5
10	29	9	4	11	14,5	7,5	7	12	5	23,5	6	10	14
11	30	7	7,5	11	10,5	9	13	11	15,5	17	10	13	11,5
12	31	7,5	11	15	11	7	11	14	4,5	14	12	11,5	9,5
13	1-Agts-06	10	12	17	12,5	5	11	10	1	21	9,5	13,5	7
14	2	13	11	19	12,5	10,5	14,5	13,5	3	16	12,5	15	6,5
15	3	4	3	4	1,5	2,5	2	2	2,5	0,5	2,5	2,5	5,5
16	4	4,5	6	12	0	6	4	4	2,5	10	8	4	6
17	5	9,5	6	14,5	6,5	7,5	6	6	1,5	14	5	6	9
18	6	12	16	13	13,5	11	12	13	2,5	13,5	11	13	9
19	7	16	11	20	14	11	12	19	8	27	20	18	18

20	8	8	16	11	13	13	15	10	5	21	12	16	11
21	9	12,5	17	17,5	14	14	14	15	7	16	16	15	11
22	10	11	19	18	17	15	13,5	14,5	10	26	15	15	10
23	11	3	7	9	2	3	3	2	4	5,5	4	2	3
24	12	7,5	13,5	15	14	11	11,5	15	10,5	18,5	1,5	11	16
25	13	9,5	15	17	18,5	11	15	14,5	9	9	10	12	7,5
26	14	11	16,5	13,5	16	10	11	12	11	24	14	16	11
27	15	15	14	15	16	18	14	17	17	21	16	19	10
28	16	13,5	19	15,5	14	12,5	11	11,5	12	25	11,5	15	12,5
29	17	12	18	14	14	14	12	12	11	17	13,5	15	14
30	18	3	2	3	8	2	1	8	8	10	10	12	13
31	19	6,5	5	6	12	6,5	2	10	6,5	15	17	17	12
32	20	14	14	15	14,5	14,5	12	14	10	18	18,5	16	12
33	21	12	18,5	17,5	11	16,5	13	11	9,5	8	5	10,5	16
34	22	13,5	13,5	14	20	17,5	18,5	10,5	18,5	22	20,5	19,5	16,5
35	23	16,5	26,5	18	18	20	16,75	17,5	14	24	26,5	20,5	14
36	24	21,5	25,5	19,5	8	22	17	22,5	24,5	25	21	16	15
37	25	15,5	20,5	18,5	18,5	14,5	13	19	12	15,5	9,5	16	15
38	26	18	17	17	16,5	11,5	19	15	18,5	25	11	18,5	15
39	27	16	25	20	21,5	21	17	25	22,5	27,5	9	18,5	14,5
40	28	12,1	22	20	14	14	14,5	13	15	15	12,5	15,5	14
41	29	18	19,5	20	18	19	16	14	16	20	14	19	17
42	30	19	21	24	19,5	20,5	19	17	20	23	21	20	15

43	31	13	21	18	17	16,5	15	16	15	23	16	16	13
44	01-Sep-07	17	22	21	21	20,5	12	16,5	21,5	24	25	12,5	16,5
45	2	24,5	29	26	20	17	20,5	26,5	18,5	29	24	19	18,5
46	3	18	23,5	13,5	20	22	18	14,5	21	22	25	20	17
47	4	3	21	21	2,5	7	3	5	4	6	5	6	9
48	5	9	19	23	11	11	8,5	8,5	9	18,5	11	8	8
49	6	13	23	23	18	15,5	16	12,5	14,5	17	15	14,5	9,5
50	7	15	26,5	25	17	21	15	15	17	21,5	18,5	19	13
51	8	3	4	2	2	1	0,5	0,5	1,5	7,5	10	2,5	7,5
52	9	11	20	19,5	14	9,5	12,5	10,25	17,5	18,5	17	16	11
53	10	16	25	22,5	18	11	16,5	12	19	20	17	20	18
54	11	15	25	22	16,5	9	17	15	22,5	22,5	22,5	20	12,5
55	12	15	7,5	5	17,5	23	11,5	15	18,5	24,5	14	20	17
56	13	15	17,5	15	15	22	19	15	25	24	19	21	13,5
57	14	21,5	26	25,5	24,5	26	21,5	25	26	27	24,5	24,5	21
58	15	13	20	15	11,5	15	15	14	16	15	16	13	13
59	16	15	24	21,5	20	24	20	17	25	23	24	11,5	21,5
60	17	15	27,5	22,5	24	20	21	18	20	26	22	12	18
61	18	9	25	22	22	25	23	19	21	23	24	6,5	18
62	19	11,5	27	23,5	18,5	11,5	19	15	23	23	15,5	2	15
63	20	18	27	25	27	27	24	25	21	29	23	3	22
64	21	3,5	7	28	3	5	2,5	2,5	3,5	6	5	10	5
65	22	10	24	20	11	16	19	14	23	18,5	17	14,5	25,5

66	23	10	24	23	1	21	19	15	15	26	16,5	10,5	12
67	24	21,5	25,5	19,5	8	22	17	22,5	24,5	25	21	16	15
68	25	15	27	21,5	16,5	20	21	16,5	16	21	15,5	23	19,5
69	26	7,5	15	8	20	21	30	9	17	22	21	18	18
70	27	13	21	16,5	19,5	17,5	16	18	16,5	18	19	17	16
71	28	21	29	30	23	22	25	25	27	30	24	25	23
72	29	9	18	15	12	12,5	13	10,5	11	19	13,5	14	11,5
73	30	14	17	21,5	21	7	18	18	20	26	25	18	19
74	01-Okt-06	17,5	20	14	20	21	22,5	19,5	17	22	15,5	25	23
75	2	12	18	25	15,5	9	15,5	12,5	20	21	12	10,5	13
76	3	13,5	20	22	20	30	17	18	23	23,5	15	18	16
77	4	16	25	25	19	24	19,5	19	18	20	16	17	18,5
78	5	18,5	26	22	18	21	22,5	15,5	19	23	18,5	19,5	15
79	6	5	5	5	3	1	11	1	0,5	8	6,5	1	17
80	7	9	20	14	11,5	19	8	10	5	15	8	8	8,5
81	8	17,5	24,5	20	19,5	25	18	11,5	23,5	20	15	14,5	17,5
82	9	14	25	21	18	22	18	14	19,5	20	11,5	18	15
83	10	20	24	20	20	24	19,5	14,5	23,5	19	20	14	19
84	11	17	25	15	19,5	19	20	13	22	21	18	19,5	12
85	12	20	25	20	21,5	25	21,5	20	20	19	20	17,5	16
86	13	25	25	22	20,5	20	23,5	19	21,5	24,5	21,5	21	18,5
87	14	20	29,5	22	19	25,5	23	19,5	25	26,5	20	21,5	19
88	15	22	30	20	30	25	25	24,5	20	21,5	20	21	20

89	16	30	30	25	23,5	25	28	20	30	25	26	19	20
90	17	25	20	24,5	19,5	15	22	30	30	20	27,5	21,5	22
	Jumlah	1174,6	1596	1550	1314,5	1350,5	1318,8	1257,8	1314	1758	1329	1265,5	1253,5
	Rata-rata	13,05	17,73	17,22	14,61	15,01	14,65	13,98	14,60	19,53	14,77	14,06	13,93



Lampiran 11. Perkembangan Berat Badan Tikus

Waktu	A			B			C			D		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Barat Badan Awal	43,4	40	56,5	70	59,9	67,5	77,4	79	95,2	58,4	50	34,2
Minggu ke 1	43,4	40	56,5	70	59,9	67,5	77,4	79	95,2	58,4	50	34,2
Minggu ke 2	65	55	68	78	68	70	86,5	63,5	107	59,5	60	50
Minggu ke 3	80,2	69,2	99,2	90	76,5	83,7	101	72	137	72,9	79,9	62,3
Minggu ke 4	96,2	115	112	102	89,9	95	109	82	130	87,8	90	70
Minggu ke 5	111	126	121	111	100	100	119	95,5	130	94,2	100	80,4
Minggu ke 6	126	141	137	129	115	117	130	104	149	99,9	120	88,4
Minggu ke 7	142	153	150	136	123	124	140	113	155	120	130	92
Minggu ke 8	160	173	153	120	139	139	150	127	172	136	145	110
Minggu ke 9	173	190	184	166	150	155	162	154	186	159	165	121
Minggu ke 10	187	206	196	170	160	161	170	170	190	167	147	130
Minggu ke 11	200	210	202	178	167	171	183	177	200	176	160	140
Minggu ke 12	210	220	212	185	170	180	189	185	210	187	141	150
Minggu ke 13	218	235	220	190	189	189	191	191	218	196	185	154
Minggu ke 14	230	256	235	200	207	201	207	211	222	204	198	168
Kenaikan Berat Badan	186,6	216	178,5	130	147,1	133,5	129,6	132	126,8	145,6	148	133,8
Rata-rata kelompok	193,70			136,87			129,47			142,47		