



**STUDI KADAR KOLESTEROL DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI AORTA KELINCI *New Zealand*
White (Orictolagus cuniculus) DENGAN PEMBERIAN
DIET ATEROGENIK**

SKRIPSI

Oleh :
YUMEIDA NOOR ILMA
115130101111020



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2017



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**STUDI KADAR KOLESTEROL DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI AORTA
KELINCI *NEW ZEALAND (ORICTOLAGUS CUNICULUS)* DENGAN
PEMBERIAN DIET ATEROGENIK**

Oleh :

YUMEIDA NOOR ILMA

115130101111010

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS

NIP. 19520412 198002 1 001

drh. Dyah Ayu Oktavianie, M. Biotech

NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Yumeida Noor Ilma

NIM : 115130101111020

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Studi Kadar Kolesterol dan Gambaran Histopatologi Aorta Kelinci *New Zealand White (Orictolagu scuniculus)* Dengan Pemberian Diet Aterogenik

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 23 Mei 2017

Yang Menyatakan,

Yumeida Noor Ilma

NIM. 115130101111020



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga proposal Skripsi yang berjudul “Studi Kadar Kolesterol dan Gambaran Histopatologi Aorta Kelinci *New Zealand White* (*Orictolagus cuniculus*) dengan Pemberian Diet Aterogenik” ini dapat terselesaikan.

Dengan penuh rasa hormat penulis mengucapkan kepada segenap pihak yang telah membantu dalam penyusunan proposal Skripsi ini baik secara langsung maupun secara tidak langsung. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas kepemimpinan dan dukungan demi kemajuan FKH UB.
2. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS sebagai dosen pembimbing I atas segala bimbingan, bantuan, waktu, serta dukungan yang diberikan kepada penulis.
3. drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M. Biotech sebagai dosen pembimbing II atas segala bimbingan, bantuan, waktu serta dukungan yang diberikan kepada penulis.
4. drh. Indah Amalia Amri, M. Si sebagai dosen penguji I atas saran dan masukan yang membangun bagi penulis.
5. drh. Dodik Prasetyo, M. Vet sebagai dosen penguji II atas saran dan masukan yang membangun bagi penulis.
6. Secara khusus penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Kedua Orang Tua, Ayahanda (Alm.) Drs. Achmad Saifudin Zuhri dan Ibunda



(Almh.) Muftiah Rosidah. Tiada kata yang dapat terlukiskan atas betapa besar jasa-jasanya.

7. Yang tercinta, suami, Abdul Khanan Fikri beserta keluarga Isyomuddin Masduqi, Chanifah, Nailul Himmah, M. Rofiul Amri dan Dalilah Safirah yang telah memberikan suasana keluarga yang baik dalam menempuh studi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
8. Sahabat penulis Qur'aini Yanti, Wahyu Ramadhan, Izzatul Maidah, Rinda Wulandari, Asmiranti Niva R serta teman-teman VETASCLUB 2011 atas semangat dan kebersamaan selama menempuh masa studi di Universitas Brawijaya.
9. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan. Kritik dan saran yang membangun dari pembaca sangat penulis harapkan demi kesempurnaan penulis.

Malang, 23 Mei 2017

Penulis



Studi Kadar Kolesterol dan Gambaran Histopatologi Aorta Kelinci *New*

Zealand White (Orictolagus cuniculus) Dengan Pemberian Diet Aterogenik

ABSTRAK

Aterosklerosis merupakan penyakit yang disebabkan karena terbentuknya plak di dinding arteri. Penyakit aterosklerosis dapat menyebabkan iskemia dan infark jantung, stroke, hipertensi renovaskuler, dan penyakit oklusi tungkai bawah. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian diet aterogenik terhadap kadar kolesterol dan gambaran histopatologi aorta pada kelinci *New Zealand White*. Diet aterogenik diberikan sebanyak 40 g/ekor/hari selama 28 hari. Penelitian ini menggunakan metode pre dan post test examination. Kelinci *New Zealand White* dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kontrol negatif (A) diberi diet normal dan kontrol positif (B) diberi diet aterogenik. Setiap kelompok terdiri dari 8 ekor kelinci. Kadar kolesterol serum diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri serta gambaran histopatologi aorta dengan menggunakan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE). Analisa statistik menggunakan SPSS rev.20,0 dengan uji t tidak berpasangan (*Independent t test*) untuk data kadar kolesterol sedangkan pengamatan histopatologi aorta dengan analisa perbandingan dengan jaringan normal. Hasil penelitian menunjukkan pemberian diet aterogenik selama 28 hari mampu meningkatkan kadar kolesterol serum sebesar 513,5% secara signifikan ($p < 0,05$) dan pada gambaran histopatologi aorta tampak perubahan struktur sel endotel disertai dengan awal pembentukan foam cell.

Kata kunci : Aterosklerosis, kadar kolesterol, histopatologi aorta, diet aterogenik.



Study of Cholesterol Levels and Histopathology of Aorta in *New Zealand*

White (Orictolagus cuniculus) Rabbits Induced by Atherogenic Diet

ABSTRACT

Atherosclerosis is a condition caused by formation of plaque in the arterial wall. Atherosclerosis can caused ischemia, heart infarct, stroke, renovascular hypertension, and the occlusion of lower extremity. The purpose of this study was to determined the effect of atherogenic diet induced to the cholesterol level and histopathology of aorta in *New Zealand White* rabbit. Atherogenic diet given 40 g/rabbit/day orally for 28 days. The study used pre and post examination test methods. Rabbits were divided into 2 groups; negative control (A) induced by normal diet and positive control (B) induced by atherogenic diet. Each groups consists of 8 rabbits. Cholesterol level serum was measured by spectrophotometric method and the histopathology of aorta was observed by *Hematoxylin Eosin* (HE) staining. Statistic analysis used SPSS rev.20.0 with independent t-test for the cholesterol level and qualitative observation method for the histopathology of aorta. The results of this study showed the atherogenic diet induced for 28 days significantly ($p < 0,05$) increase the cholesterol level for 513,5 % and the histopathology of aorta showed the changes in endothelial cells with the early formation of foam cell.

Keywords : Atherosclerosis, cholesterol level, aorta histopathology, atherogenic diet



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Aterosklerosis.....	6
2.2 Patomekanisme Hiperkolesterolemia.....	12
2.3 Histopatologi Aorta.....	15
2.4 Kelinci New Zealand White.....	16
2.5 Diet Aterogenik.....	17
BAB III KERANGKA KONSEP & HIPOTESIS PENELITIAN	21
3.1 Kerangka Konseptual.....	21
3.2 Hipotesis Penelitian.....	24
BAB IV METODE PENELITIAN	25
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	25
4.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	25
4.2.1. Bahan.....	25
4.2.2. Alat Penelitian.....	25
4.3 Tahapan Penelitian.....	26
4.4 Prosedur Kerja.....	26
4.4.1. Rancangan Penelitian dan Preparasi Hewan Coba Kelinci <i>New Zealand White (Orictolagus cuniculus)</i>	32
4.4.2. Penentuan Jumlah dan Pembuatan Diet Aterogenik.....	28
4.4.3. Preparasi Hewan Model Aterosklerosis.....	29
4.4.4. Kontrol Keberhasilan Induksi Diet Aterogenik.....	29
4.4.5. Pengambilan Sampel Serum Darah.....	29
4.4.6. Pengujian Kadar Kolesterol.....	29
4.4.6.1. Metode Penghitungan Kadar Kolesterol.....	30



4.5 Pembuatan Preparat Histologi Aorta	32
4.5.1. Pengambilan Pembuluh Darah Aorta	32
4.5.2. Pembuatan Preparat Histotologi	32
4.5.3. Pewarnaan <i>Haematoxylin-Eosin</i> (HE)	33
4.5.4. Analisis Data	33
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	35
5.1 Pengaruh Pemberian Diet Aterogenik Terhadap Kadar Kolesterol Darah Kelinci New Zealand White (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	35
5.2 Pengaruh Pemberian Diet Aterogenik Terhadap Gambaran Histologi Aorta Kelinci New Zealand White	37
5.3 Pengaruh Pemberian Pakan Normal Kelinci Terhadap Kelinci Model Hiperkolesterol	46
BAB VI PENUTUP	49
6.1 Kesimpulan	49
6.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	55
Lampiran 1 Kerangka Operasional Rancangan Penulisan	56
Lampiran 2 Keterangan Laik Etik	57
Lampiran 3 Perhitungan Dosis Diet Aterogenik	58
Lampiran 4 Koleksi Serum	59
Lampiran 5 Pembuatan Preparat Histopatologi Aorta	60
Lampiran 6 Pewarnaan <i>Haematoxylin – Eosin</i> (HE)	61
Lampiran 7 Hasil Perhitungan Kadar Kolesterol	62
Lampiran 8 Hasil Uji Statistika Menggunakan SPSS Rev. 6.0	63
Lampiran 9 Dokumentasi Penelitian	64



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian.....	27
4.2 Komposisi Pembuatan Diet Aterogenik	29
5.1 Kadar Kolesterol Serum Darah Kelinci <i>New Zealand White</i> (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) <i>Pre – Examination Test</i>	35
5.2 Kadar Kolesterol Serum Darah Kelinci <i>New Zealand White</i> (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) <i>Post – Examination Test</i>	35



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.2 Tahapan Aterosklerotik.....	7
2.3 Komposisi Pembuatan Diet Aterogenik	16
5.1 Histopatologi Aorta Kelinci <i>New Zealand White</i> (<i>Oritolagus cuniculus</i>) Kedua Kelompok Ulangan Dengan Pewarnaan HE Perbesaran 100 x	39
5.2 Histopatologi Aorta Kelinci <i>New Zealand White</i> Kedua Kelompok Ulangan Dengan Pewarnaan HE Perbesaran 400 x	43



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kelinci telah dimanfaatkan secara luas sebagai hewan model aterosklerosis yang sesuai dikarenakan ukuran tubuhnya, mudah untuk dirubah dan memiliki kemampuan dalam merespon diet kolesterol. Di antara ukuran hewan coba lainnya yaitu di antara rodensia dan spesies hewan besar, menjadikan kelinci sebagai hewan yang umum digunakan sebagai penelitian dan memiliki sistem metabolisme lipoprotein yang serupa dengan manusia (Peng, 2012)

Banyak peneliti melakukan pendekatan penelitian pembentukan kondisi aterosklerosis pada kelinci melalui diet hiperlipidemia. Kelinci memiliki kondisi fisiologis yang sensitif terhadap kolesterol dan menyebabkan pembentukan akumulasi kolesterol di dalam plasma darah. Maka dari itu peneliti menyimpulkan bahwa proses pembentukan kondisi aterosklerosis pada hewan model kelinci menjadi sangat nyata dan dapat memberikan perubahan pada berbagai faktor yang kemudian dapat diaplikasikan terhadap manusia (Dornas, 2010).

Berdasarkan data statistik Kemenkes pada tahun 2014, penyakit jantung dan pembuluh darah merupakan salah satu masalah kesehatan utama di negara maju maupun berkembang. Penyakit ini menjadi penyebab nomor satu kematian di dunia setiap tahunnya. Pada tahun 2008, diperkirakan sebanyak 17,3 juta kematian disebabkan oleh penyakit kardiovaskuler. Lebih dari 3 juta kematian tersebut terjadi sebelum usia 60 tahun. Terjadinya kematian dini yang disebabkan oleh penyakit jantung berkisar sebesar 4% di negara berpenghasilan tinggi. Dan



42% terjadi di negara berpenghasilan rendah. Kematian yang disebabkan dengan penyakit jantung pembuluh darah terutama penyakit jantung koroner dan stroke diperkirakan akan terus meningkat mencapai 23,3 juta kematian pada tahun 2030.

Di Indonesia penyakit jantung dan pembuluh darah ini terus meningkat dan akan memberikan beban kesakitan, kecacatan dan beban sosial ekonomi bagi keluarga penderita, masyarakat dan negara. Prevalensi penyakit jantung koroner di Indonesia tahun 2013 berdasarkan diagnosis dokter sebesar 0,5 %, sedangkan berdasarkan diagnosis dokter gejala sebesar 1,5 %.

Aterosklerosis, yang muncul dengan ciri-ciri adanya penebalan dinding arteri karena adanya akumulasi dari material lemak yang meliputi kolesterol, kini tetap menjadi penyebab utama dari disabilitas dan kematian pada negara berkembang. Tingginya konsentrasi plasma kolesterol dalam darah (hiperkolesterolemia) terutama kolesterol LDL, menjadi faktor resiko utama pada pembentukan lesi aterosklerotik (Peng, 2012).

Aterosklerosis atau Arteriosklerosis adalah suatu penyakit pada arteri muskularis berukuran besar dan sedang yang ditandai dengan adanya disfungsi endotel, inflamasi vaskuler dan adanya pembentukan lemak, kolesterol, kalsium dan sisa-sisa sel di antara bagian intima pada dinding pembuluh darah.

Pembentukan ini menghasilkan bentukan plak, perubahan vaskuler, obstruksi luminal akut dan kronis, keabnormalitasan aliran darah dan berkurangnya suplai oksigen pada organ target (Madhumathi, 2006)



Hiperkolesterolemia adalah suatu kondisi jumlah kolesterol darah melebihi batas normalnya. Hiperkolesterolemia merupakan hasil dari meningkatnya produksi dan atau meningkatnya penggunaan LDL (*Low Density Lipoprotein*).

Hiperkolesterolemia dapat merupakan hiperkolesterol familial atau dapat disebabkan karena konsumsi kolesterol tinggi. Hiperkolesterol terutama fraksi LDL, adalah faktor terpenting terbentuknya aterosklerosis. Dipercayai oleh para ahli gizi bahwa diet tinggi lemak dapat meningkatkan level kolesterol darah. Beberapa peneliti menerapkan prinsip tersebut untuk mendapatkan hewan coba yang hiperkolesterolemia (Murwani, 2006)

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan pemaparan penulis mengenai latar belakang dilakukannya penelitian ini, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimanakah kadar kolesterol pada kelinci yang diberikan diet aterogenik ?
2. Bagaimana gambaran histopat aorta pada kelinci yang diberikan diet aterogenik ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan strain *New Zealand White* yang diperoleh dari peternakan kelinci di Batu dengan usia 20-24 minggu dan dengan berat badan antara 900-1200 gram.



Penggunaan hewan coba pada penelitian ini sedang dalam proses untuk mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.

2. Pembuatan kondisi aterosklerosis pada hewan model kelinci dilakukan dengan cara pemberian diet aterogenik yang diberikan secara oral selama 28 hari (Istiadi, 2005).
3. Pemberian diet aterogenik yang diberikan pada satu ekor kelinci yaitu berupa *pellet* sebanyak 30 g/ekor/hari dan kuning telur puyuh mentah sebanyak 10 g/ekor/hari (Madhumati, *et. al.* 2006)
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar kolesterol dalam darah yang diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri dan gambaran histopatologi organ aorta pada kelinci yang diamati dengan perwarnaan HE.

1.4 Tujuan

Berdasarkan latar belakang dilakukannya penelitian ini, diperoleh beberapa tujuan :

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian diet aterogenik terhadap kadar kolesterol pada kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*) *New Zealand White*.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian diet aterogenik terhadap gambaran histopatologi pada aorta kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*) *New Zealand White*.



1.5 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah mengetahui kadar kolesterol serta gambaran histopatologi aorta pada kelinci New Zealand White yang telah diberikan pakan diet aterogenik.

Penelitian ini selanjutnya bertujuan untuk membentuk kondisi aterosklerosis pada hewan model kelinci New Zealand White dan menjadi hewan model pengobatan kondisi aterosklerosis.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Aterosklerosis

Aterosklerosis adalah penyakit yang terdapat pada arteri muskularis dengan ukuran sedang hingga besar dan memiliki karakteristik adanya disfungsi endotel, inflamasi vaskuler dan dengan disertai adanya bentukan dari lemak, kolesterol, kalsium dan debris dari sel-sel di antara bagian intima dinding pembuluh. Bentukan ini menyebabkan bentukan plak, perubahan vaskuler, obstruksi luminal akut dan kronis, aliran darah yang tidak normal dan gagalannya suplai oksigen terhadap target organ (Madhumathi, 2015).

Aterosklerosis bukanlah suatu proses degeneratif melainkan suatu proses inflamasi kronik yang diikuti oleh suatu proses reparasi pada dinding arteri. Hal inilah yang menjadi dasar sebuah hipotesis response to injury yang dipaparkan pertama kali oleh Russel Ross pada tahun 1976. Hipotesis ini menjelaskan bahwa lesi aterosklerosis terjadi sebagai respons platelet karena kerusakan endotel oleh hiperkolesterolemia dan hipotesis ini telah mengalami banyak perubahan seiring dengan perkembangan jaman (Murray, 2003)

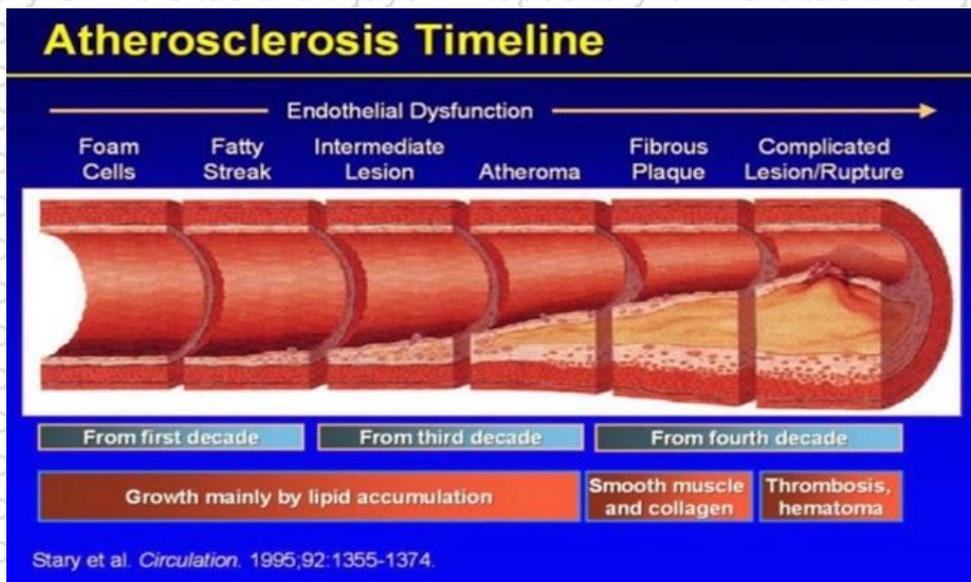
Menurut Getz (2012), proses terjadinya aterosklerosis melibatkan sistem imun spesifik dan non-spesifik dan merupakan respon dari hiperlipidemia. Dalam beberapa tahun pandangan tentang proses terjadinya aterosklerosis menjadi semakin rumit. Pada awalnya diduga yang menjadi kunci terjadinya inisiasi dan progresi dari plak aterosklerosis merupakan proses imun non-spesifik. Stress oksidatif menyebabkan aktivasi endotel yang diikuti adhesi dan diapedesis



monosit ke dalam lapisan intima. Monosit ini di dalam lapisan intima berdiferensiasi menjadi makrofag yang memfagosit lemak yang termodifikasi dan menjadi foam cell yang menjadi terjadinya plak aterosklerosis (Binder, 2011).

Menurut Kusmana dan Hanafi (2003) dalam bukunya memaparkan bahwa pembuluh arteri seperti juga organ-organ lain dalam tubuh mengikuti proses penuaan dimana terjadi proses yang karakteristik seperti penebalan lapisan intima, berkurangnya elastisitas, penumpukan kalsium, dan bertambahnya diameter lapisan intima. Pembuluh koroner terdiri dari tiga lapisan yaitu tunika intima, tunika media, dan tunika adventisia.

Perjalanan aterosklerosis secara histopatologik dibagi menjadi beberapa tahap pada **Gambar 2.2** yakni : lesi awal (*fatty streak*, dengan mikrotrombi), lesi lanjut (fibrosis, plak ateroma-aterosklerotik) dan lesi komplikata (ulserasi, kalsifikasi, perdarahan, ganggren, aneurisma serta infark).



Gambar 2.2. Tahapan Aterosklerotik (Stary, *et al.*, 1995)



Berikut ini rincian tahapan terjadinya kondisi aterosklerosis:

1. Tahap I – lapisan berlemak (*fatty streak*)

Garis lemak/*fatty streak* merupakan lesi arterosklerosis yang awal dan pertama kali ditemukan pada saat terjadinya kerusakan sel endotelial di daerah percabangan arterial karena stress regangan (*shear stress*) (Tugasworo, 2010).

Fatty streak terdiri atas makrofag yang bermigrasi ke ruang subendotelial dan sel otot polos yang mengandung lemak sehingga akan memberikan gambaran sel busa (*foam cells*). Sel endotelial yang dilapisi oleh *fatty streak* akan memberikan gambaran histologis dan fungsi yang abnormal.

Fatty streak yang memanjang atau berkerut-kerut terdapat pada permukaan sel otot polos. Lapisan ini berwarna agak kekuning-kuningan dan belum atau sedikit menyebabkan penyumbatan pada pembuluh darah (Falk, *et. al.*, 2004). *Fatty streak* dijumpai di aorta pada bayi yang baru lahir dan akan dijumpai dalam jumlah yang lebih banyak pada anak-anak yang berusia 8 – 10 tahun pada aterosklerosis aorta di negara-negara barat. *Fatty streak* pada arteri dapat mulai terlihat pada umur 15 tahun dan jumlahnya akan bertambah sampai pada dekade ke tiga dari umur manusia. Akan tetapi tidak semua *fatty streak* akan berlanjut menjadi lesi fibrotik (Massie, *et. al.*, 2002).

Fatty streak berkembang pada lokasi dimana biasanya terjadi sel endotel yang luka, sehingga menyebabkan molekul-molekul besar seperti LDL (*Low Density Lipoprotein*) dapat masuk ke dalam jaringan subendotelium. Sedangkan LDL sendiri adalah lemak aterogenik yang paling utama. Apabila LDL sudah masuk ke dalam subendotelium, maka akan terjebak dan akan menetap di dalam



13 jaringan subendotelium, hal seperti ini disebabkan karena terikatnya LDL dengan glikoaminoglikan. LDL yang terjebak semakin lama akan bermodifikasi karena adanya suatu radikal oksigen yang bebas di sel endotelial, yang merupakan inhibisi dari aterosklerosis. LDL yang bermodifikasi ini akan mengalami 3 proses yang penting yaitu mereka akan dimakan oleh monosit menjadi makrofag, makrofag ini akan tetap di dalam jaringan subendotelium, dan modifikasi LDL ini akan membantu sel mengambil lipid dalam jumlah yang besar (Baraas, 2006).

2. Tahap II – *Fibrous plaque*

Dalam bukunya, Pratanu, 1995 mengungkapkan bahwa tahapan selanjutnya dari perkembangan lesi aterosklerotik adalah konversi dari *fatty streak* ke lesi fibrotik yang ditandai dengan adanya tutup fibrotik (*fibrotic cap*). *Fibrotic cap* ini berwarna agak keputih-putihan, berkalsifikasi dan dapat menonjol ke dalam lumen sehingga dapat menyebabkan sumbatan parsial dari arteri. *Fibrous cap* ini merupakan suatu lesi patognomonik pertama aterosklerosis. Pada tahapan ini sering dijumpai mulai umur 25 tahun di aorta dan arteri koronaria di negara-negara dimana insidens yang tinggi dari aterosklerosis (Massie, *et. al.*, 2002).

Salah satu terjadinya penyebab perubahan dari *fatty streak* ke lesi fibrotik adalah adanya lesi fokal yaitu hilangnya jaringan endotelial yang melapisi *fatty streak*. Hilangnya lapisan sel ini disebabkan oleh karena adanya suatu peregangan oleh sel-sel yang mengalami disfungsi pada deformasi dinding arteri atau dikarenakan oleh suatu toksin (radikal bebas akibat hasil dari oksidasi lipid) oleh sel busa.

Pada lokasi sel yang hilang ini, platelet akan melekat dan terjadi 14 pengeluaran faktor – faktor yang akan menyebabkan perkembangan lesi (Falk, *et.*



al.,2004). Heparinase merupakan salah satu enzim yang memecah heparin sulfat (sebuah polisakarida pada matriks ekstraseluler) yang menghambat migrasi dan proliferasi dari sel otot polos. Kombinasi dari penurunan kadar heparin dan kurangnya PGI2 dan EDRF-NO, karena sel endotelial yang luka menyebabkan sel otot polos berubah dari sel yang berkontraksi menjadi sel yang tidak berkontraksi sehingga yang terjadi adalah pengeluaran dari sekresi enzim-enzim pada matriks ekstraseluler, yang menyebabkan mereka bermigrasi ke dalam intima dan berproliferasi (Henry, 2011).

3. Tahap III – Lesi Komplikata

Tahap ketiga ini terdapat dalam jumlah banyak dengan adanya peningkatan umur. Bagian dari inti plak yang mengalami komplikasi akan menyebabkan ukuran menjadi bertambah besar dan dapat mengalami perkapuran. Ulserasi dan perdarahan menyebabkan trombosis, pembentukan aneurisma, dan diseksi dari dinding pembuluh darah yang akan menyebabkan timbulnya gejala penyakit. Faktor-faktor yang menyebabkan plak tersebut pecah oleh karena adanya suatu aliran yang turbulen atau mekanisme stress peregangan, perdarahan intraplak yang dikarenakan oleh rupturnya vasavasorum, peningkatan stres yang terletak di dinding sirkumferensial dindingarteri pada penutup fibrotik dikarenakan adanya suatu penimbunan lipid dan adanya pengeluaran enzim-enzim yang dikeluarkan oleh makrofag untuk memecah matrik (Harmsen, *et al.*, 2000).

Sejalan dengan pecahnya plak maka proses yang terjadi lainnya adalah seperti thrombosis, adhesi platelet, agregasi platelet, dan koagulasi akan terjadi. Koagulasi dimulai oleh karena bercampurnya darah dengan kolagen di dalam plak



dan faktor jaringan (jaringan tromboplastin) yang diproduksi oleh sel endotelial dan makrofag di dalam sel lesi fibrotik. Faktor jaringan akan membuat faktor VII mengaktifkan faktor X, yang akan mengkatalisasi konversi dari protrombin menjadi thrombin, yang pada akhirnya akan mengalami suatu polimerisasi untuk menstabilkan trombus. Trombin akan menstimulasi terjadinya proliferasi selular pada lesi dengan mengeluarkan deposisi platelet tambahan dan pengeluaran *platelet derived growth factor* (PDGF) dan menstimulasi sel-sel lain untuk mengeluarkan PDGF. Trombosis dapat terjadi karena adanya lipoprotein(a) yang menghambat trombolisis dengan menghambat konversi dari plasminogen menjadi plasmin (Tugasworo, 2010).

Tergantung pada keseimbangan antara trombotik dan proses trombolitik, trombus dapat mengalami kejadian yang berbeda-beda. Trombus dapat mengalami disolusi (hilang) sehingga pasien tidak mengalami gejala atau dapat menempel pada proses aterosklerosis sehingga penyumbatan pada suatu lumen arteri bertambah besar dan menimbulkan gejala klinik. Pecahnya plak juga dapat menyebabkan suatu gejala klinik, dikarenakan pecahan plak tersebut berjalan bersama dengan aliran darah dan akan menyumbat pembuluh darah distal yang ukurannya akan lebih kecil. Jika pecahnya sangat besar maka kemungkinan besar akan terjadi penyumbatan pada pembuluh darah besar (Ross, 1986).

2.2 Hiperkolesterolemia

Hiperkolesterolemia adalah suatu keadaan dimana konsentrasi kolesterol di dalam darah melebihi batas normal. Diet yang kaya akan kolesterol dan lemak jenuh dapat menekan pembentukan reseptor *Low Density Lipoprotein* sehingga



meningkatkan jumlah kolesterol yang beredar di dalam darah. Keadaan ini dapat memicu terjadinya kondisi hiperkolesterolemia pada manusia sekitar 68% yang merupakan salah satu faktor pemicu terjadinya kematian. Pada hewan kejadian penyakit hiperkolesterolemia sekitar 13% (Tapan, 2005).

Hati mensintesis sekitar 20% kolesterol dalam tubuh (Gropper, *et al.*, 2005). Berdasarkan kerapatannya (densitas), kolesterol dapat dibedakan menjadi : kilomikron, *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL), *Low Density Lipoprotein* (LDL), *High Density Lipoprotein* (HDL). Dari keempat jenis lipoprotein tersebut, LDL memiliki kadar kolesterol yang paling tinggi (Gropper, *et al.*, 2005; Hirakawa, 2005). Keadaan hiperkolesterolemia dapat disebabkan karena pola makan diet kaya kolesterol yang menyebabkan obesitas. Hiperkolesterolemia yang tidak disebabkan oleh kelainan genetik dapat dicegah dengan meminimalisir konsumsi makanan dengan kadar kolesterol tinggi, asam lemak jenuh, mencegah obesitas, serta mengonsumsi makanan dengan suplemen yang dibutuhkan tubuh. Berbagai senyawa diketahui dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah (Menys, 2007).

2.2.1 Patomekanisme Hiperkolesterolemia

Kolesterol dalam tubuh diserap dalam bentuk asam kolat di hati yang dikonjugasikan dengan bahan lain membentuk garam empedu. Garam empedu membantu pencernaan dan penyerapan lemak (Hofmann, 2004; Hirakawa, 2005).

Kolesterol dari makanan dan hasil sintesa digunakan dalam pembentukan membran dan sintesa hormon steroid dan asam empedu. Kolesterol ini sebagian besar digunakan dalam proses sintesis asam empedu (King, 2010). LDL dan HDL



akan mengedarkan kolesterol ke seluruh sel (Hirakawa, 2005). *Low Density Lipoprotein* merupakan komponen lipoprotein yang terbesar membawa kolesterol (60% total serum kolesterol) ke jaringan tubuh, yang digunakan untuk pembentukan membran atau dimetabolisme menjadi hormon steroid. *High Density Lipoprotein* memiliki peran yang bertentangan dengan LDL, yaitu mengangkut kolesterol dan lipoprotein lainnya yang sudah terakumulasi dari sel dan mengembalikan kolesterol ke hati untuk selanjutnya diekskresikan dalam empedu (Gropper, *et al.*, 2005).

Kolesterol dalam makanan diserap dari usus bersama lipid lainnya, termasuk kolesterol yang disintesis dalam usus. Kolesterol yang diserap kemudian dibawa menuju ke jaringan ekstra hepatis atau jaringan lemak dan mengalami hidrolisis. Hasil hidrolisis dibawa menuju hepar oleh enzim Lipoprotein Lipase (LPL) melalui pembuluh darah kapiler. Lipid selanjutnya dimetabolisme di dalam hepar. Kilomikron sebagai transport lipid masuk ke hati dan disintesa menjadi HDL dan VLDL. Selanjutnya VLDL diubah menjadi HDL dan kemudian *Low Density Lipoprotein* (LDL). *Low Density Lipoprotein* merupakan lipoprotein yang memiliki kandungan kolesterol tertinggi dibandingkan lipoprotein lainnya dan bertugas mengedarkan kolesterol ke sel-sel jaringan melalui darah untuk digunakan di dalam sel (Murray, *et al.*, 2003). Pada pasien hiperkolesterolemia, jumlah sisa LDL yang tidak masuk ke dalam sel menjadi berlebih dalam darah akibat banyaknya kolesterol yang masuk melalui makanan sehingga tidak mampu di bawa oleh HDL menuju hepar untuk dimetabolisme.



Tubuh berusaha menyeimbangkan kadar kolesterol plasma dengan jalan mengubah kolesterol menjadiasam empedu. Reaksi 7 α -hidroksilasi merupakan tahap pertama pada biosintesis asam empedu dan juga membatasi laju reaksi hidroksilase, suatu enzim mikrosomal yang memerlukan oksigen NADPH, dan sitokrom P-450. Di dalam reaksi hidroksilasi kolesterol ini, oksigen mudah tereduksi menjadi radikal bebas anion superoksida ($O_2^{\cdot -}$). Efek kimiawi $O_2^{\cdot -}$ dalam jaringan akan menimbulkan reaksi radikal bebas. $O_2^{\cdot -}$ yang terikat pada sitokrom P-450 merupakan intermediet dalam pengaktifan oksigen pada berbagai reaksi hidroksilasi. Semakin banyak empedu yang disintesis, semakin tinggi aktivitas sitokrom P-450 dan semakin banyak oksigen yang diperlukan. Peningkatan tersebut akan menghasilkan radikal bebas sebagai hasil sampingan sehingga radikal bebas terbentuk secara berlebihan pada kondisi hiperkolesterolemia.

Produksi radikal bebas berlebihan akan mengakibatkan enzim antioksidan dalam tubuh khususnya di organ hati seperti *superoksida dismutase* (SOD) tidak mampu mengatasinya. Hal ini akan menimbulkan kondisi stres oksidatif, yaitu suatu kondisi dimana terjadi ketidak seimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan di dalam tubuh (Halliwell, 2006; Valko *et al.*, 2006). Pada kondisi stres oksidatif, radikal bebas akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran seldan merusak organisasi membran sel. Pada keadaan hiperkolesterol, HDL yang berlebih akan berikatan dengan radikal bebas membentuk LDL-oks yang nantinya akan mengendap di pembuluh darah sehingga terjadi penyumbatan pembuluh darah hingga aterosklerosis (Baigent and Clarke, 2008). Akibatnya,



dinding pembuluh darah yang semula elastis akan menjadi tidak elastis kembali (Murray, 2002).

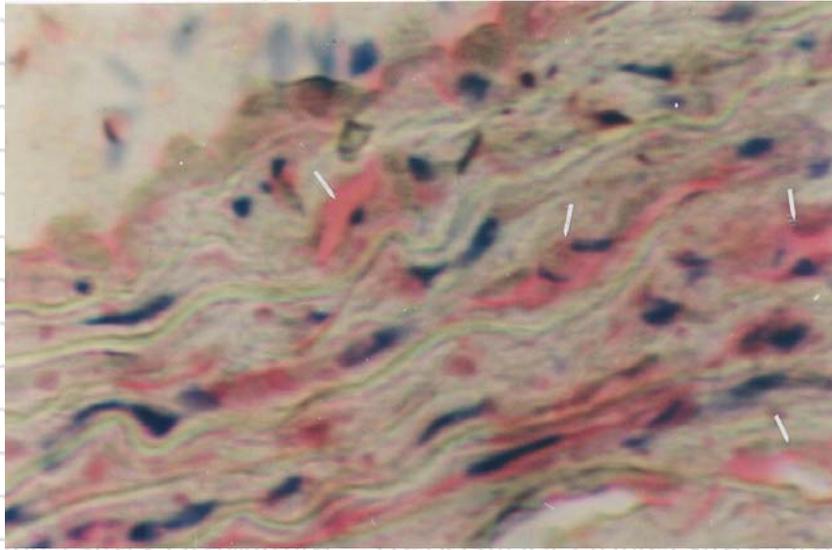
2.3 Histopatologi Aorta

Pembuluh darah aorta adalah pembuluh darah besar bagian dari sistem sirkulasi sistemik, yang keluar dari jantung dan berfungsi untuk membawa darah dari jantung yang berisi oksigen ke pembuluh arteri. Pembuluh darah aorta memiliki percabangan berupa arteri yang berfungsi membawa ke seluruh tubuh. Pembuluh darah aorta memiliki lapisan dinding yang tebal (Edmenister, *et al.*, 2008). Lapisan tersebut terdiri dari *tunika intima*, *tunika media* dan *tunika advenitia*. Studi histopatologi pembuluh darah aorta pada kasus hiperkolesterolemia menjelaskan bahwa hiper kolesterolemia mempengaruhi perubahan seluler akibat infiltrasi sel inflamatori pembuluh darah aorta yang dapat menyebabkan aterosklerosis.

Pada keadaan hiperkolesterolemia, sisa LDL dalam darah yang tinggi tidak mampu dibawa kembali ke hepar oleh HDL dan memicu terjadinya oksidasi LDL akibat radikal bebas menjadi LDL-Oksidasi yang memicu terjadinya inflamasi (Baigent and Clarke, 2008). Reaksi inflamasi akibat hiperkolesterol ditandai dengan munculnya sitokin proinflamasi dan sel sel inflamasi seperti makrofag, neutrofil dan leukosit. Leukosit akan muncul di sepanjang lumen dan dinding pembuluh darah aorta sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan permeabilitas. Hal ini menyebabkan sel endotel mengalami perubahan susunan sel dan abnormalitas struktur sel endotel dari aorta (Faraci, 2004; Ungcari, *et al.*,



2003). Gambaran histologis pembuluh darah aorta pada aorta hiperkolesterolemia dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3. Sel busa pada pewarnaan menggunakan Oil-Red O pada sel busa: sel lebih besar, inti terdesak ke tepi, sel tercat merah (panah) perbesaran 400x (Murwani dkk, 2006)

Leukosit akan muncul di sepanjang lumen dan dinding sel sehingga terjadi peningkatan permeabilitas, sedangkan monosit berperan dalam memperbaiki dinding pembuluh darah. Peningkatan monosit menyebabkan monosit menempel pada endotel yang diperantarai oleh beberapa molekul adhesi pada permukaan sel endotel, yaitu *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1), *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) dan *Selectin* kemudian monosit berdeferensiasi menjadi makrofag (Davis, 2005). Makrofag berfungsi untuk melakukan fagositosis pada daerah yang mengalami gangguan (Junaidi, 2000).

2.4 Kelinci New Zealand White

Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) secara phylogenetik memiliki kesamaan dengan primata daripada dengan spesies rodensia (Graur, *et al.*,) Kelinci memiliki



ukuran yang cukup besar untuk melakukan monitoring secara non-lethal pada perubahan secara fisik. Dengan alasan ini, beberapa peneliti telah memilih kelinci transgenik sebagai hewan model untuk studi metabolisme lipoprotein, aterosklerosis, penelitian dalam bidang kardiovaskuler serta kardiomiopati hipertropik (Bosze dan Houdebine, 2003).

New Zealand White Rabbit yang memiliki nomenklatur Crl:KBL(NZW) pertama kali dipatenkan oleh Charles River Canada dari Laboratorium Kitayama K.K di Prefektur Nagano, Jepang (Charles, 2013). Kelinci NZW memiliki bulu berwarna putih dan warna mata merah (Albino). Secara fisiologis kelinci NZW dewasa jantan memiliki berat badan berkisar 2-6 kilogram serta memiliki kebutuhan pakan dalam sehari sekitar 100-300 gram (Charles, 2013).

Kelinci NZW dimanfaatkan secara luas sebagai hewan model aterosklerosis. Studi terhadap aterosklerosis pada kelinci telah dilakukan dengan berbagai evaluasi biokimia, histopatologi dengan berbagai metode pewarnaan untuk mendukung hasil yang jelas dan untuk mengkonfirmasi adanya pembentukan aterosklerosis pada kelinci (Madhumati, 2005).

2.5 Diet Aterogenik

Pemberian diet tinggi lemak merupakan salah satu cara membentuk hewan model coba standar yang digunakan untuk menjelaskan patomekanisme aterosklerosis. Pemberian induksi diet aterogenik selama rentang waktu yang diteliti akan menyebabkan terganggunya metabolisme kolesterol dalam tubuh. Hal ini meningkatkan kadar kolesterol (hiperkolesterolemia) yang menyebabkan



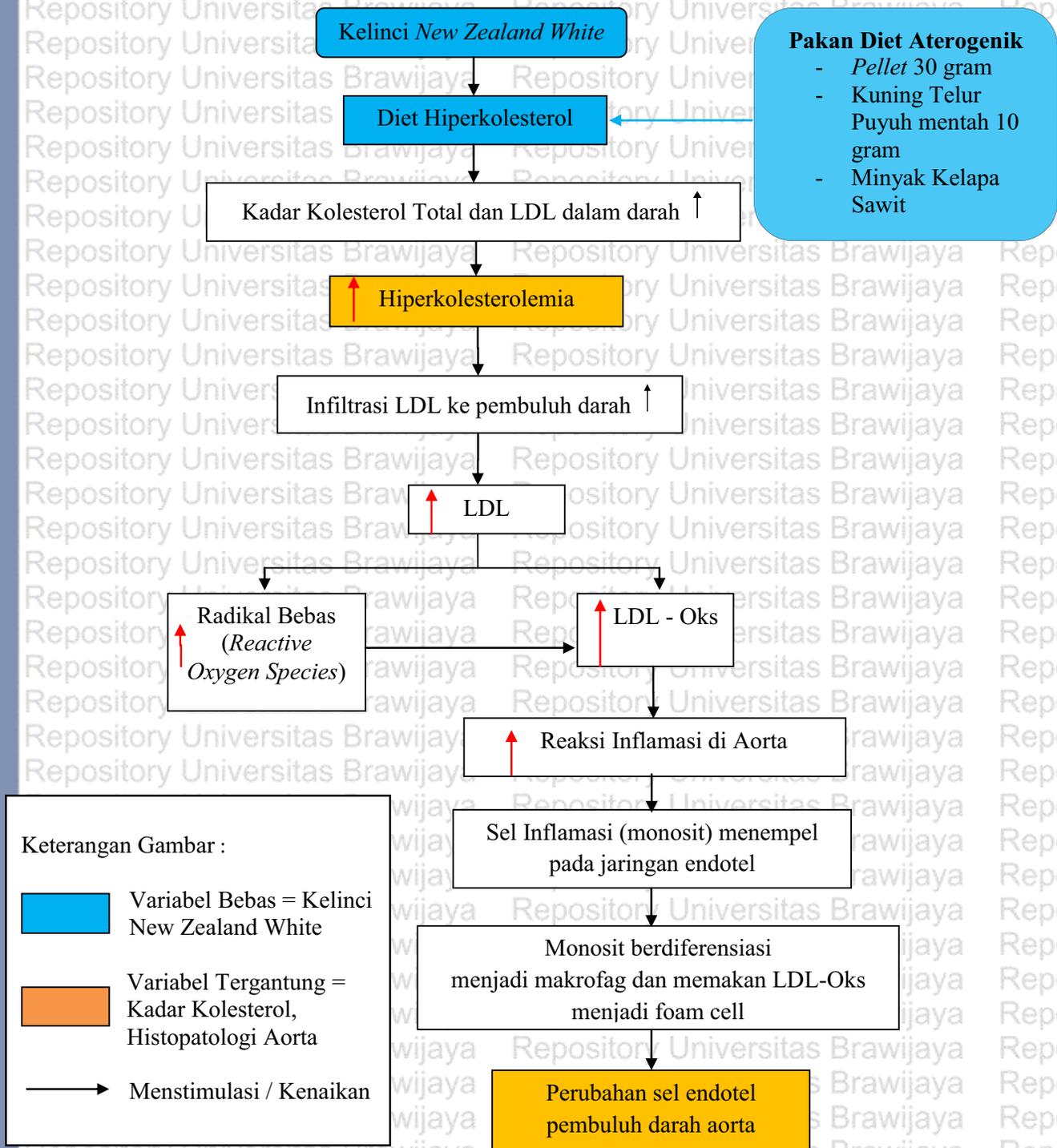
aktivitas enzim lipoprotein lipase menurun sehingga dapat menyebabkan terjadinya kondisi aterosklerosis (Gani, *et al.*, 2013).

Untuk membentuk kondisi hiperkolesterolemia hingga proses aterosklerosis pada hewan, pemberian pakan yang mengandung kolesterol banyak digunakan. Hal ini bervariasi mulai dari pakan komersial dengan kadar kolesterol, kandungan lipid, karbohidrat serta sumber lemak yang berbeda-beda. Dengan adanya penambahan *cholic acid* atau tidak (Dornas, 2005).

Pembentukan kondisi proinflamasi merupakan salah satu mekanisme dimana diet aterogenik menyebabkan penyakit metabolik dan kardiovaskuler. Diet aterogenik berhubungan dengan terjadinya disfungsi endotel, dimana disfungsi endotel merupakan tanda awal aterosklerosis (Esposito and Guigliano, 2006). Diet aterogenik berperan dalam pengaturan inflamasi serta produksi sitokin proinflamasi yang terlibat dalam aterosklerosis (Han *et al.*, 2002). Hasil penelitian pada kelinci yang diberi diet aterogenik meningkatkan resiko terjadinya aterosklerosis dengan cara menginduksi proses inflamasi (Haidar, 2007).

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual





Asam lemak jenuh di dalam kandungan pakan diet aterogenik menghasilkan asetil-CoA yang disintesa menjadi kolesterol. *Intake* kolesterol melalui pakan akan diserap dalam usus bersama molekul lipid dan trigliserida. Kolesterol yang diserap dalam usus dibawa ke jaringan ekstra hepatic untuk dihidrolisis yang selanjutnya di bawa ke hepar dalam bentuk kilomikron untuk disintesa menjadi *High Density Lipoprotein* (HDL) dan *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL).

Selanjutnya VLDL dihidrolisis menjadi *Intermediate Density Lipoprotein* (IDL) dan kemudian *Low Density Lipoprotein* (LDL). *Low Density Lipoprotein* yang diperoleh dari diet hiperkolesterol masuk ke jaringan peripheral, kulit, dan kelenjar endokrin untuk mengedarkan kolesterol ke sel-sel jaringan melalui darah untuk digunakan di dalam sel. Sisa LDL dalam darah di bawa menuju hepar untuk disintesa menjadi asam empedu. Sisa kolesterol yang tinggi tidak mampu di bawa kembali ke hepar oleh HDL dan memicu terjadinya oksidasi LDL akibat radikal bebas yang dihasilkan dari proses sintesa asam empedu menjadi LDL-Oksidasi (α -LDL) dan menyebabkan adanya reaksi inflamasi pada pembuluh darah termasuk aorta.

LDL yang teroksidasi oleh ROS atau ox-LDL memicu aktivitas sel inflamasi pada endotel yang terlihat dari aktivasi sel endothelial yaitu leukosit dan monosit. Leukosit akan muncul di sepanjang lumen dan dinding sel sehingga terjadi peningkatan permeabilitas. Penempelan endotel ini diperantarai oleh beberapa molekul adhesi pada permukaan sel endotel, yaitu inter Cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) dan Selectin kemudian monosit berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag



berfungsi menangkap akumulasi LDL dan LDL-Oksidasi melalui reseptor scavenger (scavenger cell) (Junaidi, 2000). Peningkatan makrofag menyebabkan munculnya marker inflamasi yaitu *Tumor Necrosis Factor* (TNF). TNF α berpengaruh pada sel endotel menyebabkan perubahan susunan sel dan abnormalitas struktur sel endotel (Faraci, 2004 dan Ungvari *et al.*, 2003). Sedangkan proses masuknya makrofag memicu pelepasan O^2 reaktif dan menginaktifkan *Nitric Oxide* (NO) sehingga terjadi kerusakan sel endotel (Silbernagl dan Florian, 2003) yang disebut sebagai keadaan aterosklerosis.



3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian pakan diet aterogenik mampu menyebabkan kenaikan kadar kolesterol darah serta menyebabkan perubahan gambaran histopatologi aorta pada kelinci *New Zealand White*.



BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biosains, Laboratorium Biokimia, Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei hingga Juni 2015.

4.2. Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain hewan coba yaitu kelinci *New Zealand white* jantan berumur > 6bulan. Berat badan kelinci \pm 2Kg.

kuning telur puyuh, pellet, alkohol 70%, akuades, NaOH, NaCl fisiologis 0.9 %, PFA 4%, aquades, eter, kloroform-metanol.

4.2.2. Alat Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini yaitu kandang hewan coba, tempat makan kelinci, tes strip kolesterol, timbangan, alkohol 70%, kapas, spuit 5 cc, *microtube*, *venoject* merah, seperangkat alat bedah, tissue, gelas ukur, gunting, pinset, sarung tangan, kertas saring, alat *sentrifuge*, lemari pendingin, timbangan digital (*Weston digiscale*), spektrofotometer, tabung reaksi, rak tabung, erlenmeyer, micropipet, penangas air, buret, pipet, gelas ukur, pengaduk, kit kolesterol *Easy Touch* GCU.



4.3. Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian sebagai berikut:

1. Rancangan penelitian dan preparasi hewan coba kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)
2. Penentuan dosis dan pembuatan diet aterogenik
3. Preparasi hewan model aterosklerosis
4. Pengambilan sampel serum
5. Pengujian kadar kolesterol
6. Pembuatan dan pembacaan preparat histologi aorta
7. Analisis data

4.4. Prosedur Kerja

4.4.1. Rancangan Penelitian dan Preparasi Hewan Coba Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)

Penelitian ini bersifat eksperimental. Hewan model dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan, yaitu Kelompok (A) kelinci kontrol negatif yaitu kelompok kelinci tanpa perlakuan dan kelompok (B) kelinci kontrol positif yaitu kelompok kelinci yang diberi diet aterogenik. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 8 ekor kelinci sebagai ulangan. Pengukuran kadar kolesterol dilakukan melalui *pre* dan *post examination test* serta dilakukan pembacaan gambaran histologi aorta setelah induksi. *Pre-examination test* bertujuan untuk mengetahui kadar kolesterol normal kelinci sebelum diberikan induksi pakan diet aterogenik serta *Post examination test* digunakan untuk mengetahui kadar kolesterol kelinci



setelah diinduksi dengan diet aterogenik. Diagram alir kerangka operasional dapat dilihat pada lampiran 1 dan rancangan penelitian pada **Tabel 4.1**.

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas : Pemberian diet aterogenik
2. Variabel tergantung : Kadar Kolesterol dan gambaran histopatologi aorta pada hewan coba.
3. Variabel control : Jenis hewan, jenis kelamin, umur, dan berat badan Kelinci, makanan dan minuman kelinci serta kondisi lingkungan kelinci yang berupa kandang kelinci maupun suhu kandang kelinci.

Tabel 4.1 Rancangan penelitian

Variabel yang diamati kadar kolesterol dan gambaran histologi aorta	Ulangan							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Kelompok A (kontrol negatif)								
Kelompok B (kontrol positif)								

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kelinci *New zealand* (*Oryctolagus cuniculus*) jantan, dengan berat badan 1700 - 2000 gram dan berumur 20 - 24 minggu. Kelinci yang digunakan adalah kelinci sehat yang ditandai dengan nafsu makan baik, dan perilaku normal. Kelinci diadaptasikan untuk menyesuaikan kondisi lingkungan selama 7 hari (Madhumati *et al.*, 2006).

Penentuan jumlah sampel dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):



Ulangan

$$P(n-1) \geq 15$$

$$2(n-1) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8$$

Keterangan

P = jumlah kelompok (terdiri dari 2 macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, untuk perlakuan sebanyak 2 macam perlakuan diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 8 kali dalam setiap kelompok atau sebanyak minimal 8 hewan coba. Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang digunakan dalam penelitian ini diadaptasikan selama 7 hari dengan pakan standar (pollar, susupap, sayuran) dan dikandangkan secara individu dalam ukuran 90 x 60 x 40 cm. Kandang tersebut terbuat dari kayu, bambu, kawat, besi yang kuat dan tidak mudah rusak oleh gigitan kelinci, berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Alas tempatnya mudah dibersihkan dan disanitasi.

4.4.2. Penentuan Jumlah dan Pembuatan Diet Aterogenik

Pembuatan pakan diet aterogenik dilakukan di Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya. Bahan pembuatan diet aterogenik yaitu pellet dan kuning telur puyuh. Diet aterogenik dosisnya terdiri dari 270 gram pellet dan 90 gram kuning telur puyuh, kemudian ditambahkan bahan pelarut berupa minyak goreng sebanyak 10 mL. Dibuat dalam bentuk pellet dengan dosis 40 g/ekor untuk 8 ekor kelinci. Pakan dibuat setiap hari (*fresh daily*), agar pakan tidak tengik dan berjamur.

**Tabel 4.2** Komposisi pembuatan diet aterogenik

Bahan	Dosis	Keterangan
Pellet (g)	270	
Kuning telur puyuh (g)	90	Diet aterogenik = 40 g/ekor/hari
Minyak goreng (mL)	10	

4.4.3. Preparasi hewan model aterosklerosis

Hewan model kelinci aterosklerosis dibuat dengan memberikan diet aterogenik (*pellet* dan kuning telur) dengan dosis 40 g/ekor/hari. Diet aterogenik diberikan selama 28 hari melalui oral dalam bentuk *pellet*. Pemberian diet aterogenik diberikan pada pagi hari sedangkan sore hari diberi hijauan seperti rumput, dan sayuran (pakan normal).

4.4.4. Kontrol keberhasilan induksi diet aterogenik

Untuk mengetahui keberhasilan induksi diet aterogenik pada kelinci, dilakukan pengukuran kadar kolesterol dalam darah. Kontrol peningkatan kadar kolesterol dalam darah dilakukan di pertengahan (hari ke-18) dan di akhir rentang waktu induksi diet aterogenik (hari ke-30). Pengukuran kadar kolesterol dilakukan dengan cara mengambil darah melalui pembuluh darah vena auricularis di telinga yang ditetaskan kedalam *Cholesterol Test Strips-Easy Touch* Kit. Darah yang ditetaskan pada alat tersebut kemudian ditunggu selama lima menit, kemudian dibaca hasilnya.

4.4.5. Pengambilan sampel serum darah

Pada hari ke 36 penelitian, dilakukan euthanasia menggunakan kloroform (Madhumati *et al.*, 2006) pada kedua kelompok ulangan. Kelinci diletakkan pada posisi rebah dorsal, kemudian dilakukan pembedahan pada bagian abdomen. Kemudian muskulus dikeluarkan, dilanjutkan dengan bagian *cartilago costae*



yang dikuakkan. Darah diambil melalui jantung dengan spuit 5 mL. darah tersebut dimasukkan dalam *microtube* dimasukkan dalam posisi miring 45 °C, dibiarkan mengendap pada suhu kamar selama $\pm 3,5$ jam dan disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya, serum tersebut diambil, dimasukkan dalam tabung *microtube*, dan disimpan dalam *refrigerator*.

4.4.6. Pengujian Kadar Kolesterol

4.4.6.1. Metode Penghitungan Kadar Kolesterol

Penentuan kadar kolesterol dilakukan menggunakan sampel serum yang diambil setelah dilakukan sentrifugasi pada darah kelinci. Serum kemudian direaksikan dengan reagen yang terdiri dari campuran enzim-enzim yang dapat mengubah kolesterol menjadi suatu senyawa berwarna sehingga dapat dideteksi oleh spektrofotometri *UV-Visible*. Kandungan reagen adalah: *4-aminoantipyrin*, *phenol*, *peroksidase*, *kolesterol esterase*, *kolesteroloksidase* dan *pipet buffer*.

Kolesterol yang bereaksi dengan reagen akan berubah warna menjadi merah setelah diinkubasi selama 10 menit pada suhu 25⁰ C sehingga dapat diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*. Warna merah berasal dari senyawa *quinoeimine* yang dapat terukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal 546 nm selama 5 menit dan nilai absorbansi tersebut sebanding dengan kadar kolesterol dalam darah. Pengukuran absorbansi dilakukan pada larutan standar, larutan sampel (serum) dan blanko reagen. Pengukuran absorbansi pada spektrofotometer *UV-Vis* dilakukan beberapa kali pada menit ke-10, 20, 30, 40, 50 dan 60 (1 jam). Konsentrasi dihitung pada nilai absorbansi



terbesar. Berikut contoh perhitungan kadar kolesterol darah pada kelinci 1 (B;

Kontrol Positif) :

$$\text{Rumus perhitungan kolesterol (mmol/L)} = \frac{\Delta \text{ sampel}}{\Delta \text{ standar}} \times 5,17$$

$$\Delta \text{ sampel} = 0,1225 \text{ nm}$$

$$\Delta \text{ standar} = 1,5 \text{ nm}$$

$$\Delta \text{ standar} - \Delta \text{ sampel} = 1,5 - 0,1225 = 1,4 \text{ nm}$$

$$\Delta \text{ sampel} = 0,66; 0,74; 0,65; 0,92; 0,89 \quad (\Delta \text{ sampel rata rata} = 0,77 \text{ nm})$$

Perhitungan Kolesterol (mmol/L)

$$\text{Konsentrasi kolesterol (mmol/L)} = \frac{\Delta \text{ sampel}}{\Delta \text{ standar}} \times 5,17$$

$$= \frac{0,77}{1,4} \times 5,17$$

$$= 2,8435 \text{ mmol/L}$$

Perhitungan Kolesterol (mg/dL)

$$\text{Konsentrasi kolesterol (mg/dL)} = \frac{\Delta \text{ sampel}}{\Delta \text{ standar}} \times 200$$

$$= \frac{0,77}{1,4} \times 200$$

$$= 110 \text{ mg/dL}$$



4.5. Pembuatan Preparat Histologi Aorta

4.5.1. Pengambilan Pembuluh Darah Aorta

Kelinci terlebih dahulu dieutanasi dengan menggunakan kloroform. Kloroform diteteskan pada kapas atau kain secukupnya, kemudian dimasukkan ke dalam wadah atau ember dengan penutup. Kelinci dimasukkan ke dalam wadah ember dan ditutup selama beberapa menit hingga kelinci tidak sadar. Selanjutnya dilakukan proses pembedahan. Pembedahan dilakukan dimulai dengan melakukan insisi pada muskulus maseter dari thorax hingga abdomen dan kemudian dikuakkan bagian *cartilago costae* untuk memperluas lapangan pandang. Muskulus serta organ-organ di bagian thoraco-abdominalis dikeluarkan dari rongga thorax dan abdomen dilanjutkan dengan irigasi menggunakan NaCl Fisiologis untuk membersihkan lapangan pandang dari darah. Pembuluh darah aorta terletak melekat sepanjang tulang belakang, tertaut dengan organ jantung hingga berakhir di bagian pubis. Pembuluh darah aorta yang tipis dengan hati-hati di potong dan ditarik serta direndam pada larutan *paraformaldehida* (PFA) 4%. Pengambilan aorta digunakan pembuatan preparat histologi.

4.5.2. Pembuatan Preparat Histopatologi

Proses pembuatan preparat histopatologi dimulai dengan jaringan disiksasi menggunakan formaldehid 10% selama 24 jam. Jaringan aorta kemudian didehidrasi untuk mengeluarkan air yang berada dalam jaringan dengan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90% sampai alkohol absolute. Jaringan aorta dimasukkan ke dalam paraffin cair dengan suhu 56 derajat celcius sebanyak 2 x 2 jam. Jaringan aorta kemudian diletakkan pada *object glass* dan dikeringkan pada suhu 38-40



derajat celcius hingga kering. Selanjutnya preparat siap di warnai dengan pewarnaan *Haematoxcilin-Eosin* (HE) (Wati dkk, 2013).

4.5.3. Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE)

Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) terdiri dari zat warna hematoxylin dan *eosin*. Proses pewarnaan dilakukan pada bagian awal preparat aorta dideparafinisasi menggunakan *xylol* yang bertujuan untuk menghilangkan paraffin pada jaringan. Selanjutnya dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol untuk mengembalikan kandungan air jaringan. Preparat kemudian dicuci menggunakan aquades. Setelah dilakukan pencucian, preparat dimasukkan ke dalam larutan pewarna *hematoxylin*. Preparat yang telah diwarnai dibilah kembali dengan aquades sampai bersih. Tahapan selanjutnya setelah preparat bersih diletakkan kembali di dalam pewarna *eosin*. Proses akhir preparat dicuci dengan aquades hingga bersih kemudian *didehidrasi*, *clearing* dan *mounting* (Wati dkk, 2013).

Preparat histopatologi aorta kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x dengan pengamatan pada bagian tunika intima, tunika media dan tunika adventitia. Pewarnaan HE akan dapat mewarnai sitoplasma dan inti sel. Namun tidak dapat mewarnai lemak.

4.5.4. Analisis data

Perubahan kadar kolesterol diamati secara kuantitatif yang kemudian dianalisis dengan SPSS *rev.16,0* dengan uji t tidak berpasangan (*Independent sample t-test*) (Ghozali, 2009). Sedangkan analisis gambaran histopatologi aorta dilakukan dengan membandingkan gambaran histopatologi aorta secara deskriptif kualitatif.



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Diet Aterogenik terhadap Kadar Kolesterol Darah Kelinci *New Zealand White (Orictolagus cuniculus)*

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran kadar kolesterol total pada serum kelinci yang sebelumnya diberi diet aterogenik 40 g/ekor/hari selama 30 hari. Peningkatan kadar kolesterol setelah pemberian diet aterogenik akan meningkatkan kadar LDL yang beredar di dalam darah sehingga akan berikatan dengan Reactive Oxygen Species (ROS) dan menyebabkan inflamasi pada jaringan aorta sehingga terjadi proses aterosklerosis. Data pemeriksaan kadar kolesterol rata-rata kelinci sebelum pemberian pakan diet aterogenik dapat dilihat pada **Tabel 5.1**. Sedangkan data peningkatan kadar kolesterol kelinci kelompok kontrol positif dibandingkan dengan kontrol negatif dapat dilihat pada **Tabel 5.2** dibawah ini.

Tabel 5.1. Kadar Kolesterol serum darah kelinci NZW *Pre Examination Test*

Perlakuan	Kadar Kolesterol (mg / dl)
Kelinci Kontrol (A)	58,30 ± 8,50
Kelinci Perlakuan (B)	57,60 ± 23,20

Tabel 5.2 Kadar kolesterol serum darah kelinci NZW *Post Examination Test*

Perlakuan	Kadar Kolesterol (mg / dl)	Peningkatan Kadar Kolesterol (%)
Kelinci Kontrol (A)	24,125 ± 8,28	-
Kelinci Perlakuan (B)	148 ± 43,12	513,5%

Hasil analisa uji t tidak berpasangan menggunakan SPSS 20.0 menunjukkan bahwa pemberian diet aterogenik sebanyak 40 g/ekor/hari selama 28 hari pada kelompok kelinci perlakuan dapat meningkatkan kadar kolesterol total



secara signifikan ($p < 0,05$) yang ditunjukkan pada hasil uji T terhadap kelompok kelinci kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok kelinci yang diberi perlakuan diet atherogenik mampu menaikkan kadar kolesterol total yang dibuktikan pada **Tabel 5.1** dimana terjadi peningkatan kadar kolesterol total dalam serum darah kelinci kelompok perlakuan diet atherogenik sebesar 513,5% dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Menurut Rosenthal (2002), kelinci NZW memiliki kadar kolesterol total normal dengan nilai 10-80 mg/dL. Kadar kolesterol total tersebut di dalam tubuh berguna untuk membantu proses metabolisme dalam tubuh. Kolesterol nantinya akan berkonjugasi dengan zat-zat lain untuk membentuk garam empedu yang akan meningkatkan pencernaan dan absorpsi lemak (Guyton, 2006).

Menurut Voet and Voet (2011), terjadinya peningkatan kadar kolesterol total merupakan akibat dari pemberian lemak yang masuk ke dalam tubuh dan dicerna dalam usus halus dan diangkut oleh kilomikron dan dihidrolisis oleh lipoprotein lipase menghasilkan asam lemak bebas. Akibat dari reaksi tersebut kilomikron akan mengecil dan disebut kilomikron sisa. Kilomikron sisa akan bersirkulasi membawa kolesterol ke hati, kemudian akan diserap oleh reseptor khusus melalui mekanisme *specific receptor-mediated endocytosis* (Voet and Voet, 2011). Hati memproduksi VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) untuk mengangkut kolesterol dan trigliserida dari hati menuju jaringan adiposa. Sama yang terjadi dengan kilomikron, selanjutnya VLDL ini akan mengalami hidrolisis oleh lipoprotein lipase dalam pembuluh darah dan menghasilkan IDL



(*Intermediate Density Lipoprotein*), hidrolisis lebih lanjut menghasilkan LDL (*Low Density Lipoprotein*) (Voet and Voet, 2011).

Hiperkolesterolemia, terutama fraksi *low density* adalah faktor resiko yang penting untuk proses terbentuknya aterosklerosis dan dapat meningkatkan level kolesterol. Kolesterol dari diet tinggi lemak diangkut ke jaringan oleh kilomikron, sedangkan kolesterol yang disintesa oleh jaringan tubuh sendiri khususnya oleh hepar, dialirkan ke seluruh tubuh melalui VLDL dan bisa mengakibatkan penumpukan di jaringan dan terbentuknya plak, ruptur dan pendarahan. Plak berkapsul yang terdapat di pembuluh koroner dapat menyebabkan pembentukan thrombus kemudian akan menyumbat pembuluh tersebut (Virmani *et al.*, 2000).

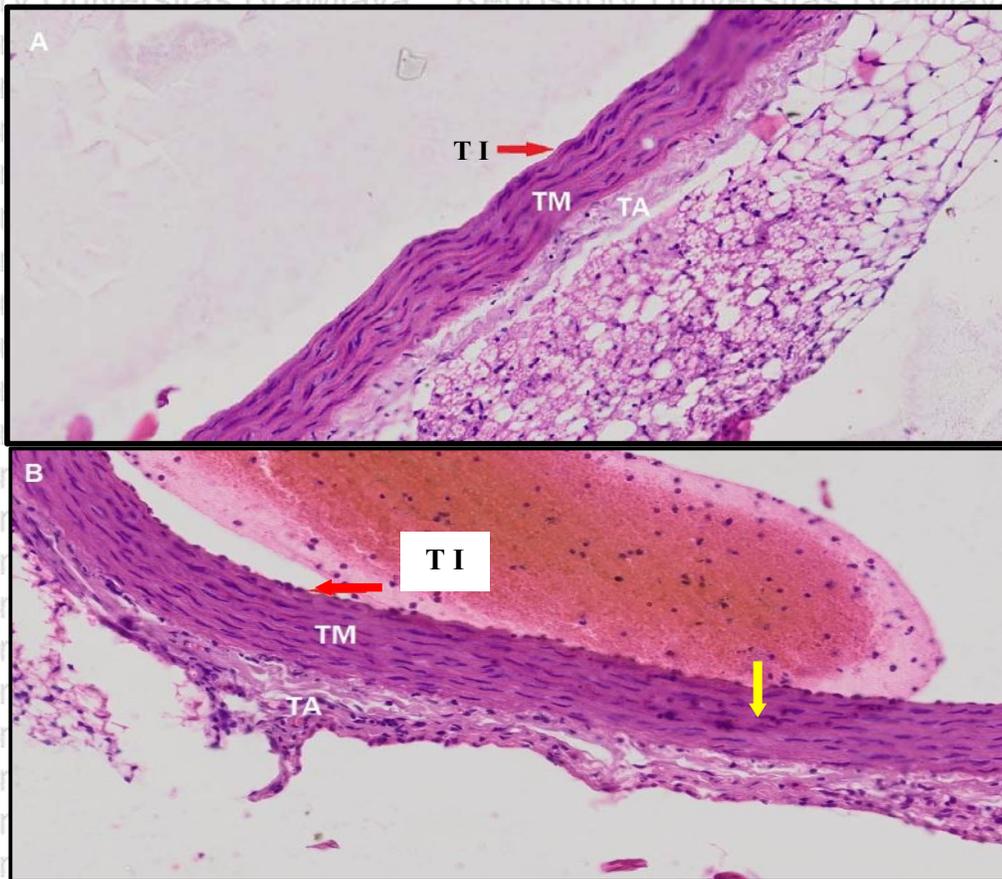
5.2 Pengaruh Pemberian Diet Aterogenik terhadap Gambaran Histopatologi Aorta Kelinci *New Zealand White* (*Oryctolagus cuniculus*)

Kondisi hiperkolesterolemia yang dicapai pada kelinci NZW hasil induksi diet aterogenik mengarah pada kecenderungan berbagai penyakit kardiometabolik. Hiperkolesterolemia umumnya berhubungan dengan berbagai kelainan metabolisme seperti aterosklerosis, disfungsi endotel serta gangguan lainnya akibat kelainan metabolisme lipid (Lovren dkk., 2015). Aterosklerosis ditandai dengan adanya akumulasi kolesterol, infiltrasi makrofag, proliferasi sel otot polos, akumulasi komponen jaringan ikat dan pembentukan trombus (Turunen dkk., 1999). Tunika intima dalam keadaan normal terdiri atas sel endotel. Tunika media terdiri dari sel otot polos dan serat retikulin sedangkan tunika adventitia terdiri dari serabut kolagen, pembuluh darah dan jaringan ikat. Kadar kolesterol yang



tinggi akan memicu LDL dan mengakibatkan penurunan kadar HDL. *High-Density Lipoprotein* (HDL) berfungsi sebagai pengangkut kolesterol dalam darah dari jaringan tubuh ke dalam hepar (Braunwald, 2007).

Low-Density Lipoprotein (LDL) yang ada dalam aliran darah akhirnya akan menempel dan terakumulasi pada dinding pembuluh darah dan memicu adanya *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga terjadi LDL oksidasi (Herpandi, 2005). *Low-Density Lipoprotein* (LDL) oksidasi akan menimbulkan reaksi inflamasi pada dinding pembuluh darah. Reaksi inflamasi menginisiasi sel imunokompeten seperti limfosit, monosit, dan makrofag. Reaksi imunologi dan luka endotel menyebabkan adanya vasodilatasi sehingga sel endotel terganggu dan permeabilitas sel-sel endotel akan memberikan celah sehingga sel inflamasi dan lemak memiliki akses ke dalam tunika intima. Luka pada sel-sel endotel mengakibatkan reaksi inflamasi sehingga terjadi penimbunan makrofag dan sel inflamasi (Taylor, 2005). Pengaruh pemberian diet atherogenik sebanyak 40 g/ekor/hari selama 28 hari terhadap gambaran histopatologi aorta meliputi penebalan endotel (**Gambar 5.1.b** Panah merah (→ Tunika Intima (endotel).



Gambar 5.1 Histopatologi Aorta Kelinci *New Zealand White* kedua kelompok ulangan dengan pewarnaan HE dan perbesaran 100X

Keterangan : (a) Kelompok kontrol negatif ; (b) Kelompok kontrol positif, TA: Tunika Adventitia; TM: Tunika Media; panah merah (→) Tunika Intima (endotel); TI; Tunika Intima

Gambaran histopatologi aorta kelompok kontrol negatif dengan perbesaran 100X menunjukkan bahwa aorta memiliki struktur yang normal tanpa adanya kerusakan yang terlihat pada bagian tunika intima, media, ataupun adventitia (**Gambar 5.1.a**). Lapisan terluar atau endotel pada tunika intima memiliki sifat yang halus dan rapi (**Gambar 5.1.a** panah merah (→) Tunika Intima (TI).

Sedangkan gambaran histopatologi aorta pada kelompok kontrol positif dengan perbesaran 100X menunjukkan adanya ruptur pada lapisan tunika intima menjadi

lebih kasar dan tidak beraturan (**Gambar 5.2.b** panah merah (→) Tunika Intima/



endotel). Kerusakan tersebut menurut Taylor (2015) mampu mengakibatkan sel-sel inflamasi dan juga sel-sel lemak masuk ke tunika intima sehingga terjadi infiltrasi sel-sel inflamasi dan sel-sel lemak. Lapisan tunika media mengalami proliferasi dan menghasilkan gambaran tunika media yang lebih tebal (**Gambar 5.2.b** panah kuning (→)).

Mekanisme kerusakan sel oleh radikal bebas didahului dengan kerusakan membran sel, sehingga menyebabkan gangguan proses transpor pada membran dan terjadinya reaksi peroksidasi lipid membran yang mengandung *polyunsaturated fatty acid* (PUFA). Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks akibat reaksi asam lemak tak jenuh ganda penyusun membran sel dengan *reactive oxygen species* (ROS) dan membentuk hidroperoksida. Menurut Winarsi (2007), target utama dari ROS adalah protein, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein serta unsur DNA termasuk karbohidrat dan RNA. Asam lemak tak jenuh merupakan komponen tubuh yang paling rentan terhadap serangan ROS (Valko et al., 2007).

Tunika adventitia memiliki peran yang cukup penting untuk lalu lintas sel ke dalam dan keluar dari dinding aorta. Tunika adventitia juga memiliki peran dalam pertumbuhan dan perbaikan dinding pembuluh serta menjadi perantara sel-sel endotel vaskular dan sel otot polos (SMC) atau keduanya dengan jaringan yang ada di sekitarnya (Sartore dkk., 2001; Haurani dkk., 2007). Tunika adventitia merupakan lokasi terbentuknya dan regresi *microvessel* (vasa vasorum) yang menembus dan memberikan nutrisi pada bagian tunika media dan tunika adventitia (Moulton dkk., 2003; Ritman dan Lerman, 2007; Drinane dkk., 2009).



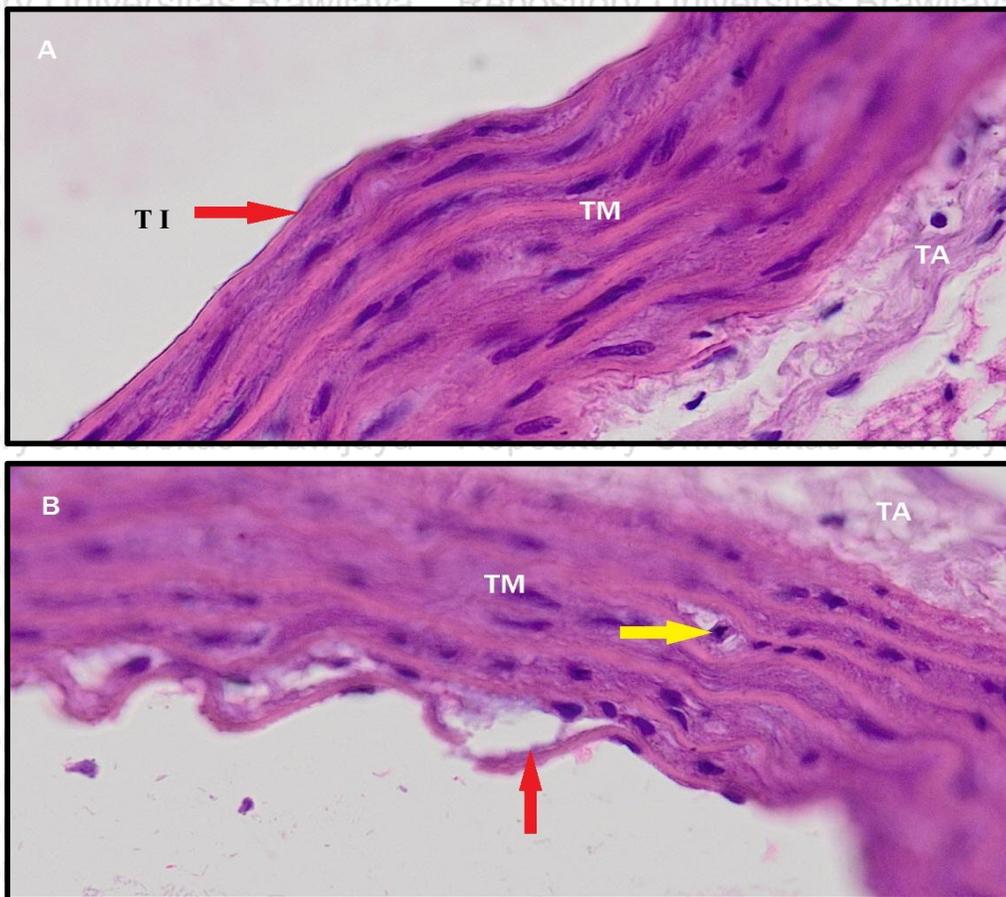
Pada tunika adventitia juga terdapat pembuluh limfatik dan saraf otonom. Tunika adventitia berperan penting dalam mengendalikan ukuran lumen melalui regulasi tonus otot polos (pada tunika media) dan kontrol dalam respon *remodeling* pembuluh (Rey dkk., 2002; Wang dkk., 2010). Tunika adventitia juga mengandung makrofag, sel-T, sel-B, sel mast, dan sel dendritik yang berperan penting dalam sistem *innate immunity* untuk menanggapi antigen asing. Majesky dkk. (2011) menyatakan bahwa tunika adventitia memiliki sebuah susunan kompleks yang menyediakan interaksi beberapa sel untuk tujuan homeostasis dan perbaikan dinding pembuluh yang membutuhkan peran yang berkaitan antara tunika media, tunika intima dan tunika adventitia.

Tunika media aorta terdiri dari jaringan ikat elastin. Di antara lamina elastik terdapat sel-sel otot polos, jaringan ikat retikular, proteoglikan dan glikoprotein, sedangkan tunika adventitia relatif kurang berkembang. Tunika intima tersusun dari sel endotel pipih selapis dan dipisahkan dari tunika media oleh lamina elastik interna. Lamina elastik interna aorta cenderung sangat tipis sehingga sulit untuk dibedakan dengan lapisan berikutnya berdasarkan gambaran histologi secara umum. Jaringan pengikat pada tunika adventitia umumnya mengalami fusi dengan jaringan pengikat yang lebih renggang di sekitarnya (Taylor *et al.*, 2005).

Lesi aterosklerosis menurut Virmani *et al.*, (2000) dan Naghavi *et al.*, (2003) dibedakan menjadi dua macam yaitu lesi intima nonaterosklerotik dan lesi aterosklerotik *progressive*. Pembentukan lesi intima nonaterosklerotik terjadi oleh aktivitas *fibroblastic* membentuk stenosis pada arteri kecil sehingga terjadi



akumulasi matriks (Dermengiu *et al.*, 2010). Sedangkan lesi aterosklerosis *progressive* terjadi akibat berkumpulnya makrofag dan limfosit T pada bagian intima membentuk *fibrous cap* sehingga terjadi reaksi inflamatori (Libby *et al.*, 2011).



Gambar 5.2 Histopatologi Aorta Kelinci NZW kedua kelompok ulangan dengan pewarnaan HE dan perbesaran 400x

Keterangan : (a) Kelompok kontrol negatif; (b) Kelompok kontrol positif; TA: tunika adventitia; TM: tunika media; TM: panah merah (→) tunika intima (endotel); panah kuning (→): sel-sel radang.

Gambaran histopatologi aorta kelinci NZW pada kelompok kontrol positif dengan perbesaran 400x (**Gambar 5.2.b**) menunjukkan susunan sel endotel yang



ireguler. Selain itu jaringan endotel juga terlepas dari membrana basalis. Marcil dkk. (2008) menyatakan bahwa sel endotel merupakan bagian penting dalam integritas dinding aorta. Perubahan fungsi endotel dapat mempengaruhi *vasokonstriksi* dinding pembuluh, aderens leukosit, aktivasi platelet, trombosis, peradangan pembuluh darah dan patogenesis terjadinya aterosklerosis. Kondisi abnormalitas juga terjadi pada tunika media yang ditandai dengan adanya rongga yang berisi sel inflamasi dan lipid yang merupakan awal dari pembentukan *foam cell* (**Gambar 5.2.b** panah kuning (→)). Masuknya sel radang pada tunika intima dengan stuktur sel endotel yang ruptur ke arah lumen ditunjukkan pada (**Gambar 5.2.b** panah merah (→)). *Foam cell* merupakan makrofag yang berisi lipid, sitoplasma dan nukleus (Libby dkk., 2002). Rongga yang terbentuk di tunika media pada kelompok kontrol positif merupakan akibat adanya reaksi peroksidasi lipid yang berlangsung pada sel-sel otot polos. Kerusakan sel dapat disebabkan karena produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang tinggi. Semakin tinggi produksi ROS di dalam tubuh, maka semakin banyak pula ROS yang tidak mampu dinetralisir. ROS yang tidak dinetralisir akan menimbulkan ikatan atau bereaksi dengan komponen-komponen tubuh diantaranya *poly-unsaturated fatty acid* (PUFA) sehingga menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid.

Berbagai penelitian telah menunjukkan keterlibatan LDL oksidasi (ox-LDL) terhadap disfungsi endotel yang dapat memicu terbentuknya *atherome* (Libby dkk., 2002). *Low-Density Lipoprotein* oksidasi (ox-LDL) dalam jumlah yang cukup besar mampu mempercepat induksi efek pro-inflamasi pada sel endotel termasuk inisiasi adhesi leukosit yang mengakibatkan disfungsi dan



kerusakan (*injury*) struktur endotel. Penetrasi sel-sel tersebut ke dalam dinding pembuluh akan menghasilkan sel busa atau biasa disebut sebagai *foam cell* (Laursen dkk., 2001; Hansson, 2001). Kerusakan endotel pada kelompok kontrol positif menunjukkan adanya pengaruh ox-LDL terhadap keutuhan sel-sel endotel dan tunika media, hal ini ditunjukkan dengan adanya ruptur endotel serta adanya sel-sel inflamasi pada tunika media (yang ditunjukkan panah merah). Sel-sel inflamasi juga teramati pada bagian tunika adventitia yang mengalami perubahan struktur menjadi lebih berongga. Hal ini merupakan akibat dari penetrasi sel-sel inflamasi yang menebus endotel dan tunika intima.

Hasil studi yang dilakukan oleh Vasa dkk. (2001) menunjukkan bahwa faktor resiko tidak hanya mampu mengganggu sirkulasi sel progenitor endotelial, tetapi juga mengganggu proses diferensiasi dan fungsi sel tersebut misalnya sifat-sifat seluler penting seperti migrasi dan adhesi. Pentingnya keseimbangan antara paparan faktor resiko dan kapasitas untuk perbaikan telah dilakukan yaitu dengan meningkatkan jumlah sirkulasi sel progenitor endotel untuk mempertahankan fungsi endotel meskipun dengan faktor resiko yang cukup tinggi (Hill dkk., 2003).

Kemampuan regenerasi sel endotel mengindikasikan adanya potensi penting terhadap interaksi antara sel-sel otot polos dan sel endotel dalam respon kerusakan vaskular.

Berdasarkan gambaran histopatologi aorta kedua kelompok kelinci ulangan, dapat disimpulkan bahwa pemberian diet aterogenik sebanyak 40 g/ekor/hari selama 28 hari mampu menghasilkan awal pembentukan *foam cell* dan kerusakan pada lapisan tunika intima aorta.



5.3 Pengaruh Pemberian Pakan Normal Kelinci Terhadap Kelinci Model Hiperkolesterol

Kelinci merupakan hewan yang membutuhkan 80% serat pada makanan setiap harinya dikarenakan sistem pencernaannya yang tidak dapat mencerna semua jenis makanan. Oleh sebab itu, kelinci memakan banyak rerumputan dan 20% lainnya yaitu buah dan hijauan lainnya. Untuk kelinci hias yang dibudidayakan oleh manusia juga membutuhkan hijauan (Vatsala, 1985). Hal ini menyebabkan kelinci model aterosklerosis tidak bisa hanya diberikan diet hiperkolesterol dalam bentuk pellet saja, melainkan tetap membutuhkan diet hijauan. Pemberian pakan normal atau hijauan pada kelinci model aterosklerosis sedikit banyak dapat memberikan pengaruh terhadap kadar kolesterol maupun marker pemeriksaan aterosklerosis yang lainnya.

Kelinci kontrol negatif menunjukkan penurunan kadar kolesterol dengan rata-rata kadar kolesterol sebelum penelitian sebesar $58,30 \pm 8,50$ dan mengalami penurunan hingga $24,125 \pm 8,28$ pada hari ke-28. Penurunan kadar kolesterol mencapai 50% selama 28 hari. Tentunya hal ini perlu dipertimbangkan pada hasil kadar kolesterol yang diharapkan kelinci kontrol positif aterosklerosis.

Diet yang diberikan pada kontrol positif adalah diet tinggi kolesterol dalam bentuk bolus yang memiliki komposisi pellet, kuning telur puyuh mentah dan minyak kelapa sebesar 30 gram per ekor. Di sore hari kelinci diberi pakan hijauan kurang lebih sebanyak 30-40 gram yang terdiri dari wortel, daun wortel dan rumput yang dikeringkan. Untuk kelinci kontrol negatif diberikan hijauan sebanyak 30-40 gram dengan komposisi yang sama di pagi dan sore hari.



Diet tinggi lemak dan kolesterol adalah faktor resiko utama pada penyakit aterosklerosis (Howard, 2011). Peningkatan konsumsi buah dan sayuran telah menjadi kunci dalam pencegahan penyakit jantung dan kardiovaskuler. Buah dan sayur mengandung banyak nutrisi seperti serat, vitamin, mineral dan *fitokimia*. Zat *fitokimia* telah terbukti dapat mengurangi inflamasi, stress oksidatif dan marker penanda penyakit kardiovaskuler lainnya (Lennie, 2001).

Di antara sayuran dan buah-buahan, wortel merupakan sayuran yang memiliki kandungan serat yang tinggi, *karotenoid*, vitamin C, Vitamin E dan kandungan *fenol* seperti *p-coumaric*, *chlorogenic* dan *caffeic acid* (Alasalvar, 2001). Konsumsi makanan yang mengandung komponen fenol dapat mengurangi resiko penyakit kardiovaskuler. Komponen fenol merupakan diet antioksidan yang ditemukan pada tumbuhan dan dapat mencegah terbentuknya LDL-Oks, agregasi dan adhesi platelet, mengurangi kadar dan total kolesterol serta dalam proses relaksasi endotel. Konsumsi wortel juga menunjukkan efek fisiologis seperti penurunan kerusakan DNA-Oks, menaikkan kadar plasma antioksidan dan mengurangi inflamasi (Reuben, 2004).

Secara biokimiawi, kandungan serat kasar pada hijauan nantinya dapat mengubah kolesterol menjadi asam empedu dan mencegah pembentukan kolesterol kembali. Sehingga dapat diamati adanya kondisi penurunan kadar kolesterol. *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang terbentuk akibat pemberian diet kolesterol akan kemudian dinetralisir oleh antioksidan yang banyak terkandung pada wortel.



Dengan demikian dapat diamati bahwa pembuatan hewan model aterosklerosis pada kelinci perlu diamati lebih lanjut pengaruh pakan selain daripada pakan diet aterogenik yang diberikan terhadap hasil kadar kolesterol. Hal ini dapat diamati pada kelinci kontrol negatif. Pengamatan ini dilakukan secara kualitatif dengan membandingkan kelinci kontrol negatif sebelum dan sesudah penelitian.

Pengaruh stress dapat menjadi salah satu faktor dalam peningkatan kadar kolesterol. Stress dapat meningkatkan kadar kolesterol yaitu kadar LDL dan Trigliserida. Semakin tinggi tingkat stress maka akan semakin tinggi kenaikan kadar LDL dan Trigliserida (Matzer, 2008). Kondisi stress dapat mendorong tubuh untuk memproduksi energi lebih dalam bentuk metabolit yang akan dapat langsung berpengaruh pada hepar untuk memproduksi kolesterol jahat atau LDL. Kondisi stress juga dapat menghambat kinerja tubuh untuk membersihkan lipid dan menyebabkan inflamasi. Kelinci yang telah diaklimatisasi selama 1 minggu masih dapat mengalami kenaikan kadar kolesterol.



BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian diet aterogenik pada kelinci *New Zealand White* selama 28 hari dengan dosis 40 g/ekor/hari mampu meningkatkan kadar kolesterol dalam darah sebesar 513,5 % pada kelinci kelompok perlakuan diet aterogenik dibandingkan dengan kelinci kontrol negatif.
2. Pemberian diet aterogenik pada kelinci *New Zealand White* selama 28 hari dengan dosis 40 g/ekor/hari mampu menyebabkan perubahan gambaran histopatologi aorta pada kelinci *New Zealand White* berupa bentukan sel busa (*foam cell*) dan kerusakan pada membran endotel aorta.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai lama waktu pemberian dan dosis diet aterogenik pada kelinci *New Zealand White* serta dilakukan terapi preventif ataupun kuratif terhadap penyakit aterosklerosis khususnya dengan menurunkan kadar kolesterol darah dan meningkatkan perbaikan sel-sel endotel aorta. Serta pengamatan lebih lanjut terhadap pengaruh pemberian pakan selain daripada pakan tinggi kolesterol terhadap kadar kolesterol yang diharapkan.



DAFTAR PUSTAKA

- Adams, C. W. M. 2014. *Relative Absence of Triglycerids in Coronary Atherosclerotic Lesions*. Journal Atheroscler Res. 1969 Sept-Oct;10 (2): 149-152.
- Barajas, Berenice. 2006. *Ambient Ultrafine Particulate Matter that Enhances Atherosclerosis*. Aha Journal, circ : 144-159
- Binder, Cristoph, J. 2011. *Experimental Immunotherapeutic approaches for atherosclerosis*. Austria : University of Vienna.
- Bozse, E; Houdebine. 2003. *Pathology of the unstable plaque*. Prog Cardiovasc Dis 44: 349, 2002.
- Braunwald, E., DP Zipes, P Libby. 2007. *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. 8th edition*. WB Saunders Company.
- Charles River. 2013. *New Zealand White Rabbits*. Model Information Sheet Charles River Laboratories International.
- Davis, H.R. 2005. *Atherosclerosis I : LDL Cholesterol Lowering*. Biochimica et Biophysica Acta 1722 (3): 282-292, 2005.
- Dermengiu, D., G. C. Curca, N. Sarbu, S. Hostiuc, M. Ceausu. 2010. *Sudden Cardiac Death in Non-atherosclerotic and Non-inflammatory Intimal Cellular Proliferations*. A Case Report. Rom J Leg Med. 18: 183-188.
- Dornas, C. Waleska; Oivieira, Tania; Agosto, Franklin; Nagem, Tanus. 2010. *Experimental Atherosclerosis In Rabbit*. Biologia Celular Departamento. Sao Paulo : Brazil.
- Drinane, M., J. Mollmark, L. Zagorchev, K. Moodie, B. Sun, A. Hall, S. Shipman, P. Morganelli, M. Simons, and M.J. Mulligan-Kehoe. 2009. *The antiangiogenic activity of rPAI-1(23) inhibits vasa vasorum a and growth of atherosclerotic plaque*. Circ. Res. 104:337–345.
- Falk, E. 2004. *Pathogenesis of Atherosclerosis*. Journal Med Screen, 11 (2004), pp.
- Faraci. 2004. *Inflammation in Atherosclerosis*. Nature. 420:868.
- Getz, G.S. 2012. *Use of Mouse Models in Atherosclerosis Research*. California : Methods Mol Biol. 2015;1339:1-16.



Ghozali, I. 2009. *Analisis Multivariate Program IBM SPSS 2*. Edisi 7. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro

Gropper, J.B; Smith JB, Mangkoewidjojo S. 2005. *Pemeliharaan, Pembiakan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: UI Press.

Guyton and Hall. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Diterjemahkan oleh Setiawati I, Tengadi AKL, Santoso S. Edisi 11. Jakarta: EGC .2006;891

Halliwell, B; Gutteridge JMC. 2006. *Free Radicals in Biology an Medicine*. Ed 3rd. New York: Oxford University.

Han, M Jane, A., Claudia, A and Kirk, J. 2002. *Prevalence and Risk Factors for Obesity in Adult Cats from Private US Veterinary Practices. Intern Journal Appl Res Vet Med*, 2:3.

Hansson, G.K. 2001. *Immune mechanisms in atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1876–1890.

Harmsen, G.K. 2000. *Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. N Engl J Med* 352:1685–1695

Harini, Marti; Parama Astirin, Okid. 2009. *Blood Cholesterol Levels of hypercholesterolemic rat (rattus norvegicus) after VCO treatment*. Journal of Nusantara Bioscience Sebelas Maret University. Surakarta.

Haurani, M.J., P.J. Pagano. 2007. *Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease. Cardiovasc. Res.* 75:679 – 689.

Henry, Thondre. 2011. *Triglyceride-rich Lipoproteins and high-density lipoprotein in Serum*. Oxford Journal.

Herpandi. 2005. *Aktivitas Hipokolesterolemik Tepung Rumput Laut Pada Tikus Hiperkolesterolemia [Tesis]*. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Hirakawa, Matsue, H., D. Edelbaum, D. Shalhevet, N. Mizumoto, C. Yang, M. E. Mummert, J. Oeda, H. Masayusu and A. Takashima. 2005. *Generation and Function of Reactive Oxygen Species in Dendritic Cell During Antigen Presentation. J. Immunology ; 171: 3010-3018*.

Hoffman, G, K. 2005. *Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. N Engl J Med* 352:1685–1695



- Istiadi. 2005. *Profil Lipid dan Perkembangan Lesi Aterosklerotik pada Tikus yang diberi Diet Perasan Pare (Momordica charantia) Bersama Statin dengan tikus yang diberi statin [TESIS]*. Ilmu Biomedik. Universitas Diponegoro
- Junaidi, Haryo. 2003. *Recent Development in Pathogenesis of Atherosclerosis, in Atherosclerosis from Theory to Clinical Practice. Semarang Cardiology-Update (Mini 12 Cardiology – Update III)*. Universitas Diponegoro., Semarang.
- King, Mann. 2010. *Rabbit Production in Hot Climates*. Poultry Production Dept., Fac. Of Agric., Alexandria Univ., Egypt. Page 1173-1177
- Kusmana, D; Hanafi, M. 2003. *Patofisiologi Penyakit Jantung Koroner*. Jakarta : Balai Penerbit FKUI.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Laursen, J.B., M. Somers, S. Kurz. 2001. *Endothelial Regulation of Vasomotion in ApoE-deficient Mice: Implications for Interactions Between Peroxynitrite and Tetrahydrobiopterin*. *Circulation* 103: 1282–1288.
- Libby, P., P.M. Ridker, A. Maseri. 2002. *Inflammation and atherosclerosis*. *Circulation* 105: 1135–1143.
- Libby, P., P. M. Ridker, G. K. Hansson. 2011. *Progress and Challenges in Translating the Biology of Atherosclerosis*. *Nature*. 473: 317-325.
- Lovren, F., H. Teoh, and S. Ferma. 2015. *Obesity and atherosclerosis: Mechanistic insight*. *Canadian journal of cardiology* 31(2):177–183.
- Madhumati B G; Venkantaranganna M V; Gopumadhavan S; Rafiq, Moch; Mitra S K. 2006. *Induction and evaluation of atherosclerosis in New Zealand White rabbit*. *Indian Journal of experimental biology* Vol 44; 203-08.
- Majesky, M.W. X.R. Xiu, V. Hognlund, W.M. Mahoney, Jr., and G. Daum. 2011. *The Adventitia A Dynamic Interface Containing Resident Progenitor Cells*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31:1530–1539.
- Massie, BM; Libby, P; Ridker, PM. 2002. *Systemic Hypertension*. 42nd Edition Atherosclerosis Journal.
- Marcil, V., E. Delvin, D. Amre, D. Sinnet, G. Mailhot, E. Seidman, and E. Levy. 2008. *Effect of Oxidative Stress on the Status of Adhesion Molecules, Nuclear Receptors and Cholesterol Flux in Endothelial Cells: Priming of Monocyte*. *Clin. Med. Cardiol.* 1–32.



Menys, Charlton. 2007. *Human Cholesterol Metabolism and Therapeutic Options*. PubMed Journal Online. 10.1113/expphysiol.2006.035147.

Moulton, K.S., K. Vakii, D. Zurakowski, M. Soliman, C. Butterfield, E. Sylvin, K.M. Lo, S. Gillies, K. Javaherin, and J. Folkman. 2003. *Inhibition of Plaque Neovascularization Reduces Macrophage Accumulation and Progression of Advanced Atherosclerosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100:4736–4741.

Muntiha. 2001. *Asupan Asam Lemak Jenuh dari Makanan Gorengan dan Risikonya terhadap Kadar Lipid Plasma pada Kelompok Usia Dewasa*. [Disertasi]. Jakarta: Universitas Indonesia.

Murray, C. J, 2003. *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins : Structure and Metabolism*. Indiana : University Press

Murwani, Sri; Ali, Mulyohadi; Muliarta, Ketut. 2006. *Diet Aterogenik Pada Tikus Putih (Rattus novergicus strain Wistar) Sebagai Model Hewan Aterosklerosis*. Indonesia : Fakultas Kedokteran Brawijaya.

Naghavi, M., P. Libby, E. Falk. 2003. *From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient: a Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies : part II*. *Circulation*. 108: 1772-1778.

Peng, Xuwen. 2012. *Transgenic Rabbit Models for Studying Human Cardiovascular Diseases*. Pennsylvania : Comparative Medicine Department.

Rey, F.E., and P.J. Pagano. 2002. *The Reactive Adventitia: Fibroblast Oxidase in Vascular Function*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:1962–1971.

Ritman, E.L., and A. Lerman. 2007. *The Dynamic Vasa Vasorum*. *Cardiovasc. Res.* 75:649–658.

Roshental, K. 2002. *Rabbit References Range*. University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine.

Ross, Russel. 1986. *Atherosclerosis – An Inflammatory Disease*. Massachusetts Medical Society.

Sartore, S., A. Chiavegato, E. Faggin, R. Franch, M. Puato, S. Ausoni, and P. Pualetto. 2001. *Contribution of Adventitial Fibroblasts to Neointima Formation and Vascular Remodeling: from Innocent Bystander to Active Participant*. *Circ. Res.* 81:1111–1121.



- Tapan; Spagnoli, L. G., E. R. Krakower, A. h. Kissebah. 2005. *A Novel Pathway to The Manifestation Metabolic Syndrome. Obesity Research*. 12 No. 2.
- Taylor, R. B., A. K. David, S. A. Fields, M. Philips, J. E. Scherger, D. E. Anisman. 2005. *Cardiovascular Handbook*. Springer Science and Business Media, Inc. Philadelphia. Pp:151–164.
- Tugasworo, D. 2010. *Prevensi Sekunder Stroke*. Indonesia : Fakultas Kedokteran UNDIP.
- Turunen, M.P., M.O. Hiltunen, S. Yla-Herttuala. 1999. *Gene Therapy for Angiogenesis, Restenosis and Related Diseases. Exp Gerontol*. 34:567–74.
- Valko , G; Xenoulis, J and Steiner, M. 2006. *Lipid Metabolism and Hyperlipidemia in Dogs*. The Veterinary Journal, 183 : 12–21.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur and J. Telser. 2007. *Review: Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. Inter J Biochem Cell Biol(2007);39:44–84*.
- Vasa, M, S. Fichtlscherer, A. Aicher, K. Adler, C. Urbich, H. Martin, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2001. *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. Circ. Res*.89:1–7.
- Virmani, R., F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. Fard, S. M. Schwartz. 2000. *Lessons from Sudden Coronary Death: a Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions. Arterioscler Thromb* 20:1262-1275.
- Voet D. and J.G. Voet. 2011. *Biochemistry 4th Ed*. J Willey and Sons Inc. New York.
- Wang, H.D., M.T. Ratsep, A. Chapman, and R. Boyd. *Adventitial Fibroblasts in Vascular Structure and Function: the Role of Oxidative Stress and Beyond*. 2010. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 88:177–186.
- Wati, E. A. dan M.Y. Hamidy. 2013. *Pengaruh Air Perasan Umbi Bawang Merah (Allium ascalanicum L) terhadap Malondialdehida (MDA) Plasma Mencit yang Diinduksi Hiperkolestolemia. Jurnal Natur Indonesia* 14(2), Februari 2012: 150-154.