



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAUN KAYU KUNING
(*Arcangelisia flava* (L.) Merr) TERHADAP HISTOPATOLOGI AORTA TIKUS
WISTAR HIPERLIPIDEMIA**

SKRIPSI

Oleh:

Yuniar Wahyu Rahmawati

NIM 112210101042

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAUN KAYU KUNING
(*Arcangelisia flava* (L.) Merr) TERHADAP HISTOPATOLOGI AORTA TIKUS
WISTAR HIPERLIPIDEMIA**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

Yuniar Wahyu Rahmawati

NIM 112210101042

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda Jhoni Arief Poerwana dan Ibunda Rohmi;
2. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi, yang telah memberikan ilmunya dan membimbingku dengan penuh rasa sabar;
3. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember

MOTTO

“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap.”

(QS Al Insyirah ayat 5-8)

“Allah tidak membebani seseorang itu melainkan sesuai dengan kesanggupannya.”

(QS Al-Baqarah ayat 286)

“Try not to become a man of success but rather try to become a man of value”

(Albert Einstein)

“Vision without action is just a dream. Action without vision just passes the time.

Vision with action can change the world”

(Joel A. Barker)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Yuniar Wahyu Rahmawati

NIM : 112210101042

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul : “Pengaruh Pemberian Ekstrak Metanol Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) terhadap Histopatologi Aorta Tikus Wistar Hiperlipidemia” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 21 Desember 2015

Yang menyatakan,

Yuniar Wahyu Rahmawati

NIM 112210101042

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAUN KAYU KUNING
(*Arcangelisia flava* (L.) Merr) TERHADAP HISTOPATOLOGI AORTA
TIKUS WISTAR HIPERLIPIDEMIA**

Oleh:

Yuniar Wahyu Rahmawati

NIM 112210101042

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Ema Rachmawati, S.Farm.,M.Sc.,Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Metanol Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) terhadap Histopatologi Aorta Tikus Wistar Hiperlipidemia” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi, Universitas Jember pada:

hari : Senin
tanggal : 21 Desember 2015
tempat : Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing I,

Dosen Pembimbing II,


Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt
NIP.197807282005012001



Ema Rachmawati, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP.198403082008012003

Tim Penguji

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,


Afifah Machlaurin, S.Farm., M.Farm., Apt
NIP. 198501262008012003


Diana Holiday, SF., M. Farm., Apt
NIP 197812212005012002

Mengesahkan

Dekan,




Lestyo Wulandari S.Si., Apt., M.Farm
NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Ekstrak Metanol Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) terhadap Histopatologi Aorta Tikus Wistar Hiperlipidemia; Yuniar Wahyu Rahmawati; 112210101042; 2015; 94 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Aterosklerosis adalah menebal dan kakunya pembuluh darah besar dan sedang akibat adanya plak ateroma yang dapat mempersempit lumen arteri dengan manifestasi klinis utama berupa infark miokardium dan stroke. Peningkatan kolesterol dan LDL plasma menjadi salah satu faktor resiko terbentuknya lesi aterosklerosis. Prevalensi penyakit yang meningkat dan mulai beralihnya masyarakat ke pengobatan herbal mendorong adanya penelitian potensi antiaterosklerosis daun Kayu kuning (*Arcangelisia flava*). Tumbuhan ini dipilih karena mengandung berberin, flavonoid, dan terpenoid sebagai antioksidan yang dapat menghambat terjadinya stress oksidatif endotel pembuluh darah.

Penelitian ini merupakan jenis *true experimental laboratories*, menggunakan tikus jantan galur Wistar. Hewan uji diinduksi dengan larutan fruktosa 27,5% dan pakan tinggi lemak selama 52 hari kemudian diberi perlakuan ekstrak metanol daun Kayu kuning selama 7 hari menggunakan tiga variasi dosis yaitu 250, 500, dan 750 mg/kg BB dengan kontrol positif simvastatin dosis 1,8 mg/kg BB. Kadar LDL dan HDL diuji untuk menentukan nilai indeks aterogenik yang merupakan parameter prediksi aterosklerosis. Gambaran histopatologi aorta diamati dengan menghitung jumlah sel busa menggunakan pewarnaan *Masson trichrome*. Analisis data menggunakan uji statistika nonparametrik Kruskal-Wallis dan Mann Whitney U.

Proses ekstraksi daun kayu kuning dengan metode remaserasi menggunakan pelarut metanol menghasilkan rendemen sebesar 9,6 persen. Kadar berberin diukur

dengan metode KLT-densitometri sebesar 0,46 mg tiap gram ekstrak dengan nilai Rf 0,67-0,69. Ekstrak metanol daun Kayu kuning belum memberikan efek bermakna terhadap penurunan nilai indeks aterogenik ($p>0.05$) namun berpengaruh signifikan terhadap penurunan jumlah sel busa ($p<0.05$). Kenaikan dosis yang diberikan mulai dari 250, 500, hingga 750 mg/kg BB menunjukkan jumlah sel busa yang menurun berturut-turut sebanyak 6, 4, dan 0 sel dibandingkan kontrol negatif sebesar 52 sel. Berdasarkan uraian tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun Kayu kuning belum berpengaruh signifikan pada nilai indeks aterogenik tetapi mampu memperbaiki gambaran histopatologi aorta melalui penurunan jumlah sel busa.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul Pengaruh Pemberian Ekstrak Metanol Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) terhadap Histopatologi Aorta Tikus Wistar Hiperlipidemia. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat untuk dapat menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini bukan semata-mata disusun berdasarkan kemampuan penulis sendiri, melainkan karena mendapat bantuan dari berbagai pihak sehingga penyusunan skripsi ini bisa terselesaikan dengan baik. Oleh karena itu pada kesempatan kali ini dengan segala ketulusan dan kerendahan hati penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada :

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Ema Rachmawati, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota; yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam membantu penulisan skripsi ini;
3. Ibu Afifah Machlaurin, S.Farm., M.Farm., Apt dan Ibu Diana Holidah, S.F., M.Farm., Apt selaku Dosen Penguji; yang telah memberikan kritik, saran, waktu, dan perhatiannya dalam penulisan skripsi ini;
4. Ibu Diana Holidah S.F., M.Farm., Apt selaku Dosen Pembimbing Akademik atas setiap perhatian dan masukan yang diberikan;
5. Kedua orang tuaku, Ayahanda Jhoni Arief Poerwana dan Ibunda Rohmi yang tak henti memberikan kasih sayang, perhatian, dukungan, motivasi, serta doanya.
6. Adikku Ulianisa Apriliani yang selalu mendoakan dan memberi semangat. Segenap keluarga besarku yang telah memberi dukungan moral dan spiritual hingga skripsi ini terselesaikan;

7. Partner skripsiku Putri Eka Maryani atas semangat, motivasi, waktu, dan kerjasamanya;
8. Mbak Indri dan Mbak Herdinik selaku teknisi Laboratorium Farmasi Klinis serta Mbak Anggra dan Bu Widi selaku teknisi Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Jember;
9. Seluruh pengurus Taman Nasional Meru Betiri dan Kebun Raya Purwodadi Pasuruan atas kesediaannya meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga untuk mendampingi dan membagi ilmu yang dimiliki;
10. Pak Wawan dan Bu Siti selaku teknisi Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan serta Pak Ary dan seluruh tim laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
11. dr. Al Munawir, M.Kes atas bimbingan dan semangat yang diberikan.
12. Teman seperjuangan KKN Desa Kepanjen, Gumukmas gelombang II tahun 2014 (Mak 'Njen Family) : Jainur, Roziq, Mirza, Amdianti, Desmi, mas Yoga, mas Danang, Fairuztya, Ajeng, Novadea yang telah memberi inspirasi dan dukungan;
13. Sahabat-sahabatku tercinta mahasiswa angkatan 2011 (ASMEF) serta teman-teman kost Putri Melati tempatku bertukar pikiran, berbagi cerita, semangat, dan kerja samanya hingga skripsi ini selesai;
14. Teman-teman UKM Karisma dan Forum Blogger UNEJ serta kakak-kakak UKM Pramuka UNEJ;
15. Para dosen serta semua pihak yang tidak mungkin penulis sebutkan satu-persatu.

Penulis juga menerima segala saran dan kritik yang membangun dari semua pihak guna kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat membawa manfaat.

Jember, 21 Desember 2015

Penulis

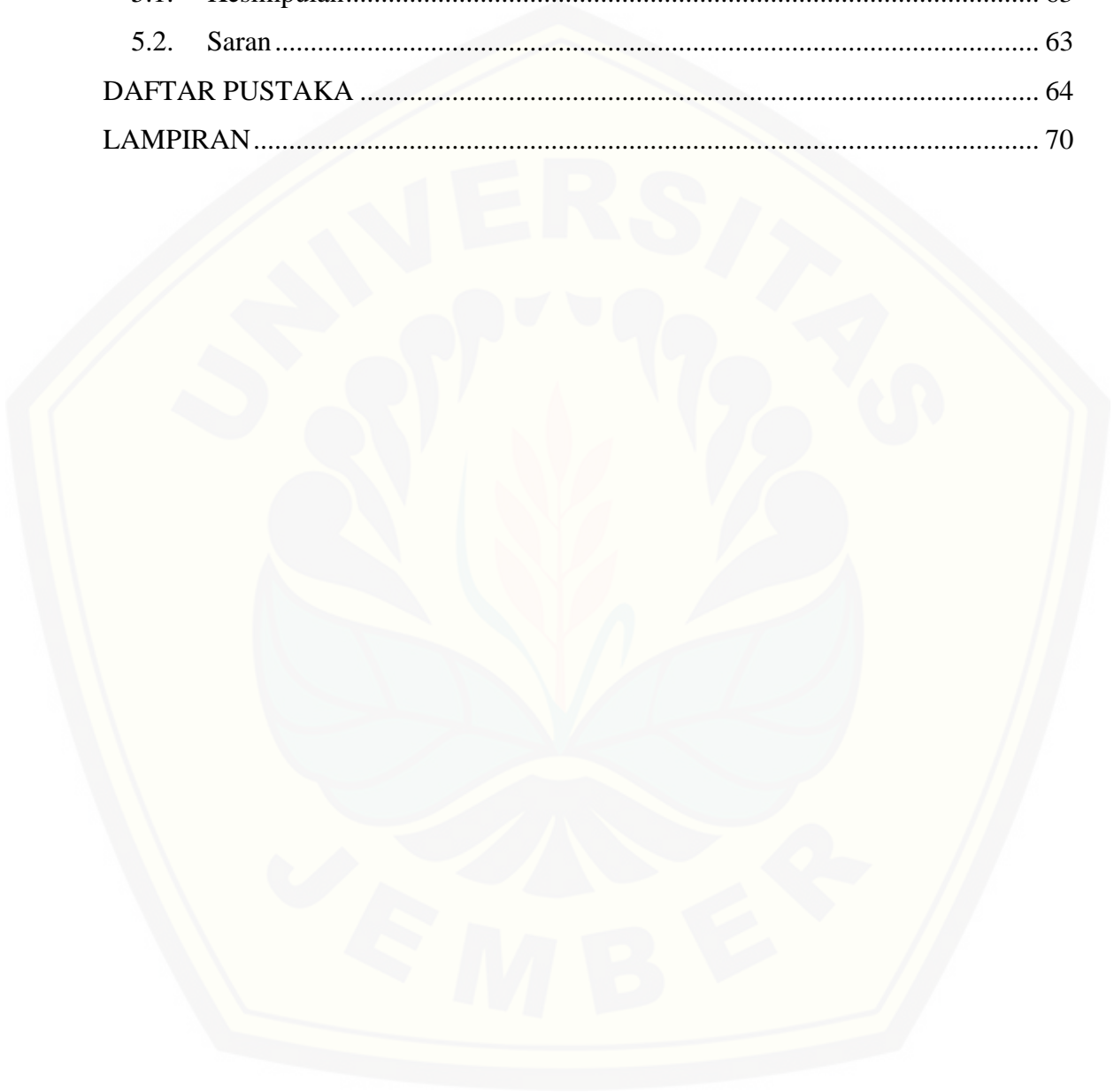
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN BIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL.....	xvii
BAB 1.PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3. Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Tumbuhan Kayu Kuning (<i>Arcangelisia flava</i>).....	5
2.1.1. Klasifikasi Tumbuhan Kayu Kuning	5
2.1.2. Persebaran <i>A. flava</i>	6
2.1.3. Morfologi <i>A. flava</i>	6
2.1.4. Kandungan Kimia dan Aktivitas Biologis <i>A. flava</i>	6
2.2. Senyawa Aktif yang Berkhasiat sebagai Antiateroklerosis.....	7
2.2.1. Berberin	7

2.2.2. Flavonoid dan Terpenoid	9
2.3. Fruktosa	10
2.3.1. Metabolisme Fruktosa.....	10
2.3.2. Dampak Konsumsi Fruktosa Berlebih.....	12
2.4. Diet Tinggi Lemak	13
2.4.1. Lemak	15
2.4.2. Telur.....	16
2.5. Lipid Darah (Lipoprotein)	17
2.6. Hiperlipidemia.....	21
2.7. Anatomi Pembuluh Arteri	22
2.8. Aterosklerosis.....	24
2.8.1. Definisi dan Faktor Resiko Aterosklerosis	24
2.8.2. Patofisiologi Aterosklerosis.....	25
2.9. Histopatologi Aterosklerosis	28
2.9.1. Definisi Histopatologi.....	28
2.9.2. Pewarnaan dalam Histologi	28
2.9.3. Histopatologi Aterosklerosis.....	29
2.10. Simvastatin	32
2.10.1. Mekanisme Aksi Simvastatin	32
2.10.2. Farmakokinetika	33
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	34
3.1. Jenis, Waktu, dan Tempat Penelitian	34
3.1.1. Jenis Penelitian.....	34
3.1.2. Waktu dan Tempat Penelitian	34
3.2. Sampel dan Jumlah Sampel.....	34
3.2.1 Sampel yang digunakan	34
3.2.2 Jumlah Sampel	34
3.3. Rancangan Penelitian	35
3.4. Alat dan Bahan	36

3.4.1.	Alat.....	36
3.4.2.	Bahan	37
3.5.	Variabel Penelitian	37
3.5.1.	Variabel Bebas	37
3.5.2.	Variabel Terikat	37
3.5.3.	Variabel Terkendali	37
3.6.	Definisi Operasional Penelitian.....	38
3.7.	Prosedur Penelitian.....	39
3.7.1.	Tahapan Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Kayu kuning.....	39
3.7.2.	Penetapan Kadar Berberin dalam Ekstrak	39
3.7.3.	Pembuatan Larutan Fruktosa 27,5%	40
3.7.4.	Pembuatan Pakan Tinggi Lemak	40
3.7.5.	Pembuatan Suspensi Ekstrak	41
3.7.6.	Pembuatan Suspensi Simvastatin (kontrol positif)	41
3.7.7.	Persiapan Hewan Coba	41
3.7.8.	Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Coba	42
3.7.11.	Perhitungan nilai indeks aterogenik.....	44
3.7.12.	Pembuatan Larutan <i>Neutral Buffer Formalin</i> 10%.....	44
3.7.13.	Pemeriksaan Histopatologi Organ Tikus	45
3.7.14.	Penghitungan Sel Busa	47
3.8.	Analisis Data	47
3.9.	Alur Penelitian.....	47
3.9.1.	Skema Pembuatan Pakan Tinggi Lemak	47
3.9.2.	Skema Pembuatan Ekstrak Metanol Daun <i>A.flava</i>	48
3.9.3.	Skema Perlakuan Hewan Coba	49
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	50
4.1.	Hasil dan Analisis Data	50
4.1.1.	Pembuatan Ekstrak Metanol Daun <i>A. flava</i>	50
4.1.2.	Perlakuan terhadap Hewan Coba.....	50

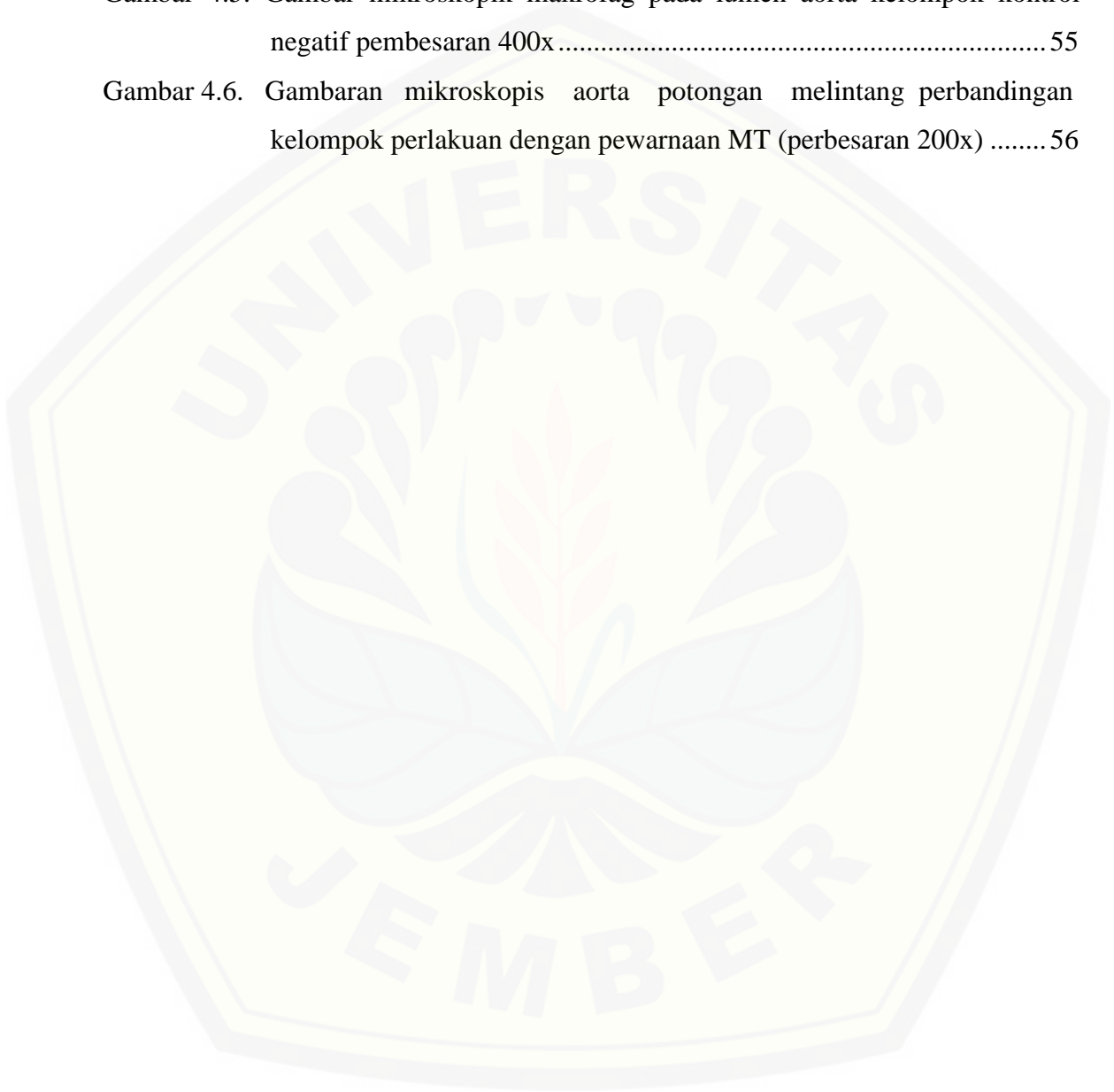
4.2. Pembahasan	57
BAB 5. PENUTUP	63
5.1. Kesimpulan	63
5.2. Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN	70



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Tumbuhan <i>Arcangelisia flava</i>	5
Gambar 2.2 Struktur kimia berberin	8
Gambar 2.3. Mekanisme utama berberin pada metabolisme lipid.....	9
Gambar 2.4. Struktur kimia fruktosa	10
Gambar 2.5. Metabolisme fruktosa dan glukosa.....	11
Gambar 2.6. Metabolisme lipoprotein asal hati	20
Gambar 2.7. Skema histologi pembuluh darah	23
Gambar 2.8. Proses terjadinya penebalan dinding pembuluh darah	26
Gambar 2.9. Ilustrasi perkembangan plak aterosklerosis.....	27
Gambar 2.10. Gambaran sel busa pada aorta tikus	29
Gambar 2.11. Histopatologi aorta tikus pada pewarnaan Oil-Red O.....	30
Gambar 2.12. Gambaran histologi plak ateromatosa di arteri koronaria	30
Gambar 2.13. Gambaran histologi aorta kelinci dengan plak aterosklerosis pada pewarnaan Masson Trichrome)	31
Gambar 2.14 Keutuhan dinding endotel pembuluh darah	31
Gambar 2.15 Mekanisme kerja inhibitor HMG CoA reduktase	33
Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian.....	35
Gambar 3.2 Skema pembuatan pakan tinggi lemak.....	47
Gambar 4.1. Gambar mikroskopik aorta normal pada pembesaran 400x;.....	54
Gambar 4.2. Gambar mikroskopik perdarahan lumen aorta kelompok kontrol negatif pembesaran 100x.....	54
Gambar 4.3. Gambar mikroskopik sel busa aorta kelompok kontrol negatif pembesaran 400x.....	54

- Gambar 4.4. Gambar mikroskopik sediaan kontrol negatif dengan *fibrous cap* pembesaran 400x 55
- Gambar 4.5. Gambar mikroskopik makrofag pada lumen aorta kelompok kontrol negatif pembesaran 400x 55
- Gambar 4.6. Gambaran mikroskopis aorta potongan melintang perbandingan kelompok perlakuan dengan pewarnaan MT (perbesaran 200x) 56



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Perbandingan nutrisi kuning telur dan telur utuh.....	16
Tabel 2.2. Kandungan kolesterol berbagai telur	17
Tabel 2.3. Komponen lipoprotein	18
Tabel 2.4. Klasifikasi kadar lipid darah manusia.....	21
Tabel 2.5. Faktor resiko aterosklerosis	25
Tabel 3.1. Komposisi Pakan Tinggi Lemak.....	41
Tabel 3.2. Komposisi Larutan <i>Neutral Buffer Formalin</i> 10%	44
Tabel 4.1. Rendemen Ekstrak Metanol Daun <i>A. flava</i>	50
Tabel 4.2. Rata-rata kadar LDL tikus (mg/dl) sebelum dan sesudah perlakuan	51
Tabel 4.3. Rata-rata kadar HDL tikus (mg/dl) sebelum dan sesudah perlakuan.....	51
Tabel 4.4. Rata-rata nilai indeks aterogenik (IA) plasma	52
Tabel 4.5. Rata-rata jumlah sel busa	53

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Arteriosklerosis adalah suatu penyakit yang ditandai dengan penebalan dan hilangnya elastisitas dinding arteri. Bentuk arteriosklerosis yang paling umum ditemukan adalah aterosklerosis yang ditandai dengan terdapatnya ateroma pada intima arteri. Pembuluh darah yang terkena adalah arteri besar dan sedang, antara lain pembuluh koroner, pembuluh serebral, dan aorta. Kondisi hiperlipoproteinemia/ hiperlipidemia terutama peningkatan kolesterol dan LDL plasma menjadi salah satu faktor resiko terbentuknya lesi aterosklerosis (Suyatna, 2007; Ross *et al.*, 1976). Aterosklerosis menjadi penyebab infark miokardium (serangan jantung), infark serebri (stroke), aneurisma aorta, dan penyakit vaskular perifer (Schoen dan Cotran, 2007)

Data statistik WHO (2014) menyebutkan bahwa peringkat pertama dan kedua dalam 10 penyebab kematian terbesar di dunia pada tahun 2012 adalah penyakit jantung (*ischemic heart disease*) sebesar 7,4 juta dan penyakit stroke sebesar 6,7 juta. PJK merupakan penyebab utama dari seluruh kematian di Indonesia, yakni sebesar 26,4% dan didukung hasil riset kesehatan dasar tahun 2013 yang menunjukkan prevalensi penyakit jantung koroner pada umur ≥ 15 tahun di Indonesia sebesar 1,5%. Diperkirakan pada tahun 2020, PJK menjadi pembunuh pertama tersering yakni sebesar 36% dari seluruh kematian di dunia (Kementerian Kesehatan RI, 2013 ; Ditjen Binfar, 2006).

Tingginya prevalensi penyakit tersebut dapat diakibatkan oleh perubahan gaya hidup masyarakat yang mulai jarang berolahraga dan cenderung memilih mengkonsumsi makanan tinggi lemak tetapi rendah serat. Kandungan asam lemak jenuh dan asam lemak *trans* dalam makanan tinggi lemak tersebut dapat meningkatkan kadar kolesterol LDL dan menurunkan kadar kolesterol HDL sehingga

resiko aterosklerosis meningkat (Tuminah, 2009). Selain itu, diet tinggi lemak juga dapat menimbulkan stres oksidatif endotel pembuluh darah. Hal ini dapat menyebabkan disfungsi endotel dan produksi berlebihan dari ROS (*Reactive oxygen spesies*) yang akan mengoksidasi LDL ekstraseluler sehingga terbentuklah LDL teroksidasi. LDL teroksidasi akan difagositosis oleh makrofag melalui reseptor *scavenger* sehingga terbentuk sel busa sebagai lesi awal aterosklerosis (Welinsa *et al.*, 2014).

Selain makanan kaya lemak, masyarakat juga mulai senang mengonsumsi minuman ringan yang mengandung fruktosa sebagai pemanis. Padahal diet tinggi fruktosa (>25% kebutuhan energi per hari) akan meningkatkan prevalensi terjadinya sindrom metabolik seperti dislipidemia, obesitas, hipertensi, hiperurisemia, dan resistensi insulin (Prahastuti, 2011). Fruktosa sangat efisien menginduksi *de novo* lipogenesis (DNL) dengan menyediakan atom karbon untuk gliserol dan asil-KoA untuk sintesis trigliserida dan VLDL sehingga meningkatkan penimbunan lemak dalam hepar yang menyebabkan penurunan sensitivitas insulin. Pemberian diet tinggi fruktosa juga dapat meningkatkan kadar homosistein sehingga memicu terjadinya aterosklerosis (Baschiano *et al.*, 2005).

Prevalensi dan faktor resiko PJK yang meningkat menyebabkan penelitian mengenai terapi untuk mengatasi aterosklerosis mulai banyak dikembangkan. Kayu kuning (*Arcangelisia flava*) adalah salah satu flora langka Indonesia yang dilindungi di Taman Nasional Meru Betiri. Tanaman ini memiliki potensi sebagai agen antiaterosklerosis dikarenakan adanya kandungan alkaloid, flavonoid, saponin, dan terpenoid (Maryani, 2013).

Flavonoid bersifat antiaterogenik karena merupakan senyawa antioksidan yang dapat menghambat oksidasi LDL sehingga keutuhan endotel pembuluh darah terjaga dan mengurangi resiko terjadinya aterosklerosis (Nijvelt, 2001). Penelitian Keawpradub *et al.*(2005) menyatakan bahwa ekstrak metanol *A. flava* memiliki aktivitas antioksidan akibat adanya kandungan alkaloid berberin, palmatin, dan jatrorrhizin didalamnya. Aktivitas antioksidan ini ditunjukkan ekstrak metanol *A.*

flava dengan EC_{50} sebesar 25,7 $\mu\text{g/mL}$. Senyawa berberin selain bersifat antioksidan juga dapat menurunkan sintesis lipid dalam tubuh, mencegah inflamasi dengan menurunkan produksi prostaglandin dan COX-2, dan menghambat proliferasi sel otot polos vaskular (Pang *et al.*, 2015; Wongbutdee, 2008; Vuddanda *et al.*, 2010). Tumbuhan *A. flava* juga berpotensi sebagai antiaterosklerosis dengan adanya kandungan terpenoid. Salminen *et al* (2008) menyebutkan bahwa terdapat 43 jenis turunan terpenoid yang dapat menghambat sinyal NF- $\kappa\beta$ sehingga tidak terjadi proses inflamasi pada endotel pembuluh darah.

Berdasarkan pemaparan diatas maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antiaterosklerosis ekstrak metanol daun *A. flava*. Penelitian bioaktivitas tersebut dilakukan *in vivo* dengan cara pengamatan histopatologi aorta tikus yang diinduksi fruktosa dan diet tinggi lemak.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas dapat disusun rumusan permasalahan sebagai berikut.

1. Apakah ekstrak metanol daun *A. flava* memiliki pengaruh terhadap perbaikan gambaran histopatologi aorta pada tikus yang telah diinduksi diet tinggi lemak dan fruktosa?
2. Bagaimana pengaruh perbedaan dosis ekstrak metanol daun *A. flava* dalam memperbaiki gambaran histopatologi aorta tikus yang telah diinduksi diet tinggi lemak dan fruktosa?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui pengaruh ekstrak metanol daun *A. flava* pada perbaikan gambaran histopatologi aorta tikus yang telah diinduksi diet tinggi lemak dan fruktosa.

2. Mengetahui pengaruh perbedaan dosis ekstrak metanol daun *A. flava* dalam memperbaiki gambaran histopatologi aorta tikus yang telah diinduksi diet tinggi lemak dan fruktosa.

1.3. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, antara lain sebagai berikut.

1. Menambah informasi mengenai manfaat tumbuhan *A. flava* sebagai kandidat antiaterosklerosis dari bahan alam.
2. Menjadi dasar bagi penelitian lebih lanjut mengenai tumbuhan *A. Flava*
3. Sebagai alternatif baru pengobatan aterosklerosis dari bahan alam.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tumbuhan Kayu Kuning (*Arcangelisia flava*)

2.1.1. Klasifikasi Tumbuhan Kayu Kuning

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Ranunculales

Famili : Menispermaceae

Genus : *Arcangelisia*

Spesies : *Arcangelisia flava*

Nama asing : *Yellow fruited moon seed* (www.plantamor.com)

Nama lokal : *Reuy ki koneng* (Sunda), *Oyod sirawanan*, *Sirawan kunyit* (Jawa), *Wuh bulan* (Ambon), *Oyod koneng* (Madura), *Mololeya gumini* (Halmahera), *Akar kuning* (etnis Talang Mamak), *Akar kunyit* (etnis Anak Dalam Jambi), *Oyong kuni* (Sulawesi tenggara), *Tali kuning* (etnis Menado), *Katola* (Sulawesi) dan *mongko lawak* (etnis Saluan) (Damayanti, 1999; Rahayu *et al.*, 2006; Hariana, 2013; Larisu *et al.*, 2013).



Gambar 2.1. Tumbuhan *Arcangelisia flava* (Sumber: Hariana, 2013)

2.1.2. Persebaran *A. flava*

Arcangelisia flava (L.) Merr tersebar mulai dari Hainan, Indochina, Semenanjung Thailand Selatan, Sumatera Utara dan Tengah, Malaya, Jawa, Kalimantan sampai Filipina, Sulawesi Utara dan Tengah, dan Irian. Spesies ini tumbuh di dalam hutan pada ketinggian mencapai 1000 mdpl dan kadang-kadang tumbuh di tepian sungai. Keberadaannya tergolong langka/rawan, yaitu tidak segera terancam kepunahan tetapi terdapat dalam jumlah sedikit dan eksploitasinya terus berjalan sehingga perlu dilindungi (Damayanti, 1999).

2.1.3. Morfologi *A. flava*

A. flava merupakan tumbuhan langka berbentuk liana, yaitu tumbuhan berkayu yang batangnya menjalar atau memanjat pada tumbuhan lain (Damayanti, 1999). Ciri morfologi dari tumbuhan ini adalah tumbuhan liana berkayu kuning yang memancarkan getah kuning jika dipotong, keras, panjangnya dapat mencapai 20 m, dan diameter batang 5-10 cm. Daun *A. flava* umumnya bulat dengan ukuran 10-25cm x 5,5-19 cm, bertekstur seperti kulit, licin dan mengkilat, urat daun menjari 5 pada pangkalnya, tangkai daun menggebung pada kedua pangkalnya, tidak berdaun penumpu. Perbungaan mulai di ketiak daun atau di batang, bunga uniseksual, berumah dua, mahkota berwarna kuning, tanpa kelopak bunga. Buahnya ringan membulat kotak dengan tiga rusuk, kulit agak berbulu dan berwarna hijau hingga coklat kehitaman, berbiji tunggal kecil berwarna kuning kecoklatan, dan endokarp berkayu (Quattrocchi, 2012; Hidayat dan Wahyuni, 2009).

2.1.4. Kandungan Kimia dan Aktivitas Biologis *A. flava*

A. flava telah diteliti mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan terpenoid (Maryani *et al.*, 2013). Daun, batang, tangkai, dan akarnya mengandung berberin dan alkaloid lain. Daging buahnya mengandung zat lendir. Sementara itu, bijinya mengandung saponin yang beracun (Hariana, 2013). Ekstrak kloroform daun

A. flava telah diuji mengandung 0,0423% berberin (Baroroh, 2014). Nilai LD₅₀ dari air rebusan kayu kuning diketahui sebesar 12,65 g/kg BB (Harmain, 1986).

A. flava dimanfaatkan oleh sedikitnya empat etnis di Indonesia sebagai obat sakit kuning. Selain itu, tumbuhan ini memiliki efek farmakologis lain yaitu untuk antiseptik, stomakik, ekspektoran, tonikum, emenagogue, mengobati malaria, demam, kanker, luka, panas dalam, patah tulang, pegal linu, rematik, sakit pinggang, sariawan, sesak nafas, setelah melahirkan, iritasi kulit, dan sebagai afrodisiak (Damayanti, 1999; Rahayu *et al.*, 2006; Quattrocchi, 2012; Lovin *et al.*, 2012). Asap dari kayunya yang dibakar jika dihirup dapat mengatasi gangguan membran mukosa hidung dan mulut (Quattrocchi, 2012). Air rebusan batang *A. flava* terbukti memiliki efek antimikroba terhadap *Shigella flexneri* penyebab diare berdarah (Larisu *et al.*, 2010). Aktivitas antioksidan ditunjukkan ekstrak metanol *A. flava* dengan EC₅₀ sebesar 25,7 µg/mL (Keawpradub *et al.*, 2005).

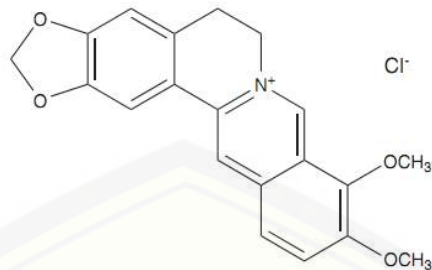
2.2. Senyawa Aktif yang Berkhasiat sebagai Antiateroklerosis

Tumbuhan *A. flava* mengandung beberapa zat aktif yang berpotensi sebagai antiaterosklerosis. Senyawa tersebut antara lain alkaloid berberin, flavonoid, dan terpenoid.

2.2.1. Berberin

Berberin (2,3-metilenedioksi-9,10-dimetoksiprotoberberinklorida) adalah garam amonium kuarterner dari golongan alkaloid isokuinolin.. Senyawa dengan rumus struktur C₂₀H₁₈NO₄⁺ dan bobot molekul 336.36122 g/mol ini dapat diisolasi dari berbagai tanaman, antara lain *Coptis chinensis*, *Hydrastis canadensis*, *Berberis aquifolium*, *Berberis aristata*, *Berberis vulgaris*, dan *Arcangelisia flava* (Vuddanda *et al.*, 2010).

Berberin telah digunakan dalam pengobatan tradisional China, Timur Tengah dan Ayurveda untuk antimikroba, antiprotozoa, dan antidiare. Efek farmakologis lain dari berberin yaitu antihipertensi, antitumor, antiinflamasi, antiaritmia, antioksidan dan antiagregasi platelet (Wongbutdee, 2008; Vuddanda *et al.*, 2010).



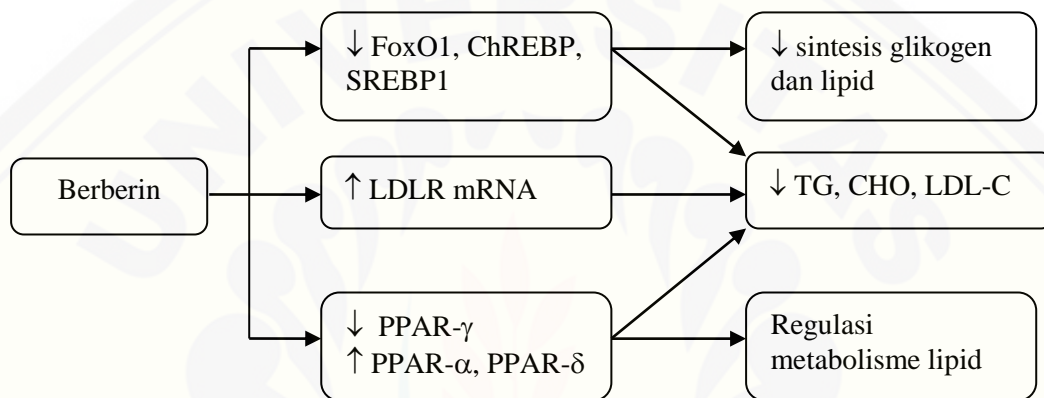
Gambar 2.2 Struktur kimia berberin (Sumber: Vuddanda *et al.*, 2010)

Berberin berpotensi sebagai antiaterosklerosis dengan mekanisme penurunan kadar gula darah, regulasi lipid, antiinflamasi, dan penghambatan proliferasi sel otot polos vaskular (Wu *et al.*, 2010). Berberin telah diteliti memiliki aktivitas antihiperlikemik dan proteksi terhadap kerusakan sel β pankreas akibat stres oksidatif pada tikus diabetes. Studi lebih lanjut menunjukkan bahwa berberin mampu melawan resistensi insulin dengan cara meningkatkan sensitivitas insulin melalui aktivasi reseptor insulin (Vuddanda *et al.*, 2010).

Pada metabolisme lipid, berberin mampu menurunkan konsentrasi lipid (kolesterol total, trigliserida, dan LDL-C) dengan meningkatkan aktivitas transkripsional promotor reseptor LDL melalui jalur JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) dan menstabilisasi reseptor LDL-C melalui jalur sinyal *extracellular-regulated kinase (ERK)-dependent*. Lebih dari itu, pengaruh pada 5' AMPK dan pengeblokan jalur MAPK/ERK menyebabkan inhibisi sintesis lipid pada sel hepatosit (Pang *et al.*, 2015; Wongbutdee, 2008; Vuddanda *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010). Berberin yang diberikan selama 16 minggu mampu melawan hiperhomosisteinemia dan hiperlipidemia melalui peningkatan level reseptor LDL dan apoE mRNA serta menekan ekspresi gen HMGR (*3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase*) pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak (Chang *et al.*, 2012). Berberin memiliki efek proteksi terhadap oksidasi LDL dan sitotoksitas pada sel endotel akibat oksidasi LDL (Wu *et al.*, 2010).

Berberin memiliki efek antiinflamasi dengan mekanisme penurunan produksi prostaglandin dan jumlah protein COX-2. Berberin dapat mensupresi interleukin-1 β dan produksi *tumor necrosis factor* (TNF- α) melalui jalur sinyal TNF- $\kappa\beta$. Berberin

juga menunjukkan aktivitas antiproliferatif terhadap sel otot polos vaskuler (VMSC) dengan memblok siklus sel pada fase G0 dan G1/M. Efek antiproliferatif ini penting dalam pencegahan aterosklerosis karena penyakit ini dapat bermula dari migrasi VMSC, proliferasi ke endomembran dan pembentukan sel busa setelah menelan lipid (Wu *et al.*, 2010). Efek toksik (LD₅₀) berberin telah diteliti pada mencit sebesar 22mg/kgBB (Nechepurenko *et al.*, 2010).



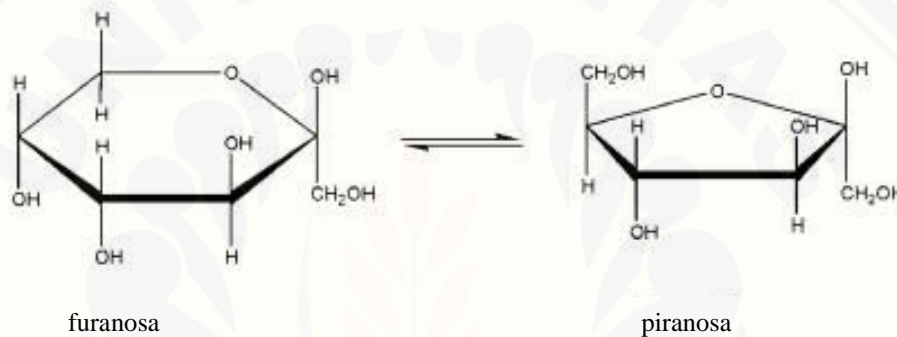
Gambar 2.3. Mekanisme utama berberin pada metabolisme lipid. Keterangan: FoxO1 *Forkhead transcription factor O1*; ChREBP: *carbohydrate responsive element-binding protein*; SREBP1: *sterol regulatory element-binding protein-1*; LDLR mRNA: *low-density lipoprotein receptor m-ribonucleic acid*; TG: trigliserida; CHO: kolesterol; LDL-C: *low-density lipoprotein cholesterol*; PPARs: *peroxisome proliferator-activated receptors* (Sumber: Pang *et al.*, 2015)

2.2.2. Flavonoid dan Terpenoid

Tumbuhan *A. flava* juga berpotensi sebagai antiaterosklerosis dengan adanya kandungan terpenoid. Salminen *et al.* (2008) menyebutkan bahwa terdapat 43 jenis turunan terpenoid yang dapat menghambat sinyal NF- κ B sehingga tidak terjadi proses inflamasi pada endotel pembuluh darah. Aktivitas antioksidan *A. flava* diketahui akibat adanya senyawa flavonoid yang dapat menghambat oksidasi LDL. Hal ini menyebabkan keutuhan endotel pembuluh darah terjaga dan mengurangi resiko terjadinya aterosklerosis (Nijvelt, 2001).

2.3. Fruktosa

Fruktosa (*D-fructose*) adalah salah satu pemanis yang biasa digunakan selain sukrosa. Senyawa ini memiliki dua bentuk molekul, yaitu bentuk furanosa dan piranosa. Fruktosa berupa serbuk kristal putih atau tidak berwarna, tidak berbau, dengan rasa sangat manis. Senyawa dengan rumus empiris $C_6H_{12}O_6$ ini memiliki tingkat kemanisan lebih tinggi dari sukrosa, manitol, dan sorbitol (Rowe *et al.*, 2006). Fruktosa juga terdapat dalam buah-buahan dengan kadar bervariasi antara 5-10 % (Prahastuti, 2011).



Gambar 2.4. Struktur kimia fruktosa (Rowe *et al.*, 2006)

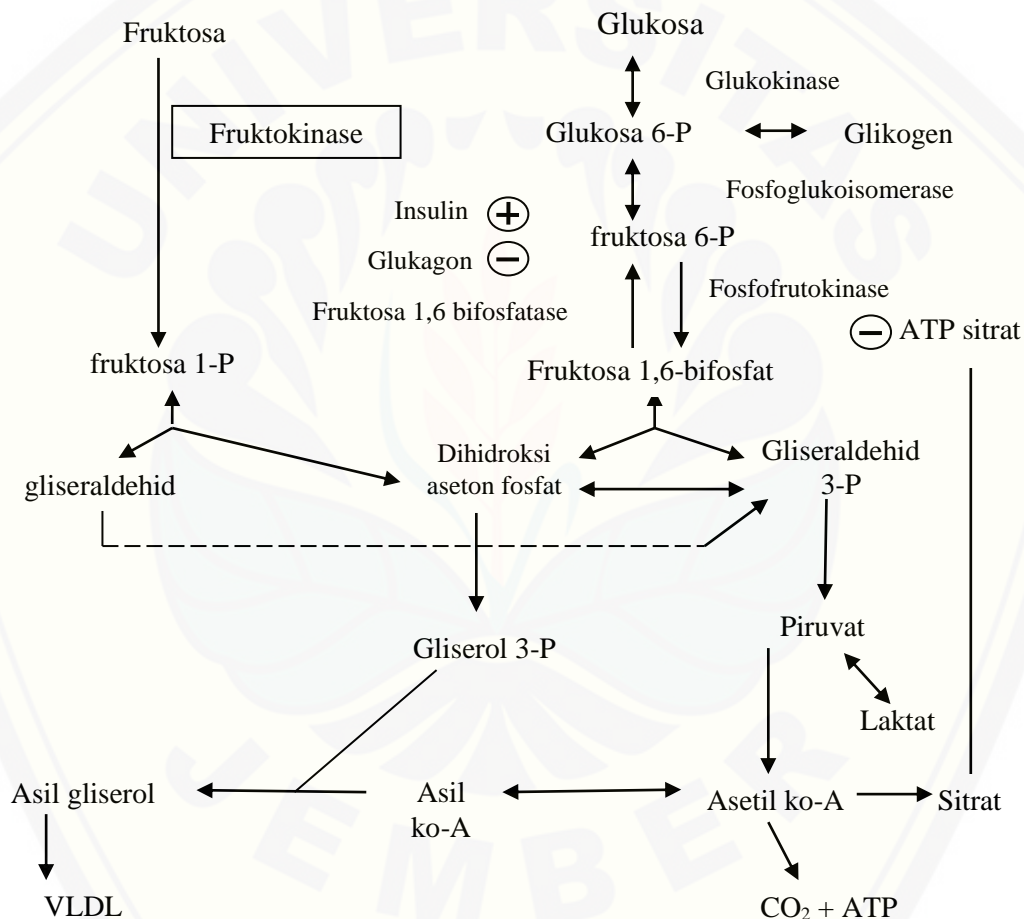
2.3.1. Metabolisme Fruktosa

Fruktosa diabsorpsi lebih lambat dibandingkan dekstrosa tetapi metabolismenya lebih cepat. Metabolisme fruktosa terjadi utamanya di organ hati dengan jalan mengubah fruktosa menjadi dekstrosa dan metabolit asam laktat dan asam piruvat. Absorpsi fruktosa lebih cepat jika diberikan bersamaan dengan glukosa (Rowe *et al.*, 2006; Prahastuti, 2011).

Glucose transporter 5['] (GLUT5) merupakan *transporter* fruktosa dari lumen ke epitel intestinal. Fruktosa ditranspor dari lumen intestinal ke sel epitel melalui GLUT5 secara pasif searah gradien kadar (dari konsentrasi tinggi ke rendah) dan tidak memerlukan ion Na^+ sebagai *kotranspor*. Pada basolateral plasma membran epitel intestinal terdapat GLUT2 yang merupakan *transporter* glukosa, galaktosa maupun fruktosa keluar dari sel epitel intestinal masuk ke cairan ekstraseluler.

Setelah diabsorpsi oleh usus, 50-75% fruktosa dimetabolisme di hepar dan sisa metabolisemenya dikeluarkan melalui ginjal.

Enzim pertama yang berperan dalam metabolisme fruktosa adalah fruktokinase atau ketoheksokinase/KHK-C yang menggunakan ATP untuk memfosforilasi fruktosa menjadi fruktosa-1-fosfat. Ekspresi KHK-C terutama pada hepar, epitel intestinal, sel adiposit dan endotelium vaskuler.



Gambar 2.5. Metabolisme fruktosa dan glukosa (Elliot *et al.*, 2002)

Fruktosa-1-fosfat diubah menjadi dihidroksi aseton fosfat dan gliseraldehid 3-fosfat yang merupakan bahan untuk membentuk gliserol-3-fosfat dan asetil-KoA. Selanjutnya asetil-KoA diubah menjadi asil-KoA, berikatan dengan gliserol-3-fosfat membentuk trigliserida. Stimulasi pembentukan trigliserida selain menyebabkan

peningkatan resistensi insulin juga menyebabkan peningkatan stabilitas apo B dan *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP) sehingga pembentukan VLDL meningkat (Prahastuti, 2011). Fruktosa mengalami glikolisis yang lebih cepat daripada glukosa karena zat ini memintas tahap regulatorik yang dikatalisis oleh fosfofruktokinase. Hal ini memungkinkan fruktosa memenuhi jalur-jalur metabolik di hati sehingga terjadi peningkatan sintesis dan esterifikasi asam lemak, dan sekresi VLDL. Peristiwa tersebut dapat meningkatkan triasilgliserol serum dan akhirnya meningkatkan kadar kolesterol LDL (Bender dan Mayes, 2009).

Berlawanan dengan glukosa, diet tinggi fruktosa tidak menstimulasi insulin atau leptin (dua faktor penting yang berperan dalam mengatur asupan energi dan penimbunan lemak tubuh) tetapi menyebabkan resistensi insulin melalui penurunan sensitivitas reseptor insulin. Insulin merupakan mediator pelepasan nitrit oksida (NO) endotelial sehingga terjadi peningkatan aliran darah ke otot skeletal dan peningkatan serapan glukosa oleh sel. Sedangkan leptin berfungsi untuk menurunkan asupan makanan dan pengeluaran kelebihan energi. Oleh karena itu, subjek yang diberi fruktosa mengeluh lebih cepat lapar dan makan lebih banyak kalori sepanjang hari dibandingkan yang hanya diberi makan pati sehingga diet tinggi fruktosa cepat meningkatkan berat badan (Prahastuti, 2011).

2.3.2. Dampak Konsumsi Fruktosa Berlebih

Konsumsi fruktosa berlebihan (>75 g per hari) tanpa adanya dekstrosa dalam berbagai bentuk (misalnya sukrosa, pati, dekstrin) dapat menyebabkan malabsorpsi pada individu yang rentan. Malabsorpsi tersebut dapat berupa kembung, nyeri abdomen, dan diare. Konsumsi fruktosa dalam bentuk HFCS (*High Fructose corn Syrup*) lebih dari 25% kebutuhan energi per hari (sekitar 85g fruktosa/hari) secara reguler dan jangka panjang dapat memicu timbulnya dislipidemia, obesitas, hiperurikemia, hipertensi, maupun resistensi insulin. *British Diabetic Association* merekomendasikan batas asupan fruktosa per hari tidak lebih dari 25 g (Rowe *et al.*, 2006; Prahastuti, 2011).

Pemaparan fruktosa pada liver dalam jumlah besar menstimulasi lipogenesis dan akumulasi TG secara cepat. Hal ini berkontribusi untuk menurunkan sensitivitas insulin dan intoleransi glukosa/resistensi insulin hepatik. Percobaan yang dilakukan pada tikus menunjukkan level homosistein yang meningkat pada pemberian diet tinggi fruktosa. Peningkatan homosistein ini meningkatkan resiko penyakit kardiovaskular. Selain itu, diet tinggi fruktosa juga meningkatkan kadar trigliserida, menstimulasi sekresi VLDL, dan meningkatkan resiko terjadinya aterosklerosis (Basciano *et al.*, 2005).

Jika dibandingkan dengan glukosa, maka fruktosa bersifat lebih lipogenik (Elliot *et al.*, 2002). Fruktosa sangat efisien menginduksi *de novo* lipogenesis (DNL), dengan menyediakan atom karbon untuk gliserol dan asil-KoA untuk sintesis trigliserida dan meningkatkan penimbunan lemak dalam hepar yang menyebabkan penurunan sensitivitas insulin (Prahastuti, 2011).

Penelitian menunjukkan pemberian fruktosa 60% dalam diet mencit selama 7 hari menginduksi SREBP-1 dan ekspresi gen lipogenik seperti *fatty acid sintase* (FAS), *acetyl-CoA carboxylase* (ACC), dan *stearoyl-CoA desaturase* (SCD). SREBP-1 merupakan faktor *transkripsi* yang meregulasi biosintesis asam lemak dan kolesterol. SREBP-1 berikatan dengan *sterol responsive elements* (SRE) dan mengaktifkan serangkaian enzim yang terlibat dalam biosintesis kolesterol seperti HMG-CoA reduktase dan *fatty acid sintase*. Sebaliknya, hepatosit tikus yang diberi fruktosa menunjukkan penurunan ekspresi PPAR α yang menyebabkan menurunnya oksidasi lipid sehingga menimbulkan akumulasi lipid (Prahastuti, 2011). Penelitian Abo-youssef (2013) menunjukkan pemberian fruktosa 10% pada tikus selama 8 minggu menunjukkan adanya peningkatan kadar kolesterol total, trigliserida, dan nitrit oksid sebagai indikator stress oksidatif.

2.4. Diet Tinggi Lemak

Diet tinggi lemak dapat menyebabkan peningkatan lipid, perubahan gambaran histologi pembuluh darah, dan resistensi insulin. Hal ini terjadi karena diet tinggi

lemak dapat menyebabkan obesitas yang akan meningkatkan kerja SREBP-1, yaitu faktor *transkripsi* adipo/lipogenik dan sintesis trigliserida. Meskipun kelebihan lemak dalam tubuh disimpan didalam jaringan adiposa dalam bentuk trigliserida (TG) tetapi trigliserida akan mengalami hidrolisis oleh enzim lipoprotein lipase menjadi asam lemak bebas (FFA / *free fatty acid*). FFA yang dilepaskan masuk ke jaringan nonadiposa, meningkatkan TG pada jaringan nonadiposa dan menyebabkan kerusakan oksidatif.

Kelebihan asam lemak di sirkulasi juga disimpan di liver, hati, pankreas dan otot skeletal. Peningkatan FFA mengganggu insulin dalam pengeluaran glukosa hepatic, stimulasi ambilan glukosa di otot skelet dan sekresi insulin dari sel β -pankreas. Hati yang terpapar FFA dalam konsentrasi tinggi akibat kompensasi hiperinsulinemia yang menghambat lipolisis sel lemak intraabdomen. Fenomena ini menstimulasi glukoneogenesis, serta sintesis dan sekresi VLDL. Meningkatnya produksi VLDL dan katabolisme VLDL yang lambat menyebabkan peningkatan trigliserida. Pemberian diet tinggi lemak selama 8 minggu terbukti dapat meningkatkan lemak viseral, gula darah, kadar SERBP-1, dan resistensi insulin (Mawarti *et al.*, 2012).

Pemberian diet tinggi lemak dapat menimbulkan stres oksidatif endotel pembuluh darah melalui pembentukan keadaan dislipidemia yaitu tingginya kadar kolesterol total, LDL, VLDL, TG dan rendahnya kadar HDL dalam sirkulasi. Stres oksidatif dapat menyebabkan disfungsi endotel dan produksi berlebihan dari ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang akan mengoksidasi LDL ekstraseluler sehingga terbentuklah LDL teroksidasi. LDL teroksidasi akan difagositosis oleh makrofag melalui reseptor *scavenger* sehingga terbentuk sel busa sebagai lesi awal aterosklerosis (Welinsa *et al.*, 2014). Warditiani *et al.*(2012) telah meneliti bahwa pemberian fruktosa 1,8 g/kg BB dan makanan kaya lemak (15% lemak babi dan 5% kuning telur bebek) selama 50 hari dapat membentuk plak-plak lemak pada aorta

tikus. Komponen dari diet tinggi lemak yang digunakan dalam penelitian ini adalah mentega dan telur.

2.4.1. Lemak

Lemak adalah suatu ester trigliserida (TG) dari gliserol dengan 3 asam lemak terikat pada rantai utamanya (Tuminah, 2009). Minyak dan lemak memegang peranan penting dalam menjaga kesehatan tubuh manusia dengan menyumbangkan energi kepada tubuh sebesar 9 kalori tiap gram lemak dan sebagai pelarut vitamin (Ketaren, 2008). Namun ada beberapa lemak yang perlu dibatasi konsumsinya karena perbedaan dalam komposisi asam lemak dari minyak-minyak makanan mempunyai kaitan dengan penyakit jantung koroner dan aterosklerosis, khususnya mengenai kadar lemak serum dan kolesterol yang tinggi (Tuminah, 2009). Berdasarkan tingkat kejenuhannya, asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh *trans* memiliki peranan penting dalam terjadinya penyakit kardiovaskuler.

Asam lemak jenuh terdapat dalam produk hewani seperti susu *full-cream* dan daging-daging berlemak serta terdapat dalam beberapa produk nabati seperti minyak kelapa. Kadar asam lemak tidak jenuh dalam lemak hewani lebih kecil dari lemak nabati (Ketaren, 2008). Mentega sebagai produk hewani memiliki kandungan lemak jenuh sebesar 53% per takaran saji (Rosenthal, 2009). Asupan asam lemak jenuh dalam jumlah banyak, secara signifikan meningkatkan kadar kolesterol LDL (Tuminah, 2009).

Asam lemak *trans* berasal dari 3 sumber makanan, yaitu produk lemak hewan pemamah biak (susu, daging, jaringan adiposa), minyak yang dihidrogenasi sebagian (margarine, *shortening*, *cooking fats*), dan minyak yang telah dihilangkan baunya (Tuminah, 2009). Dalam jumlah kecil, asam lemak *trans* terdapat secara alami pada mentega dan produk hewan ruminansia lain seperti susu *full-cream*, keju, telur dan daging akibat fermentasi bakteri didalam hewan tersebut (Sartika, 2008; Silalahi *et al.*, 2002). Mentega sebagai produk olahan susu menyumbangkan sekitar 10% asupan asam lemak *trans* pada tubuh (Silalahi *et al.*, 2002). Dari beberapa penelitian,

diperoleh kesimpulan bahwa batas atas asam lemak *trans* yang aman adalah sekitar 2% kkal. Asam lemak *trans* tidak hanya meningkatkan kadar kolesterol LDL, tetapi secara bersamaan juga menurunkan kadar kolesterol HDL. Tingginya kadar kolesterol total dalam plasma darah, kolesterol LDL, kolesterol VLDL serta rendahnya kolesterol HDL berhubungan dengan aterosklerosis koroner (Tuminah, 2009). Silalahi *et al.* (2002) juga menyebutkan bahwa asam lemak *trans* cenderung menaikkan lipoprotein aterogenik, yaitu lipoprotein(a).

Secara umum makanan yang berasal dari hewani (daging berlemak, keju, mentega dan krim susu) selain mengandung asam lemak jenuh juga mengandung kolesterol (Sartika, 2008). Mentega mengandung 300mg kolesterol/100gram bahan lebih tinggi daripada gajih kambing yang hanya mengandung 130mg kolesterol/100gram bahan (Dewi, 2009).

2.4.2. Telur

Telur merupakan salah satu bahan makanan yang memiliki nilai gizi tinggi dan bermanfaat pada pertumbuhan dan perkembangan tubuh. Telur mengandung protein, lemak, vitamin, dan mineral. Lemak telur terletak pada bagian kuning telur (Anjarsari, 2010). Kuning telur jika dipisahkan dari putihnya akan memiliki kadar lemak dan kolesterol yang lebih tinggi daripada telur utuh seperti terlihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Perbandingan nutrisi kuning telur dan telur utuh (Kandungan Lemak per 100 gram Telur Ayam)

Komposisi nutrisi	Kuning telur	Telur utuh
Lemak (g)	34,65	11,50
Kolesterol (mg)	2000	500

Sumber: Anjarsari (2010); Harmanto (2005)

Kandungan kolesterol perlu dipertimbangkan ketika akan mengonsumsi telur. Setiap telur memiliki kandungan kolesterol yang berbeda. Harmanto (2005) dan Dewi (2009) menyebutkan bahwa telur burung puyuh dan kuning telur ayam

merupakan jenis telur yang harus dihindari akibat tingginya kandungan kolesterol, masing-masing sebesar 3640 mg dan 2000 mg per 100 gram bahan makanan. Sedangkan telur ayam utuh dapat dikonsumsi dalam jumlah sangat terbatas karena mengandung kolesterol sebesar 500 mg tiap 100 gram telur (Harmanto, 2005). Kandungan kolesterol pada kuning telur puyuh paling tinggi dibanding kuning telur unggas lain (Tabel 2.2). Selain itu, telur juga mengandung asam lemak *trans* walaupun dalam jumlah kecil (Sartika, 2008).

Tabel 2.2. Kandungan kolesterol berbagai telur

Bahan Pangan	Kadar kolesterol total (mg/100g)
Kuning telur:	
▪ Ayam kampung	1.881,30
▪ Ayam ras	1.274,50
▪ Itik	2.118,75
▪ Burung puyuh	2.139,17
Putih telur (semua telur)	0

Sumber: Dwiloka (2003)

Pemberian kuning telur 1cc per oral selama 49 hari terbukti dapat meningkatkan kadar kolesterol total, LDL, dan trigliserida secara signifikan serta menimbulkan kerusakan dan penebalan endotel pembuluh darah (Mustofa *et al.*, 2013). Penelitian Lamanepa *et al.* (2005) menyebutkan bahwa pemberian injeksi intravena adrenalin dan induksi kuning telur per oral selama 3 minggu dapat menyebabkan kenaikan kadar lipid darah dan terbentuknya lesi aterosklerosis.

2.5. Lipid Darah (Lipoprotein)

Lipoprotein adalah kompleks agregat lipid dan protein yang membuat lipid sesuai dengan lingkungan cairan tubuh serta membantu transportasi lipid ke seluruh tubuh (Syamsudin, 2011). Suatu makromolekul yang berbentuk bola, dan bagian dalamnya terdiri dari lemak-lemak netral, seperti trigliserida dan ester kolesterol, dan dikelilingi oleh bagian permukaan yang bersifat polar dan terdiri dari apolipoprotein, fosfolipid, dan kolesterol bebas. Adanya komponen yang polar inilah yang menyebabkan lipoprotein dapat larut dalam plasma (Sofian, 2011; Suyatna, 2007).

Total konsentrasi lipoprotein plasma rata-rata sekitar 700 mg per 100 mL plasma yang tersusun oleh komponen seperti yang tertera pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3. Komponen lipoprotein

Konstituen	Jumlah (mg/dl)
Kolesterol	180
Fosfolipid	160
Trigliserida	160
Protein	200

Sumber: Hall (2011)

Lipoprotein dibagi menjadi 5 golongan besar sebagai berikut (Sofian, 2011; Syamsudin, 2011; Suyatna, 2007).

a. Kilomikron

Kilomikron, yang terdiri dari 90% trigliserida dan kurang dari 5% kolesterol, merupakan lipoprotein dengan bobot molekul terbesar, mempunyai densitas yang paling rendah (<0,94 g/ml). Protein utama kilomikron adalah apolipoprotein B-48. Kilomikron berfungsi mengangkut trigliserida yang diserap oleh usus dari pencernaan lemak dalam makanan menuju jaringan lemak dan otot rangka, serta membawa kolesterol makanan ke hati.

b. Lipoprotein densitas sangat rendah (*very low density lipoprotein*).

VLDL terdiri dari 60% trigliserida, 10-15% kolesterol dan fosfolipid. *VLDL* diproduksi di hepatosit. Protein utamanya adalah apo B-100. *VLDL* berfungsi mengangkut trigliserida dan lemak-lemak lain yang disintesis oleh hati. Setelah trigliserida dihilangkan dari *VLDL* maka akan terbentuk *IDL*.

c. Lipoprotein densitas sedang (*intermediate density lipoprotein*).

IDL kurang mengandung trigliserida dan lebih banyak kolesterol. *IDL* merupakan zat perantara normal dalam perubahan *VLDL* menjadi *LDL*. Biasanya *IDL* ini akan dengan cepat dihilangkan dari plasma. Pada beberapa penyakit tertentu *IDL* ini akan tetap ada dalam plasma. *IDL* juga dinamakan beta-*VLDL*.

d. Lipoprotein densitas rendah (*low density lipoprotein*)

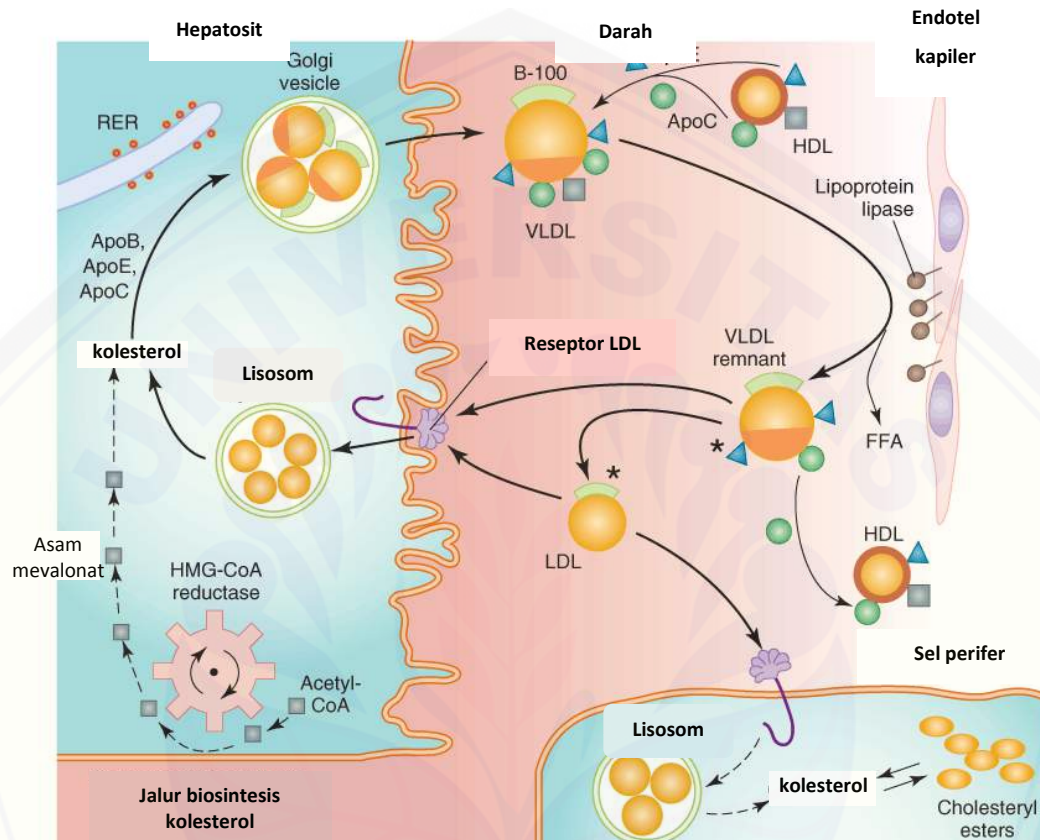
Inti *LDL* mengandung sekitar 35-45% ester kolesterol dan 6-12% trigliserida. Sedangkan permukaannya mengandung 6-10% kolesterol bebas, 20-25% fosfolipid, dan 20-25% protein. Satu-satunya protein *LDL* adalah apoB dan satu partikel *LDL* selalu mengandung satu molekul apoB. *LDL* memiliki kepadatan sekitar 1,019-1,063 g/ml dan diameter 22-28 nm. *LDL* merupakan produk akhir dari metabolisme *VLDL*. *LDL* berfungsi membawa kolesterol ke jaringan hati dan perifer. Kadar *LDL* plasma bergantung dari banyak faktor termasuk kolesterol dalam makanan asupan lemak jenuh serta kecepatan produksi dan eliminasi *LDL* dan *VLDL*. Lipoprotein(a) merupakan bentuk *LDL* termodifikasi, yaitu mengandung bagian apolipoprotein B-100 dari *LDL* yang terikat ke apolipoprotein A. studi epidemiologi menunjukkan adanya korelasi antara peningkatan kadar lipoprotein A dalam darah dengan terjadinya penyakit koroner.

e. Lipoprotein densitas tinggi (*high density lipoprotein*)

HDL mempunyai kandungan protein dan fosfolipid yang paling besar; 20% kolesterol, 5% trigliserida, dan 50% protein. *HDL* penting untuk membersihkan trigliserida dan kolesterol serta untuk *transpor* dan metabolisme ester kolesterol dalam plasma. *HDL* akan menurun pada penderita kegemukan, perokok, penderita diabetes yang tidak terkontrol dan pemakai kombinasi estrogen dan progestin.

Peningkatan *low density lipoprotein* (*LDL*) dalam darah dapat menyebabkan aterosklerosis, sedangkan kadar *high density lipoprotein* (*HDL*) yang tinggi memberikan efek protektif. Peningkatan rasio *LDL/HDL* merupakan parameter yang paling prediktif untuk insiden aterosklerosis dan PJK, dibanding hanya kadar kolesterol total yang tinggi maupun kolesterol *LDL* sendiri. Rasio *LDL/HDL* adalah perhitungan untuk indeks aterogenik. Nilai indeks aterogenik sangat tergantung pada kadar kolesterol *HDL*. Semakin tinggi kadar kolesterol *HDL* maka semakin kecil

indeks aterogenik, sehingga risiko terjadinya aterosklerosis juga kecil. Pada tikus, nilai normal untuk indeks aterogenik berkisar antara 0,34-0,35 (Paulina, 2015).



Gambar 2.6. Metabolisme lipoprotein asal hati. Panah tebal menunjukkan jalur utama. (Warna gelap menunjukkan ester kolesterol, warna terang untuk trigliserida, tanda bintang menunjukkan ligan fungsional untuk reseptor LDL; segitiga menunjukkan apolipoprotein E, lingkaran dan kotak mewakili C apolipoprotein;. RER menunjukkan retikulum endoplasma kasar) (Katzung, 2006)

Metabolisme lipoprotein (gambar 2.7.) dimulai saat VLDL yang baru terbentuk dilepaskan melalui aparat Golgi. Mereka memperoleh lipoprotein C tambahan dan apo E dari HDL. VLDL dikonversi ke sisa-sisa VLDL (IDL) oleh lipolisis melalui lipoprotein lipase di dalam pembuluh jaringan perifer. Dalam proses ini, C apolipoprotein dan sebagian dari apo E diberikan kembali ke HDL. Beberapa sisa-sisa VLDL dikonversi ke LDL dengan hilangnya trigliserida dan apo E. Jalur

utama untuk degradasi LDL melibatkan endositosis LDL oleh reseptor LDL di dalam hati dan jaringan perifer, dimana apo B100 adalah ligan.

2.6. Hiperlipidemia

Hiperlipidemia adalah kenaikan kadar lipid dan kolesterol di dalam darah melebihi batas kadar seperti yang tertera pada tabel 2.3 (Syamsudin, 2011).

Tabel 2.4 Klasifikasi kadar lipid darah manusia

Jenis lipid	Kadar dalam darah (mg/dL)	Klasifikasi
Kolesterol total	<200	Normal
	200-239	Batas atas
	≥240	Tinggi
LDL	<100	Normal
	100-129	Mendekati normal
	130-159	Batas atas
	160-189	Tinggi
	≥190	Sangat tinggi
HDL	<40	Rendah
	≥60	Tinggi
Trigliserida	<150	Normal
	150-199	Batas atas
	200-499	Tinggi
	≥500	Sangat tinggi

Sumber: Dipiro (2008)

Hiperlipoproteinemia dapat menyebabkan aterosklerosis, xantoma pada kulit dan tendo. Sedangkan hipertrigliserida dapat menimbulkan nyeri perut berhubungan dengan pankreatitis dan hepatosplenomegali (Suyatna, 2007). Hiperlipidemia terlibat dalam aterosklerosis, yang merupakan penyebab utama penyakit jantung dan stroke (Harikumar *et al.*, 2013). Hiperlipidemia kronis, terutama hiperkolesterolemia dapat secara langsung mengganggu fungsi sel endotel melalui peningkatan pembentukan

radikal bebas oksigen yang mendeaktivasi nitrat oksida, faktor utama pelemas endotel (Schoen dan Cotran, 2007).

2.7. Anatomi Pembuluh Arteri

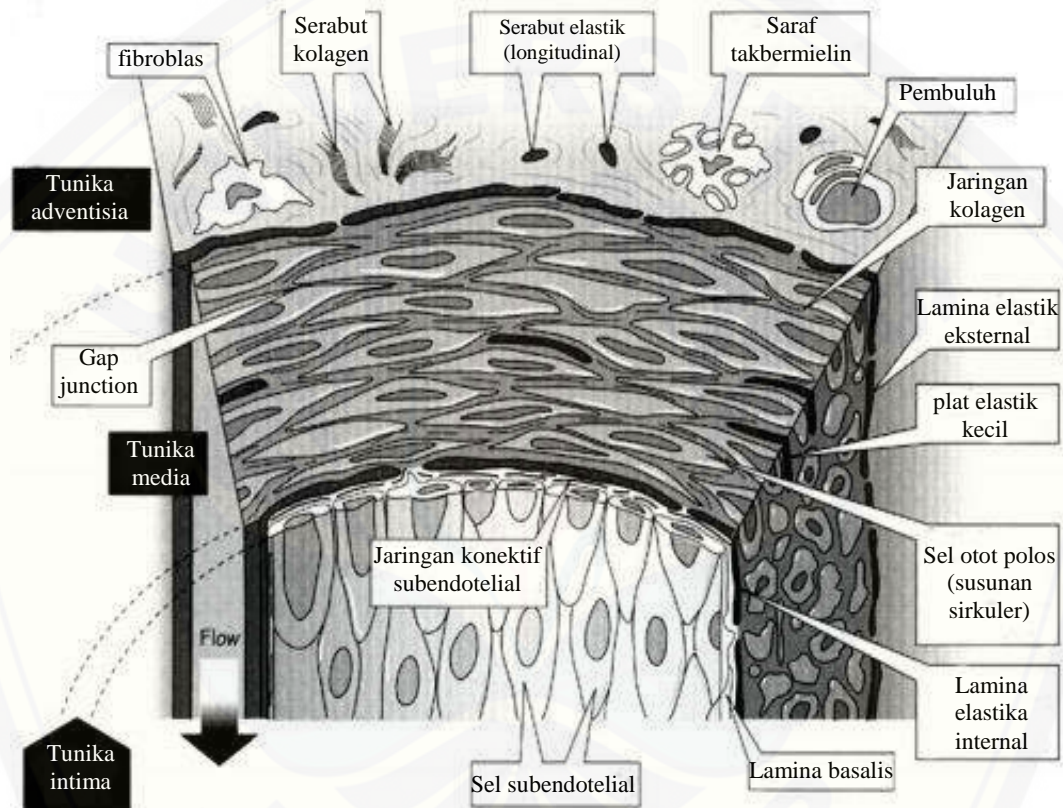
Arteri merupakan pembuluh darah yang mengalirkan darah dari jantung ke seluruh tubuh. Berdasarkan ukuran dan strukturnya arteri dibagi menjadi tiga (Schoen dan Cotran, 2007), yaitu:

- a. Arteri besar/elastik, termasuk aorta dan cabangnya (inominata, subklavia, karotis komunis, iliaka), dan arteri pulmonalis.
- b. Arteri ukuran sedang atau muskular, misalnya arteri koroner dan renalis.
- c. Arteri kecil (garis tengah kurang dari 2 mm) dan arteriol (ukuran diameter 20-100 μ m).

Secara anatomis, dinding arteri terdiri atas tiga lapisan konsentris atau tunika. Lapisan tersebut terlihat jelas pada pembuluh darah besar. Komponen dasar dinding pembuluh darah adalah sel (sel otot polos dan sel endotel), dan matriks ekstrasel (termasuk elastin, kolagen, dan glukosaminoglikan). Gambaran struktur mikroskopis dinding arteri koroner dari arah dalam keluar dinding adalah sebagai berikut (Simanjuntak, 2003; Krause, 2005; Eroschenko, 2008):

- a. Tunika intima (tunika interna) sebagai lapisan dalam yang terdiri dari selapis sel-sel endothelialis. Lapisan ini terdiri atas epitel skuamosa sederhana, yang disebut endotelium pembuluh darah. Dibawah lamina endothelialis terdapat jaringan ikat yang sangat tipis, tidak jelas dan disebut lamina subendothelialis. Pada lamina subendothelialis dijumpai serabut-serabut elastik dan tidak jelas, terlihat adanya sel-sel. Pada batas tunika intima dengan tunika media serabut-serabut elastik terlihat lebih jelas, bergelombang dengan arah sirkuler disebut sebagai lamina elastika internal yang tebal dan merupakan membran. Jejas pada endotel dapat menyebabkan mulai terbentuknya trombus dan lesi vaskular. Denudasi (kehilangan nyata) dari sel endotel dapat memicu thrombosis dan proliferasi otot polos. Sedangkan disfungsi endotel merupakan

beberapa jenis perubahan (mungkin dapat reversibel) status fungsional sel endotel yang terjadi sebagai respon rangsangan lingkungan. Disfungsi endotel sangat penting pada pathogenesis pembuluh darah karena dapat bermanifestasi sebagai gangguan vasodilatasi endotel, penurunan sintesis nitrit oksida, dan pembentukan radikal bebas oksigen.



Gambar 2.7. Skema histologi pembuluh darah (Aaronson,1999)

- b. Lapisan tengah adalah tunika media yang tersusun atas lapisan serabut otot polos yang mempunyai arah sirkuler dengan susunan serabut-serabut yang rapat dan diantaranya terdapat serabut-serabut elastik. Lapisan ini jauh lebih tebal dibanding dengan tunika intima (dua kali tebal tunika intima). Pada arteri, otot polos memproduksi matriks ekstraseluler. Lamina elastika eksternal terdapat pada bagian perifer dari tunika media muskular.

- c. Lapisan paling luar adalah tunika adventisia yang utamanya tersusun atas jaringan serabut penghubung elastis dan kolagen (terutama kolagen tipe I). Sebagai batas tunika media dan tunika adventitia adalah lamina elastika eksterna, tetapi tidak setebal dan sejelas lamina elastika interna. Pada tunika adventisia terdapat vasa vasorum atau pembuluh darah dalam pembuluh darah.

Pada manusia, penyakit arteri merupakan penyebab morbiditas dan mortalitas yang lebih sering daripada kategori lain. Beberapa lesi patologik mengenai arteri dengan ukuran tertentu, misalnya aterosklerosis menyerang arteri elastik dan muskular, sedangkan hipertensi menyerang arteri muskular kecil dan arteriol (Schoen dan Cotran, 2007).

2.8. Aterosklerosis

2.8.1. Definisi dan Faktor Resiko Aterosklerosis

Arteriosklerosis adalah istilah umum yang mengacu pada menebal dan kakunya pembuluh darah dari semua ukuran. Aterosklerosis adalah bentuk arteriosklerosis yang paling umum ditemukan dan menyerang arteri berukuran besar dan menengah (pembuluh serebral, vertebral, koroner, renal, aorta, dan pembuluh di tungkai) (Ditjen Binfar, 2006). Aterosklerosis terutama mengenai arteri elastik dan paling sering dijumpai pada aorta abdominal, aorta torakalis/torasika, arteri poplitea, arteri carotis interna dan arteri koronaria (Welinsa *et al.*, 2014). Hal ini ditandai dengan berkembangnya lesi lemak yang disebut plak ateromatosa di dalam permukaan dinding arteri. Aterosklerosis merupakan proses pembentukan plak (plak aterosklerotik) akibat akumulasi beberapa bahan seperti *lipid-filled macrophages (foam cells)*, *massive extracellular lipid* dan plak fibrous yang mengandung sel otot polos dan kolagen. Perkembangan terkini menjelaskan aterosklerosis adalah suatu proses inflamasi/infeksi, dimana awalnya ditandai dengan adanya kelainan dini pada lapisan endotel, pembentukan sel busa dan *fatty streaks*, pembentukan *fibrous cups* dan lesi lebih lanjut, dan proses pecahnya plak aterosklerotik yang tidak stabil (Ditjen

Binfar, 2006). Komplikasi terpenting dari arteriosklerosis adalah infark miokardium (penyakit jantung koroner), infark serebral (stroke), dan gangguan pembuluh darah perifer (Suyatna, 2007; Schoen dan Cotran, 2007).

Ada beberapa hal yang menjadi faktor resiko terjadinya aterosklerosis (Tabel 2.5.). Hiperlipidemia, hipertensi, merokok, dan diabetes adalah empat faktor utama namun dapat dimodifikasi atau dikendalikan.

Tabel 2.5. Faktor resiko aterosklerosis

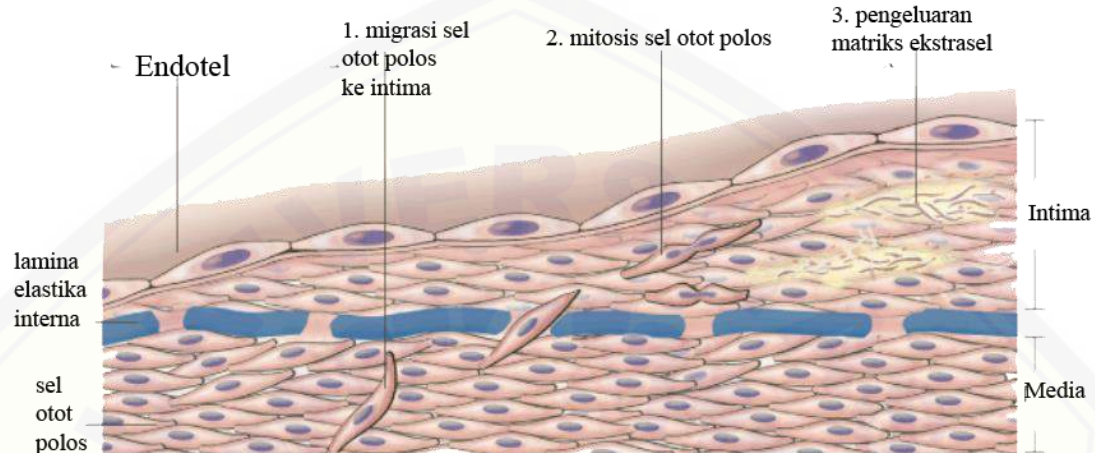
Resiko Mayor	Resiko Minor, Tidak Pasti, atau Tidak terukur
Tidak dapat dimodifikasi	
Pertambahan usia	Kegemukan
Lelaki	Kurang gerak
Riwayat keluarga	Stress (kepribadian 'Tipe A')
Kelainan genetik	Defisiensi estrogen pasca menopause
Dapat dikendalikan	
Hiperlipidemia	Asupan karbohidrat tinggi
Hipertensi	Lipoprotein(a)
Merokok	Asupan lemak tak jenuh trans
Diabetes	<i>Chlamydia pneumonia</i>

Sumber : Schoen dan Cotran (2007)

2.8.2. Patofisiologi Aterosklerosis

Perjalanan aterosklerosis dimulai dari rusaknya endotel pembuluh darah. Kerusakan pada endotel vaskular meningkatkan ekspresi molekul adhesi pada sel endotel dan menurunkan kemampuan mereka untuk melepaskan oksida nitrat dan zat-zat lain yang membantu mencegah adhesi makromolekul, trombosit, dan monosit pada endotel (Hall, 2011; Suyatna, 2007). Setelah kerusakan pada endotel vaskular terjadi, monosit dan lipid (sebagian besar LDL) yang beredar mulai menumpuk di lokasi cedera. Monosit menyeberangi endotelium, memasuki intima dinding pembuluh darah, dan berdeferensiasi menjadi makrofag. Makrofag tersebut kemudian menelan dan mengoksidasi akumulasi lipoprotein sehingga memberikan penampilan makrofag yang seperti busa (Hall, 2011). Makrofag yang diubah dan sel-sel otot

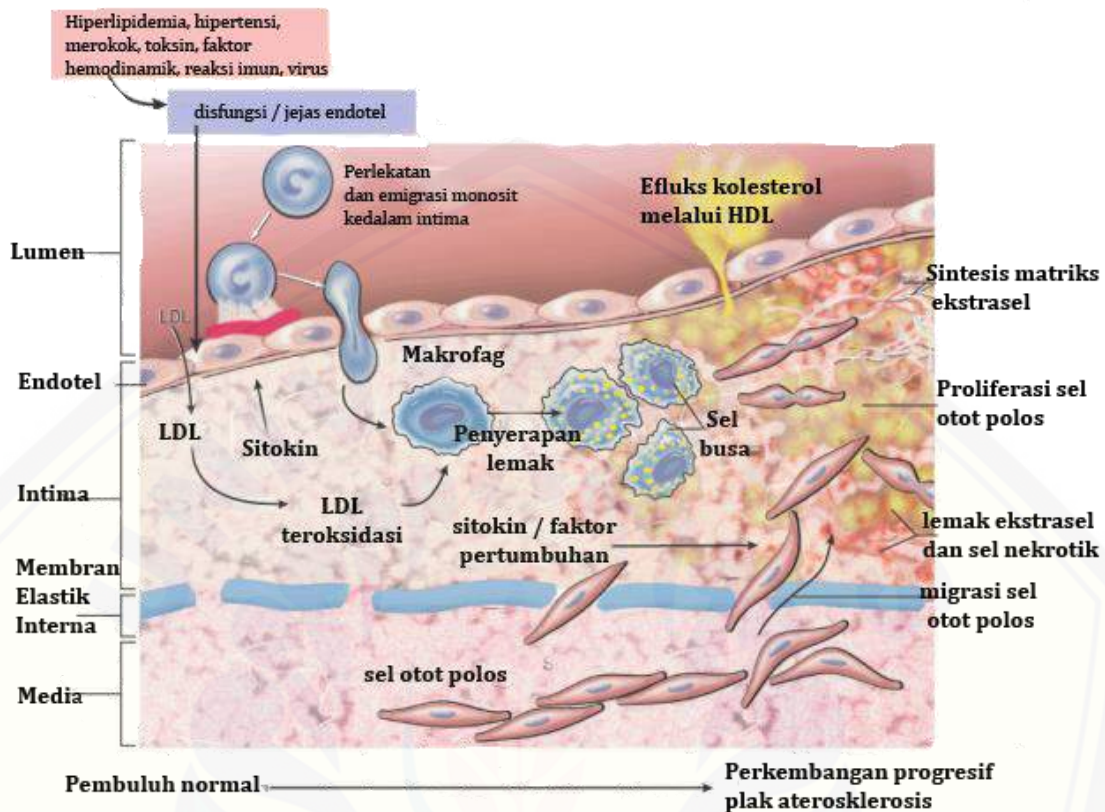
polos yang menjadi terisi dengan ester kolesteril disebut dengan sel busa (*foam cells*) dan merupakan karakteristik komponen seluler dalam plak aterosklerotik (Katzung, 2002).



Gambar 2.8. Proses terjadinya penebalan dinding pembuluh darah (Sumber: Schoen dan Cotran, 2007)

Sel busa makrofag ini kemudian beragregasi pada pembuluh darah dan membentuk garis lemak (*fatty streak*). Seiring dengan waktu, garis-garis lemak tumbuh lebih besar dan menyatu, dan jaringan otot polos dan berserat sekitarnya berproliferasi membentuk plak yang lebih besar. Makrofag juga melepaskan zat yang menyebabkan peradangan dan proliferasi lebih lanjut dari otot polos dan jaringan berserat di dalam permukaan dinding arteri.

Deposit lipid ditambah proliferasi sel dapat menjadi begitu besar sehingga plak menonjol ke dalam lumen arteri dan sangat mengurangi aliran darah, kadang-kadang benar-benar menyumbat pembuluh darah. Bahkan tanpa oklusi, fibroblas dari plak akhirnya menyumbangkan sejumlah besar jaringan ikat padat; sklerosis (fibrosis) menjadi begitu besar sehingga arteri menjadi kaku. Kemudian garam kalsium sering mengendap dengan kolesterol dan lemak lainnya dari plak, yang menyebabkan kalsifikasi sehingga membuat arteri menjadi kaku. Kedua tahap akhir dari penyakit ini disebut "pengerasan arteri" (Hall, 2011).



Gambar 2.9. Ilustrasi perkembangan plak aterosklerosis (Schoen dan Cotran, 2007)

Aterosklerosis menyebabkan penurunan diameter lumen arteri koroner. Kelainan dalam lipoprotein plasma dan gangguan metabolisme lipid merupakan faktor resiko paling kuat untuk aterosklerosis (Syamsudin, 2011). Tingginya kolesterol total dalam serum sangat erat kaitannya dengan aterosklerosis. LDL sebagai pengangkut kolesterol total juga ditemukan dalam plak aterosklerosis. Secara in vitro, LDL bisa mengubah sel-sel otot halus dan makrofag menjadi sel busa yang merupakan sel utama pada lesi ateromatus.

Aterosklerosis juga terjadi akibat adanya stres oksidatif akibat NOX2 (NADPH oksidase isoform 2). Ketika NADPH mendonorkan elektron pada molekul oksigen melalui NOx2, O_2^- terbentuk. Stres oksidatif terjadi ketika produksi O_2^- melebihi kapasitas antioksidan dari lingkungan sekitar. Stres oksidatif menyebabkan penurunan produksi nitrit oksida sehingga terjadi disfungsi endotel. Selain itu stres

oksidatif juga meningkatkan proliferasi sel otot polos vaskuler dan oksidasi lipid serta menurunkan ambilan kembali kolesterol oleh ApoA₁. Beberapa peristiwa tersebut dapat meningkatkan resiko terjadinya aterosklerosis (Symons, 2013).

2.9. Histopatologi Aterosklerosis

2.9.1. Definisi Histopatologi

Histologi merupakan studi mengenai jaringan dan sel normal, utamanya dengan mikroskop. Sedangkan studi mikroskopik dari jaringan atau sel yang mengalami perubahan struktur mikroskopik spesifik disebut histopatologi atau patologi anatomi (Young *et al.*, 2006).

2.9.2. Pewarnaan dalam Histologi

Pewarnaan merupakan salah satu cara untuk memudahkan pengamatan histologi. Beberapa pewarnaan yang digunakan dalam histopatologi antara lain sebagai berikut (Young *et al.*, 2006).

a. Haematoxylin dan eosin (H&E)

Pewarnaan ini adalah teknik yang paling umum digunakan pada histologi hewan dan patologi rutin. Pewarna dasar, hematoksilin, mewarnai struktur asam sebagai warna biru keunguan. Sebaliknya, eosin merupakan pewarna asam yang mewarnai struktur basa menjadi merah muda.

b. Giemsa

Teknik ini biasa digunakan untuk pewarnaan sel darah dan hapusan sel lain (misal sumsum tulang). Nukleus akan berwarna biru tua hingga ungu, sitoplasma biru pucat, dan eritrosit berwarna merah muda pucat.

c. Van Gieson

Teknik ini merupakan pewarnaan untuk jaringan konektif dimana kolagen akan berwarna merah, nukleus berwarna biru, dan eritrosit serta sitoplasma akan berwarna kuning.

d. Pewarnaan retikulin

Metode ini untuk menggambarkan serabut retikulin dari jaringan pendukung yang akan terwarnai biru atau hitam dengan tehnik ini.

e. Reaksi asam-schiff periodik (PAS)

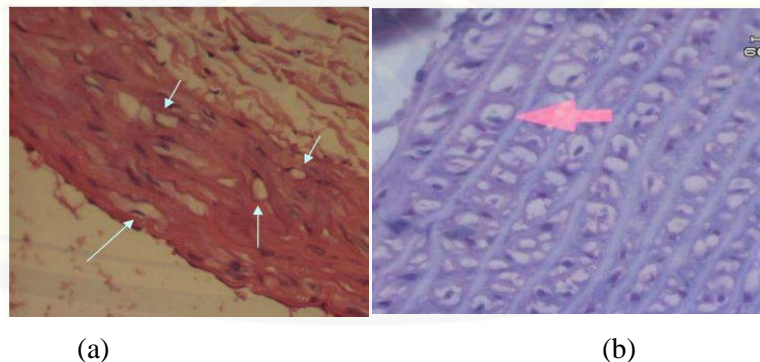
Reaksi PAS mewarnai kompleks karbohidrat dengan warna merah gelap(magenta). Organ atau jaringan yang mengandung karbohidrat seperti hepatosit akan memberikan respon positif dengan pewarnaan ini.

f. Masson trichrome

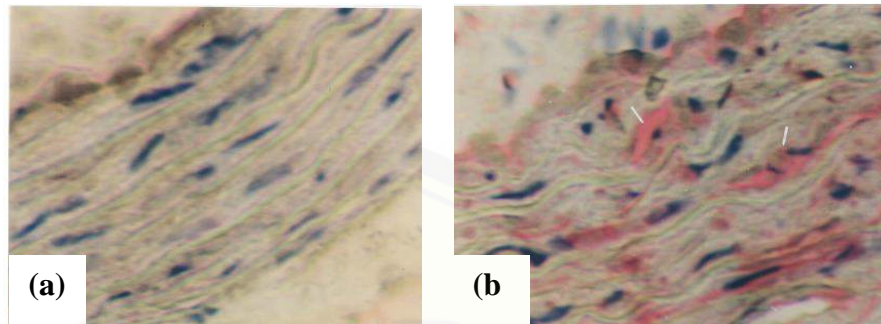
Tehnik ini disebut juga tehnik jaringan penghubung. Pewarnaan ini menunjukkan tiga warna; nukleus dan struktur basofilik lainnya akan berwarna biru; kolagen akan terwarnai hijau atau biru tergantung tehnik yang digunakan; serta sitoplasma, otot, eritrosit, dan keratin akan terwarnai merah terang.

2.9.3. Histopatologi Aterosklerosis

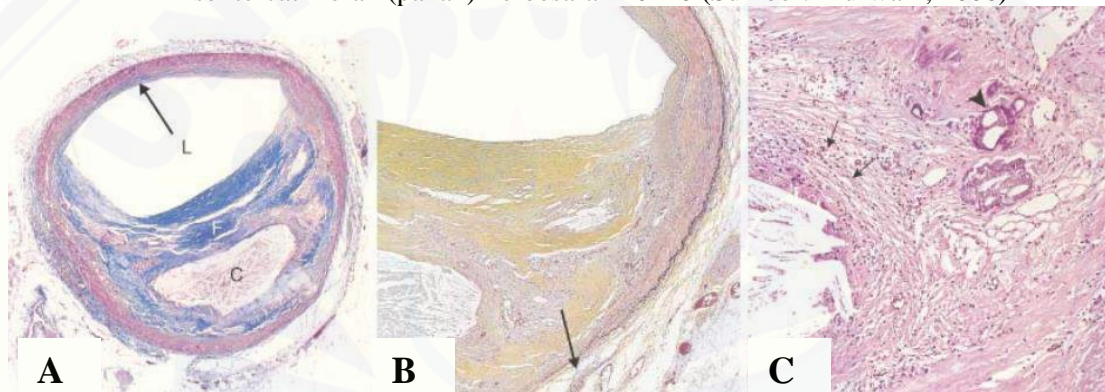
Lesi aterosklerosis dapat diamati antarlain dengan histopatologi aorta. Pada penampang mikroskopis akan terlihat gambaran sel busa, penebalan dinding pembuluh darah, atau ketidakutuhan endotel pembuluh darah seperti terlihat pada Gambar 2.12 dan 2.13 berikut.



Gambar 2.10. Gambaran sel busa (ditunjukkan tanda panah) pada aorta tikus (a) yang diberi diet aterogenik (Sumber: Lamanepa *et al.*, 2005) dan (b) kelompok kontrol positif (Sumber:Maramis *et al.*, 2014)

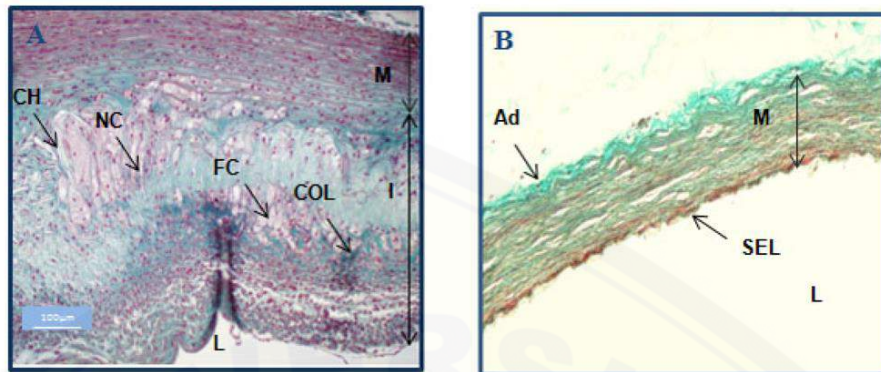


Gambar 2.11. Perbandingan histopatologi aorta tikus (a) Aorta normal tikus (*Rattus norvegicus* strain Wistar) Perbesaran 10x40 (b) Sel busa pada pewarnaan menggunakan Oil-Red O Pada sel busa: sel lebih besar, inti terdesak ke tepi, sel tercat merah (panah) Perbesaran 10x40 (Sumber: Murwani, 2006)



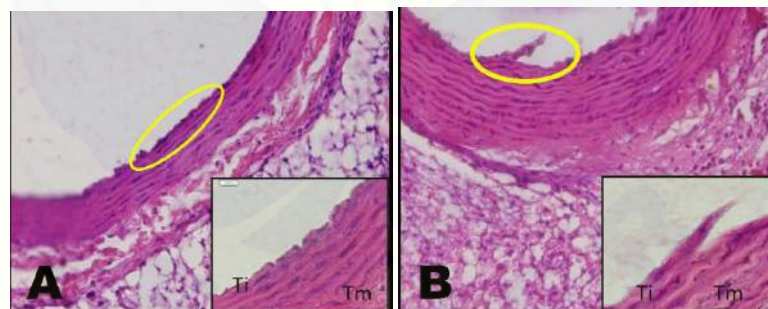
Gambar 2.12. Gambaran histologi plak ateromatosa di arteri koronaria (Sumber: Schoen dan Cotran, 2007)

Gambar 2.12.A. memperlihatkan foto keseluruhan irisan arteri dimana terdapat lapisan fibrosa (F) dan inti lemak (C) dengan celah kolesterol khas. Lumen (L) mengalami penyempitan sedang. Perhatikan segmen dinding yang bebas plak (tanda panah). Di bagian ini kolagen terwarnai biru (pewarnaan trikrom Masson). Gambar 2.12.B. merupakan foto perbesaran kuat terhadap salah satu bagian plak gambar A yang diwarnai untuk elastin (hitam) memperlihatkan bahwa membran elastika interna dan eksterna telah rusak dan tunika media arteri di bawah plak paling lanjut telah menipis (tanda panah). Sedangkan gambar 2.12.C. adalah foto perbesaran kuat dari pertemuan lapisan fibrosa dari inti plak yang memperlihatkan sel radang yang tersebar, kalsifikasi (tanda panah lebar), dan neurovaskularisasi (tanda panah kecil).



Gambar 2.13. Gambaran histologi aorta dengan plak aterosklerosis (pewarnaan Masson Trichrome) pada kelinci yang diberi diet tinggi kolesterol (A) dan diet normal (B). Gambar (A) menunjukkan bentuk plak kompleks dengan penebalan intima, sel busa (FC), jaringan kolagen (COL), inti nekrotik (NC), dan kolesterol (CH). Gambar (B) menunjukkan aorta normal dengan selapis endotel (SEL) yang menutupi tunika media (M). (Sumber: Deramchia *et al.*, 2012).

Parameter aterosklerosis selain sel busa adalah tebal dinding aorta. Penebalan dinding aorta pada bagian tunika intima dan tunika media dapat terjadi akibat adanya sel busa. Keutuhan dinding aorta dapat menjadi salah satu parameter penilaian aterosklerosis.



Gambar 2.14 Keutuhan dinding endotel pembuluh darah (perbesaran 400 X dan 1000X); A. Dinding endotel utuh, B. Dinding endotel rusak (Sumber: Rufaida *et al.*, 2013)

Gambaran histopatologi aorta tikus normal (Gambar 2.14 A) menunjukkan bentuk normal tidak terdapat adanya kerusakan endotel dengan tidak adanya lesi di intima perlemakan di tunika media. Lapisan endotel tersusun rapi dan halus, berbentuk pipih, dan poligonal dengan sumbu panjang sel sejajar dengan aliran darah. Tunika intima disusun oleh sel endotelial atau *single cell layer*, sedangkan tunika

media disusun oleh sel otot polos. Gambaran histopatologis aorta hiperkolesterolemia (Gambar 2.14 B) menunjukkan adanya kerusakan endotel dengan bentukan lapisan sel endotel pada tunika intima kasar, berbentuk tidak beraturan hingga terlepasnya sel endotel ke lumen.

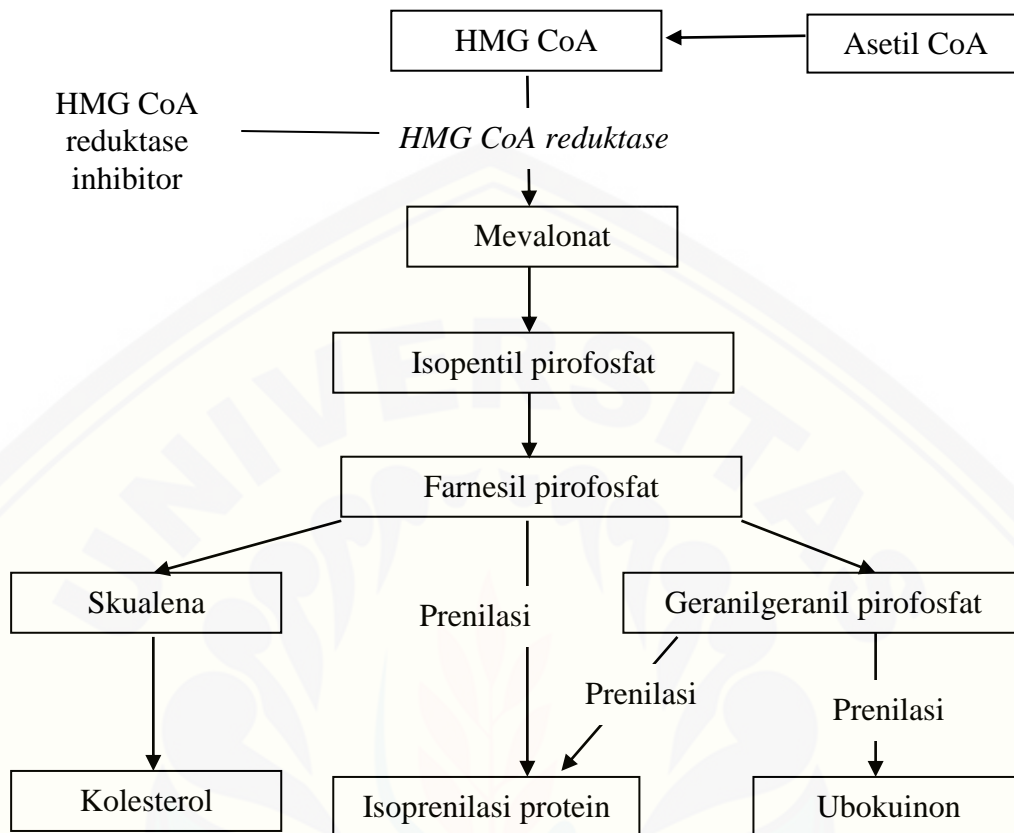
2.10. Simvastatin

Hipolipidemik adalah obat yang digunakan untuk menurunkan kadar lipid plasma. Tindakan menurunkan kadar lipid plasma merupakan salah satu tindakan yang ditujukan untuk menurunkan resiko penyulit aterosklerosis. Simvastatin adalah salah satu obat hipolipidemik yang biasa digunakan (Suyatna, 2007).

2.10.1. Mekanisme Aksi Simvastatin

Simvastatin adalah golongan statin yang bekerja dengan jalan menghambat sintesis koleterol dalam hati dengan jalan menghambat enzim HMG Ko-A reduktase (3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktase). Penghambatan enzim ini menyebabkan inhibisi pembentukan mevalonat. Mengacu pada efek samping dan efektivitas, statin adalah pilihan utama untuk pasien hiperkolesterolemia karena statin adalah monoterapi paling poten untuk menurunkan kadar kolesterol total dan LDL (Dipiro *et al.*, 2008 ; Syamsudin, 2011).

Pengobatan dengan statin dapat menurunkan risiko komplikasi aterosklerosis kardiovaskuler sehingga menjadi cara pencegahan primer dan sekunder. Pada penderita penyakit vaskular aterosklerosis, simvastatin dan pravastatin menurunkan kejadian komplikasi kardiovaskular serius sekitar 30%. Statin mencegah kejadian aterotrombosis karena adanya efek nonsterol terhadap fungsi endotelium, makrofag, platelet, dan otot halus. Statin dapat memperbaiki fungsi vasomotor endotelium, meningkatkan aktivitas fibrinolisis sel endotelium, menurunkan potensi trombogenesis, dan menghambat aktivasi platelet melalui mekanisme nonkolesterol. Efek ini terjadi sebelum reduksi morfologi plak seperti yang terlihat melalui angiografi (Syamsudin, 2011).



Gambar 2.15 Mekanisme kerja inhibitor HMG CoA reductase (Sumber : Syamsudin, 2011)

2.10.2. Farmakokinetika

Bioavailabilitas simvastatin hanya sekitar 5% akibat adanya efek metabolisme lintas pertama yang ekstensif. Simvastatin ditransformasi oleh sistem sitokrom P450 menjadi metabolit aktif atau tidak aktif (Syamsudin, 2011). Simvastatin diberikan mulai dari dosis kecil hingga mencapai dosis yang diinginkan. Simvastatin umumnya diberikan pada dosis 5-80 mg (Suyatna, 2007). Untuk pencegahan penyakit kardiovaskular, simvastatin diberikan pada dosis awal 20-40 mg sekali sehari disesuaikan dengan interval setidaknya selama empat minggu. Statin memiliki efek samping berupa miolisis dan dikontraindikasikan untuk pasien dengan gangguan hati, pasien hamil, dan menyusui (BNF, 2009).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Jenis, Waktu, dan Tempat Penelitian

3.1.1. Jenis Penelitian

Penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak metanol daun Kayu kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) terhadap histopatologi aorta tikus wistar hiperlipidemia ini merupakan penelitian *true experimental laboratories*.

3.1.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Maret hingga November 2015 di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Jember. Pembuatan preparat aorta dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

3.2. Sampel dan Jumlah Sampel

3.2.1 Sampel yang digunakan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dengan usia 2-3 bulan, berat 150-200 gram, warna bulu putih bersih, tidak cacat fisik, kadar kolesterol total dan trigliserida awal <200 mg/dl, dan kadar glukosa darah awal <100 mg/dl.

3.2.2 Jumlah Sampel

Estimasi jumlah sampel yang digunakan dapat dihitung menggunakan rumus Federer, yaitu:

$$(p - 1)(n - 1) \geq 15 : \{(p - 1)(n - 1)\} \geq 15$$

Keterangan :

n: jumlah sampel

p : jumlah kelompok kontrol dan perlakuan

jika, $p = 6$

maka, $\{(6 - 1)(n - 1)\} \geq 15$

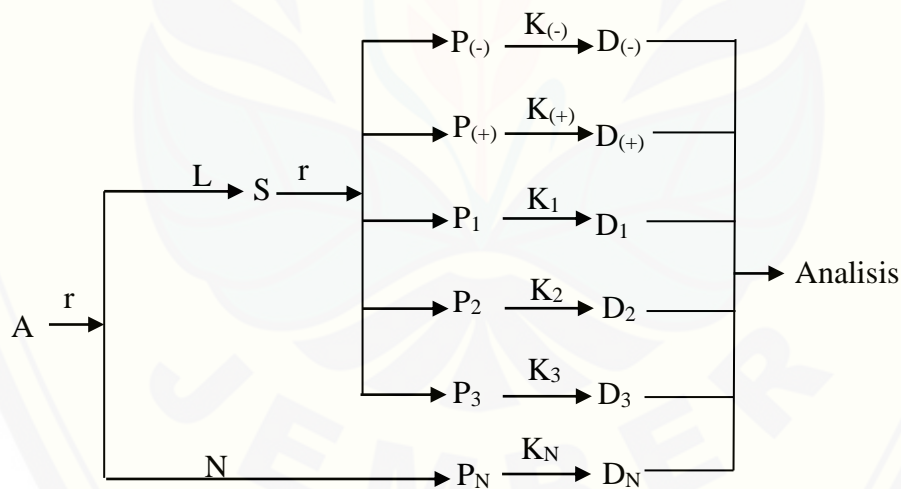
$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan rumus Federer tersebut maka jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 24 ekor tikus yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan (masing-masing perlakuan sebanyak 4 ekor tikus).

3.3. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *randomized post test only control group design*. Gambaran histopatologi aorta hewan coba diamati setelah diberi perlakuan dan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Rancangan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan :

A : Populasi tikus

L : Tikus diinduksi pakan tinggi lemak dan fruktosa

S : Sampel tikus hiperlipidemia

r : Randomisasi

N : Tikus diberi pakan normal

- P₍₋₎ : Kelompok perlakuan berupa pemberian suspensi CMC-Na 1% sebagai kontrol negatif
- P₍₊₎ : Kelompok perlakuan berupa pemberian suspensi simvastatin 1,8 mg/kgBB dalam CMC Na 1% sebagai kontrol positif
- P₁ : Kelompok perlakuan berupa pemberian ekstrak metanol daun Kayu kuning (250 mg/kg BB) 1 kali sehari selama 7 hari
- P₂ : Kelompok perlakuan berupa pemberian ekstrak metanol daun Kayu kuning (500 mg/kg BB) 1 kali sehari selama 7 hari
- P₃ : Kelompok perlakuan berupa pemberian ekstrak metanol daun Kayu kuning (750 mg/kg BB) 1 kali sehari selama 7 hari
- P_N : Kelompok perlakuan berupa pemberian suspensi CMC-Na 1% sebagai kontrol normal
- K₍₋₎ : Perlakuan berupa pemberian suspensi CMC-Na 1% sebagai kontrol negatif
- K₍₊₎ : Perlakuan berupa pemberian suspensi simvastatin 1,8 mg/kgBB dalam CMC Na 1% sebagai kontrol positif
- K₁ : Perlakuan berupa pemberian ekstrak metanol daun Kayu kuning (250 mg/kg BB) 1 kali sehari selama 7 hari
- K₂ : Perlakuan berupa pemberian ekstrak metanol daun Kayu kuning (500 mg/kg BB) 1 kali sehari selama 7 hari
- K₃ : Perlakuan berupa pemberian ekstrak metanol daun Kayu kuning (750 mg/kg BB) 1 kali sehari selama 7 hari
- K_N : Perlakuan berupa pemberian suspensi CMC-Na 1% sebagai kontrol normal
- D₍₋₎ : Data kelompok kontrol negatif
- D₍₊₎ : Data kelompok kontrol positif
- D₁ : Data kelompok perlakuan 1
- D₂ : Data kelompok perlakuan 2
- D₃ : Data kelompok perlakuan 3
- D_N : Data kelompok kontrol normal

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah oven, maserator, gunting, blender, alat gelas, kertas saring, *rotary evaporator* (Heidolph Laborata 4000), sonde tikus, mikropipet, mikrotube, pipa kapiler, *chamber*, kapas, tisu, alat sentrifugasi, timbangan gram kasar, neraca digital, *holder* tikus, alat-alat bedah, *hotplate*, *coldplate*, mikrotom, *Tissue floating Bath*, gelas obyek, gelas penutup, mikroskop (Olympus Tipe BX53T), bioanalyzer *Biolyzer 100TM*, pH meter, lampu UV, densitometer Camag.

3.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Kayu kuning (*Arcangelisia flava*) yang diperoleh dari kawasan konservasi Taman Nasional Meru Betiri Jember, metanol, akuades, toluen, etanol, NH_4OH 25%, lempeng silica gel Merck F254, standar berberin, CMC Na, tablet simvastatin 10 mg (PT. Pertiwi Agung Landson), fruktosa 55%, mentega, kuning telur puyuh, pakan standar BR2, reagen fluidtest uji LDL, reagen fluidtest uji HDL, kloroform, larutan NaCl 0,9%, *NBF* (*neutral buffer formalin*) 10%, xylol, alkohol 70%, alkohol 85%, alkohol absolut, pewarna *Masson Trichrome*, paraffin, balsam kanada.

3.5. Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak metanol daun Kayu kuning (*Arcangelisia flava*) sebesar 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, dan 750mg/kgBB.

3.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nilai indeks aterogenik dan gambaran histopatologi aorta tikus jantan berupa gambaran sel busa setelah tujuh hari perlakuan.

3.5.3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Cara ekstraksi (metode maserasi)
- b. Formula pakan tinggi lemak dan fruktosa
- c. Jenis hewan coba (tikus galur Wistar)
- d. Jenis kelamin hewan coba (jenis kelamin jantan)
- e. Umur hewan coba (2-3 bulan)
- f. Berat badan hewan coba (150-200 gram)
- g. Pemeliharaan hewan coba

- h. Lama perlakuan
- i. Cara, frekuensi dan volume pemberian pakan tinggi lemak, fruktosa 27,5%, ekstrak metanol daun kayu kuning, dan simvastatin.

3.6. Definisi Operasional Penelitian

- a. Bagian tanaman Kayu kuning yang digunakan adalah daun Kayu kuning yang berwarna hijau tua dengan panjang daun lebih dari 5 cm dan diambil dari kawasan Taman Nasional Meru Betiri, Desa Andongrejo, Kabupaten Jember.
- b. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak metanol serbuk daun Kayu kuning hasil maserasi yang dipekatkan dan disuspensikan dalam larutan CMC Na 1%.
- c. Gambaran histopatologi aorta tikus adalah gambaran histopatologi arcus aorta tikus meliputi jumlah sel busa pada tunika intima dan tunika media.
- d. Sel busa adalah sel yang mengandung makrofag bermuatan lipid dan sel otot polos yang sitoplasmanya membesar oleh lipid. Jumlah sel busa dihitung dari tunika intima hingga tunika media dalam satu irisan melintang aorta yang dipulas dengan pewarnaan MT dan diamati dengan mikroskop pembesaran 400 kali.
- e. Tikus hiperlipidemia adalah tikus yang telah memenuhi kriteria kadar kolesterol total, trigliserida, dan indeks aterogenik lebih tinggi daripada tikus kelompok kontrol normal setelah induksi hiperlipidemia.
- f. Diet tinggi fruktosa adalah pemberian larutan fruktosa 27,5% melalui air minum sebanyak 30 ml per hari.
- g. Diet tinggi lemak adalah pemberian campuran dari pakan standar BR2, mentega, dan kuning telur puyuh dengan perbandingan 80: 15: 5 sebanyak 15 gram per ekor tikus per hari.
- h. Ekstrak metanol daun *A.flava* memiliki aktivitas terhadap gambaran histopatologi aorta jika jumlah sel busa menurun dibandingkan kontrol negatif setelah pemberian ekstrak selama tujuh hari.

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1. Tahapan Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Kayu kuning

a) Pembuatan Simplisia

Daun Kayu Kuning diambil dari kawasan Taman Nasional Meru Betiri Jember. Daun dipisahkan dari batang, tangkai daun, dan rumput. Daun kemudian dicuci bersih dengan air mengalir, diangin-anginkan selama tujuh hari dan dicacah. Hasil cacahan daun Kayu kuning dioven pada suhu 50°C selama 24 jam kemudian digiling hingga menjadi serbuk. Serbuk simplisia diayak dan ditimbang untuk proses selanjutnya.

b) Proses Ekstraksi

Serbuk simplisia diekstraksi dengan cara remaserasi menggunakan metanol. Serbuk simplisia direndam dalam n-heksana sebanyak 6 kali berat serbuk simplisia. Setelah 48 jam, maserat disaring menggunakan kertas saring dengan bantuan corong buchner. Filtrat ditampung dalam botol. Residu direndam kembali dengan n-heksana dan proses tersebut dilakukan 2 kali. Ampas kemudian dikeringkan dan dimaserasi dengan metanol sebanyak 6 kali berat serbuk simplisia. Setelah 48 jam, maserat disaring menggunakan kertas saring dengan bantuan corong *buchner*. Filtrat ditampung dalam botol. Residu direndam kembali dengan metanol dan proses maserasi dilakukan 3 kali. Seluruh filtrat hasil maserasi dengan metanol dikumpulkan menjadi satu dan dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* 50°C sampai diperoleh ekstrak metanol. Ekstrak metanol daun Kayu kuning kental yang diperoleh kemudian ditimbang.

3.7.2. Penetapan Kadar Berberin dalam Ekstrak

a. Pembuatan eluen (fase gerak)

Eluen (fase gerak) dibuat dengan mencampurkan 10 ml etanol dengan 2,5 ml NH_4OH 25%. Campuran diaduk perlahan kemudian ditambahkan 7,5 ml

toluen sedikit demi sedikit sambil dikocok hingga homogen. Eluen dituangkan kedalam chamber untuk proses penjenuhan sebelum dimulainya eluasi.

b. Pembuatan larutan standar berberin

Standar berberin ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam metanol p.a. hingga diperoleh konsentrasi standar berberin sebesar 50, 100, 200, 250, 500, dan 1000 ppm.

c. Pembuatan larutan uji

Sebanyak 75 mg ekstrak metanol daun *A. flava* dilarutkan dalam 1 ml metanol p.a. Penimbangan ekstrak dilakukan replikasi sebanyak dua kali.

d. Penetapan kadar berberin dalam ekstrak

Larutan standar berberin konsentrasi 50, 100, 200, 250, 500, dan 1000 ppm ditotolkan pada lempeng silica gel Merck F254 masing-masing sebanyak 2 μ l. Sedangkan larutan uji ditotolkan sebanyak 6 μ l. Jarak antar totolan adalah 1cm. Lempeng diamati dibawah sinar UV 254nm untuk memastikan totolan terlihat. Lempeng dimasukkan kedalam chamber yang sudah jenuh pada posisi vertikal. Eluasi dilakukan hingga eluen mencapai tanda batas eluasi. Lempeng dikeringkan dan diamati kembali dibawah sinar UV untuk kemudian dianalisis menggunakan densitometer.

3.7.3. Pembuatan Larutan Fruktosa 27,5%

Sebanyak 50 mL fruktosa 55% dilarutkan dalam aquadest ad 100mL. Larutan fruktosa 27,5% diberikan melalui air minum sebanyak 30 mL per hari untuk 1 ekor tikus.

3.7.4. Pembuatan Pakan Tinggi Lemak

Pakan tinggi lemak atau diet tinggi lemak (DTL) dibuat dengan cara mencampurkan bahan-bahan sesuai dengan tabel 3.1. hingga homogen.

Tabel 3.1 Komposisi Pakan Tinggi Lemak

Bahan	Persentase dalam komposisi (%)
Pellet BR2	80
Kuning telur puyuh	5
Mentega	15

Kuning telur puyuh yang digunakan adalah kuning telur puyuh mentah yang telah dipisahkan dari bagian putihnya. Mentega dicairkan terlebih dahulu untuk mempermudah proses pencampuran. Pakan diberikan sebanyak 15 gram per hari per ekor tikus.

3.7.5. Pembuatan Suspensi Ekstrak

Sebanyak 1 gram CMC-Na ditaburkan pada 20 ml air panas (20 kali berat CMC-Na) hingga mengembang, kemudian diaduk kuat hingga terbentuk massa yang kental. Tambahkan dengan aquades hingga volume 100 ml. Kemudian sebanyak 500 mg dari ekstrak metanol daun Kayu kuning dilarutkan dalam 20 ml CMC-Na untuk mendapatkan konsentrasi 250mg/kgBB, 1000mg ekstrak dalam 20 mL untuk konsentrasi 500mg/kgBB, dan 1500mg ekstrak dalam 20 mL untuk konsentrasi 750mg/kgBB.

3.7.6. Pembuatan Suspensi Simvastatin (kontrol positif)

Sebanyak 18 mg simvastatin disuspensikan dalam CMC Na 1% kemudian ditambahkan akuades sampai volume 100 mL. Suspensi simvastatin ini diberikan pada kelompok kontrol positif dengan dosis 1,8 mg/kgBB.

3.7.7. Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dilakukan, disiapkan tempat pemeliharaan hewan coba berupa kandang (bak plastik) berbentuk segi empat diberi alas sekam dan dilengkapi tempat minum tikus. Bak plastik berukuran 30 x 40 cm tersebut disekat menjadi dua bagian (1 bak untuk 2 ekor tikus). Sebanyak 24 ekor tikus jantan (*Rattus norvegicus*)

galur Wistar diadaptasikan selama satu minggu dengan diberi pakan standar dan air minum *ad libitum*. Kemudian tikus dibagi secara acak menjadi enam kelompok perlakuan (masing-masing kelompok sebanyak 4 ekor tikus). Tikus ditimbang dan diberi tanda pengenal pada bagian ekor. Setelah itu dicek kadar lipid awal sebelum diberi perlakuan.

3.7.8. Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Coba

Sebanyak lima kelompok tikus diinduksi hiperlipidemia dengan cara diberikan 30 mL larutan fruktosa 27,5% melalui air minum dan diet tinggi lemak tidak kurang dari 15 gram per ekor tikus per hari. Sedangkan satu kelompok tikus diberi 15 gram pakan standar per ekor tikus per hari dan air minum biasa. Perlakuan tersebut diberikan selama 45 hari kemudian dilakukan pengukuran kadar lipid darah. Pengukuran berat badan tikus dilakukan satu minggu sekali untuk melihat adanya kenaikan berat badan yang berpengaruh pada volume pemberian.

Pada hari ke 46 hingga 52, masing-masing kelompok hewan coba diberi perlakuan sebagai berikut.

Kelompok I ($P_{(-)}$) : kelompok kontrol negatif yang diberi pakan tinggi lemak dan air minum fruktosa 27,5% kemudian diberi suspensi CMC Na 1% per oral sekali sehari.

Kelompok II ($P_{(+)}$) : kelompok kontrol positif yang diberi pakan tinggi lemak dan air minum fruktosa 27,5% kemudian diberi perlakuan simvastatin dengan dosis 1,8 mg/kgBB tikus per oral sekali sehari.

Kelompok III ($P_{(N)}$) : kelompok kontrol normal yang diberi pakan standar dan air minum biasa kemudian diberi suspensi CMC Na 1% per oral sekali sehari.

Kelompok IV ($P_{(1)}$) : kelompok perlakuan yang diberi pakan tinggi lemak dan air minum fruktosa 27,5% kemudian diberi suspensi ekstrak metanol daun *A. flava* 250 mg/kg BB per oral sekali sehari.

Kelompok V (P₍₂₎) : kelompok perlakuan yang diberi pakan tinggi lemak dan air minum fruktosa 27,5% kemudian diberi suspensi ekstrak metanol daun *A. flava* 500 mg/kg BB per oral sekali sehari.

Kelompok VI (P₍₃₎) : kelompok perlakuan yang diberi pakan tinggi lemak dan air minum fruktosa 27,5% kemudian diberi suspensi ekstrak metanol daun *A. flava* 500 mg/kg BB per oral sekali sehari.

Pada hari ke-53, tikus-tikus tersebut dikorbankan dengan cara dibius menggunakan kloroform kemudian dibedah. Organ aorta diambil dan dimasukkan ke dalam larutan *neutral buffer formalin* 10% untuk dibuat preparat histopatologi organ. Organ aorta yang diambil sepanjang ± 5 cm mulai dari katup aorta/keluarnya aorta dari jantung (*aorta ascendens*) hingga akhir dari lengkung aorta (*arcus aorta transversalis*) sebelum aorta torasika descendens.

3.7.9. Pemeriksaan kadar LDL

Prinsip pengujian LDL kolesterol ini adalah presipitasi LDL oleh heparin pada titik isoelektrik (pH 5,12). Setelah sentrifugasi, HDL dan VLDL tetap ada dalam supernatan dan dapat ditentukan secara enzimatis. Pengujian diawali dengan prosedur presipitasi, yaitu mencampurkan 10 μ l serum sampel dengan 100 μ l reagen LDL, dibiarkan 10 menit pada suhu 25°C, disentrifus 15 menit 4000 rpm kemudian dipisahkan supernatannya. Sebanyak 50 μ l supernatan yang diperoleh ditambah dengan 500 μ l reagen kolesterol. Selain itu dibuat juga blanko reagen dengan mencampurkan 50 μ l aquabides dan 500 μ l reagen kolesterol. Masing-masing dicampur hingga homogen, diinkubasi selama 5 menit suhu 37°C atau 10 menit suhu 25°C dan diukur kadarnya (mg/dl) dengan menggunakan *Biolzyer 100TM*.

3.7.10. Pemeriksaan kadar HDL

Pemeriksaan kadar HDL-kolesterol menggunakan metode *HDL-Cholesterol Precipitation Reagent* dengan prinsip bahwa kilomikron, VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) dan LDL (*Low Density Lipoprotein*) dipresipitaskan dengan

penambahan asam fosfotungstat dan magnesium klorida. Setelah disentrifugasi, cairan supernatan mengandung fraksi HDL (*High Density Lipoprotein*) yang ditentukan secara enzimatis.

Pengujian diawali dengan prosedur presipitasi makro yaitu dengan mencampurkan 50 µl serum sampel dengan 100 µl reagen HDL dalam tabung, didiamkan 10 menit pada suhu 25°C kemudian disentrifus selama 10 menit 4000 rpm dan dipisahkan supernatannya. Supernatan yang diperoleh kemudian ditambahkan dengan reagen kolesterol (50 µl supernatan ditambah dengan 500 µl reagen kolesterol). Selain itu dibuat juga blanko reagen dengan mencampurkan 50 µl aquabides dan 500 µl reagen kolesterol. Masing-masing dicampur hingga homogen, diinkubasi selama 5 menit suhu 37°C dan diukur kadarnya (mg/dl) dengan menggunakan *Biolyzer 100TM*.

3.7.11. Perhitungan nilai indeks aterogenik

Nilai indeks aterogenik merupakan rasio antara LDL dan HDL. Peningkatan nilai ini merupakan parameter prediktif aterosklerosis dan PJK (Paulina, 2015). Indeks aterogenik dapat dihitung dengan rumus berikut.

$$\text{Indeks aterogenik} = \frac{\text{kadar LDL (mg/dl)}}{\text{kadar HDL (mg/dl)}}$$

3.7.12. Pembuatan Larutan *Neutral Buffer Formalin* 10%

Larutan *Neutral Buffer Formalin* 10% dibuat dengan cara mencampurkan bahan-bahan sesuai tabel 3.2.

Tabel 3.2. Komposisi Larutan *Neutral Buffer Formalin* 10%

Bahan	Jumlah
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	4,0 gram
Na ₂ HP04 . 2H ₂ O	6,5 gram
Formaldehyde (37%-40%.)	100 mL
Akuades	Ad 1000 mL

Sumber: Muntiha (2011)

Formaldehid dicampur dengan akuades hingga terbentuk larutan formalin 10%. Bahan berbentuk serbuk dilarutkan terlebih dahulu dengan larutan formalin 10%. Semua bahan tersebut dicampur ad homogen dan dicek ad pH 7,0.

3.7.13. Pemeriksaan Histopatologi Organ Tikus

Pemeriksaan histopatologi aorta tikus terdiri dari beberapa proses, yaitu pembuatan preparat / irisan jaringan, pewarnaan, dan pengamatan dengan mikroskop.

- a. Dehidrasi organ dilakukan dengan memasukkan organ ke dalam alkohol dengan konsentrasi 70%, 80%, 95%, alkohol absolut I, II, III, masing-masing selama 2 jam. Dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan nantinya dapat diisi dengan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini perlu dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat.
- b. Selanjutnya dilakukan proses *clearing* dengan memasukkan organ ke dalam xylol I dan II masing-masing selama 1 jam, dan xylol III selama 2 jam.
- c. Proses pembedahan (*impregnasi*) yaitu dengan memasukkan organ ke dalam parafin solid I, kemudian dimasukkan ke dalam oven suhu 60°C selama 2 jam dan diulangi lagi dengan parafin II pada suhu dan waktu yang sama. Pembedahan (*impregnasi*) bertujuan untuk mengeluarkan cairan pembedahan dari jaringan dan diganti dengan parafin. Hal ini karena sisa cairan pembedahan dapat mengkristal dan sewaktu dipotong dengan mikrotom akan menyebabkan jaringan menjadi mudah robek.
- d. Proses dilanjutkan dengan penempelan organ ke dalam paraffin (*embedding*) dan *blocking*. Pengecoran (*blocking*) adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom. Proses *embedding* dan *blocking* dilakukan dengan menyiapkan *base mould* pada suhu 60 ° C. Kaset *for tissue* disiapkan pada suhu 60° C kemudian kran parafin dispenser ditekan pada *base mould* sampai volumenya cukup. Spesimen dimasukkan ke dasar *base mould*

dengan menggunakan pinset. Kaset diletakkan diatas *base mould* yang sudah terisi jaringan/spesimen. *Base mould* yang sudah terisi diletakkan pada *Cold plate*. Tunggu 2-4 menit dan base mould akan berbunyi thik. Kaset dilepaskan dari base mould. Blok parafin siap untuk dipotong/disayat.

- e. Proses pemotongan dimulai dengan menyiapkan blok paraffin yang akan dipotong pada Cold plate. Kemudian alat *Tissue Rotation Bath* yang berisi air disiapkan pada suhu 43°C dan *Hot plate* pada suhu 60°C. *Object glass* disiapkan sesuai label specimen yang akan dipotong. Ketebalan sayatan dan sudut pisau pada Rotary Microtome diatur sesuai kebutuhan. Pisau *disposable* dipasang pada *holder blade* Microtome. Bloks paraffin diletakkan pada alat pemegang blocks paraffin Microtome lalu dilakukan *trimming* pada bloks paraffin yang disayat. Selanjutnya dilakukan penyayatan boks paraffin beberapa kali. Sayatan yang diperoleh diambil dan diletakkan pada *Tissue Flotation Bath*. Sebanyak 1-2 sayatan yang sudah mengembang baik diambil dan diletakkan pada Object glass yang sesuai labelnya. *Object glass* yang berisi sayatan jaringan diletakkan pada Hot Plate selama 15 menit. Preparat histopatologi siap dilakukan pewarnaan.
- f. Pewarnaan dimulai dengan proses *dewax*, bilas dengan air.
- g. Preparat diwarnai dengan pewarna Mayer selama 10 menit, bilas dengan air selama 5 menit kemudian dimasukkan ke dalam *acid Fuchsin* selama 30 detik, bilas dengan air. Proses berikutnya, preparat dimasukkan ke dalam *phospomolibdic acid* selama 5 menit, keringkan dengan tissue Kemudian preparat dimasukkan ke dalam *Methyl green/blue* selama 30 detik (maksimal 2 menit), bilas. Selanjutnya preparat dimasukkan ke dalam asam asetat 1% selama 5 menit, bilas dengan air.
- h. Preparat dikeringkan dengan hotplate.
- i. Proses terakhir adalah *mounting* yaitu penutupan gelas obyek dengan gelas penutup yang sebelumnya telah ditetesi menggunakan entellan atau kanada balsem.

3.7.14. Penghitungan Sel Busa

Tehnik pemeriksaan dan penghitungan jumlah sel busa adalah dengan melakukan pemeriksaan dengan mikroskop pembesaran 400X (okuler 10X, obyektif 40X). Selanjutnya menghitung semua sel busa di tunika intima dan tunika media aorta secara membuta (*blinded*).

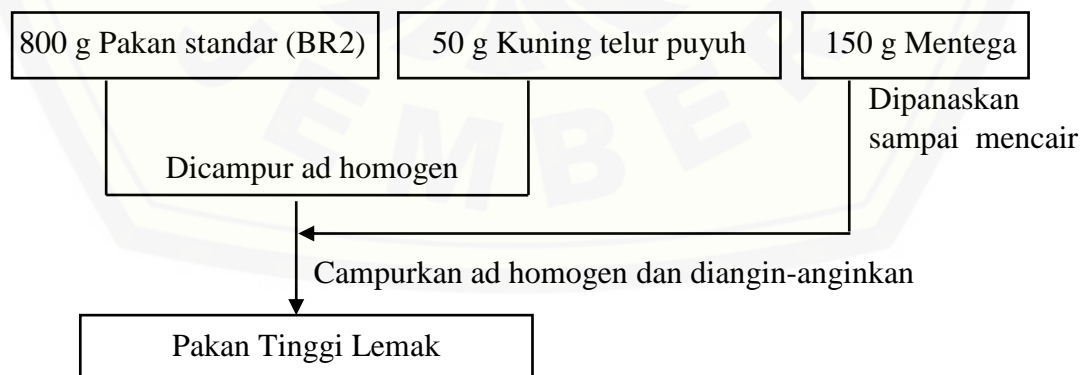
3.8. Analisis Data

Analisis data hasil penelitian menggunakan analisis deskriptif dan analisis inferensial dengan program *SPSS*. Analisa statistik deskriptif dilakukan dengan cara data kadar LDL, kadar HDL, indeks aterogenik plasma, dan jumlah sel busa yang diukur dari masing-masing kelompok dideskripsikan dalam bentuk tabel.

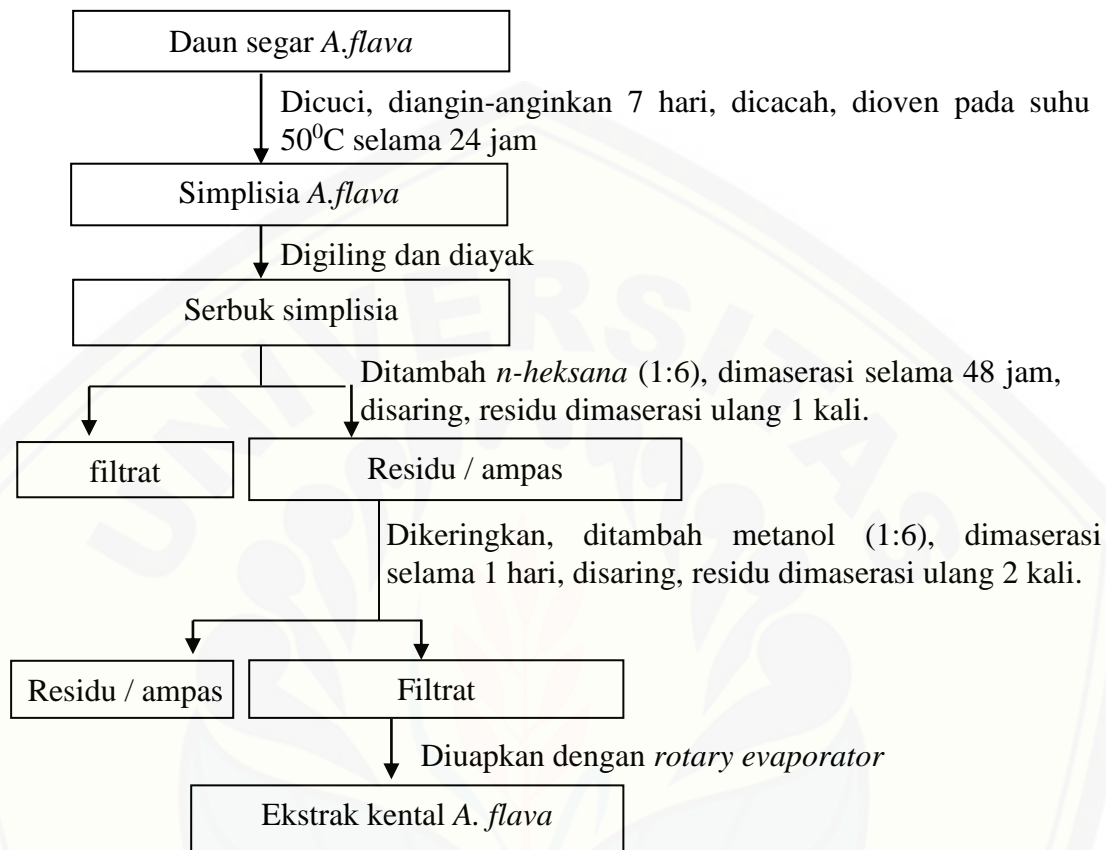
Data kadar LDL, kadar HDL, indeks aterogenik plasma, dan jumlah sel busa kemudian diuji dengan metode statistik inferensial. Normalitas diuji menggunakan metode Shapiro-Wilk ($n < 50$). Jika distribusi data normal dan homogen maka digunakan metode Anova satu arah kemudian dilakukan uji LSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Jika distribusi data tidak normal maka dilakukan uji nonparametrik Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji Mann Whitney U.

3.9. Alur Penelitian

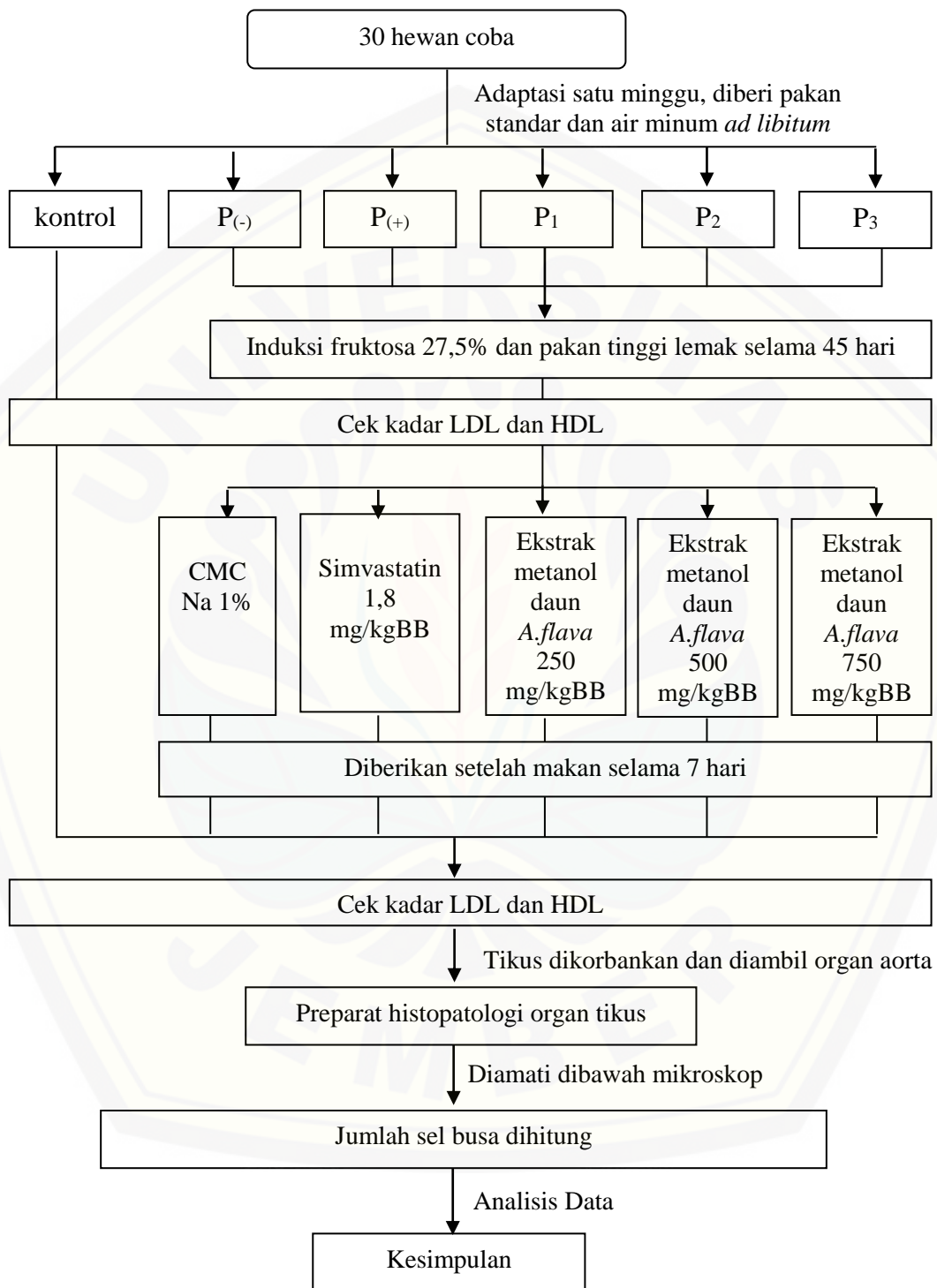
3.9.1. Skema Pembuatan Pakan Tinggi Lemak untuk 1Kg Pakan



Gambar 3.2 Skema pembuatan pakan tinggi lemak

3.9.2. Skema Pembuatan Ekstrak Metanol Daun *A.flava*Gambar 3.3 Skema pembuatan ekstrak metanol *A. flava*

3.9.3. Skema Perlakuan Hewan Coba



Gambar 3. 4 Alur perlakuan hewan coba