

**Kadar Kolesterol Darah Dan Ekspresi VCAM-1 Pada Endotel
Aorta Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L) Hiperkolesterolemik
Setelah Perlakuan VCO**

**Marti Harini
S.900905001**

Pascasarjana Program Studi Biosains

Universitas Sebelas Maret

Surakarta

2009

ABSTRAK

Marti Harini. 2007. KADAR KOLESTEROL DARAH DAN EKSPRESI VCAM-1 PADA ENDOTEL AORTA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus* L) SETELAH PERLAKUAN VCO. 1. Prof. Drs. Sutarno, M.Sc., Ph.D. 2. Dr. Okid Parama Astirin M.S. Program Studi Biosains, Program Pascasarjana. Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Penyakit jantung koroner merupakan penyakit kardiovaskuler yang utama pada usia produktif yang erat kaitannya dengan aterosklerosis. Aterosklerosis yaitu pengerasan arteri yang disebabkan akumulasi kolesterol dalam pembuluh darah. Hiperkolesterolemia merupakan faktor resiko utama bagi terbentuknya aterosklerosis. Upaya untuk menurunkan kadar kolesterol dalam darah dapat dilakukan dengan menggunakan obat tradisional, antara lain VCO. *Virgin Coconut Oil* merupakan minyak kelapa murni tanpa pemanasan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan VCO terhadap kadar kolesterol darah dan mengetahui ekspresi VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) pada sel endotel aorta tikus putih (*R. norvegicus* L.) hiperkolesterolemik yang merupakan tanda awal terjadinya aterosklerosis.

Penelitian ini menggunakan 25 tikus putih (*R. norvegicus* L) jantan galur Wistar yang dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu: kontrol, simvastatin (1,3 ml/270gr BB), kolesterol (lemak babi 9:1), VCO 1 (1ml/270gr BB), dan VCO 2 (1,3 ml/270gr BB). Perlakuan diberikan secara oral. Kadar kolesterol total, kadar LDL dan kadar HDL diukur pada hari ke 1, ke 14 dan hari ke 28. Pada akhir perlakuan semua kelompok tikus dikorbankan dan dibuat preparat mikroanatomi aorta dengan pengecatan imunohistokimia dengan VCAM-1 sebagai *marker*. Data kadar kolesterol (kolesterol total, LDL dan HDL) dianalisis dengan Ancova dan dilanjutkan dengan uji *contrast* pada taraf signifikansi 5%. Data persentase ekspresi VCAM-1 pada endotel dianalisis dengan Anava dilanjutkan dengan Duncan's pada taraf signifikansi 5%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan VCO pada berbagai dosis berpengaruh nyata terhadap penurunan kadar kolesterol total darah, kadar LDL darah dan peningkatan kadar HDL darah serta mampu menurunkan ekspresi VCAM-1 pada endotel aorta tikus putih (*R. norvegicus* L) hiperkolesterolemik.

Kata kunci: kolesterol, aterosklerosis, VCO, VCAM-1

BAB I

PENDAHULUAN

A.Latar Belakang Masalah

Penyakit kardiovaskuler (PKV) merupakan penyakit degeneratif yang paling sering terjadi dan menjadi pembunuh utama di Negara-negara industri. Di Indonesia, hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga Nasional (SKRT) 1992 menyebutkan, PKV mulai menempati urutan pertama sebagai penyebab kematian untuk usia diatas 40 tahun (Penyakit kardiovaskuler yang utama pada usia produktif adalah penyakit jantung koroner (PJK) yang erat kaitannya dengan aterosklerosis (Kalim, dkk., 1996). Aterosklerosis adalah pengerasan arteri yang disebabkan akumulasi kolesterol dalam pembuluh darah akibat tidak imbangnya influks- efluks kolesterol (Prabowo, dkk, 1995). Hiperkolesterolemia merupakan faktor resiko utama bagi terbentuknya aterosklerosis yang mendasari PJK (Marinetti 1990 dalam Wresdiyati,2006).

Terjadinya PKV dapat dikurangi dengan menurunkan pembentukan aterosklerosis yaitu dengan menurunkan kadar kolesterol dalam darah dan meningkatkan konsentrasi lipoprotein berkerapatan tinggi (*High Density Lipoprotein/ HDL*)(Nogrady, 1992).

Tanda dini aterosklerosis adalah terjadinya *injury* pada dinding pembuluh darah khususnya endotel yang diikuti pengerahan limfosit dan monosit, pembentukan makrofag, deposisi lipid, proliferasi otot polos dan sintesis matriks ekstraseluler. *Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM-1)* merupakan molekul

adhesi yang bereksresi pada sel endotel pembuluh darah yang dapat mengikat monosit dan limfosit. Ekspresi VCAM-1 pada endotel dapat diketahui dengan teknik pewarnaan Imunohistokimia (Li *et al*, 1993).

Berbagai upaya untuk menurunkan kadar kolesterol dalam darah dapat dilakukan dengan menggunakan obat kimiawi yang mengandung senyawa atau agensia penurun lipid maupun obat tradisional. Terapi dengan obat tradisional dirasakan lebih murah dan dengan prosedur lebih mudah dibandingkan dengan obat kimiawi sintetik.

Virgin Coconut Oil (VCO) atau minyak kelapa murni merupakan minyak kelapa yang dihasilkan dari santan buah kelapa segar tanpa pemanasan dan tanpa penambahan bahan apapun. Minyak kelapa murni ini mengandung 100% lemak yang terdiri atas 92% asam lemak jenuh, 6% asam lemak tak jenuh tunggal, dan 2% asam lemak tak jenuh ganda. Asam lemak jenuh pada VCO terdiri atas 90% asam lemak rantai sedang dan 10% asam lemak rantai panjang. Asam lemak rantai sedang pada VCO didominasi oleh asam laurat (C12) yaitu 45-55%. Di dalam tubuh asam lemak jenuh rantai sedang ini dipecah dan digunakan untuk memproduksi energi dan jarang disimpan sebagai lemak tubuh atau menumpuk dalam pembuluh darah. Asam lemak ini dengan mudah dapat diserap dan dengan cepat dibakar dan digunakan sebagai energi untuk metabolisme sehingga meningkatkan aktivitas metabolik, sehingga dapat membantu melindungi tubuh dari penyakit dan mempercepat penyembuhan. (Enig,2001)

Secara empiris VCO diketahui bermanfaat bagi kesehatan tubuh. Mengonsumsi VCO setiap hari antara lain dapat meningkatkan kekebalan tubuh, mencegah penyakit akibat infeksi bakteri, jamur dan virus, membantu

mengatasi obesitas, mencegah penyakit jantung, aterosklerosis, mengatasi kolesterol, diabetes dan kanker.

Sejauh ini belum ada dasar yang kuat dan bukti ilmiah yang diketahui tentang potensi *VCO* sebagai agen anti kolesterolemik dan anti aterosklerosis. Berdasar kenyataan tersebut, peneliti ingin mengetahui pengaruh *VCO* terhadap kadar kolesterol darah dan ekspresi *VCAM-1* sebagai model indikator adesi monosit dan limfosit pada endotel aorta tikus putih hiperkolesterolemik yang merupakan tanda dini terjadinya aterosklerosis.

B. Perumusan Masalah

1. Bagaimana kadar kolesterol darah tikus putih hiperkolesterolemik setelah perlakuan *VCO* ?.
2. Bagaimanakah ekspresi *VCAM-1* pada sel endotel aorta tikus putih hiperkolesterolemik setelah perlakuan *VCO* ?.

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Menguji pengaruh perlakuan *VCO* terhadap kadar kolesterol darah tikus putih hiperkolesterolemik
2. Menguji pengaruh perlakuan *VCO* terhadap ekspresi *VCAM-1* pada sel endotel aorta tikus putih hiperkolesterolemik

D. Manfaat Penelitian

Manfaat yang ingin diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan bukti ilmiah mengenai potensi *VCO* sebagai antikolesterol dan anti aterosklerosis
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah untuk digunakan dalam pengembangan penelitian lebih lanjut tentang potensi *VCO* dan penggunaannya pada masyarakat sebagai terapi yang rasional.

BAB II

LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

1. Virgin Coconut Oil (VCO)

Minyak *virgin* merupakan minyak nabati yang diperoleh dari pengolahan daging buah kelapa (*Cocos nucifera*) segar melalui fermentasi, pemancingan ataupun sentrifugasi, tanpa melalui pemanasan dengan temperatur yang tinggi. *Virgin Coconut Oil* tidak dihasilkan melalui proses kimia *refining* (penambahan bahan kimia untuk memurnikan), *deodorizing* (menghilangkan aroma yang kurang sedap) dan *bleaching* (memutihkan). Minyak kelapa murni tidak mudah tengik karena kandungan asam lemak jenuhnya tinggi sehingga proses oksidasi tidak mudah terjadi. Secara fisik *VCO* berwarna jernih seperti kristal (Setiaji, dkk., 2006). *Virgin Coconut Oil* mengandung 92% asam lemak jenuh (*saturated fatty acid*), 6% asam lemak tak jenuh tunggal (*monounsaturated fatty acid*), dan 2% asam lemak tak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acid*). Tingginya asam lemak jenuh yang dikandungnya menyebabkan minyak kelapa tahan terhadap ketengikan akibat oksidasi. Oksidasi menyebabkan pembentukan radikal bebas yang berbahaya bagi tubuh. Asam lemak jenuh pada *VCO* terdiri atas 90% asam lemak rantai sedang (C6-C12) dan 10% rantai panjang (C14-24). Asam lemak rantai sedang didominasi oleh asam laurat (C12) yaitu 44%-55%, sedang asam lemak rantai panjang didominasi oleh asam miristat (C14) yaitu 13%-19%. (Syah, 2005).

Asam lemak rantai sedang (MCFA/*Medium Chain Fatty Acid*) yang biasa disebut MCT (*Medium Chain Triglyceride*) yang dikandung dalam minyak kelapa, setelah dikonsumsi, akan sampai ke dalam saluran pencernaan dan karena ukuran molekulnya yang kecil dapat segera diserap melalui dinding usus tanpa harus melalui proses hidrolisis dan enzimatis. Asam lemak ini akan langsung dibawa aliran darah melalui vena dan dibawa ke organ hati untuk dimetabolisasi. Di dalam hati minyak kelapa ini diproses untuk memproduksi energi dan tidak ditimbun sebagai lemak di dalam jaringan tubuh. Energi yang dihasilkan digunakan untuk meningkatkan fungsi semua kelenjar endokrin, organ dan jaringan tubuh. Asam laurat setelah masuk ke dalam tubuh akan diubah menjadi monolaurin, berperan menaikkan metabolisme dan mempermudah proses pencernaan lemak-lemak yang ditemukan dalam minyak dari sumber lain. Hal ini disebabkan karena lemak tersebut diproses secara langsung dalam hati dan diubah menjadi energi (Enig,2001; Eraly, 1994).

Penelitian yang dilakukan oleh Nevin (2004), pada binatang percobaan tikus Sprague-Dawley yang diberi diet VCO, menunjukkan kadar kolesterol total darah, trigliserida, pospolipid dan LDL (*low density lipoprotein*) yang rendah, HDL (*high density lipoprotein*) meningkat. Fraksi polypenol dari VCO juga ditemukan untuk mencegah oksidasi LDL *invitro*. Kolesterol teroksidasi merupakan awal dari proses aterosklerosis. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa asam laurat dan monolaurin merupakan agent antivirus dan antimicrobial yang bisa menghentikan pertumbuhan virus dan bakteri yang berbahaya. Menurut Fife (2003), VCO mampu memperbaiki sekresi insulin dan pemanfaatan glukosa darah, juga mampu membakar kalori lebih banyak sehingga menurunkan berat badan. Studi epidemiologis menunjukkan bahwa penduduk Polynesia,

Indonesia, Srilangka, India, Filipina yang sering mengkonsumsi minyak kelapa mempunyai serum kolesterol yang rendah dan mempunyai angka kesakitan dan kematian yang rendah terhadap penyakit jantung koroner.(Dayrit, 2003)

2. Simvastatin

Simvastatin termasuk golongan statin, merupakan obat penurun kadar kolesterol (agen hipokolesterolemia) dan dihasilkan dari fermentasi *Aspergillus terreus*. Mekanismenya dalam menurunkan kadar kolesterol adalah dengan menghambat 3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl Co-enzym A Reduktase (HMG Co-A Reduktase), yang merupakan enzim yang mengkatalisis HMG Co-A menjadi asam mevalonik. Cara kerjanya adalah menghambat pembentukan kolesterol di hati dan meningkatkan pembuangan LDL dari aliran darah (Kalbe Farma, 2004). Hasil uji klinik menunjukkan bahwa Simvastatin dapat mengurangi konsentrasi kolesterol total plasma, konsentrasi kolesterol LDL dan konsentrasi kolesterol VLDL dan dapat meningkatkan kolesterol HDL dan mengurangi trigliserida plasma.

Dosis yang dianjurkan untuk manusia adalah 5-10 mg tiap hari, untuk hiperkolesterolemia medium dianjurkan mengkonsumsi simvastatin 5 mg tiap hari, dan dosis maksimum yang dianjurkan adalah 40 mg tiap hari (Kalbe Farma, 2004).

3.Lemak

Lemak terdapat dalam semua bagian tubuh manusia. Selain sebagai pelarut vitamin A, D, E, K, lemak berperan sebagai cadangan energi, komponen

struktural membran sel, pelindung dan transportasi molekul. Trigliserida dan asam lemak adalah senyawa yang penting dalam metabolisme lemak. Dua golongan lemak tersebut diperoleh dari makanan. Dua golongan lemak lainnya, fosfolipid dan kolesterol ester, dalam saluran pencernaan mengalami hidrolisis menjadi sejumlah monofosfolipida. Hasil pemecahan diserap usus dan masuk sistem sirkulasi. Lemak diserap oleh usus dalam bentuk kilomikron (Wirahadikusumah, 1985). Kilomikron bertanggung jawab atas pengangkutan lemak dari usus ke hati, sedang dari hati ke jaringan lain dilakukan oleh lipoprotein.

Lipoprotein adalah molekul yang terdiri dari protein dan lipid yang digabungkan dengan ikatan non kovalen yaitu interaksi hidrofob antara bagian (gugus) non polar dari lipid dengan molekul protein. Kolesterol dan lipid tersebut dilarutkan melalui interaksi dengan lipoprotein dalam mukosa usus membentuk kilomikron, kemudian masuk dalam pembuluh limfatik, lalu memasuki aliran darah melalui saluran toraks (rongga dada).

Berdasarkan kerapatan strukturnya, lipoprotein plasma darah dibagi menjadi lima golongan yaitu,

1. *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL): trigliserida tinggi, kolesterol tinggi, adalah lipoprotein yang disekresi oleh hepar serta mengangkut trigliserida yang dibuat di hepar dan kolesterol yang juga berasal dari hepar, mengandung sekitar 90% lipid.
2. *Low Density Lipoprotein* (LDL): trigliserida sedang, kolesterol tinggi, adalah lipoprotein yang membawa sekitar setengah hingga dua pertiga kolesterol di dalam darah, sering disebut sebagai kolesterol buruk.

3. *High Density Lipoprotein* (HDL): trigliserida dan kolesterol rendah , adalah lipoprotein yang disintesa di hepar dan intestinum dan terdiri atas 50% protein dan 20% kolesterol, sering disebut kolesterol baik.

4. *Very High Density Lipoprotein* (VHDL): tanpa kandungan trigliserida dan kolesterol) (Murray *et al.*, 1996).

4. Kolesterol

Kolesterol terdapat dalam diet semua orang dan dapat diabsorpsi dengan lambat dari saluran pencernaan masuk kedalam limfe usus. Kolesterol sangat larut dalam lemak, tetapi hanya sedikit larut dalam air, dan mampu membentuk ester dengan asam lemak. Lebih kurang 70% kolesterol plasma berada dalam bentuk ester kolesterol (Guyton, 1991). Kolesterol yang diperoleh dari diet disebut kolesterol eksogen, sedang kolesterol endogen disintesis di dalam tubuh. Sintesis kolesterol terbanyak terjadi di hepar dan sedikit di usus.

Fungsi kolesterol adalah mengatur proses kimiawi di dalam tubuh. Kolesterol di dalam tubuh digunakan untuk menyusun membran sel, membuat hormon seks, hormon korteks adrenal, vitamin D dan garam empedu, sehingga kolesterol merupakan lemak yang sangat penting bagi tubuh. Kolesterol adalah hasil metabolisme hewan sehingga terdapat dalam segala makanan yang berasal dari hewan seperti kuning telur, daging, hati dan otak (Murray *et al.*, 1999).Kolesterol merupakan unsur utama pembentuk asam empedu.

Kolesterol tinggi adalah faktor resiko utama penyebab penyakit jantung. Kolesterol yang memiliki hubungan erat terhadap terjadinya aterosklerosis adalah kolesterol-HDL dan kolesterol- LDL (Ganong, 1980). Kadar kolesterol HDL yang

rendah diketahui dapat menghambat progresi aterosklerosis. Karena molekulnya yang relative kecil dibandingkan dengan lipoprotein lain, HDL dapat melewati sel-sel endotel vaskuler dan masuk ke dalam intima untuk mengangkut kembali kolesterol yang terkumpul dalam makrofag, disamping HDL juga mempunyai sifat antioksidan, sehingga dapat mencegah terjadinya oksidasi LDL (Moeliandari dan Wijaya, 2002).

Menurut Japardi (2002), LDL yang bersifat aterogenik adalah LDL teroksidasi (ox-LDL). Fungsi utama LDL adalah mengangkut asam lemak tak jenuh, vitamin yang larut dalam lemak dan kolesterol yang membutuhkannya. Selama perjalanannya, LDL mengalami oksidasi dengan hasil metabolik yang bermacam-macam. Jika LDL ada dalam jumlah banyak dalam pembuluh darah, ox LDL ini akan dijumpai dalam jumlah yang banyak pula dalam darah. Oksidasi LDL berbahaya bagi endotel karena akan merangsang pengeluaran molekul adhesi dan zat kemoatraktan sehingga menyebabkan disfungsi endotel. Tubuh manusia memiliki mekanisme perlindungan terhadap oksidasi ini antara lain melalui enzim SOD (*Superoxide Dismutase*), GPx (*Glutathion Peroxidase*) selain juga adanya antioksidan dalam makanan baik berupa vitamin E, flafonoid, alfa tokoferol, beta karoten dan sebagainya.

5. Biosintesis kolesterol

Tubuh memperoleh kolesterol dari dua sumber yaitu makanan dan sintesis *de novo*. Meskipun semua jaringan hewan dapat menjalankan proses

sintesis kolesterol, namun sebagian besar kolesterol disintesis di hati. Menurut Wirahadikusumah (1985), sintesis kolesterol terdiri dari tiga tahap, yaitu:

1. Pembentukan asam mevalonat dari asetat
2. Pembentukan skualin dari asam mevalonat
3. Pembentukan sterol dari skualin

Asam mevalonat terbentuk dari tiga molekul asetil Ko A yang berkondensasi melalui pembentukan senyawa antara B-hidroksi-B-metilglutaril Ko A (HMG-Ko A). Tahap reaksi pertama dikatalis oleh HMG- Ko A sintase. Dua molekul NADPH dipakai sebagai koenzim pada tahap reaksi kedua yang dikatalis oleh HMG-KoA reduktase. Selanjutnya mevalonat diubah menjadi skualin. Pada tahap ini dibutuhkan NADPH sebagai pereduksi. Akhirnya, skualin mengalami konversi menjadi kolesterol dengan bantuan skualin monooksigenase.

6. Metabolisme Kolesterol

Menurut Murray *et al*, (1999), pada manusia dan hewan peningkatan kolesterol terjadi karena :

1. Pengambilan protein yang mengandung kolesterol oleh reseptor misalnya reseptor LDL atau reseptor *scavenger*.
2. Pengambilan kolesterol bebas dari lipoprotein yang kaya kolesterol oleh membran sel.
3. Sintesis kolesterol
4. Hidrolisis ester kolestril oleh enzim ester kolestril hidrolase.

Menurut Montgomery *et al*, (1993), penurunan kadar kolesterol terjadi karena :

1. Aliran keluar kolesterol dari membran sel ke lipoprotein dengan potensial kolesterol yang rendah.
2. Esterifikasi kolesterol oleh enzim ACAT (*Asil Ko-A Kolesterol Asil Transferase*).
3. Penggunaan kolesterol untuk sintesis senyawa steroid yang lain, seperti hormon atau asam empedu dalam hati.

Kolesterol makanan memerlukan waktu beberapa hari untuk mengimbangi kolesterol dalam plasma dan beberapa minggu untuk mengimbangi kolesterol dalam jaringan. Pergantian kolesterol dalam hati berlangsung relatif cepat bila dibanding waktu paruh kolesterol tubuh yang memerlukan waktu beberapa minggu. Kolesterol bebas dalam plasma dan hati akan seimbang dalam waktu beberapa jam karena pertukaran dan pengangkutan kolesterol antar membrane sel, lipoprotein plasma serta membrane eritrosit terjadi dengan mudah (Montgomery *et al.*, 1999).

Ester kolestril dalam makanan akan dihidrolisis menjadi kolesterol bebas, yang kemudian bercampur dengan kolesterol bebas dalam makanan dan kolesterol empedu sebelum diserap usus bersama unsur lipid yang lain. Senyawa ini bercampur dengan kolesterol yang disintesis dalam usus dan kemudian disatukan dalam kilomikron. Dari kolesterol yang diserap, 80-90% akan mengalami esterifikasi dengan asam lemak rantai panjang dalam mukosa usus (Murray *et al.*, 1999).

7. Aterosklerosis

Aterosklerosis adalah pengerasan arteri yang disebabkan akumulasi kolesterol dalam pembuluh darah akibat tidak seimbang influs- efluks kolesterol (Prabowo, dkk., 1995). Menurut Stein (1994), aterosklerosis merupakan gangguan yang mendasari penyakit kardiovaskuler yang merupakan penyakit yang paling sering menjadi penyebab kematian di Negara berkembang. Hiperkolesterolemia merupakan faktor resiko utama bagi terbentuknya aterosklerosis.

Penyakit aterosklerosis ditandai dengan penumpukan kolesterol dan ester kolesteril dari lipoprotein yang mengandung ApoB 100 dalam jaringan ikat dinding arteri, sehingga terjadi penyempitan pembuluh darah. Penyakit dengan kenaikan kadar VLDL, IDL atau LDL dalam darah yang berlangsung lama misalnya pada penderita DM dan berbagai keadaan hiperlipidemia lain sering disertai aterosklerosis (Baraas, 1999).

Aterosklerosis dapat mengenai semua pembuluh darah sedang dan besar, namun yang paling sering adalah aorta, pembuluh koroner dan pembuluh darah otak. Proses aterosklerosis dimulai sejak usia muda berjalan perlahan dan jika tidak terdapat faktor resiko yang mempercepat proses ini misalnya *Diabetes mellitus*, merokok, hipertensi, hiperlipidemia, proses ini tidak akan muncul sebagai penyakit sampai usia pertengahan atau lebih (Japardi, 2002). Lesi utamanya berbentuk plak menonjol pada tunika intima yang mempunyai inti berupa lemak (terutama kolesterol & ester kolesterol) dan ditutupi oleh *fibrous cap*. Kolesterol merupakan komponen utama dalam plak aterosklerosis. Jenis kolesterol yang paling berhubungan dengan aterosklerosis adalah LDL

(kolesterol jahat), sedangkan HDL bersifat protektif terhadap aterosklerosis karena HDL berfungsi memfasilitasi pembuangan kolesterol (kolesterol baik).

Tanda dini aterosklerosis yang sering terlihat sebelum terjadi perubahan struktur dinding vaskuler adalah disfungsi dan atau *injury* vaskuler khususnya endotel, diikuti dengan pengerahan limfosit, pembentukan makrofag, deposisi lipid, proliferasi otot polos melalui aktivitas faktor mitogenik dan sintesis matriks ekstraseluler. Disfungsi endotel dapat disebabkan oleh rangsangan patofisiologik seperti dislipidemia, DM, merokok dan infeksi mikroorganisme. Pada keadaan hiperkolesterolemia terdapat peningkatan mobilisasi monosit. Monosit ini melekat pada endotel secara sitoplasmik (Prabowo, 1995). Monosit yang menempel pada sel endotel ini kemudian menyusup di antara sel endotel dan mengambil tempat di daerah sub endotel untuk kemudian berubah menjadi *scavenger cell* dan berubah bentuk menjadi makrofag. Makrofag berfungsi menelan dan membersihkan lemak terutama LDL yang sudah teroksidasi melalui reseptor khusus yang disebut reseptor *scavenger*. Sel *scavenger* ini kemudian menjadi sel busa (*foam cell*) yang merupakan awal dari *fatty streak* (Japardi, 2002). Berkumpulnya makrofag di daerah sub intima menyebabkan kerusakan endotel bertambah. Sel-sel ini menghasilkan dan mensekresikan zat yang bersifat toksik dan juga metabolit yang bersifat oksidatif seperti LDL teroksidasi dan anion superoksida. Semua ini dapat menyebabkan kerusakan / gangguan fungsi endotel bertambah.

Inflamasi berkaitan dengan aterogenesis khususnya melalui aktivasi dan proliferasi makrofag, sel endotel dan sel otot polos pembuluh darah. Inflamasi ditandai dengan dikeluarkannya berbagai protein plasma ke dalam darah, antara lain CRP (C-reaktif protein). Selain CRP, zat lain yang meningkat pada inflamasi

adalah molekul adhesi seperti ICAM-1 (*Intercellulare Adhesion Molecule*) dan VCAM-1. Zat ini merangsang penempelan monosit pada dinding endotel yang merupakan tahap awal aterogenesis.(Russels, 1999). Kadar CRP dan kadar molekul adhesi yang tinggi berkontribusi terhadap terjadinya disfungsi endotel dan penebalan intima- media vascular.

8. VCAM-1

Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM-1) adalah immunoglobulin yang merupakan molekul adesi yang berekspresi pada sel –sel endotel yang mengalami aktivasi (Ley and Yuging, 2001). *Vascular Cell Adhesion Molecule* ini merupakan *marker* untuk aterogenesis, berperan dalam *recruitment* sel-sel inflamasi yaitu merangsang penempelan monosit pada dinding endotel, yang merupakan tahap awal dari aterogenesis pada binatang percobaan maupun manusia. Pada binatang kelinci yang diberi diet aterogenik, dalam waktu 7 hari terjadi peninggian ekspresi molekul adesi (*VCAM-1*) sebelum terjadi adhesi monosit dan penampakan makrofag dalam dinding vaskuler (Li,1993 dalam Tanuwidjojo, 2005). Ekspresi *VCAM-1* pada sel endotel aorta ditunjukkan dengan teknik pewarnaan Imunohistokimia. Sel yang positif akan memberikan warna merah kecoklatan, sedang sel yang negatif sitoplasma tidak berwarna dengan inti berwarna ungu (Li *et al*, 1993).

9. Histologi pembuluh darah

Secara histologis, dinding pembuluh darah terdiri atas tiga lapis berturut-turut dari dalam keluar yaitu tunika intima, tunika media dan tunika adventisia. Bagian tunika intima yang berhubungan dengan lumen pembuluh darah adalah sel endotel. Pada pembuluh darah yang lebih besar, sel-sel endotel ini dilapisi oleh jaringan ikat longgar yang disebut jaringan sub endotel. Tunika media terdiri dari sel-sel otot polos dan jaringan ikat yang tersusun konsentris dikelilingi oleh serabut kolagen dan elastis. Tunika media dipisahkan dari tunika intima oleh suatu membrane elastis yang disebut lamina elastica interna, dan dari tunika adventisia oleh lamina elastica externa. Kedua lamina ini tersusun dari serabut elastis dimana celah antara serabut-serabut tersebut dapat dilewati oleh zat kimia dan sel darah. Tunika adventisia terdiri dari jaringan ikat yang tersusun longitudinal dan mengandung sel-sel lemak, serabut syaraf dan pembuluh darah kecil yang memperdarahi dinding pembuluh darah (*vasa vasorum*)(Junquiera et al, 1997).

Arteri mempunyai dinding yang lebih tebal dibandingkan dengan vena yang setingkat karena memiliki tunika media yang lebih tebal, namun diameter vena pada umumnya lebih besar. (Leeson *et al.*, 1996).

10. Aorta

Arteri besar termasuk aorta, disebut juga arteri elastis. Dindingnya dilapisi oleh sel endotel yang berbentuk pipih hingga poligonal, tunika intima lebih tebal daripada arteri ukuran kecil dan sedang (arteri muskuler). Pada aorta, lapisan sub endotel tersusun oleh serabut-serabut elastis dan kolagen yang tersusun

longitudinal. Di bagian dalam tunika intima terdapat berkas-berkas otot polos . Membrana elastika interna tidak selalu ada. Tunika media terdiri atas membrane elastis yang tersusun konsentris, mengalami perforasi dan disebut membrana fenestrata. Ruang antara membrane elastis mengandung fibroblast, dan otot polos. Tunika adventisiannya merupakan selubung yang tipis mengandung serabut elastis dan kolagen. Membrana elastika eksterna tidak dijumpai.(Junqueira *et al*, 1997).

11. Endotel

Endotel merupakan sel yang melapisi seluruh pembuluh darah. Pada arteri, endotel membentuk selapis sel yang kontinu dan tak terputus dan merupakan barier utama antara elemen darah dengan dinding pembuluh darah. Hubungan antar selnya melalui *tight junction* dan *gap junction*. Transportasi zat melalui mekanisme endositosis.

Sifat-sifat endotel antara lain : selektif permeabel, metabolismenya sangat aktif, dapat membentuk beberapa zat vasoaktif yang bersifat vasodilator seperti prostasiklin maupun yang bersifat vasokonstriktor seperti endotelin. Sel endotel bertumpu pada membran basalis yang tersusun terutama oleh kolagen dan molekul proteoglikan. Zat-zat ini diproduksi sendiri oleh sel endotel dan berfungsi sebagai filter. Pada permukaan endotel terdapat reseptor-reseptor untuk berbagai macam molekul, diantaranya untuk LDL, GF (*Growth Factor*). Kemampuan khusus sel endotel yang berhubungan dengan aterogenesis adalah kemampuan memodifikasi lipoprotein. Lipoprotein densitas rendah (LDL)yang ditangkap oleh reseptor LDL endotel mengalami oksidasi, masuk ke dalam sel

endotel dan diteruskan ke sub intima. Kemudian LDL yang telah teroksidasi tersebut akan ditangkap oleh reseptor khusus di permukaan makrofag yang disebut *scavenger* reseptor, kemudian ditelan oleh makrofag dan membentuk sel busa (*foam cell*). (Japardi, 2002)

Dalam keadaan normal permukaan sel endotel mempunyai sifat anti trombotik sehingga menghambat adesi trombosit. Namun pada saat terjadi inflamasi atau kerusakan sel endotel, sel-sel ini akan mensintesa dan mensekresikan factor-faktor yang bersifat protrombotik. Zat yang dihasilkan pada reaksi inflamasi, merangsang pembentukan dan sekresi zat-zat lain yang akan menarik leukosit yang beredar dalam darah dan mendekati tempat inflamasi seperti interleukin-8, ICAM-1(*Intercelulare Adhesion Molecule*), VCAM-1, yang merupakan regulator pengumpulan sel-sel leukosit ke permukaan pembuluh darah yang mengalami gangguan.

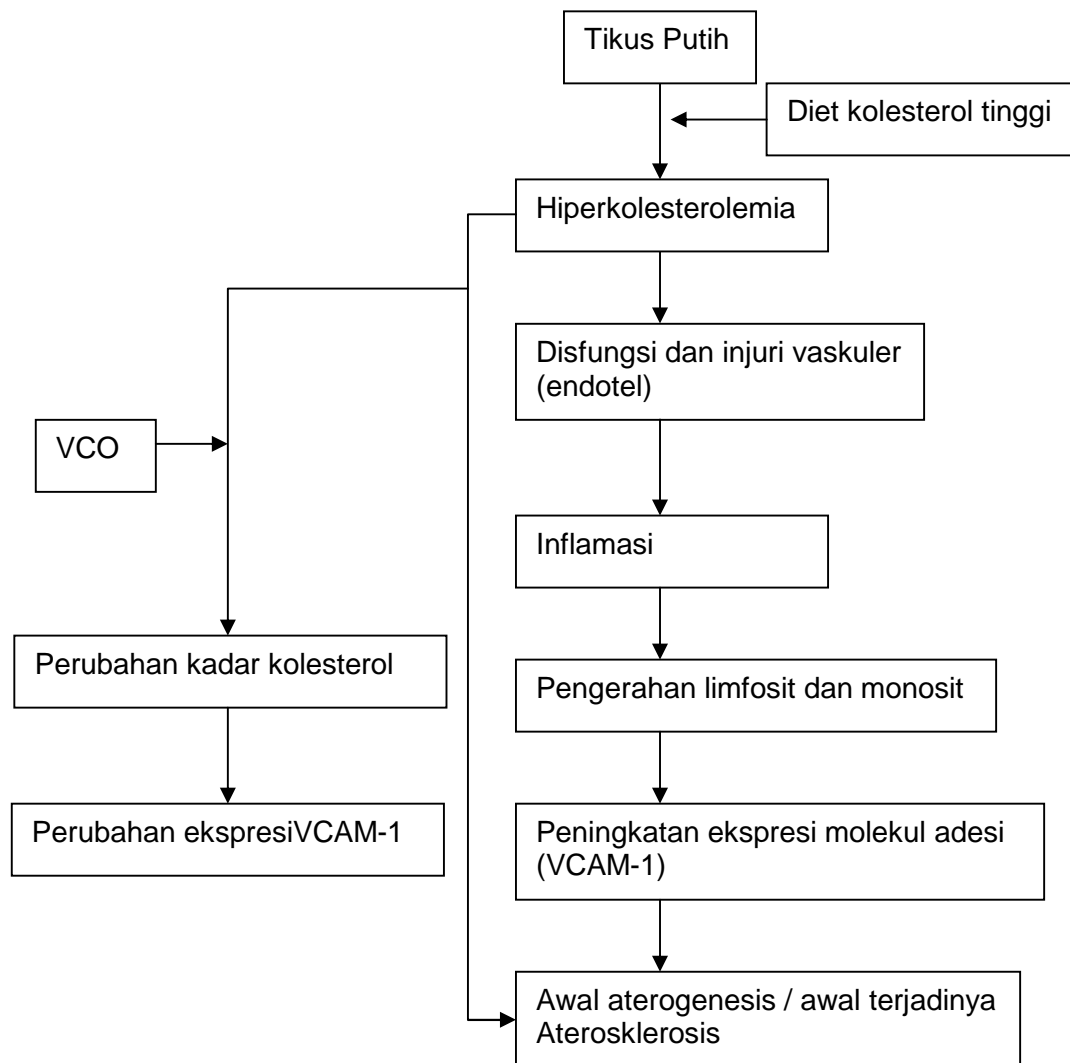
D. Kerangka Pemikiran

Di Indonesia, penyakit kardiovaskuler merupakan penyakit yang menduduki urutan pertama penyebab kematian . Penyakit kardiovaskuler yang utama adalah penyakit jantung koroner yang erat kaitannya dengan aterosklerosis. Hiperkolesterolemia merupakan faktor resiko utama bagi terbentuknya aterosklerosis. Karena itu, diperlukan tindakan preventif dan pengobatan yang efektif untuk menekan resiko penderita.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek hipokolesterolemik Virgin Coconut Oil pada tikus putih hiperkolesterolemik. VCO diperlakukan pada tikus putih yang diinduksi kolesterol tinggi kemudian dilakukan pemeriksaan terhadap

kadar kolesterol darah, dan dilakukan pemeriksaan terhadap ekspresi VCAM-1 pada sel endotel aorta .

Bagan Kerangka Pemikiran :



Gambar 1. Bagan Kerangka Pemikiran

E. Hipotesis

1. Terjadi penurunan kadar kolesterol darah tikus putih hiperkolesterolemik setelah perlakuan *VCO*
2. Terjadi pengurangan ekspresi *VCAM-1* pada sel endotel aorta tikus putih hiperkolesterolemik setelah perlakuan *VCO*

BAB III METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2007- Desember 2007

2. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di LP3HP-LPPT UGM Yogyakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNS.

B. Bahan dan alat

1. Bahan Penelitian

a. Hewan percobaan:

Dalam penelitian ini hewan yang digunakan adalah 25 tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) jantan strain Wistar umur 2 bulan dengan berat badan 250-290 gram yang diperoleh dari LP3HP-LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

b. *Virgin Coconut Oil* dari Pusat Pengolahan Kelapa Terpadu Jogjakarta.

c. Lemak babi dari LP3HP- LPPT Yogyakarta.

d. Simvastatin produksi Kimia Farma.

e. Pakan hewan uji (Pellet)/BR-II.

f. *Antibody Rat anti human VCAM-1*.(Sigma)

g. Reagen untuk pembuatan preparat mikroanatomi :

fiksatif PBS (*Phosphat Buffer Saline*), alkohol, xylol, paraffin. Hematoxylin.

2. Alat Penelitian

a. Alat untuk perlakuan hewan percobaan:

Alat suntik (*syringe*) ukuran 2,5 ml, kanul dan timbangan

b. Pengambilan sampel darah:

Mikrohematokrit, tabung eppendorf, alat sentrifuse Hettich mikro22,
tabung sentrifuse mikro

c. Pengukuran kadar kolesterol darah:

Spektrofotometer, sentrifuse, oven, tabung reaksi

d. Pembuatan preparat mikroanatomi:

Disecting kit, *staining jar*, mikrotom, *water bath*, gelas benda, gelas penutup, Mikroskop, kamera.

C. Cara Kerja

1. Persiapan

Hewan Percobaan

Sebelum digunakan percobaan, tikus putih diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari untuk membiasakan terhadap lingkungan yang diberikan.

2. Penentuan dosis Simvastatin:

Dosis yang digunakan untuk manusia hiperkolestroemia adalah 10 mg tiap hari.

Jadi dosis simvastatin setelah dikonversikan untuk *Rattus norvegicus* L berdasar tabel konversi Laurence dan Bacharach yang dikutip oleh Haznam (1976) yaitu:
 $10 \text{ mg/hari} \times 0,018 = 0,18 \text{ mg/hari}/200 \text{ gr BB}$. Suspensi simvastatin diperoleh dengan melarutkan 0,18mg simvastatin dalam bentuk bubuk ke dalam 1 ml akuades. Untuk tikus dengan berat badan 270 gr diperlukan 1,3 ml suspensi simvastatin

3. Penentuan dosis dan pemberian VCO:

VCO yang diberikan untuk terapi manusia adalah 3 sendok makan atau setara dengan 45 ml/hari (Dayrit, 2000). Bila dikonversikan untuk tikus = $0,018 \times 45 = 0,81 \text{ ml}/200 \text{ gr BB/hari}$ atau sama dengan $1,09 \text{ ml}/270 \text{ gr BB/hari}$ Pada penelitian ini diberikan variasi dosis yaitu dosis I= $1 \text{ ml/hari}/270 \text{ g BB}$ dan dosis II= $1,3 \text{ ml/hari}/270 \text{ gr BB}$.

4. Perlakuan hewan percobaan:

Untuk pengukuran kadar kolesterol darah pada penelitian ini menggunakan 25 tikus (*Rattus norvegicus* L) jantan yang dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan, masing-masing 5 tikus sebagai berikut:

Kelompok I : perlakuan akuades dan pellet selama 28 hari (kontrol)

Kelompok II : perlakuan pellet dan minyak babi 9:1 selama 14 hari dilanjutkan

Simvastatin sampai hari ke 28.

Kelompok III : perlakuan campuran pellet dan minyak babi 9;1 selama 14 hari,

dilanjutkan pellet dan aquadest sampai hari ke 28

Kelompok IV : perlakuan campuran pellet dan minyak babi 9:1 selama 14 hari dilanjutkan perlakuan VCO dosis 1ml hingga hari ke 28.

Kelompok V : perlakuan campuran pellet dan minyak babi 9:1 selama 14 hari dilanjutkan perlakuan VCO dosis 1,3 ml hingga 28 hari

Pada akhir perlakuan semua tikus dikorbankan dan diambil organ aortanya.

Pemberian makan dan minum secara *ad libitum*, perlakuan VCO dan Simvastatin secara oral menggunakan jarum kanul.

Pada awal perlakuan dan setelah berakhir masa perlakuan berat badan tikus ditimbang.

5. Penetapan kadar kolesterol darah:

Kadar kolesterol darah ditetapkan dengan metode pengukuran Enzimatik Endpoint Method dengan Spektrofotometri. (Artiss dkk, 1997). Darah diambil dari sinus orbitalis dengan menggunakan mikrohematokrit, setelah ditampung ditetesi heparin sebagai anti koagulan pada hari ke 1(setelah aklimasi), hari ke 14, dan 28. Kadar kolesterol darah yang diukur adalah kolesterol total, LDL.dan HDL. Pengukuran kadar HDL dan kadar LDL dengan metode presipitasi dan enzymatic

6. Pembuatan preparat mikroanatomi aorta:

Tikus putih dari 5 macam perlakuan (I, II, III, IV, V) dikorbankan pada akhir perlakuan dengan jalan dislokasi servik, diambil organ aorta, dibuat preparat mikroanatomi dengan metode paraffin dengan pewarnaan Imunohistokimia.dengan VCAM-1 sebagai *marker*. Preparat diamati di bawah mikroskop dan difoto menggunakan kamera.

D.Rancangan Percobaan

Dalam percobaan ini digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan 5 macam perlakuan dengan 5 ulangan pada masing-masing perlakuan.

E. Analisis Data

Data kuantitatif (kadar kolesterol total, kolesterol LDL dan kolesterol HDL) dianalisis dengan menggunakan uji T dependent untuk mengetahui pengaruh pemberian lemak babi 10%. Sedang data untuk pengaruh pengobatan dianalisis dengan Ancova (*Analysis co Variance*), dan bila terdapat beda nyata, dilanjutkan dengan uji kontras pada taraf signifikansi 5% untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

Data kuantitatif (pengamatan mikroskopis aorta) diperoleh dengan menghitung persentase sel endotel yang mengekspresikan VCAM-1 dari satu penampang aorta dan dianalisis dengan menggunakan ANAVA dan dilanjutkan dengan Duncan's dengan taraf signifikansi 5%.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus* L) galur Wistar jantan, berumur 2-3 bulan. Tikus digunakan karena mempunyai kemiripan dengan manusia dalam hal fisiologi, anatomi, nutrisi, patologi, metabolisme dan lazim digunakan dalam penelitian mengenai kadar kolesterol. Tikus jantan digunakan karena sedikit terpengaruh oleh perubahan hormonal (Sitepoe, 1992). Menurut Ganong (1998), estrogen berpengaruh terhadap kolesterol darah. Pada tikus jantan, lipid darah tidak dipengaruhi karena hewan tersebut mempunyai sedikit estrogen.

Penelitian ini melalui beberapa tahapan yaitu aklimasi hewan untuk menyesuaikan dengan kondisi lingkungan sekitar, pemberian diet tinggi kolesterol dan perlakuan dengan *Virgin Coconut Oil* (VCO). Selama aklimasi, semua tikus diberi pakan pellet dan air minum *ad-libitum* selama 7 hari. Pemberian diet tinggi kolesterol dengan mencampurkan pakan pellet dengan lemak babi dengan perbandingan 90:10 selama 14 hari. Pada perlakuan VCO, tikus diberi VCO selama 14 hari berturut-turut dan sebagai kontrol positifnya digunakan obat paten Simvastatin.

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar kolesterol total darah, kolesterol LDL, kolesterol HDL, dan pengamatan ekspresi VCAM-1 pada endotel aorta.

Dari uji statistik, pemberian lemak babi 9:1 dalam pakan menyebabkan peningkatan yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap kadar kolesterol total darah (Lampiran 1) sebesar 10,7%, peningkatan kadar LDL (Lampiran 2) sebesar

55,52% dan penurunan yang tidak signifikan kadar HDL (Lampiran 3) sebesar 2,17%. Keadaan ini terjadi akibat peningkatan penimbunan lemak dalam hepar yang menimbulkan peningkatan jumlah acetyl co-A dalam sel hepar untuk menghasilkan kolesterol (Guyton, 1991). Lemak babi mengandung asam lemak jenuh yang tinggi. Lemak jenuh mengakibatkan kadar triglicerida dalam darah meningkat dan merupakan precursor kolesterol. Mengonsumsi lemak jenuh menyebabkan peningkatan kadar kolesterol total dan penurunan HDL sehingga meningkatkan perbandingan kolesterol total dan HDL, sehingga resiko terjadinya aterosklerosis semakin besar. (Baraas, 1993). Mengonsumsi lemak berlebihan mengakibatkan hiperlipidemia dengan meningkatnya ApoB kolesterol dan kadar LDL. Meningkatnya ApoB kolesterol dihubungkan dengan berkurangnya fungsi reseptor LDL (Verd *et al*, 1999).

1. KADAR KOLESTEROL TOTAL DARAH

Hasil analisa kadar kolesterol darah disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata Kadar kolesterol total darah tikus putih (*Rattus norvegicus* L) (mg/dl) pada hari ke 1, ke 14 dan ke 28 dan persentase kenaikan dan penurunannya.

| Perlakuan | Hari ke 1 | Hari ke 14 | Kenaikan (%) | Hari ke 28 | Penurunan (%) |
|-------------|------------|------------|--------------|-------------------------|---------------|
| Kontrol | 52,92±3,08 | 50,42±4,32 | -4,7 | 52,74±4,17 ^a | -4,6 |
| Simvastatin | 52,84±1,65 | 60,44±2,56 | 14,38 | 42,98±4,78 ^b | 28,8 |
| Kolesterol | 53±5,4 | 59,94±2,96 | 13,09 | 55,9±5,6 ^a | 6,74 |
| VCO 1ml | 51,7±0,96 | 58,84±2,9 | 13,8 | 47,6±2,8 ^b | 19,1 |
| VCO 1,3 ml | 52,81±4,55 | 61,8±6 | 17,4 | 44,6±2,76 ^b | 27,83 |

Keterangan: huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

Kolesterol terdapat pada semua jaringan dan lipoprotein plasma, terdapat dalam bentuk kolesterol bebas atau gabungan asam lemak rantai panjang sebagai ester kolestril. Unsur ini disintesis dari Acetil-co A dan akhirnya dikeluarkan dari tubuh lewat empedu sebagai garam kolesterol. Kolesterol bebas dikeluarkan dari jaringan oleh HDL dan diangkut ke dalam hati untuk diubah menjadi asam empedu (Murray *et al*, 1999).

Keadaan hiperkolesterolemik ditandai dengan kenaikan kadar kolesterol darah diatas normal. Pada tikus *R. norvegicus* L. galur Wistar, kadar kolesterol darah normal adalah 10-54 mg/dl (Smith dan Mangkoewidjojo, 1998).

Uji statistik (Lampiran 4), perlakuan dengan VCO maupun Simvastatin mampu menurunkan kadar kolesterol total darah secara signifikan.

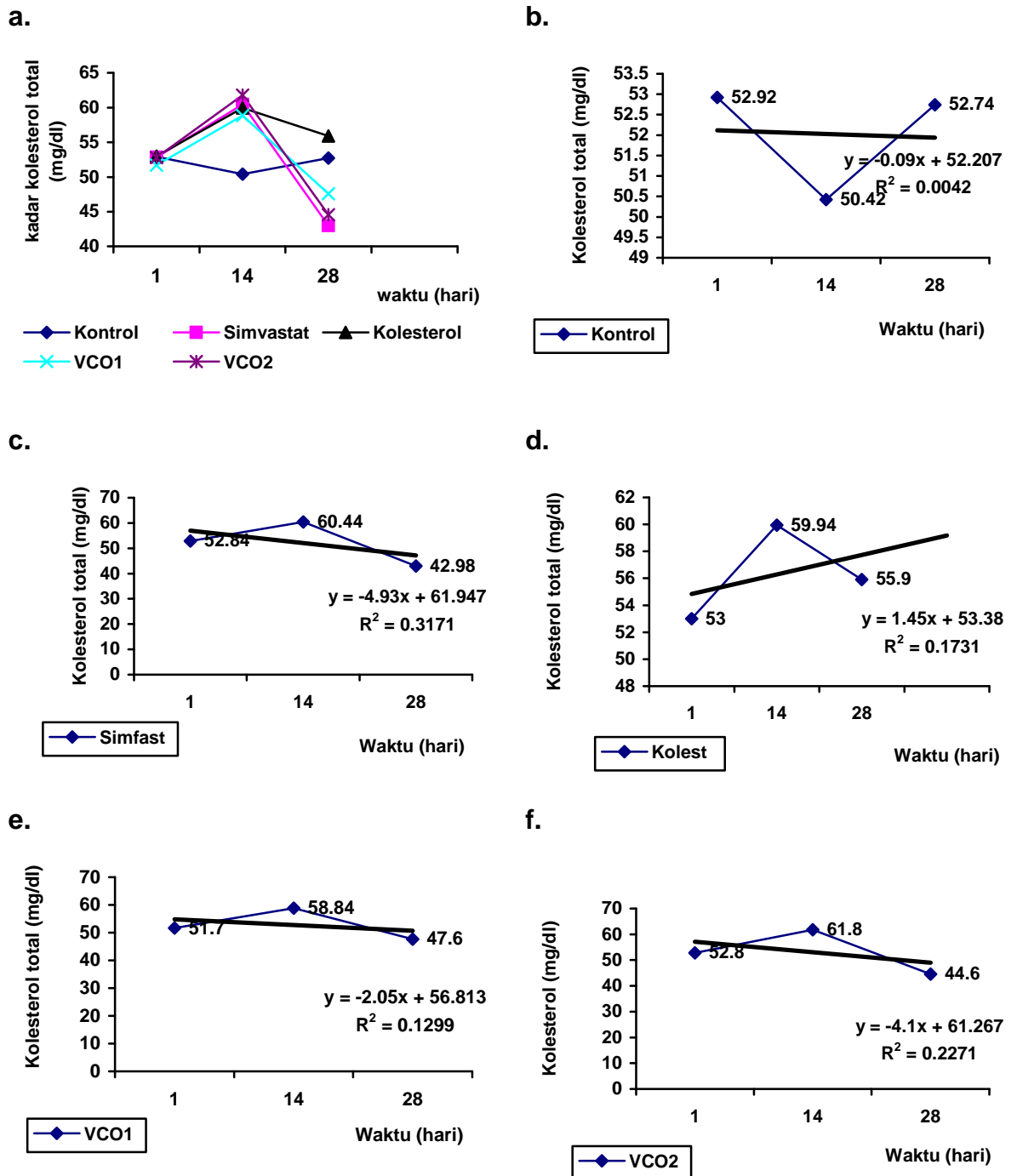
Pemberian VCO 1ml per hari selama 14 hari dapat menurunkan kadar kolesterol total sebesar 19,1% dan VCO 1,3 ml per hari selama 14 hari berturut-turut dapat menurunkan kadar kolesterol total 27,83%. Pemberian Simvastatin mampu menurunkan kadar kolesterol total sebesar 28,8%. Dosis VCO yang paling efektif untuk menurunkan kadar kolesterol total dalam penelitian ini adalah 1,3 ml.,tidak beda nyata dengan pemberian Simvastatin.(Lampiran 4)

Pada kelompok I (kontrol) yang tidak diberi pakan dengan lemak babi dari awal hingga akhir perlakuan, pada hari ke 14 mengalami penurunan kadar kolesterol total dan pada akhir perlakuan terjadi kenaikan sebesar 4,6%. Sedang pada kelompok III (Kolesterol) yang diberi pakan dengan lemak babi hingga hari ke 14 dan tanpa diberi lemak babi hingga hari ke 28 terjadi penurunan kadar kolesterol total 6,7% berbeda nyata dengan hewan uji yang diberi perlakuan VCO.(Lampiran 4).

Menurut Syah (2005), VCO mempunyai kandungan asam lemak jenuh yang didominasi oleh asam lemak rantai sedang. Asam lemak rantai sedang didominasi oleh asam laurat. Karena ukuran molekulnya yang kecil, asam lemak rantai sedang mudah diserap usus tanpa melalui proses enzimatik. Asam lemak ini dibawa aliran darah ke hati untuk dimetabolisasi dan dibawa ke mitokondria tanpa karnitin menghasilkan energi yang cepat dan efisien sehingga tidak terdeposit sebagai lemak dalam jaringan.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Nevin (2004) pada binatang tikus Sprague-Dawley yang diberi diet VCO yang menunjukkan kadar kolesterol total darah maupun LDL menurun dan kadar HDL meningkat.

Adanya kenaikan dan penurunan Kadar kolesterol total dalam darah selama percobaan dapat ditunjukkan pada gambar 2 berikut ini.

Gambar 2. Kadar Kolesterol Total Darah *R.norvegicus* L

Keterangan:

. Kadar kolesterol darah(mg/dl) vs waktu (hari):

a. Perlakuan kontrol, simvastatin, kolesterol, VCO 1ml, VCO 1,3 ml.

b. Kontrol. c. Simvastatin d. Kolesterol e. VCO 1 ml. f. VCO 1,3 ml.

2. KADAR LDL DARAH.

Hasil analisa kadar LDL darah dapat disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rerata Kadar LDL Darah tikus putih (*Rattus norvegicus* L) (mg/dl) pada hari ke 1, ke 14 dan ke 28 dan persentase kenaikan dan penurunannya.

| Perlakuan | Hari ke 1 | Hari ke 14 | Kenaikan (%) | Hari ke 28 | Penurunan (%) |
|-------------|------------|------------|--------------|-------------------------|---------------|
| Kontrol | 19,1±4,1 | 25,78±5,12 | 34,97 | 25,34±5,44 ^a | 1,7 |
| Simvastatin | 17,84±3,16 | 26,5±3,53 | 48,54 | 19,08±4,02 ^b | 28 |
| Kolesterol | 15,3±1,53 | 32,2±6,83. | 110,45 | 34,14±7,11 ^a | 6,02 |
| VCO 1ml | 17,88±4,07 | 22,58±1,99 | 26,28 | 19,82±2,71 ^b | 12,22 |
| VCO1,3 ml | 15,96±4,66 | 26,82±4,88 | 68,04 | 19,3±1,8 ^b | 28 |

Keterangan: huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.05$).

Low Density Lipoprotein merupakan lipoprotein yang mengangkut lipid dari hepar menuju ke perifer (ekstra hepatic) dan sering disebut kolesterol "buruk". Menurut Murray, 1996, LDL mengandung setengah hingga dua pertiga kolesterol. Kadar LDL yang tinggi beresiko terjadinya aterosklerosis.

Perlakuan dengan VCO mampu menurunkan kadar LDL darah secara signifikan. Pemberian VCO 1ml per hari selama 14 hari berturut-turut dapat menurunkan kadar LDL sebesar 12,2% dan VCO 1,3ml per hari selama 14 hari mampu menurunkan kadar LDL hingga 28%. Pemberian VCO 1,3 ml ini tidak berbeda nyata dengan pemberian Simvastatin (Lampiran 5), yaitu sebesar 28%.

Pemberian statin termasuk Simvastatin mengurangi kadar LDL darah, menghambat HMG Co A reduktase yang akan menghambat HMG Co A menjadi

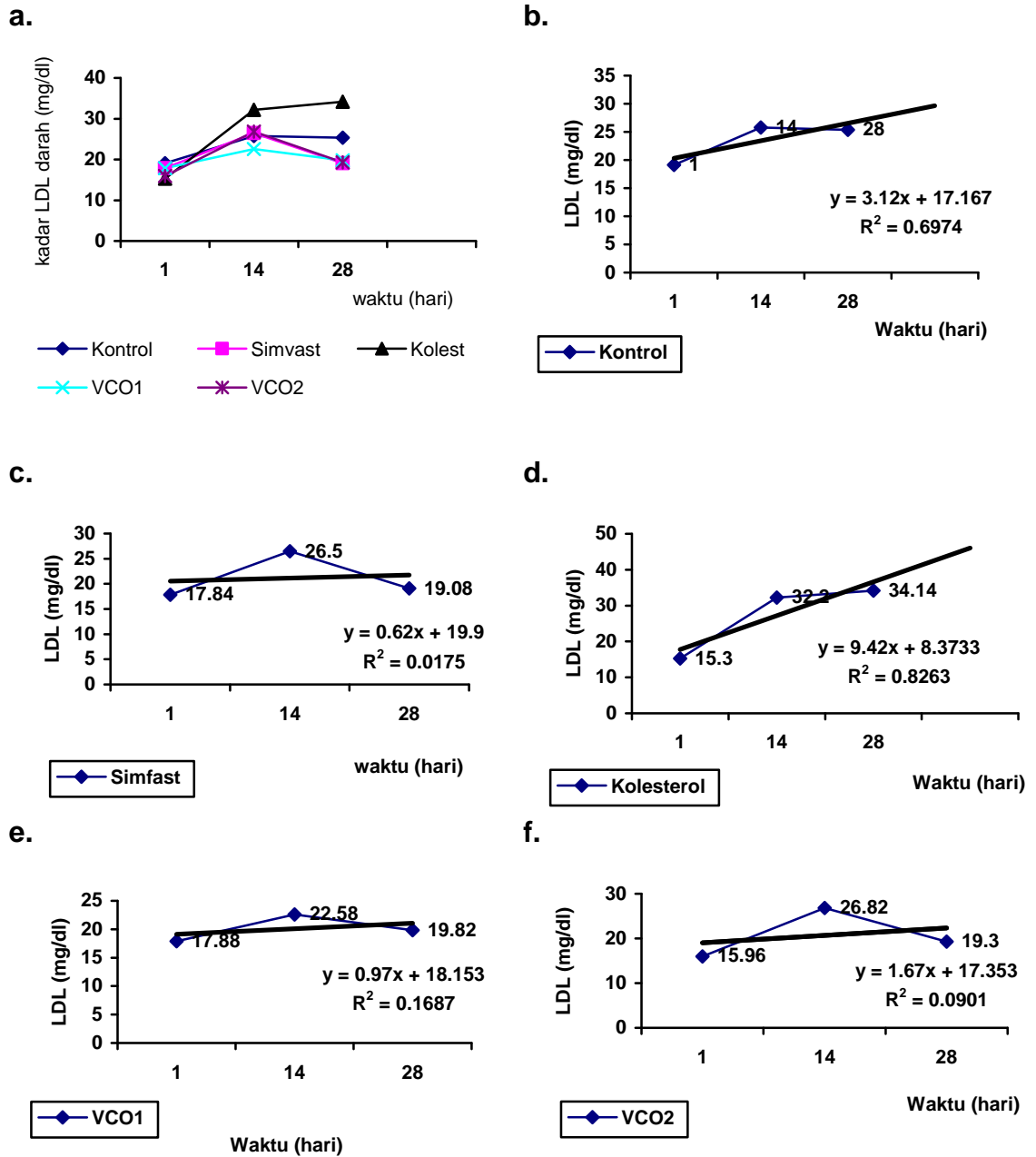
mevalonat sehingga menghambat sintesis kolesterol dan menyebabkan penurunan konsentrasi kolesterol pada sel hepar dan meningkatkan reseptor LDL (E, Apo-B-100).

Pada penelitian ini, pemberian Simvastatin menyebabkan kadar LDL mengalami penurunan yaitu dari 26,5 pada hari ke 14 menjadi 19,08 pada hari ke 28.

Pada kelompok I (Kontrol) yang tidak diberi pakan lemak babi, hingga akhir perlakuan terjadi sedikit penurunan yaitu 1,7 %. Kelompok III yang selama 14 hari pertama diberi pakan lemak babi dan 14 hari selanjutnya tidak diberi pakan lemak babi terjadi kenaikan kadar LDL darah sebesar 6%, hal ini dimungkinkan karena kolesterol berasal selain dari hepar juga dari makanan yang mengandung kolesterol, jadi kadar kolesterol dalam tubuh akan tetap tinggi karena tubuh juga memproduksi kolesterol.

Pada penelitian ini pemberian VCO menurunkan kadar LDL darah dan menurunkan kadar kolesterol total darah. Hal ini terjadi karena 65% kolesterol terdapat dalam bentuk LDL, jadi jika kolesterol total turun maka kadar LDL juga turun.

Adanya kenaikan dan penurunan kadar LDL dalam darah selama percobaan dapat ditunjukkan pada gambar 3.

Gambar 3. Kadar LDL Darah *R. norvegicus* L

Keterangan:

Kadar LDL darah (mg/dl) vs waktu (hari)

a. Perlakuan kontrol, simvastatin, kolesterol, VCO 1ml, VCO 1,3ml.

b. Kontrol c. Simvastatin d. Kolesterol e. VCO 1 ml f. VCO 1,3 ml.

3. KADAR HDL DARAH

Hasil analisa kadar HDL Darah disajikan pada Tabel 3

Tabel 3. Rerata Kadar HDL Darah (mg/dl) tikus putih (*Rattus norvegicus* L) pada hari ke 1, ke 14 dan ke 28 dan persentase perubahannya.

| Perlakuan | Hari ke 1 | Hari ke 14 | Penurunan (%) | Hari ke 28 | Kenaikan (%) |
|-------------|------------|------------|---------------|-------------------------|--------------|
| Kontrol | 21,38±1,94 | 23,98±4,74 | -0,12 | 24,84±2,8 ^b | 3,58 |
| Simvastatin | 25,26± | 23,44±2,58 | 7,2 | 27,18±3,68 ^a | 16 |
| Kolesterol | 21,32±1,95 | 19,94±3,19 | 6,47 | 21,58±2,28 ^b | 15,95 |
| VCO 1ml | 23,98±4,74 | 22,26±2,19 | 7,17 | 29,68±4,75 ^a | 33,3 |
| VCO 1,3 ml | 23,2±2,93 | 22,68± | 2,24 | 27,6±3,43 ^a | 21,69 |

Keterangan : huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

High Density Lipoprotein sering disebut kolesterol “baik” karena merupakan lipoprotein yang mengangkut lipid dari perifer menuju ke hepar. Karena molekulnya yang relative kecil dibanding lipoprotein lain, HDL dapat melewati sel endotel vascular dan masuk ke dalam intima untuk mengangkut kembali kolesterol yang terkumpul dalam makrofag, disamping HDL juga mempunyai sifat antioksidan sehingga dapat mencegah terjadinya oksidasi LDL. Rendahnya kadar HDL di dalam darah akan meningkatkan resiko aterosklerosis dan penyakit jantung koroner (Moeliandari dan Wijaya, 2002).

Dari pengujian statistik (lampiran 3), pada perlakuan dengan pemberian pakan lemak babi selama 14 hari diberbagai kelompok terjadi penurunan kadar HDL yang tidak beda nyata. Sedangkan pada akhir perlakuan terjadi peningkatan kadar HDL yang berbeda nyata (lampiran 6)

Pada kelompok I (Kontrol) mengalami kenaikan kadar HDL sebesar 3,58% pada akhir perlakuan. Pada kelompok II (Simvastatin) terjadi peningkatan kadar HDL sebesar 16%. Pada kelompok ini mempunyai kadar HDL yang tidak beda nyata dengan kelompok yang diberi VCO 1,3 ml.

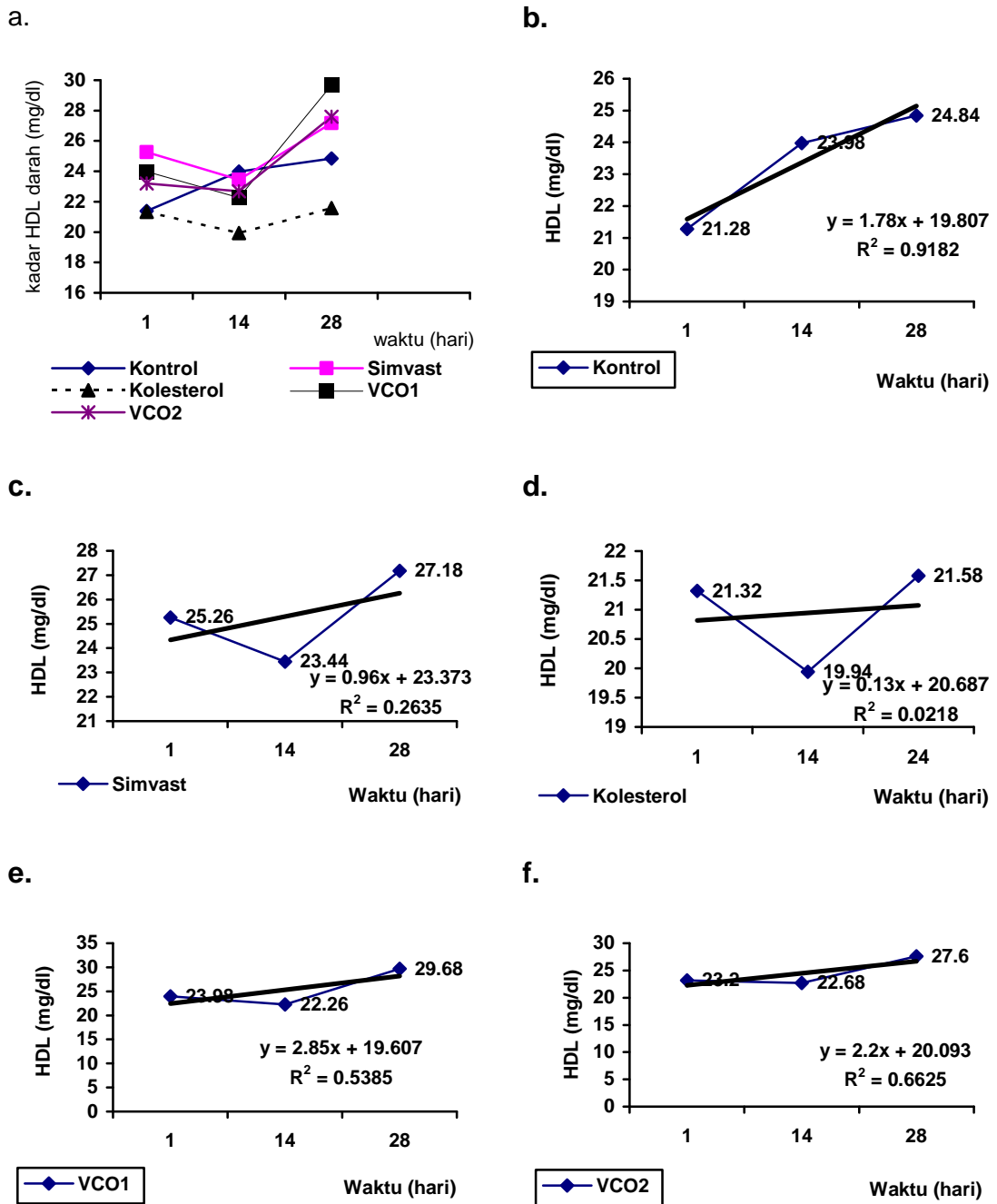
Kelompok III (Kolesterol) yang tidak diberi pakan lemak babi setelah hari ke 14, hingga akhir perlakuan hari ke 28 terjadi kenaikan kadar HDL hanya sebesar 8%.

Kelompok tikus yang mempunyai kadar HDL paling tinggi adalah kelompok yang diberi VCO 1ml yaitu sebesar 29, 68 mg/dl, tidak beda nyata dengan kelompok yang diberi VCO 1,3 ml. sebesar 29,6 mg/dl. Pemberian VCO dengan dua macam dosis dapat meningkatkan kadar HDL lebih baik daripada pemberian dengan Simvastatin.

Virgin Coconut Oil merupakan minyak kelapa yang disusun oleh asam lemak rantai sedang (C12) yang didominasi oleh asam laurat. Asam lemak rantai sedang (MCT) bersifat lebih polar (lebih cepat melepas ion H) daripada asam lemak rantai panjang (LCT). Sifat kelarutan MCT dalam air yang lebih tinggi dari LCT membuatnya masuk ke dalam hati secara langsung melalui vena porta setelah diabsorpsi oleh usus tanpa lipase pankreas dan dengan cepat dimetabolisasi menjadi energi. Asam lemak rantai sedang ini tidak masuk dalam siklus kolesterol dan tidak tertimbun sebagai lemak dalam jaringan tubuh. (Dayrit,2003). Menurut Enig, (2001), asam laurat yang terkandung dalam VCO mampu membakar lemak dari sumber lain, dan dengan cepat menjadikan energi dan menaikkan metabolisme. Pada penelitian ini, pengaruh pemberian VCO dengan kandungan asam lauratnya menyebabkan kenaikan kadar HDL. Fungsi HDL adalah mengangkut kolesterol dari jaringan perifer menuju ke hepar,

menyingkirkan kolesterol yang berlebihan dan menghambat perkembangan plak atheroma, sehingga kenaikan kadar HDL dalam darah akan mencegah terjadinya resiko aterosklerosis.

Adanya penurunan dan kenaikan kadar HDL dalam darah dapat ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. Kadar HDL Darah *R. norvegicus* L

Keterangan:

Kadar HDL darah (mg/dl) vs waktu (hari)

a. Perlakuan kontrol, simvastatin, kolesterol, VCO 1ml, VCO 1,3 ml.

b. Kontrol c. Simvastatin d. Kolesterol e. VCO 1 ml f. VCO 1,3 ml

EKSPRESI VCAM-1 PADA ENDOTEL AORTA

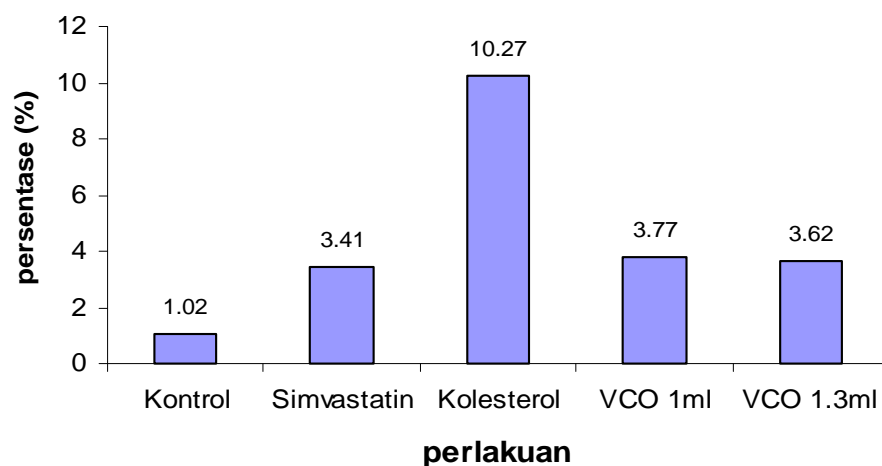
Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM-1), merupakan molekul adesi yang berekspresi pada sel endotel, berperan dalam recruitment sel-sel inflamasi yang merupakan tahap awal dari aterosclerosis.

Hasil analisis ekspresi VCAM-1 pada sel endotel disajikan pada Tabel 4

Tabel 4. Rerata persentase jumlah sel endotel terekspresi VCAM-1 pada akhir perlakuan (hari ke 28).

| Perlakuan | Jumlah sel endotel terekspresi VCAM-1(%) |
|-------------|--|
| Kontrol | 1,02±0,32 ^a |
| Simvastatin | 3,41±1,42 ^b |
| Kolesterol | 10,27±1,61 ^c |
| VCO 1ml | 3,77±0,99 ^b |
| VCO 1.3ml | 3,62±1,0 ^b |

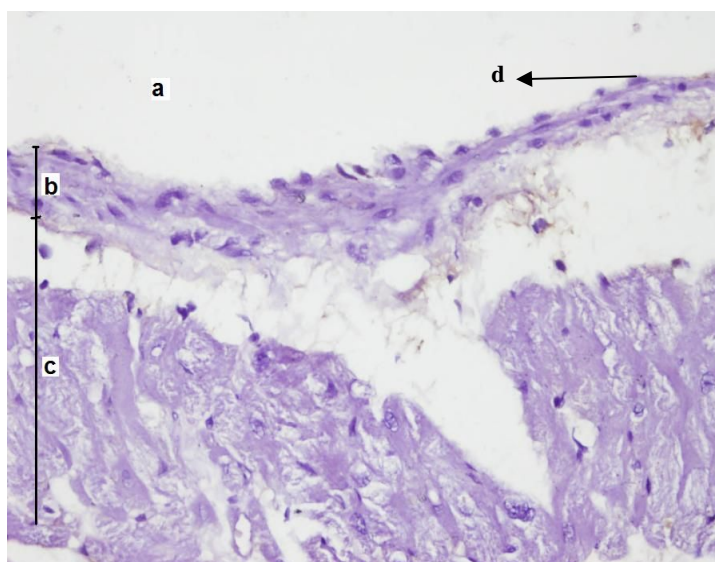
Keterangan: huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.05$)



Gambar 5. Ekspresi VCAM-1 pada endotel aorta *R. norvegicus* L

Pada penelitian ini, tikus putih (*Rattus norvegicus* L) yang diberi diet tinggi lemak (lemak babi 10%) selama 14 hari ,dan dilanjutkan dengan 5 macam perlakuan (Kontrol, Simvastatin, Kolesterol, VCO 1ml dan VCO 1.3ml) hingga hari ke 28, nampak ekspresi VCAM-1 pada endotel aorta yang ditandai dengan sel endotel berwarna merah kecoklatan dengan teknik Imunohistokimia (Gambar 6s/d 10). Persentase ekspresi VCAM-1 diperoleh dengan menghitung jumlah sel endotel yang positif dibanding jumlah sel endotel seluruhnya dalam satu irisan aorta.

Hasil pengamatan pada kelompok I (Kontrol), nampak adanya beberapa sel endotel dalam penampang aorta yang mengekspresikan VCAM-1 (1.02%). Hal ini sesuai dengan hasil pengukuran kadar LDL darah pada kelompok kontrol yang mengalami sedikit kenaikan pada akhir perlakuan. Kenaikan kadar LDL beresiko terjadinya aterosklerosis. Tanda dini adanya aterosklerosis adalah adanya ekspresi VCAM-1 pada endotel. Ekspresi VCAM-1 ditunjukkan pada gambar 6.



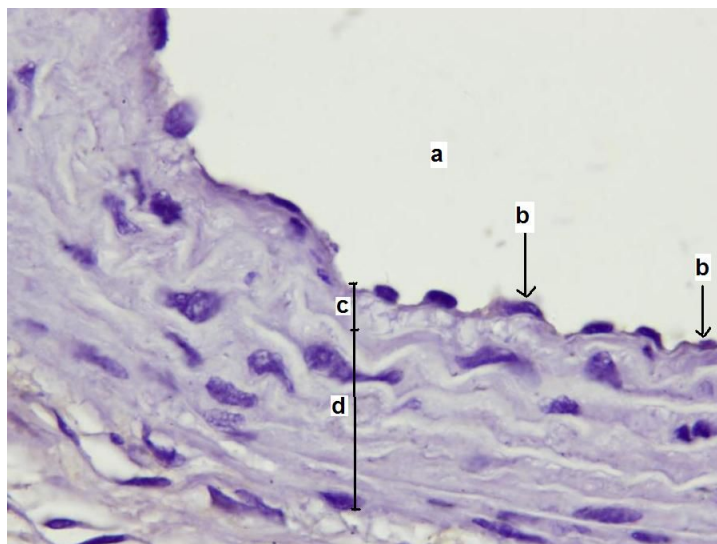
Gambar 6. Ekspresi VCAM-1 pada endotel aorta *R. norvegicus* L
Kelompok I (Kontrol) Perbesaran 10x100

Keterangan:

a. lumen aorta b. tunika intima c. tunika media. d. ekspresi VCAM-1 pada endotel

Dari uji statistik, pada perlakuan dengan pemberian Simvastatin setelah hari ke 14 hingga hari ke 28 (Kelompok II), pada akhir perlakuan terlihat ekspresi VCAM-1 pada endotel aorta sebesar 3,41% (Tabel 4) berbeda nyata dengan Kontrol dan berbeda nyata dengan perlakuan Kolesterol, namun pemberian Simvastatin ini tidak berbeda nyata dengan pemberian VCO 1ml maupun VCO 1,3 ml (Lampiran 7).

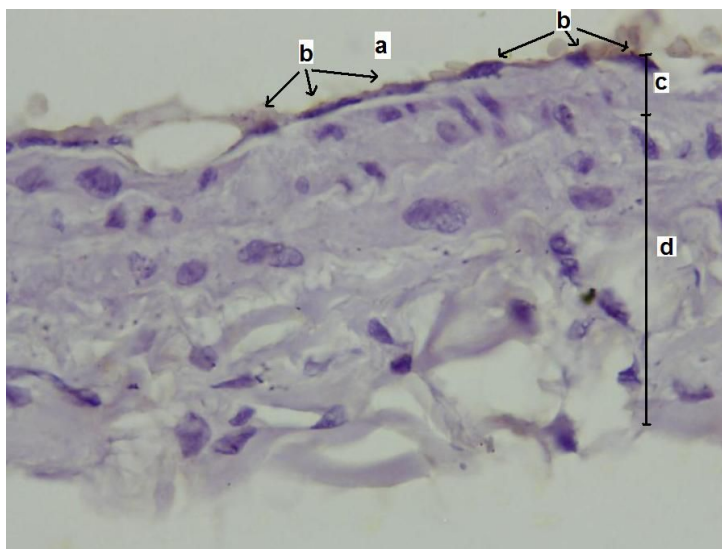
Simvastatin menghambat sintesis kolesterol di hati dan meningkatkan pembuangan LDL dari aliran darah, sehingga kadar LDL mengalami penurunan. Penurunan kadar LDL akan mengurangi LDL teroksidasi dan menghambat *injury* vascular sehingga mengurangi *recruitment* monosit dan limposit pada dinding pembuluh darah, selanjutnya akan mengurangi ekspresi molekul adesi VCAM-1 pada endotel. Ekspresi VCAM-1 pada endotel ditunjukkan pada Gambar7.



Gambar 7. Ekspresi VCAM-1 pada endotel aorta *R. norvegicus* L. Kelompok II (Simvastatin). Perbesaran 10x100
Keterangan: a. lumen aorta b. ekspresi VCAM-1 pada endotel c. tunika intima d. tunika media

Pada penelitian ini, pemberian perlakuan dengan memberikan diet lemak babi selama 14 hari dan diberi diet standard hingga hari ke 28 (Kelompok

III) menunjukkan persentase ekspresi VCAM-1 yang paling tinggi yaitu sebesar 10,27% (Tabel 4). Ekspresi VCAM-1 ini ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Ekspresi VCAM-1 pada endotel aorta *R.norvegicus* L
Kelompok III (Kolesterol) Perbesaran 10x100

Keterangan: a. lumen aorta b. ekspresi VCAM-1 pada endotel c. tunika intima d. tunika media

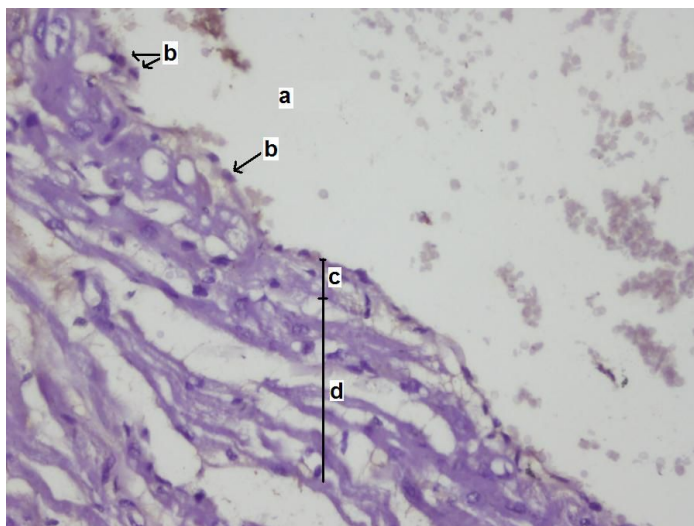
Naiknya kadar kolesterol total dan kadar LDL karena pengaruh pemberian diet tinggi lemak beresiko terjadinya aterosklerosis. Tanda dini terjadinya aterosklerosis adalah terjadinya reaksi inflamasi pada dinding pembuluh darah.

Pemberian lemak babi 10% pada pakan berdasar penelitian ini mampu menaikkan kadar LDL secara signifikan.

Partikel LDL yang masuk ke dalam intima arteri bisa mengalami oksidasi menjadi LDL-oks dan difagosit oleh makrofag melalui reseptor *scavenger* (pemangsa) di permukaan sel. Fagositosis menyebabkan terbentuknya peroksidasi lipid dan mempermudah akumulasi ester kolesterol yang menghasilkan pembentukan *foam cell* (sel busa). Jadi sel busa teraktivasi begitu terjadi modifikasi dan fagositosis LDL oleh makrofag. LDL teroksidasi juga merupakan kemotaktik bagi monosit dan dapat memacu ekspresi gen untuk MCSF (*Macrofag Cell Stimulating Factor*) dan MCP (*Monocyt Chemoattractan*

Protein), juga *VCAM-1* yang berasal dari sel endotel. Sehingga LDL teroksidasi membantu memperluas respon inflamasi dengan menstimulasi monosit ke dalam lesi dan berperan dalam pembentukan sel busa (Ley, 2001). Menurut Li 1993 dalam Tanuwijaya 2005, pada hewan kelinci yang diberi diet tinggi lemak, dalam waktu 7 hari terjadi peningkatan ekspresi molekul adhesi *VCAM-1* pada dinding vaskuler. Pembuangan LDL teroksidasi merupakan proteksi inisial makrofag dalam respon inflamasi .

Pada Kelompok IV, pemberian *VCO* 1ml menunjukkan ekspresi *VCAM-1* sebesar 3,77% tidak berbeda nyata dengan pemberian Simvastatin (Tabel 4). Ekspresi *VCAM-1* ditunjukkan pada Gambar 9.

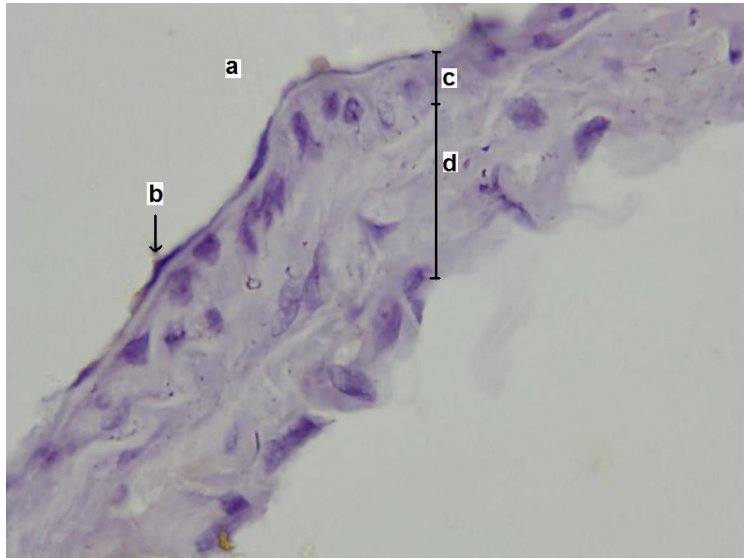


Gambar 9. Ekspresi *VCAM-1* pada endotel aorta *R. norvegicus* L
Kelompok IV(*VCO* 1 ml). Perbesaran 10x100

Keterangan:

- a. lumen aorta b. ekspresi *VCAM-1* pada endotel c. tunika intima d.
tunika media

Pada penelitian ini , kelompok V (pemberian *VCO* 1,3 ml) menunjukkan adanya ekspresi *VCAM-1* pada endotel sebesar 3,62%, tidak berbeda nyata dengan pemberian Simvastatin (Tabel 4). Pada kelompok ini terjadi penurunan ekspresi *VCAM-1* dibanding dengan kelompok III (Kolesterol), yaitu dari 10,27% menjadi 3,62%. Ekspresi *VCAM-1* pada endotel ditunjukkan pada Gambar 10.



Gambar 10. Ekspresi VCAM-1 pada endotel aorta *R. norvegicus* L
 Kelompok V (VCO 1,3 ml) Perbesaran 10x100
 Keterangan: a. lumen aorta b. ekspresi VCAM-1 pada endotel c. tunika intima d. tunika media

Virgin Coconut Oil (VCO) merupakan minyak kelapa yang mengandung 92% asam lemak jenuh yang didominasi oleh asam lemak rantai sedang. (MCT), yang 44%-55% nya adalah asam laurat. Metabolisme MCT berbeda dengan asam lemak rantai panjang (LCT), MCT bisa diabsorpsi dengan cepat di dalam intestinum tanpa memerlukan lipase pankreas, dan dibawa oleh vena porta menuju hepar dan dengan cepat teroksidasi menjadi energi. Energi ini dipergunakan untuk meningkatkan metabolisme, sehingga dapat membantu melindungi tubuh dari penyakit dan mempercepat penyembuhan.

Menurut Carandang (2005), di dalam VCO juga terkandung bahan aktif meskipun dalam jumlah yang sedikit yang bias mencegah dan memberi proteksi terhadap penyakit dan bermanfaat bagi kesehatan. Bahan aktif yang diketahui adalah *tocopherol*, merupakan antioksidan yang mempunyai rantai samping phyti jenuh, dan *tocotrienol*, suatu antioksidan yang lebih baik dari *tocopherol* dengan

rantai samping *isoprenoid* tidak jenuh dengan tiga ikatan rangkap. Kedua bahan aktif ini mempunyai efek hipokolesterolemik, anti aterogenik dan anti kanker. Aktivitas anti aterogeniknya dengan menghambat oksidasi LDL, menekan aktivitas HMG-Co A reductase dan menghambat agregasi platelet (Theriault *et al.*, 1999 dalam Carandang, 2005). Hal ini serupa dengan mekanisme Simvastatin dalam menurunkan kadar kolesterol dan mengurangi kadar LDL. Bahan aktif lain dalam VCO adalah *flafonoid* dan *polyphenol*. Flavonoid sebagai antioksidan mempunyai efek yang menguntungkan pada fungsi endotel yaitu menurunkan oksidasi LDL dan meningkatkan produksi Nitric Oxide (NO) (Vita, 2005). Oksidasi LDL akan menginduksi respon inflamasi dengan memproduksi lleukosit dan Cytokine pada endotel. Flavonoid menurunkan oksidasi LDL dan mencegah inflamasi pada indotel. Nitric Oxide adalah *vasodilator endogenous* yang mempunyai kemampuan anti aterosklerosis. Polyphenol akan mencegah oksidasi LDL. Oksidasi LDL akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species (ROS)* yang bersifat toksik, dan jika berikatan dengan NO akan membentuk peroksinitrit oksidan. Oksidasi kolesterol ini dapat memacu terjadinya proses aterosklerosis.

Pada penelitian ini pemberian VCO dosis iml/hari dan dosis 1,3ml/hari selama 14 hari mampu menurunkan ekspresi *VCAM-1* pada sel endotel. Hal ini sesuai dengan pengukuran kadar kolestewrol total, kadar LDL pada kedua dosis pada perlakuan tersebut yang menunjukkan terjadinya penurunan, tidak berbeda nyata dengan perlakuan Simvastatin. Penurunan kadar kolesterol akan mengurangi terjadinya aterosklerosis. Tanda dini ateroskleross adalah terjadinya peningkatan molekul adesi *VCAM-1*.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Pemberian *VCO* (*Virgin Coconut Oil*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus* L) hiperkolesterolemik mengakibatkan penurunan kadar kolesterol (kolesterol total, LDL) dan kadar HDL secara signifikan pada taraf signifikansi 5%, tidak berbeda nyata dengan pemberian obat paten Simvastatin sebagai obat penurun kolesterol
2. Pemberian *VCO* pada tikus putih (*Rattus norvegicus* L) hiperkolesterolemik mampu menurunkan ekspresi *VCAM-1* pada sel endotel aorta.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh *VCO* terhadap kadar kolesterol darah dengan penekanan pada:

1. Isolasi asam laurat yang merupakan senyawa yang terkandung dalam *VCO* dan mekanisme senyawa tersebut pada berbagai hewan percobaan.
2. Aktivitas hipokolesterolemik *VCO* dengan dosis yang lebih besar (lebih dari 1,3 ml/ hari/ 270 gr BB) dan waktu perlakuan yang lebih lama (lebih dari 14 hari).
3. Aspek klinis dari potensi anti kolesterol dan anti aterosklerosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Baraas, F. 1993. Mencegah Serangan Jantung Dengan Menekan Kolesterol.
Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Carandang, EV., 2005. Health Benefits Of Virgin Coconut Oil Explained. <http://www.pcrdf.Org./artemiages%.5cVCO.doc>. (7 februari 2009).
- Dayrit, Conrado S.MD., 2000. Coconut Oil in Health and Disease : It's and Monolaurin's Potencial and Cure for HIV/AIDS, XXXVI Cocotech Meeting, Chennai, India.
- Dayrit, Conrado S. MD., 2003. Coconut Oil : Atherogenic or not ? (What therefore causes Atherosclerosis). *Philippine Journal of Cardiology* 31:97-104.
- Enig, M.G., 2001. Coconut In Support of Good Health in the 21 Century, 1999.www.mecola.com/2001/jul/28-coconut-health.htm
- Eraly, M.G., 1995. Coconut Oil and Heart Attack. Coconut and Coconut Oil in Human Nutrition, Proceedings Symposium on Coconut Oil in Human Nutrition, March, 27,1994. Coconut Development Board. Kochi, India, p. 63-64
- Fife,B, 2003. The Healing Miracels of Coconut Oil. Colorado Springs Health Wise Pub Guyton, A.C.,1991, Buku Teks Fisiologi Kedokteran : Teks Book of Medical Physiology (diterjemahkan oleh Adji Darma dan P Lukmanto). Jakarta:EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Japardi,I., 2002. Patomekanisme Stroke Infark Aterotrombotik. http://library.usu.ac.id/download/fk/bedah-iskandar%20japardi_35.pdf(2 Oktober 2007)

- Junquiera,C., J. Carneiro dan K.O. Kelly, 1997. Histologi Dasar (diterjemahkan oleh Yan Tambayong). Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kalbe Farma, 2004. cholestet. [http://www. Kalbe Farma Medical Portal.com/simvastatin.htm](http://www.KalbeFarmaMedicalPortal.com/simvastatin.htm).
- KalimH., Karo-Karo S., Soerianata S, 1996. Pedoman Tatalaksana Dislipidemia dalam penanggulangan Penyakit Jantung Koroner. Persatuan Dokter Spesialis Kardiovaskuler Indonesia.
- Leeson, C.R., T.S. Leeson dan A.A. Paparo, 1996. Buku Ajar Histologi. Alih bahasa Yan Tambayong. Jakarta: EGC.
- Ley, K and Y.Huo, 2001, VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J.Clin Invest.* 107(10):1209-1210.
- Li, H., M.I.Cybulsky, M.A. Gimbrone and P. Libby, 1993. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, cytokine- regulatable mononuclear leucocyte adhesion molecule in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler thromb* :13; 197-204.
- Moeliandari , F. dan A. Wijaya, 2002. Metabolisme dan Mekanisme Anti-Aterosklerotik Dari HDL. Suatu Pandangan Baru. [http://www. Prodia.co.id/files/FD/fdiag.4.2002.pdf](http://www.Prodia.co.id/files/FD/fdiag.4.2002.pdf).(2 oktober 2007)
- Murray, R.K., D.K. Granner,P.A. Mayes, and V.W. Rodwell, 1996. Biokimia Harper (Harper's Review of Biochemistry diterjemahkan oleh; A. Hartono). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Nevin K.G., T. Rajamohan, Beneficial Effect of Virgin Coconut Oil on Lipid Parameters and In vitro Oxidation. *Clinical Biochemistry* 37, 2004;830-835.
- Nogrady,T., 1992, Kimia Medisinal : Pendekatan Secara Biokimia (diterjemahkan oleh Raslim Rasyid dan Amir Musadad). Bandung:Penerbit ITB

- Prabowo P., 1995. Patogenesis dan Regresi Aterosklerosis, dalam Dislipidemia dan Penyakit Jantung Koroner Problematik dan Pengelolaannya. Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan III/1995. Laboratorium-UPF Kardiologi Fakultas Kedokteran UNAIR-RSUD Dr. Sutomo Surabaya. Hal 23-34.
- Price, S.A. dan L.M. Wilson, 1994. Patofisiologi- Konsep Klinik Proses-Proses Penyakit (diterjemahkan oleh Adji Darma). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Russels, R., 1999. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N.EJM.*; 1999:15-125.
- Scalia R, J.Z. Appel, M.L. Allan, 1998. Leukocyte-Endothelium Interaction During the Early Stages of Hypercholesterolemia in The Rabbit. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 18; 1093-1100
- Setiaji, B.,S . Prayugo, 2006, Membuat VCO Berkualitas Tinggi. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Syah, A. N. A., 2005. Virgin Coconut Oil, Minyak Penakluk Aneka Penyakit. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Tanuwidjoyo, S., 2005, Pathogenesis of Atherosclerosis: The Role of Inflammation. *Kumpulan naskah Semarang Cardiology Up date “ New Trends in Cardiovascular Pharmacotherapy”*. Semarang: Badan Penerbit Undip.
- Verd, J. C., Cristina, P., Marta, A., Cristina, D., Gonzalo, H., Manuel, V., Tomas, A., Juan, C. L., and Rosa, M. S. 1999. Different Effect Of Simvastatin And Atorvastatin On Key Enzyme Involved In VLDL Synthesis And Chatabolism In High Fat/ Cholesterol Fet Rabbits. *British Journal of Pharmacology* 127: 1479-1485.

Vita, J.A., 2005. Polyphenol And Cardiovascular Disease: Effect On Endothelial And Platelet Function. *American Journal of Clinical Nutrition* 81(1): 292s-297s.

Wirahadikusumah, M., 1985. Biokimia : Metabolismi, Energi, Karbohidrat dan Lipid, Ed.1, Bandung: Penerbit ITB, 164-172.

Wresdiyati, T., Astawan, M., Lusiana, Y.H., 2006 Profil Imunohistokimia Super Oksida Dismutase (SOD) Pada Jaringan Hati Tikus dengan Kondisi Hiperkolesterolemia. *Jurnal Biosains Hayati* 13: 85-89

LAMPIRAN

Lampiran 1. Kadar Kolesterol Total Darah *Rattus norvegicus* L.

a. Data mentah kadar kolesterol Total darah *Rattus norvegicus* L selama percobaan (mg/dl)

| Kelompok | Ulangan | Hari ke 1 | Hari ke 14 | Hari ke 28 |
|-------------|---------|---------------|---------------|---------------|
| I | 1 | 56,1 | 48,2 | 50,7 |
| | 2 | 48,7 | 56,7 | 58 |
| | 3 | 47,9 | 47,7 | 50 |
| | 4 | 57,6 | 42,4 | 45 |
| | 5 | 54,3 | 57,1 | 60 |
| II | 1 | 51,6 | 54,4 | 40,8 |
| | 2 | 51,5 | 65,8 | 48 |
| | 3 | 50,4 | 58,8 | 30,8 |
| | 4 | 54,6 | 61,8 | 47,8 |
| | 5 | 56 | 61,4 | 47,5 |
| III | 1 | 66,2 | 65,4 | 65,2 |
| | 2 | 43,8 | 61,7 | 42 |
| | 3 | 46,8 | 53,0 | 53 |
| | 4 | 52,2 | 58,0 | 57,8 |
| | 5 | 56 | 61,6 | 61,5 |
| IV | 1 | 51 | 58,7 | 44,6 |
| | 2 | 52,6 | 62,1 | 53,6 |
| | 3 | 53,4 | 52,2 | 46,1 |
| | 4 | 49,5 | 56,9 | 50 |
| | 5 | 52 | 64,3 | 43,7 |
| V | 1 | 45,14 | 51,9 | 42 |
| | 2 | 54,1 | 59,6 | 45,2 |
| | 3 | 57,7 | 69,4 | 45,4 |
| | 4 | 58 | 69,2 | 50,1 |
| | 5 | 49,1 | 58,9 | 40,3 |
| Rata - rata | | 52,652 | 58,288 | 48,764 |

Kenaikan Kadar Kolesterol Total Darah setelah pemberian lemak babi 10% =
 $(58,288 - 52,652) : 52,652 \times 100\% = 10,7\%$.

Lampiran 2 : Kadar LDL Darah *Rattus norvegicus* L

a. Data mentah kadar LDL darah *Rattus norvegicus* L selama percobaan (mg / dl)

| Kelompok | Ulangan | Hari ke 1 | Hari ke 14 | Hari ke 28 |
|-------------|---------|---------------|---------------|---------------|
| I | 1 | 13,6 | 10,4 | 23,9 |
| | 2 | 18,8 | 30 | 33,4 |
| | 3 | 12,6 | 28,9 | 17,8 |
| | 4 | 29,7 | 27,5 | 18 |
| | 5 | 20,8 | 32,1 | 33,6 |
| II | 1 | 23,2 | 26 | 23 |
| | 2 | 13,7 | 29,8 | 23,8 |
| | 3 | 12,5 | 16,4 | 11,1 |
| | 4 | 20,6 | 28,1 | 22,5 |
| | 5 | 19,2 | 32,2 | 15 |
| III | 1 | 16 | 41,7 | 42 |
| | 2 | 11,8 | 11,7 | 12,8 |
| | 3 | 14,2 | 34,6 | 37,2 |
| | 4 | 15,8 | 40,8 | 41 |
| | 5 | 18,7 | 32,2 | 37.7 |
| IV | 1 | 14,4 | 22,8 | 24,9 |
| | 2 | 12,7 | 25,1 | 21,1 |
| | 3 | 30,1 | 25,6 | 21,6 |
| | 4 | 14,4 | 16,6 | 18,5 |
| | 5 | 17,8 | 22,8 | 13 |
| V | 1 | 13,6 | 15,5 | 14,2 |
| | 2 | 20,4 | 32,5 | 19 |
| | 3 | 25,5 | 28,8 | 23,5 |
| | 4 | 9,8 | 33,8 | 20 |
| | 5 | 10,5 | 23,5 | 19,8 |
| Rata - rata | | 17,216 | 26,776 | 23,536 |

Kenaikan Kadar LDL Darah setelah pemberian lemak babi 10% =

$$(26,776 - 17,216) : 17,216 \times 100\% = 55,52\%.$$

Lampiran 3. Kadar HDL Darah *Rattus norvegicus* L.

. Data mentah kadar HDL darah *Rattus norvegicus* L selama percobaan (mg / dl)

| Kelompok | Ulangan | Hari ke 1 | Hari ke 14 | Hari ke 28 |
|-------------|---------|---------------|---------------|---------------|
| I | 1 | 22,1 | 14,8 | 22.6 |
| | 2 | 26,5 | 27,5 | 27.1 |
| | 3 | 21,2 | 20 | 22.5 |
| | 4 | 18,6 | 22,9 | 21 |
| | 5 | 18,5 | 34.7 | 31 |
| II | 1 | 20,1 | 15,7 | 33 |
| | 2 | 27,5 | 25,3 | 24,8 |
| | 3 | 20,2 | 24,6 | 23,2 |
| | 4 | 27,1 | 26,9 | 32,4 |
| | 5 | 35,4 | 24,7 | 22,5 |
| III | 1 | 22,1 | 19,9 | 23 |
| | 2 | 26,4 | 23,9 | 27 |
| | 3 | 21 | 21 | 18.6 |
| | 4 | 18,5 | 10,4 | 18.3 |
| | 5 | 18,6 | 24,5 | 21 |
| IV | 1 | 14,8 | 23,4 | 32,3 |
| | 2 | 27,5 | 27,7 | 33,2 |
| | 3 | 20 | 16,2 | 16,3 |
| | 4 | 22,9 | 21,9 | 37,8 |
| | 5 | 34,7 | 22,1 | 28,8 |
| V | 1 | 24 | 18,1 | 27,7 |
| | 2 | 27 | 24,1 | 29,3 |
| | 3 | 18,4 | 28,4 | 36,1 |
| | 4 | 19,2 | 25,3 | 24,8 |
| | 5 | 27,4 | 17,5 | 20,1 |
| Rata - rata | | 23,028 | 22,528 | 26,176 |

Penurunan Kadar HDL Darah setelah pemberian lemak babi 10% =

$$(22,528 - 23,028) : 23,028 = - 2,17\%$$

Lampiran 4. Uji Statistik Kadar Kolesterol Total Darah

T-Test kadar Kolesterol Total

Paired Samples Statistics

| | Mean | N | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|----------------------------------|---------|----|----------------|-----------------|
| Pair 1 Kadar_Ttl_Kolest_minggu_0 | 52.6536 | 25 | 4.77371 | .95474 |
| Kadar_Ttl_Kolest_minggu_2 | 58.2840 | 25 | 6.58854 | 1.31771 |

Paired Samples Test

| | | Paired Differences | | | | | | | |
|--------|---|--------------------|----------------|-----------------|---|----------|--------|----|-----------------|
| | | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean | 95% Confidence Interval of the Difference | | t | df | Sig. (2-tailed) |
| | | | | | Lower | Upper | | | |
| Pair 1 | Kadar_Ttl_Kolest_minggu_0 - Kadar_Ttl_Kolest_minggu_2 | -5.63040 | 6.92731 | 1.38546 | -8.48985 | -2.77095 | -4.064 | 24 | .000 |

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

| | Value Label | N |
|-------------|-------------|---|
| Perlakuan 1 | Kontrol | 5 |
| 2 | Simvastatin | 5 |
| 3 | Kolesterol | 5 |
| 4 | VCO1 | 5 |

Between-Subjects Factors

| | Value Label | N |
|---|-------------|---|
| 1 | Kontrol | 5 |
| 2 | Simvastatin | 5 |
| 3 | Kolesterol | 5 |
| 4 | VCO1 | 5 |
| 5 | VCO2 | 5 |

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent

Variable:Kadar_Ttl_Kolest_minggu_4

| F | df1 | df2 | Sig. |
|-------|-----|-----|------|
| 1.274 | 4 | 20 | .313 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan + Kadar_Ttl_Kolest_minggu_2

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Kadar_Ttl_Kolest_minggu_4

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|--------|-------------------------|----|-------------|---|------|
|--------|-------------------------|----|-------------|---|------|

| | | | | | |
|---------------------------|----------------------|----|---------|-------|------|
| Corrected Model | 806.671 ^a | 5 | 161.334 | 5.030 | .004 |
| Intercept | 41.557 | 1 | 41.557 | 1.296 | .269 |
| Perlakuan | 790.333 | 4 | 197.583 | 6.160 | .002 |
| Kadar_Ttl_Kolest_minggu_2 | 212.273 | 1 | 212.273 | 6.618 | .019 |
| Error | 609.447 | 19 | 32.076 | | |
| Total | 60864.310 | 25 | | | |
| Corrected Total | 1416.118 | 24 | | | |

a. R Squared = ,570 (Adjusted R Squared = ,456)

Estimated Marginal Means

Perlakuan

Dependent Variable:Kadar_Ttl_Kolest_minggu_4

| Perlakuan | Mean | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|-------------|---------------------|------------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | 57.296 ^a | 3.091 | 50.827 | 63.765 |
| Simvastatin | 41.731 ^a | 2.579 | 36.333 | 47.129 |
| Kolesterol | 54.941 ^a | 2.560 | 49.582 | 60.299 |
| VCO1 | 47.289 ^a | 2.536 | 41.982 | 52.597 |
| VCO2 | 42.563 ^a | 2.654 | 37.009 | 48.117 |

a. Covariates appearing in the model are evaluated at the following values: Kadar_Ttl_Kolest_minggu_2 = 58,2840.

Custom Hypothesis Tests

Contrast Results (K Matrix)

| | | Dependent Variable |
|--|---|-------------------------------|
| Perlakuan Simple Contrast ^a | | Kadar_Ttl_Kolest_minggu _4 |
| Level 1 vs. Level 5 | Contrast Estimate | 14.733 |
| | Hypothesized Value | 0 |
| | Difference (Estimate - Hypothesized) | 14.733 |
| | Std. Error | 4.404 |
| | Sig. | .003 |
| | 95% Confidence Interval for Lower Bound | 5.515 |
| | Difference Upper Bound | 23.952 |
| Level 2 vs. Level 5 | Contrast Estimate | -.832 |
| | Hypothesized Value | 0 |
| | Difference (Estimate - Hypothesized) | -.832 |
| | Std. Error | 3.595 |
| | Sig. | .819 |
| | 95% Confidence Interval for Lower Bound | -8.357 |
| | Difference Upper Bound | 6.692 |
| Level 3 vs. Level 5 | Contrast Estimate | 12.378 |
| | Hypothesized Value | 0 |
| | Difference (Estimate - Hypothesized) | 12.378 |
| | Std. Error | 3.606 |
| | Sig. | .003 |
| | 95% Confidence Interval for Lower Bound | 4.829 |

| | | |
|---------------------|---|-------------|
| | Upper Bound | 19.926 |
| Level 4 vs. Level 5 | Contrast Estimate | 4.727 |
| | Hypothesized Value | 0 |
| | Difference (Estimate - Hypothesized) | 4.727 |
| | Std. Error | 3.644 |
| | Sig. | .210 |
| | 95% Confidence Interval for Lower Bound | -2.901 |
| | Difference | Upper Bound |
| | | 12.354 |

a. Reference category = 5

Lampiran 5. Uji Statistik Kadar LDL Darah

T-Test Kadar LDL

Paired Samples Statistics

| | Mean | N | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|---------------------------|---------|----|----------------|-----------------|
| Pair 1 Kadar_LDL_minggu_0 | 17.2160 | 25 | 5.51526 | 1.10305 |
| Kadar_LDL_minggu_2 | 26.7760 | 25 | 8.06558 | 1.61312 |

Paired Samples Test

| | Paired Differences | | | | | | | |
|--|--------------------|----------------|-----------------|---|----------|--------|----|-----------------|
| | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean | 95% Confidence Interval of the Difference | | t | df | Sig. (2-tailed) |
| | | | | Lower | Upper | | | |
| Pair 1 Kadar_LDL_minggu_0 - Kadar_LDL_minggu_2 | -9.56000 | 8.71015 | 1.74203 | -13.15537 | -5.96463 | -5.488 | 24 | .000 |

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

| | Value Label | N |
|-------------|-------------|---|
| Perlakuan 1 | Kontrol | 5 |
| 2 | Simvastatin | 5 |

| | | |
|---|------------|---|
| 3 | Kolesterol | 5 |
| 4 | VCO1 | 5 |
| 5 | VCO2 | 5 |

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable:Kadar_LDL_minggu_4

| F | df1 | df2 | Sig. |
|-------|-----|-----|------|
| 2.696 | 4 | 20 | .060 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan + Kadar_LDL_minggu_2

Estimated Marginal Means

Perlakuan

Dependent Variable:Kadar_LDL_minggu_4

| Perlakuan | Mean | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|-------------|---------------------|------------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | 25.951 ^a | 2.488 | 20.744 | 31.158 |
| Simvastatin | 19.169 ^a | 2.483 | 13.971 | 24.367 |
| Kolesterol | 30.813 ^a | 2.618 | 25.334 | 36.292 |
| VCO1 | 22.394 ^a | 2.564 | 17.026 | 27.761 |
| VCO2 | 19.273 ^a | 2.483 | 14.076 | 24.470 |

Perlakuan

Dependent Variable:Kadar_LDL_minggu_4

| Perlakuan | Mean | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|-------------|---------------------|------------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | 25.951 ^a | 2.488 | 20.744 | 31.158 |
| Simvastatin | 19.169 ^a | 2.483 | 13.971 | 24.367 |
| Kolesterol | 30.813 ^a | 2.618 | 25.334 | 36.292 |
| VCO1 | 22.394 ^a | 2.564 | 17.026 | 27.761 |
| VCO2 | 19.273 ^a | 2.483 | 14.076 | 24.470 |

a. Covariates appearing in the model are evaluated at the following values: Kadar_LDL_minggu_2 = 26,7760.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Kadar_LDL_minggu_4

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|--------------------|-------------------------|----|-------------|--------|------|
| Corrected Model | 1337.075 ^a | 5 | 267.415 | 8.675 | .000 |
| Intercept | 86.394 | 1 | 86.394 | 2.802 | .111 |
| Perlakuan | 457.219 | 4 | 114.305 | 3.708 | .022 |
| Kadar_LDL_minggu_2 | 496.947 | 1 | 496.947 | 16.120 | .001 |
| Error | 585.725 | 19 | 30.828 | | |
| Total | 15752.560 | 25 | | | |
| Corrected Total | 1922.800 | 24 | | | |

a. R Squared = ,695 (Adjusted R Squared = ,615)

Test Results

Dependent Variable:Kadar_LDL_minggu_4

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Contrast | 457.219 | 4 | 114.305 | 3.708 | .022 |
| Error | 585.725 | 19 | 30.828 | | |

Custom Hypothesis Tests

Contrast Results (K Matrix)

| | | Dependent Variable |
|--|---|--------------------|
| | | Kadar_LDL_minggu_4 |
| Perlakuan Simple Contrast ^a | | |
| Level 1 vs. Level 5 | Contrast Estimate | 6.678 |
| | Hypothesized Value | 0 |
| | Difference (Estimate - Hypothesized) | 6.678 |
| | Std. Error | 3.515 |
| | Sig. | .073 |
| | 95% Confidence Interval for Lower Bound | -.679 |
| | Difference Upper Bound | 14.035 |
| Level 2 vs. Level 5 | Contrast Estimate | -.104 |
| | Hypothesized Value | 0 |
| | Difference (Estimate - Hypothesized) | -.104 |

| | | |
|---------------------|---|-------------|
| | Std. Error | 3.512 |
| | Sig. | .977 |
| | 95% Confidence Interval for Lower Bound | -7.454 |
| | Difference | Upper Bound |
| | | 7.247 |
| Level 3 vs. Level 5 | Contrast Estimate | 11.540 |
| | Hypothesized Value | 0 |
| | Difference (Estimate - Hypothesized) | 11.540 |
| | Std. Error | 3.606 |
| | Sig. | .005 |
| | 95% Confidence Interval for Lower Bound | 3.992 |
| | Difference | Upper Bound |
| | | 19.088 |
| Level 4 vs. Level 5 | Contrast Estimate | 3.121 |
| | Hypothesized Value | 0 |
| | Difference (Estimate - Hypothesized) | 3.121 |
| | Std. Error | 3.571 |
| | Sig. | .393 |
| | 95% Confidence Interval for Lower Bound | -4.353 |
| | Difference | Upper Bound |
| | | 10.595 |

a. Reference category = 5

Lampiran 6. Uji Statistik Kadar HDL Darah

T-Test Kadar HDL

Paired Samples Statistics

| | Mean | N | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|---------------------------|---------|----|----------------|-----------------|
| Pair 1 Kadar_HDL_minggu_0 | 23.0280 | 25 | 4.74820 | .94964 |
| Kadar_HDL_minggu_2 | 22.4600 | 25 | 5.16882 | 1.03376 |

Paired Samples Test

| | Paired Differences | | | | | | | |
|--|--------------------|----------------|-----------------|---|---------|------|----|---------------|
| | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean | 95% Confidence Interval of the Difference | | t | df | Sig. (tailed) |
| | | | | Lower | Upper | | | |
| Pair 1 Kadar_HDL_minggu_0 - Kadar_HDL_minggu_2 | -.56800 | 6.63084 | 1.32617 | -2.16908 | 3.30508 | .428 | 24 | .672 |

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

| | Value Label | N |
|-------------|-------------|---|
| Perlakuan 1 | Kontrol | 5 |
| 2 | Simvastatin | 5 |

| | | |
|---|------------|---|
| 3 | Kolesterol | 5 |
| 4 | VCO1 | 5 |
| 5 | VCO2 | 5 |

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable:Kadar_HDL_minggu_4

| F | df1 | df2 | Sig. |
|-------|-----|-----|------|
| 1.688 | 4 | 20 | .192 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan + Kadar_HDL_minggu_2

Estimated Marginal Means

Perlakuan

Dependent Variable:Kadar_HDL_minggu_4

| Perlakuan | Mean | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|-------------|---------------------|------------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | 24.082 ^a | 2.271 | 19.329 | 28.836 |
| Simvastatin | 26.692 ^a | 2.258 | 21.965 | 31.419 |
| Kolesterol | 22.836 ^a | 2.309 | 18.004 | 27.668 |
| VCO1 | 29.760 ^a | 2.250 | 25.051 | 34.468 |
| VCO2 | 27.490 ^a | 2.250 | 22.781 | 32.199 |

Perlakuan

Dependent Variable:Kadar_HDL_minggu_4

| Perlakuan | Mean | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|-------------|---------------------|------------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | 24.082 ^a | 2.271 | 19.329 | 28.836 |
| Simvastatin | 26.692 ^a | 2.258 | 21.965 | 31.419 |
| Kolesterol | 22.836 ^a | 2.309 | 18.004 | 27.668 |
| VCO1 | 29.760 ^a | 2.250 | 25.051 | 34.468 |
| VCO2 | 27.490 ^a | 2.250 | 22.781 | 32.199 |

a. Covariates appearing in the model are evaluated at the following values: Kadar_HDL_minggu_2 = 22,4600.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Kadar_HDL_minggu_4

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|--------------------|-------------------------|----|-------------|-------|------|
| Corrected Model | 337.643 ^a | 5 | 67.529 | 2.669 | .054 |
| Intercept | 251.712 | 1 | 251.712 | 9.950 | .005 |
| Perlakuan | 150.773 | 4 | 37.693 | 1.490 | .245 |
| Kadar_HDL_minggu_2 | 147.232 | 1 | 147.232 | 5.820 | .026 |
| Error | 480.668 | 19 | 25.298 | | |
| Total | 17942.650 | 25 | | | |
| Corrected Total | 818.310 | 24 | | | |

a. R Squared = ,413 (Adjusted R Squared = ,258)

Test Results

Dependent Variable:Kadar_HDL_minggu_4

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Contrast | 150.773 | 4 | 37.693 | 1.490 | .245 |
| Error | 480.668 | 19 | 25.298 | | |

Custom Hypothesis Tests

Contrast Results (K Matrix)

| | | Dependent Variable |
|--|---|--------------------|
| | | Kadar_HDL_minggu_4 |
| Perlakuan Simple Contrast ^a | | |
| Level 1 vs. Level 5 | Contrast Estimate | -3.408 |
| | Hypothesized Value | 0 |
| | Difference (Estimate - Hypothesized) | -3.408 |
| | Std. Error | 3.192 |
| | Sig. | .299 |
| | 95% Confidence Interval for Lower Bound | -10.090 |
| | Difference Upper Bound | 3.274 |
| Level 2 vs. Level 5 | Contrast Estimate | -.799 |
| | Hypothesized Value | 0 |
| | Difference (Estimate - Hypothesized) | -.799 |
| | Std. Error | 3.185 |

| | | |
|---------------------|---|-------------|
| | Sig. | .805 |
| | 95% Confidence Interval for Lower Bound | -7.465 |
| | Difference | Upper Bound |
| | | 5.867 |
| Level 3 vs. Level 5 | Contrast Estimate | -4.654 |
| | Hypothesized Value | 0 |
| | Difference (Estimate - Hypothesized) | -4.654 |
| | Std. Error | 3.231 |
| | Sig. | .166 |
| | 95% Confidence Interval for Lower Bound | -11.417 |
| | Difference | Upper Bound |
| | | 2.108 |
| Level 4 vs. Level 5 | Contrast Estimate | 2.269 |
| | Hypothesized Value | 0 |
| | Difference (Estimate - Hypothesized) | 2.269 |
| | Std. Error | 3.182 |
| | Sig. | .484 |
| | 95% Confidence Interval for Lower Bound | -4.391 |
| | Difference | Upper Bound |
| | | 8.930 |

a. Reference category = 5

Lampiran 8. Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Cara Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Sectioning atau pembedahan, dilakukan setelah selesai perlakuan yaitu setelah tikus dikorbankan pada hari ke 28 untuk mengambil organ. Organ yang diambil adalah aorta.

Fixasi (Fiksasi). Potongan organ dimasukkan dalam botol- botol flakon yang sudah diisi larutan fiksatif (PBS/ Phospat Buffer Saline) yang volumenya minimal 10x besar potongan organ.

Washing(Pencucian). Pencucian dengan alcohol 70%.

Dehidrasi (Dehidrasi). Molekul air dihilangkan dari jaringan dengan cara memindahka organ ke dalam alkohol bertingkat (dari 80%, 90%, 96%, absolut), masing-masing 2x selama 15 menit.

Clearing (Penjernihan), dengan cara memindahkan potongan organ ke dalam botol yang berisi toluol hingga jaringan menjadi transparan.

Infiltrasi. Dilakukan dalam oven dengan temperatur 55- 58 derajat C. Gelas Erlenmeyer diisi xilol dan parafin dengan perbandingan 1:1, kemudian deretan parafin murni I, II, dan III, potongan jaringan dipindahkan berturut-turut ke dalam gelas Erlenmeyer, masing-masing selama 30 menit.

Embedding(penyelubungan) atau penanaman jaringan pada parafin, dilakukan dengan memasukkan potongan jaringan dari parafin III ke dalam cetakan yang telah diisi dengan parafin cair, letak jaringan diatur menurut rencana pemotongan. Blok diberi label.

Sectioning (pengirisan). Blok-blok parafin diiris sedemikian rupa sehingga permukaan yang akan diiris dengan pisau mikrotom berbentuk segi empat. Blok parafin direkatkan pada holder kayu hingga melekat erat . Holder bersama blok parafin dipasang pada *rotary microtome*, selanjutnya blok parafin diiris setebal 3-4 mikron meter.

Affixing atau penempelan, *coupes* atau film (potongan pita jaringan) dilekatkan dengan poly L-lysin *glass slide* yang telah diberi label. Slide tersebut diinkubasi pada suhu 37 derajat C selama satu malam supaya lebih melekat.

Deparafinasi dilakukan dengan memasukkan slide ke dalam xylene I, xylene II, dan xylene III masing-masing selama 5 menit. Kemudian slide dimasukkan dalam alkohol bertingkat (96%, 95%, 70%), masing-masing selama 2 x 5 menit. Selanjutnya slide dimasukkan dalam aquades selama 2 x 5 menit.

Tahap retrieval antigen dilakukan dengan buffer sitrat. Slide dimasukkan ke dalam *microwave oven* dengan buffer sitrat pH 6,4 pada suhu sedang selama 2 menit dan pada suhu rendah selama 1 menit.

Selanjutnya dicuci dengan aquades 2 x 5 menit, sambil digoyang perlahan-lahan.

Tahapan *quencing endogenous peroxidase* :

Slide dikeluarkan dari air dan dikeringkan dengan menggunakan kertas *tissue*. Diinkubasi dengan metanol + H₂O₂ 3% dalam *humid chamber* selama 30 menit, selanjutnya slide dicuci dengan PBS 2 x 5 menit.

Slide ditetesi dengan *blocking reagent* 100 ul, dibiarkan selama 20 menit, kemudian dicuci dengan aquades 2 x 5 menit. Tepi irisan sampel ditandai dengan dako pen sebelum ditetesi *blocking reagent*.

Selanjutnya slide ditetesi dengan antibodi primer mouse anti human V-CAM 1 yang telah dilarutkan dalam antibodi diluent (1: 100).

Kemudian disimpan dalam kulkas pada suhu 4 derajat selama 18 jam atau dapat juga dilanjutkan keesokan harinya. Slide ini harus dijaga kelembabannya, sehingga pada tempat penampung slide diberi sedikit air.

Slide dicuci dengan aquades 2 x 5 menit setelah dikeluarkan dari kulkas. Ditambahkan antibodi sekunder berlabel biotin 100 ul, ditunggu selama 20 menit, kemudian dicuci lagi dengan aquades 2 x 5 menit. Slide diberi substrat DAB (diaminobenzidine) + H₂O₂ 3% dan diletakkan di tempat yang tidak terkena sinar, ditunggu selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit.

Pewarnaan tandingan (*counter stain*) dilakukan dengan menggunakan *hematoxilin mayer* selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir.

Slide dikeringkan, kemudian dilakukan dehidrasi dngan alkohol bertingkat dari 70%, 80%, 90%, absolut, xilol 2x5 menit dan ditutup *deck glass* yang dilekatkan dengan *mounting media*.

Slide dilihat dengan mikroskop OLYMPUS seri BX-41 yang dilengkapi kamera dan memakai *software* OLYSIA di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNS. Sel endotel aorta yang bernilai positif (ekspresi V-CAM 1) ditunjukkan dengan warna coklat kuning keemasan sampai dengan coklat tua sebagai reaksi enzimatis antara antibodi monoklonal Rat anti human Vascular Cell Adhesion Molecule(V-CAM1) dengan antigen permukaan penanda sel endotel dilanjutkan dengan enzim peroksidase dan DAB sebagai substrat enzim yang menyertai reaksi spesifik antara antigen dan antibodi yang digunakan .