

PENGARUH PEMBERIAN VCO TERHADAP KADAR KOLESTEROL TOTAL, TNF- α , DAN JUMLAH LEUKOSIT

(Studi Eksperimental Pada Tikus Wistar Jantan dengan Hiperkolesterol)

Tesis



Magister Ilmu Biomedik

Mutmainnah
MBK 19.14.01.0157

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2021**

**PENELITIAN
PENGARUH PEMBERIAN VCO TERHADAP KADAR
KOLESTEROL TOTAL, TNF- α , DAN JUMLAH LEUKOSIT**

(Studi Eksperimental Pada Tikus Wistar Jantan dengan Hiperkolesterol)

disusun oleh :

**Mutmainnah
MBK 19.14.01.0157**

Yang telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada 20 Agustus 2021

Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Dr. Hj.Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes
NIK. 220198045

Dr. dr. Chodidjah, M.Kes
NIK. 210186023

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik,
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang



Assoc. Prof. DR. Da. Agung Putra, Msi. Med

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Agustus 2021



Mutmainnah

RIWAYAT HIDUP

1. Identitas Diri

Nama : Mutmainnah
 Tempat / tanggal lahir : Takalar, 14 November 1997
 Agama : Islam
 Jenis Kelamin : Perempuan

2. Riwayat Pendidikan Formal

1. TK Aisyiah Bone : Lulus tahun 2003
 2. SD Inp. Limbung : Lulus tahun 2009
 3. MTS Sultan Hasanuddin : Lulus tahun 2012
 4. SMAN 1 Takalar : Lulus tahun 2015
 5. D4 Ahli Teknologi Laboratorium Medik : Lulus tahun 2019
 6. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2019- sekarang

3. Riwayat Keluarga

Nama Orang Tua
 Ibu : Rahmatiah
 Ayah : Drs. Syakib Arsalam
 Nama Saudara Kandung
 Kakak : dr. Khusnul Khatimah
 Adik 1 : Faturrahman
 Adik 2 : St. Hajar
 Adik 3 : Farhan

KATA PENGANTAR

Puji syukur terpanjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia dan ridho-NYA, sehingga proposal tesis dengan judul “Pengaruh Pemberian VCO Terhadap Kadar Kolesterol Total, TNF- α , dan Jumlah Leukosit (Studi Experimental pada Tikus Wistar Jantan dengan Hiperkolesterol)” ini dapat penulis selesaikan.

Proposal Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Biomedik di program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya, kepada :

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Drs. H. Bedjo Santoso, M.T.,Ph.D
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi Sp.KF. SH.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Assoc. Prof. DR. Dr. Agung Putra, Msi. Med
4. Ibu Dr. Hj. Ir. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku dosen pembimbing pertama yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan proposal.
5. Ibu Dr.dr.Chodidjah.M.Kes atas bimbingan, arahan dan waktu yang telah diluangkan kepada penulis untuk berdiskusi selama menjadi dosen pembimbing kedua.
6. Bapak dr. Fikri Taufiq, M.Si. Med, Ph.D atas bimbingan, saran dan masukkannya sebagai penguji pertama.
7. Ibu Dr. Siti Thomas, M.Kes, S.KM atas bimbingan, saran dan masukkannya sebagai penguji kedua.

8. Ibu Dr. dr. Sri Priyantini Mulyani, Sp.A atas bimbingan, saran dan masukannya sebagai penguji ketiga.
9. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
10. Segenap staf administrasi progam Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
11. Kedua orang tua dan seluruh keluarga saya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas segala dukungan dan doanya.
12. Teman yang selalu ada dan sebagai penyemangat saya terima kasih atas segala motivasi, perhatian, dan dukungan yang telah diberikan selama ini.
13. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Dengan keterbatasan pengalaman, ilmu maupun pustaka yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan dan pengembangan lanjut agar benar benar bermanfaat. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran agar proposal tesis ini lebih sempurna serta sebagai masukan bagi penulis untuk penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa yang akan datang.

Akhir kata, penulis berharap tesis ini memberikan manfaat bagi kita semua terutama untuk pengembangan ilmu pengetahuan yang ramah lingkungan.

Wassalammua'laikum warohmatullahi wabarakatuh

Semarang, Agustus 2021



Mutmainnah

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR	
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Umum	4
1.4 Tujuan Khusus.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
1.6 Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kolesterol	8
2.2 Hiperkolesterol	14
2.3 Diet Tinggi Kolesterol	20
2.4 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)	23
2.5 Leukosit	33
2.6 Virgin Coconut OIL (VCO)	43
2.7 Efek VCO terhadap kadar kolesterol, TNF- α , dan Jumlah Leukosit pada Hiperkolesterol	46

BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
3.1	Kerangka Teori..... 51
3.2	Kerangka Konsep 55
3.3	Hipotesis..... 55
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian 56
4.2	Populasi 57
4.3	Sampel..... 57
4.4	Besar Sampel..... 58
4.5	Varibel dan Definisi Operasional..... 58
4.6	Instrumen dan Bahan Penelitian..... 61
4.7	Dosis VCO 62
4.8	Pemberian Makanan Diet Tinggi Kolesterol..... 62
4.9	Cara Kerja Penelitian 62
4.10	Alur Penelitian..... 66
4.11	Tempat dan Waktu Penelitian 67
4.12	Analisis Data 67
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1	Hasil Penelitian 68
5.2	Pembahasan..... 75
5.3	Keterbatasan Penelitian..... 80
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1	Kesimpulan 81
6.2	Saran..... 81
DAFTAR PUSTAKA 83	
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Struktur Kimia Kolesterol.....	8
2.2	Sintesis Kolesterol	11
2.3	Struktur Gen TNF- α	26
2.4	TNF <i>Signalling Pathway</i>	30
3.2	Skema Kerangka Konsep.....	37
2.5	<i>Formulation of white cells</i>	35
2.6	Jenis Leukosit	40
3.1	Bagan Kerangka Teori	54
3.2	Bagan Kerangka Konsep	55
4.1	Desain Penelitian	56
4.2	Kamar Hitung <i>Improved Neubauer</i>	65
4.3	Bagan Alur Penelitian	66
5.1	Rerata kadar kolesterol total (mg/dL).....	70
5.2	Rerata kadar TNF- α (ng/L).....	72
5.3	Rerata kadar jumlah leukosit (sel/mm ³).....	74

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1.1	Originalitas Penelitian.....	6
2.1	Klasifikasi Kadar Kolesterol Total	15
2.2	Sifat Fisikokimia TNF- α	25
2.3	Perbedaan Jumlah jenis Leukosit di dalam darah.....	40
5.1	Kadar Kolesterol Tikus Setelah 7 Hari Pemberian Diet Tinggi Kolesterol.....	68
5.2	Hasil analisis rerata kadar kolesterol total, TNF- α , dan Jumlah Leukosit	69
5.3	Perbedaan kadar kolesterol total antar 2 kelompok menggunakan uji <i>Mann Whitney</i>	70
5.4	Perbedaan kadar TNF- α antar 2 kelompok menggunakan uji Tamhane's T2	72
5.5	Perbedaan Jumlah Leukosit antar 2 kelompok menggunakan uji Tukey	74
5.4	Perbedaan kadar TNF- α antar 2 kelompok menggunakan uji Tamhane's T2	72



DAFTAR SINGKATAN

APAF1	: <i>Apoptotic Protease Activating Factor-1</i>
ApoE	: <i>Apolipoprotein E</i>
ATP	: <i>Adenosine Triphosphate</i>
BID	: <i>BH3 Interacting Death Domain</i>
CAT	: <i>Catalase</i>
CPT I	: <i>Carnitine Palmitoyl Transferase</i>
CREB	: <i>Cyclic AMP response element binding protein</i>
CytoC	: <i>Cytochrome-C</i>
DD	: <i>Death domain</i>
EPO	: <i>Erythropoietin</i>
ERK2	: <i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
ETC	: <i>Electron Transport Chain</i>
FADD	: <i>Fas-Associated Death Domain</i>
FFA	: <i>Free fatty acid</i>
G-CSF	: <i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GPx	: <i>glutation peroksidase</i>
HDL	: <i>High Desity Lipoprotein</i>
HMG-CoA	: <i>Hidroxymethylglutaryl Coenxyme A Reductase</i>
HPA	: <i>Hypothalamus-pituitary-adrenal</i>
IDL	: <i>Intermediate Density Lipoprotein</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-γ</i>
IL	: <i>Interleukins</i>
IL-18	: <i>Interleukin-18</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IMT	: <i>Indeks Massa Tubuh</i>
IR	: <i>Insulin Resistensi</i>
LCAT	: <i>Lecithin cholesterol acyltransferase</i>
LDL	: <i>Low Density Lipoprotein</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
MADD	: <i>MAPK Activating Death Domain</i>

MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
M-CSF	: <i>Monocyte colony stimulating factor</i>
MCT	: <i>Medium Chain Triglycerides</i>
MDA	: <i>Melondialdehyd</i>
MEKK	: <i>MEK Kinase</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NCEP	: <i>National Cholesterol Education Program</i>
NF-AT	: <i>Nuclear factor activated T cells</i>
NF κ B	: <i>Nuclear factor kappa b</i>
NIK	: <i>NF-KappaB-Inducing Kinase</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
PJK	: <i>Penyakit Jantung Koroner</i>
RAIDD	: <i>RIP-Associated ICH-1</i>
Riskesmas	: <i>Riset Kesehatan Dasar</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SCF	: <i>Stem cell factor</i>
SM	: <i>Sindrom Metabolik</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SODD	: <i>Silencer of Death Domains</i>
STAT	: <i>Signal Transduction and activator of transcription</i>
TACE	: <i>TNF-Converting Enzyme</i>
tBID	: <i>Truncated BID</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Th1	: <i>T helper 1</i>
Th2	: <i>T helper 2</i>
TLR-4	: <i>Toll Like Reseptor 4</i>
TNFR1	: <i>TNF-Reseptor 1</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TPO	: <i>Thrombopoietin</i>
TPO	: <i>Thrombopoietin</i>
TRADD	: <i>TNFR-Associated Death Domain</i>

TRAF2	: <i>TNF Receptor-Associated Factor-2</i>
Treg	: <i>T regulator</i>
VCO	: <i>Virgin Coconut Oil</i>
VLDL	: <i>Very Low Density Lipoprotein</i>
WBC	: <i>White Blood Cells</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>



PENGARUH PEMBERIAN VCO TERHADAP KADAR KOLESTEROL TOTAL, TNF- α , DAN JUMLAH LEUKOSIT

(Studi Eksperimental pada Tikus Wistar Jantan dengan Hiperkolesterol)

ABSTRAK

Latar Belakang : Hiperkolesterol berkontribusi terhadap kejadian stress oksidatif yang dapat menyebabkan disregulasi respon proinflamasi dengan meningkatnya kadar TNF- α dan jumlah leukosit yang menjadi faktor resiko kejadian sindrom metabolik. Dibutuhkan antioksidan eksogen seperti tokofenol untuk memutus reaksi berantai dari radikal bebas, dan asam laurat sebagai antiinflamasi untuk meningkatkan imunitas, kandungan tersebut terdapat di dalam VCO.

Tujuan : Mengetahui pengaruh pemberian VCO terhadap penurunan kadar kolesterol total, kadar TNF- α , dan jumlah leukosit.

Metode : Penelitian eksperimental dengan *post test only control group design*. Subyek penelitian berjumlah 24 ekor tikus wistar jantan yang dibagi secara random menjadi 4 kelompok. Kelompok K0 tanpa pemberian diet tinggi kolesterol dan VCO. Kelompok K1 diet tinggi kolesterol tanpa pemberian VCO. Kelompok P1 dan P2 diet tinggi kolesterol dan pemberian VCO dengan dosis masing-masing 0,9 mL/200 gr BB/hari dan 0,45 mL/200 gr BB/hari. Hari ke 21 dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan kadar kolesterol total, TNF- α , dan jumlah leukosit di laboratorium PSPG UGM.

Hasil : Uji *kruskal wallis* menunjukkan perbedaan yang bermakna pada kadar kolesterol total ($p=0.000$), serta uji *one way anova* pada kadar TNF- α dan jumlah leukosit menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p=0.000$). Uji *mann whitney* kadar kolesterol total pada K0, P1, P2 menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap K1 ($p<0.05$). Hasil uji *post hoc Tamhane's* dan *Tukey* kadar TNF- α dan jumlah leukosit pada K0, P1, P2 menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kadar K1 ($p<0.05$).

Kesimpulan : Pemberian VCO menurunkan kadar kolesterol total, TNF- α , dan jumlah leukosit.

Kata kunci : VCO, kolesterol total, TNF- α , Jumlah leukosit.

THE EFFECTS OF VCO TO TOTAL CHOLESTEROL, TNF-A, AND LEUKOCYTES COUNT

(An Experimental Study Of Wistar Male Rats With Hypercholesterol)

ABSTRACT

Background: Hypercholesterol contributes to an incidence of oxidative stress that can cause dysregulation of the proinflammatory response by increasing levels of TNF- α and total leukocyte count that are risk factors for the occurrence of metabolic syndrome. Antioxidants such as tocopherol are important to break the chain reactions of free radicals, the content is contained inside the VCO.

Objective: To determine the effect of VCO on reducing total cholesterol, TNF- α levels, and total leukocyte counts.

Methods: True experimental, post test only control group design. The research subjects were 24 male wistar rats which were randomly divided into 4 groups. The K0 group without giving high cholesterol diet and VCO. The K1 was given high cholesterol diet without VCO. Group P1 and P2 were given high cholesterol diet and VCO at dose of 0,9 mL/200 gr BB/day and 0,45 mL/200gr BB/day. Day 21 blood was drawn for examination of total cholesterol, TNF- α , and total leukocyte counts in UGM's PSPG laboratory.

Results: *Kruskal Wallis* test showed significant difference in total cholesterol levels ($p=0.000$), and the *one way anova* test on TNF- α levels and leukocyte counts showed significant differences ($p=0.000$). The *man whitney* test of cholesterol levels at K0, P1, P2 showed a significant difference to K1 ($p<0.05$). The post hoc test results of *Tamhane's* and *Tukey's* TNF- α levels and the number of leukocytes at K0, P1, P2 showed a significant difference to K1 levels ($p<0.05$).
Conclusion : Giving VCO can reduce total cholesterol, TNF- α , and total leukocyte count.

Key words : VCO, Total Cholesterol, TNF- α , Leukocytes Counts

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit Jantung Koroner (PJK) adalah kasus yang telah menjadi momok selama bertahun-tahun, akan tetapi sampai sekarang belum juga dapat terselesaikan. Salah satu faktor resiko PJK adalah kondisi hiperkolesterol, yaitu terjadinya peningkatan kadar kolesterol di dalam darah melebihi batas normal, dapat dipicu dengan seringnya mengonsumsi makanan berlemak.¹ Konsumsi lemak berlebih menyebabkan terjadinya stress oksidatif, sekresi berlebih sejumlah adipokin seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), IL-18² yang dapat mengaktivasi sel-sel imun seperti leukosit, dan disregulasi respon proinflamasi yang sangat berkontribusi terhadap perkembangan Sindrom Metabolik (SM).³ Hal tersebut dapat dicegah dan diatasi dengan mengonsumsi senyawa yang mengandung tokoferol dan polifenol sebagai antioksidan untuk mencegah stress oksidatif dan yang mempunyai kandungan asam laurat sebagai agen antiinflamasi untuk meningkatkan sistem imunitas seperti *Virgin Coconut Oil* (VCO). Penelitian terdahulu telah mengamati efek VCO terhadap kadar kolesterol, namun hingga saat ini masih sedikit data mengenai penelitian pemberian VCO terhadap eksperisi TNF- α , maupun leukosit pada kondisi hiperkolesterol.⁴

Menurut Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013, prevalensi hiperkolesterol di Indonesia pada usia >15 tahun sebesar 35,9%.⁵ Prevalensi orang yang menderita *Sindrom Metabolik* (SM) diperkirakan mencapai lebih dari 20% dari populasi orang dewasa di seluruh dunia.⁶ *Sindrom Metabolik* merupakan kumpulan faktor resiko penyakit kardiovaskuler. Berdasarkan laporan *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2002, mencatat bahwa lebih dari 7 juta orang meninggal akibat Penyakit Jantung Koroner (PJK) dan diperkirakan meningkat hingga 11 juta orang pada tahun 2020,⁷ untuk kasus hiperkolesterol pada tahun yang sama WHO menyebutkan bahwa sebanyak 4,4 juta kematian akibat hiperkolesterol atau sebesar 7,9% dari jumlah total kematian di usia muda.⁵

Penelitian yang dilakukan oleh Maharani dkk pada penderita hipertensi menunjukkan bahwa terdapat penurunan kadar kolesterol total pada semua responden setelah mengonsumsi VCO selama 2 minggu.⁸ Hasil penelitian yang dilakukan oleh Akinnuga dkk dengan pemberian VCO 10% pada tikus diabetes selama 3 minggu menunjukkan bahwa terjadi penurunan konsentrasi trigliserida, kolesterol total, *Low Density Lipoprotein* (LDL), *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL), dan peningkatan pada parameter *High Density Lipoprotein* HDL. Kesimpulan pada penelitian tersebut adalah VCO mampu memperbaiki profil lipid pada keadaan diabetes mellitus.⁹ Secara *in vitro*, Sandeep dkk melakukan uji antiinflamatori dan *skin protective* dari VCO dengan hasil bahwa

VCO mampu menghambat TNF- α , IL-6, IL-8 pada sel THP-1 (*Human monocytes*).¹⁰ Pada penelitian Winarsi dkk dengan sasaran penderita candidiasis vagina, mendapatkan hasil bahwa VCO yang diperkaya Zn mampu meningkatkan *Superoxide Dismutase* (SOD), katalase, glutathion peroksidase, dan menurunkan kadar MDA.¹¹ ¹¹ Beberapa penelitian terdahulu sudah meneliti hubungan pemberian VCO terhadap profil lipid pada tikus dengan diet tinggi kolesterol, namun masih belum ada yang meneliti hubungannya terhadap parameter TNF- α dan Jumlah leukosit sebagai penanda terjadinya inflamasi pada kondisi hiperkolesterol.

Hiperkolesterol memberikan kontribusi terhadap terjadinya stress oksidatif. Diet tinggi kolesterol akan meningkatkan aktivitas enzim sitokrom P-450 oksidase dengan hasil samping terbentuknya ROS, meningkatkan LPS plasma melalui jalur aktivasi *Toll Like Reseptor 4* (TLR-4),¹² serta akan meningkatkan akumulasi lemak pada jaringan adiposa yang dapat merangsang pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α .¹³ Produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) meningkat dan kapasitas antioksidan tubuh tidak mampu mengatasinya maka akan terjadi kondisi stress oksidatif. Stress oksidatif dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan memicu sel imun berupa leukosit untuk berdiapedesis ke jaringan yang rusak lalu melakukan fagositosis.¹⁴ Asupan tambahan seperti VCO dengan kandungan utamanya asam laurat dan polifenol, dimana asam laurat dapat menekan inflamasi (antiinflamasi) dan polifenol dapat

mencegah terjadinya stress oksidatif (antioksidan). Asam laurat dan polifenol dapat bekerja secara sinergis mencegah terjadinya abnormalitas kadar kolesterol dengan cara menurunkan lipogenesis dari hepar, meningkatkan β -oksidasi di mitokondria dan peroksisom serta meningkatkan *reverse cholesterol transport*¹⁵, maka perlu dilakukan penelitian dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian VCO terhadap kadar kolesterol, TNF- α , dan jumlah leukosit pada keadaan hiperkolesterol.

1.2 Perumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian VCO terhadap penurunan kadar kolesterol, TNF- α , dan jumlah leukosit pada Tikus wistar jantan dengan keadaan hiperkolesterol?

1.3 Tujuan umum

Penelitian ini untuk membuktikan pengaruh pemberian VCO terhadap penurunan kadar kolesterol total, TNF- α , dan jumlah leukosit pada tikus wistar jantan dengan keadaan hiperkolesterol.

1.4 Tujuan Khusus

1.4.1 Menganalisis pemberian VCO dengan dosis 0,9ml/hari dan 0,45ml/hari terhadap penurunan rerata kadar kolesterol total pada tikus wistar jantan dengan keadaan hiperkolesterol.

- 1.4.2 Menganalisis pemberian VCO dengan dosis 0,9ml/hari dan 0,45ml/hari terhadap penurunan rerata kadar TNF- α pada tikus wistar jantan dengan keadaan hiperkolesterol.
- 1.4.3 Menganalisis pemberian VCO dengan dosis 0,9ml/hari dan 0,45ml/hari terhadap penurunan rerata jumlah leukosit pada tikus wistar jantan dengan keadaan hiperkolesterol.
- 1.4.4 Menganalisis perbedaan kadar kolesterol total, TNF- α , dan jumlah leukosit terhadap kelompok yang menggunakan pemberian VCO dengan dosis 0,9ml/hari dan kelompok yang menggunakan pemberian VCO dengan dosis 0,45ml/hari.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Dapat membuktikan pengaruh pemberian VCO terhadap kadar kolesterol, TNF- α , dan jumlah leukosit pada Tikus wistar jantan dengan keadaan hiperkolesterol.

1.5.2 Manfaat Praktis

Mengembangkan pemanfaatan pemberian VCO sebagai antioksidan, untuk meningkatkan imunitas tubuh.

1.6 Originalitas Penelitian

Originalitas penelitian menyajikan perbedaan dan persamaan bidang kajian yang diteliti antara peneliti dengan peneliti-peneliti sebelumnya.

Perbedaan penelitian yang akan dilakukan dengan penelitian sebelumnya adalah variabel bebas menggunakan VCO dan variabel terganggunanya menggunakan kadar kolesterol total, TNF- α , dan jumlah leukosit pada tikus wistar jantan dengan Hiperkolesterol.

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul Penelitian	Metode Penelitian	Hasil Penelitian
Tria Ranti Maharani, Herliawati, Fuji Rahmawati 2019 ⁸	Perubahan Kadar Kolesterol Total Setelah Penggunaan <i>Virgin Coconut Oil</i> (VCO) pada Penderita Hipertensi di Desa Limbang Jaya Kabupaten Ogan Ilir	Penelitian pre eksperimental dengan rancangan <i>One Group Pretest-Posttest Design</i>	Terdapat perbedaan signifikan Kadar koelsterol total sebelum dan sesudah pemberian VCO dengan p value 0,000 (p< 0,05)
A. Akinnuga, S. Jeje, O. Bamidele, V. Sunday 2014 ⁹	<i>Dietary Consumption of Virgin Coconut Oil Ameliorates Lipid Profiles in Diabetic Rats</i>	Penelitian eksprerimental dengan rancangan <i>post-test only control group design</i>	Pemberian diet VCO 10% selama 8 minggu pada tikus wistar diabetes didapatkan hasil VCO dapat memperbaiki profil lipid
Diyah Krisnawati 2014 ¹⁶	Pengaruh Pemberian <i>Virgin Coconut Oil</i> (VCO) Terhadap Jumlah Leukosit Darah Tepi Tikus Wistar Jantan Yang Dipapar <i>Staphylococcus aureus</i>	Penelitian eksprerimental dengan rancangan <i>post-test only control group design</i>	Terdapat perbedaan yang bermakna jumlah leukosit darah tepi antara kelompok kontrol, kelompok perlakuan tanpa VCO, dan kelompok perlakuan dengan VCO. Pada kelompok

			perlakuan dengan VCO didapatkan jumlah leukosit yang lebih rendah dari padakelompok perlakuan tanpa VCO.
Sandeep R. Varma, Thiyagarajan O. Sivaprakasam, Ilavarasu Arumugan, et al 2017 ¹⁰	<i>In Vitro Anti-inflammatory and skin protective properties of Virgin Coconut oil</i>	Penelitian eksperimental dengan rancangan <i>post-test only control group design</i>	<i>VCO inhibited TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-8, and IL-5 respectively in THP-1 cells. The anti inflammatory activity of VCO by suppressing inflammatory markers and protecting the skin by enhancing skin barrier function.</i>



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kolesterol

2.1.1 Pengertian Kolesterol

Kolesterol atau *cholesterin* adalah senyawa kompleks yang mempunyai berat molekul 386 Da dengan rumus molekul $C_{27}H_{45}OH$, merupakan komponen esensial membran struktural setiap sel tubuh. Konsentrasi tertinggi terdapat dalam jaringan kelenjar dan di dalam hati sekitar 80%, tempat kolesterol disintesis dan disimpan.¹⁷ Struktur kimia dasar kolesterol berupa steroid, bentuk kolesterol bebas terdapat dalam jaringan dan plasma, atau sebagai ester kolesterol dari gabungan asam lemak rantai panjang. Sebagian besar kolesterol yang dibutuhkan tubuh, disintesa secara endogen dari asetil KoA melalui β -metil glutamil KoA. Kolesterol merupakan prekursor semua steroid lain di dalam tubuh, termasuk kortikosteroid, hormon seks, asam empedu, dan vitamin D.¹⁸



Gambar 2.1 Struktur Kimia Kolesterol¹⁹

Kolesterol total adalah total dari jumlah kolesterol yang dibawa dalam partikel pembawa kolesterol dalam darah. Kolesterol memiliki peran penting dalam membentuk kompleks lipid-protein yang disebut lipoprotein, seperti kilomikron, *very low density lipoprotein* (VLDL), LDL, dan HDL. *Low density lipoprotein* (LDL) akan paralel dengan kadar kolesterol total pada kebanyakan kasus. Kolesterol yang diproduksi oleh hepar diangkut di plasma adalah sebagai LDL, sementara kolesterol yang dilepaskan dari jaringan tepi dan di esterifikasi di dalam plasma dengan asam lemak yang berasal dari lesitin oleh lesitin kolesterol diangkut ke hepar sebagai *High Density Lipoprotein* (HDL).²⁰

Kolesterol yang berasal dari luar tubuh disebut kolesterol eksogen dan kolesterol yang berasal dari dalam tubuh disebut kolesterol endogen. Kolesterol eksogen terdapat dalam semua bahan makanan yang berasal dari hewan, misalnya kuning telur, hati, daging, dan otak karena merupakan produk khas hasil metabolismenya, selain dari hewani juga berasal dari nabati dengan sumber terbesar dari minyak kelapa dan kacang-kacangan.¹⁸ Kolesterol di dalam tubuh berperan sebagai pengatur proses kimiawi, sehingga diproduksi dalam jumlah yang dibutuhkan. Sintesis kolesterol dalam hati dan usus menghasilkan sekitar 10% dari sintesis total manusia²¹. Kadar normal kolesterol tiap

100 ml dalam darah manusia yaitu 150-200 mg. Untuk kolesterol tetap dalam kisaran nilai normal maka dibutuhkan pengendalian lewat makanan dan pengendalian dengan pengaturan pembentukan kolesterol dari asetil koenzim A.²²

2.1.2 Sintesis Kolesterol

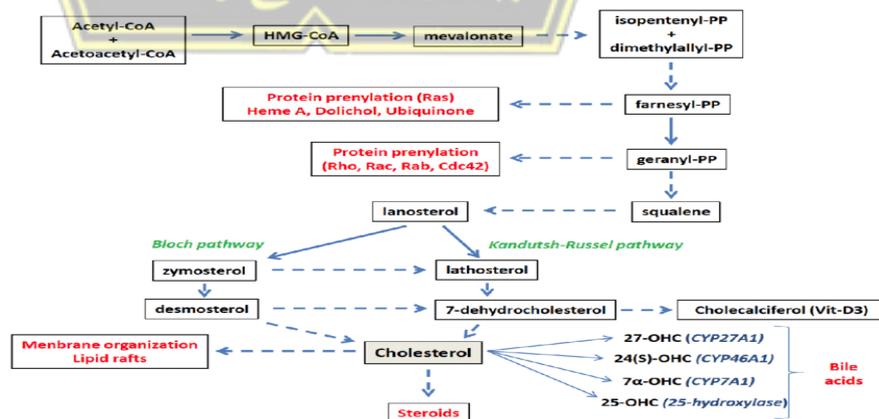
Kolesterol secara normal diproduksi oleh tubuh dalam jumlah yang tepat, akan tetapi jumlahnya akan meningkat tergantung dari makanan yang dikonsumsi, misal makanan yang berasal dari lemak hewani.²³ Penambahan kolesterol 1% pada pakan akan meningkatkan kadar kolesterol plasma dan kadar kolesterol hati.¹² Organ hati merupakan jalur utama untuk sintesis dan metabolisme kolesterol, serta merupakan jalur utama untuk eliminasi kolesterol darah.

Kolesterol disintesis melalui beberapa tahap yang dimulai dengan pembentukan asetoasetil-KoA dengan bantuan enzim thiolase, setelah itu asetoasetil-KoA yang terbentuk akan dikondensasikan dengan asetil-KoA dikatalisis enzim hidroksi metil glutaryl KoA (HMG-KoA) synthase kemudian akan terbentuk HMG-KoA.

HMG-KoA direduksi menjadi mevalonate dengan bantuan HMG-KoA Reduktase. Mevalonate kemudian diaktifkan oleh tiga kinase tergantung ATP menghasilkan 3-fosfo-5pirofosfomevalonat yang tidak stabil dan segera mengalami dekarboksilasi dan defosforilasi

menghasilkan isopentenil pirofosfat (I-PP;C5), dan pada tahap akhir akan membentuk isopentil difosfat.

Isopentil difosfat akan mengalami isomerisasi dengan bantuan enzim isopentil-difosfat isomerase membentuk 3,3 dimetilallyl difosfat kemudian mengalami isomerisasi lagi membentuk geranyl difosfatase. Geranyl difosfat akan membentuk farnesyl difosfat setelah mengalami reaksi dengan enzim cis-prenyl transferase. Farnesyl difosfat selanjut akan membentuk squalene yang dikatalisis oleh enzim squalene synthase. Squalene akan teroksidasi membentuk epoksida, kemudian membentuk lanosterol setelah mengalami siklisasi intramolekul. Lanosterol dioksidasi terus membentuk zymosterol. Isomer zymosterol adalah cholestadienol, ini kemudian dioksidasi lagi membentuk demosterol dan terakhir direduksi dengan 24-reduktase dan terbentuklah kolesterol.^{22,21}



Gambar 2.2. Sintesis Kolesterol²⁴

2.1.3 Metabolisme Kolesterol

Kolesterol merupakan precursor dari semua steroid lain di tubuh seperti kortikosteroid, hormon sex, asam empedu dan vitamin D. Kolesterol yang berasal dari makanan dapat berupa kolesterol bebas dan kolesterol ester dimana kolesterol ester ini akan mengalami hidrolisis menjadi kolesterol yang berada dalam usus oleh kolesterol esterase. Jenis lipoprotein yang berperan dalam pengangkutan kolesterol adalah kilomikron, VLDL, HDL, dan LDL.²⁵

Kolesterol yang diabsorpsi dari usus bersama dengan forfolipid dan apolipoprotein akan membentuk partikel besar lipoprotein, yang disebut kilomikron. Kilomikron akan membawa kolesterol ke hati. Hati juga membentuk kolesterol. Sebagian kolesterol hati dieksresikan dalam empedu dalam bentuk bebas maupun sebagai asam empedu. Sisa kolesterol akan menjadi satu dengan VLDL, kemudian dari hati VLDL membawa kolesterol ke dalam plasma. Kolesterol total pada manusia normalnya berkisar 200 mg/dl. VLDL yang dengan perantara *Intermediate Density Lipoprotein* (IDL) akan membentuk LDL. LDL inilah yang membawa kolesterol ke seluruh tubuh. Saat kolesterol dalam darah berlebih, disinilah HDL akan berperan. HDL akan mengangkut kelebihan kolesterol menuju hati agar

terjadi metabolisme kembali dan disebarkan keseluruh tubuh melalui sirkulasi darah.²⁶

Sintesis kolesterol dalam sel akan dihambat dengan adanya peningkatan kolesterol pada intrasel dan ini juga akan mengurangi suplai reseptor kolesterol HDL yang baru sehingga *intake* menjadi berkurang. Sebagian dari kolesterol HDL dapat dipindahkan ke VLDL dan kilomikron dan diolah kembali.²⁵

2.1.4 Eksresi Kolesterol

Eksresi kolesterol terbanyak adalah melalui empedu, dimana kolesterol akan diubah menjadi asam empedu.²⁷ Kolesterol dikeluarkan sekitar 1 gram perhari. Kolesterol yang dikonversi menjadi garam empedu akan dieksresikan dalam bentuk feses, sisanya akan dikeluarkan sebagai steroid netral. Sterol utama dalam feses adalah koprostanol. Koprostanol dibentuk oleh bakteri di usus bagian bawah dari kolesterol.²⁸ Garam-garam empedu yang akan dieksresikan adapula yang mengalami penyerapan kembali di ileum ke dalam sirkulasi vena porta, diambil oleh hati lalu kemudian dieksresikan kembali ke dalam empedu. Proses ini dikenal sebagai sirkulasi enterohepatic.

Sekitar 3-5 gram asam empedu setiap harinya didaur ulang melalui usus sekitar 6 sampai 10 kali. Banyaknya asam empedu yang

didaur ulang dengan yang keluar melalui tinja yang terbentuk dari kolesterol setara, sehingga ukuran kompartemen asam empedu dapat dipertahankan konstan. Hal ini diatur dalam mekanisme control umpan balik.²¹

2.2 Hiperkolesterol

2.2.1 Defenisi Hiperkolesterol

Hiperkolesterol merupakan penyakit gangguan metabolisme kolesterol, kondisi dimana di dalam darah terdapat kolesterol yang melebihi batas normal yang ditandai dengan kenaikan kolesterol darah total, LDL dan VLDL. Faktor resiko hiperkolesterol antara lain konsumsi makanan yang mengandung lemak tinggi, hipertensi, kebiasaan merokok, kelebihan berat badan, dan peningkatan kadar kolesterol LDL.²³ Klasifikasi Hiperkolesterol dibagi menjadi hiperkolesterol ringan, sedang dan berat. Hiperkolesterol ringan mempunyai kadar kolesterol LDL 140-159 mg/dl, hiperkolesterol sedang mempunyai kadar kolesterol total 240-300 mg/dl dengan kadar kolesterol LDL 160-189 mg/dl, sedangkan hiperkolesterol berat mempunyai kadar kolesterol LDL >190 mg/dl.²⁹ Hiperkolesterol merupakan salah satu faktor resiko terjadinya penyakit kardiovaskuler yang banyak terjadi di masyarakat. Pada tahun 2007-2008 telah dilakukan penelitian dengan hasil bahwa kadar kolesterol dalam darah >200 mg/dl dapat meningkatkan resiko terjadinya penyakit jantung dan pembuluh dasar

besar 1,8 kali lebih besar dibandingkan dengan kolesterol darah <200 mg/dl.¹ Klasifikasi kadar kolesterol total menurut *National Cholesterol Education Program* (NCEP) adalah sebagai berikut:

Tabel 2.1 Klasifikasi Kadar Kolesterol Total³⁰

	Kolesterol Total	LDL
Ideal	≤ 200 mg/dl	< 200 mg/dl
Batas Tinggi	200-239 mg/dl	130-159 mg/dl
Tinggi	≥ 240 mg/dl	≥ 160 mg/dl

2.2.2 Patofisiologi Hiperkolesterol

Lemak yang berasal dari makanan yang dikonsumsi akan mengalami proses pencernaan di dalam usus menjadi asam lemak bebas, kolesterol, fosfolipid dan trigliserida dan kemudian diserap dalam bentuk kilomikron. Sisa pemecahan kilomikron akan beredar menuju hati dan sebagian akan membentuk kolesterol yang kemudian bersama dengan trigliserida dan apoprotein membentuk VLDL, selanjutnya enzim lipoprotein lipase (LPL) akan memecah VLDL menjadi IDL yang bertahan 2-6 jam saja, setelah itu akan diubah menjadi LDL. Saat banyak mengonsumsi bahan makanan yang mengandung kolesterol tinggi seperti daging kambing, jeroan, ataupun telur, sintesis kolesterol di hati akan mengalami peningkatan dengan menstimulasi aktivasi reduktase *Hidroksimethylglutaryl Coenzyme A Reductase* (HMG-CoA), maka hati

akan mempunyai cukup kolesterol dan otomatis menghentikan pengambilan LDL, hal ini akan menyebabkan meningkatnya kolesterol dalam darah dan terjadilah hiperkolesterol.³¹

Efek dari kelebihan kolesterol di dalam darah menyebabkan kolesterol mudah melekat pada dinding pembuluh darah bagian dalam membentuk suatu timbunan lemak atau plak yang sering disebut dengan aterosklerosis. Hal ini mengakibatkan pembuluh darah menjadi sempit dan aliran darah akan terhambat, menjadi kurang encer. Plak tersebut bersifat mudah rapuh dan pecah sehingga dapat menimbulkan luka pada pembuluh darah dan mengakibatkan pembekuan darah. Plak yang terus menerus terbentuk akan mengakibatkan suplai darah ke jantung menjadi terhambat, menimbulkan rasa sakit dan nyeri (angina), dan berakibat fatal dengan matinya jaringan otot jantung dan gagal jantung, jika hal ini terjadi di dalam arteri karotid yang menuju otak maka akan menyebabkan stroke.³²

2.2.3 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Kadar Kolesterol

a) Faktor genetik

Faktor genetik memiliki peranan yang penting dalam penentuan kadar kolesterol. Kelainan mutasi pada reseptor LDL menyebabkan pembentukan LDL yang tinggi. Hal tersebut biasanya ditandai dengan produksi kolesterol >400 mg/dL sementara kadar kolesterol HDL adalah <35 mg/dL.³³

b) Makanan yang dikonsumsi

Kandungan kolesterol yang tinggi secara umum berasal dari lemak hewani misalnya dari daging, jeroan, dari santan, dan telur dimana ini merupakan faktor yang paling susah dihindari oleh seseorang yaitu mengatur pola makannya. Diet tinggi kolesterol dapat meningkatkan sintesis kolesterol di hati melalui peningkatan aktivitas enzim HMG-CoA, dimana enzim ini merupakan katalisator dari tahap pertama dalam biosintesis kolesterol. Diet tinggi kolesterol akan berujung kepada peningkatan kolesterol dalam plasma.¹ Hasil penelitian yang dilakukan oleh Harsa menunjukkan bahwa pemberian diet tinggi lemak dapat meningkatkan level kolesterol total, trigliserol, LDL dan menurunkan HDL.³⁴

c) Indeks Massa Tubuh

Pada orang dengan kelebihan berat badan atau obesitas akan mengalami gangguan pada regulasi asam lemak yang akan berdampak pada kenaikan kadar trigliserida dan ester kolesterol. Penumpukan lemak yang berlebihan pada obesitas secara tidak langsung juga menyebabkan peningkatan kadar kolesterol melalui kenaikan kolesterol yang terdapat pada *verylow density lipoprotein* dan *lowdensity lipoprotein* sekunder oleh karena adanya peningkatan kadar trigliserida yang besar.³³ Hasil penelitian yang dilakukan oleh

Fitri menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna rata-rata nilai kolesterol total pada orang dengan obesitas dan non obesitas.³⁵

d) Usia

Seiring dengan bertambahnya usia maka kadar kolesterol total pun akan relative lebih tinggi, ini dikarenakan pada usia tua aktivitas reseptor LDL akan semakin berkurang. Sel reseptor ini banyak terdapat di hati, berfungsi untuk hemostasis pengatur peredaran kolesterol dalam darah, sehingga apabila sel reseptor tersebut terganggu maka kolesterol total pun akan meningkat dalam sirkulasi darah.³⁵

e) Jenis Kelamin

Jenis kelamin dapat mempengaruhi kadar kolesterol darah. Laki-laki remaja menunjukkan penurunan kadar kolesterol yang signifikan, hal tersebut dikarenakan adanya pengaruh dari hormon testostosterone yang mengalami peningkatan pada masa itu. Wanita yang telah mencapai fase menopause akan memiliki kadar kolesterol lebih tinggi dibandingkan laki-laki, ini disebabkan adanya penurunan hormone esterogen setelah wanita mengalami menopause.²⁷ Penelitian yang dilakukan oleh Rita menunjukkan kadar kolesterol total >240 mg/dL pada lansia usia 60-64 tahun sebesar 33,8% untuk wanita dan 10,6% untuk pria, sedangkan umur >65 tahun sebesar 29,1% pada wanita dan

13,9% pada pria.³⁶ Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Solikin dan Muradi dengan hasil bahwa peningkatan kadar kolesterol total cenderung dialami oleh perempuan dibandingkan dengan laki-laki.³⁷

f) Aktivitas fisik

Makanan yang dikonsumsi akan dimetabolisme tubuh dan menghasilkan *adenosine triphosphate* (ATP), dimana ATP ini merupakan energi untuk melakukan aktivitas fisik. Kurangnya aktivitas fisik menyebabkan makanan yang harusnya dibentuk menjadi energi akan diubah menjadi kolesterol. Semakin banyak aktivitas fisik yang dilakukan maka akan semakin banyak kebutuhan ATP dan semakin sedikit untuk pembentukan kolesterol total. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Zuhriyyah dkk menunjukkan bahwa aktivitas fisik memiliki hubungan terbalik bermakna dengan kadar kolesterol total dan LDL.³⁸

2.2.4 Pengukuran kadar kolesterol

Metode kolorimetrik enzimatik (*Cholesterol Oxidase Methode / CHOD-PAP*) adalah metode yang sesuai dengan standar WHO. Prinsip pemeriksaan metode ini adalah kolesterol ester diurai menjadi kolesterol dan asam lemak menggunakan enzim kolesterol esterase. Kolesterol yang terbentuk kemudian diubah menjadi *Cholesterol-3-one* dan hydrogen

peroksida oleh enzim kolesterol oksidase. Hidrogen peroksida yang terbentuk beserta fenol dan 4-aminophenazone oleh peroksidase diubah menjadi zat yang berwarna merah. Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan konsentrasi kolesterol total dan dibaca pada panjang gelombang 546 nm.³⁹

Menurut National Cholesterol Education Program (NCEP) kadar kolesterol total berada dalam batas normal saat masih dibawah 200 mg/dl, patut diwaspadai apabila kadar kolesterol mencapai 200-239 mg/dl dan ini sudah masuk ke dalam kategori hiperkolesterol, dan ketika sudah sama dengan atau lebih dari 240 mg/dl maka akan menjadi sangat berbahaya karena akan beresiko 2 kali lebih besar untuk terkena serangan jantung.⁴⁰

2.3 Diet Tinggi Kolesterol

Diet tinggi kolesterol akan meningkatkan kadar kolesterol plasma dan kadar kolesterol hati. Kolesterol digunakan tubuh untuk membentuk asam kolat sebagai dasar dari pembentukan asam empedu yang disintesis dihati. Tahap pertama dari biosintesis asam empedu adalah reaksi dari 7 α -hidroksilasi terhadap kolesterol yang di katalisis oleh 7 α -hidroksilase yaitu suatu enzim mikrosomal, yang memerlukan oksigen, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (NADPH), dan sitokrom P-450 oksidase. Peningkatan konsentrasi kolesterol plasma dalam tubuh pada kondisi hiperkolesterol berbanding lurus dengan sintesis asam empedu yang berarti

akan semakin banyak pemakaian oksigen, NADPH, dan sitokrom P-450 oksidase. Disamping itu, Sitokrom P-450 oksidase juga memainkan peran dalam memperantarai metabolisme retikulum endoplasmik yang pada akhirnya akan menghasilkan ROS dengan jenis radikal anion superoksida (O_2^-).¹²

Diet tinggi kolesterol menyebabkan peningkatan lipopolisakarida (LPS) plasma dan mengaktivasi *toll-like receptor 4* (TLR 4) sehingga akan menyebabkan meningkatnya kadar sitokin proinflamasi, seperti IL-6, IL-17 dan TNF- α .¹³ Selain itu, diet tinggi kolesterol juga akan meningkatkan akumulasi lemak pada jaringan adiposa. Lemak yang menumpuk akan mensekresikan sejumlah sitokin proinflamasi termasuk TNF- α dan menginduksi spesies oksigen reaktif (ROS).² Pada peningkatan jaringan adiposa juga ditemukan penurunan secara signifikan aktivitas enzim antioksidan seperti *superoksida dismutase* (SOD), katalase (CAT), dan *glutation peroksidase* (GPx).⁴¹ Produksi ROS meningkat dan kapasitas antioksidan menurun menghasilkan proses yang disebut stress oksidatif. Stress oksidatif akan meningkatkan proses peroksidasi lipid yang berujung kepada terjadinya sindrom metabolik (SM).⁴² SM ditandai dengan adanya hipertriasilgliserol, meningkatnya kadar kolesterol total dan LDL, dan menurunnya kadar HDL. Individu dengan SM akan memiliki risiko tinggi mengalami penyakit jantung dan pembuluh darah.⁴³

Sindrom Metabolik sangat erat kaitannya dengan inflamasi kronis yang melibatkan sel-sel imun *innate* dan sel-sel imun adaptif. Sel-sel imun *innate* seperti makrofag, sel mast, netrofil, eosinophil, sedangkan adaptif meliputi sel T *helper* 2 (Th2), sel T regulator (Treg), sel T *helper* 1 (Th1), sel T CD8+ dan sel B. Di dalam jaringan adiposit orang sehat, sel-sel imun tersebut selalu berada dalam keadaan seimbang, namun akan menjadi tidak seimbang pada individu yang mengonsumsi lemak berlebih. Konsumsi lemak berlebih akan memicu peningkatan sel-sel imun seperti makrofag, netrofil, sel mast, sel B, sel Th1 dan sel T CD8+ yang memproduksi berbagai sitokin pro-inflamasi. Sitokin-sitokin ini kemudian bermigrasi ke hati, otot, dan jaringan pankreas melalui pembuluh darah dan dapat memicu resistensi insulin (IR).⁴⁴

Terjadinya inflamasi pada sindrom metabolik salah satu penyebabnya adalah disfungsi mitokondria. Mitokondria adalah tempat diproduksinya sebagian besar energi di dalam sel khususnya sel eukariotik. Kelebihan asupan energi akan menyebabkan gangguan metabolisme lipid karena beban metabolisme mitokondria akan meningkat dan *electron transport chain* (ETC) akan teraktivasi.⁴⁵ Salah satu asumsi dari terjadinya disfungsi mitokondria adalah dengan adanya penumpukan lemak berlebih sehingga mengakibatkan terganggunya homeostasis redoks dan peningkatan stress oksidatif. Stress oksidatif juga dianggap sebagai

penyebab utama toksisitas jaringan. Selama proses respirasi, pelepasan elektron energi yang tinggi dan tidak berpasangan oleh mitokondria dapat meningkatkan ROS dalam sel. ROS tersebut kemudian akan mengarah ke inflamasi kronis, yaitu mengaktifasi faktor transkripsi NF-Kb yang menginduksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α yang berperan penting dalam terjadinya inflamasi hati dan sistemik. Selanjutnya inflamasi akan berlanjut pada fragmentasi DNA yang akan memicu terjadinya apoptosis mengakibatkan persinyalan seluler terganggu sehingga hemostasis dalam tubuh juga terganggu dan akan berakibat ke kardiovaskuler.⁴²

2.4 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)

2.4.1 Defenisi TNF- α

Sitokin mengontrol kelangsungan hidup sel, kematian, dan diferensiasinya dimana ini merupakan proses yang integral yang diperlukan untuk perkembangan jaringan dan homeostasis. Dalam sistem imunitas, termasuk di dalamnya adalah interferon, hemopoietin, sitokin, kemokin, *transforming growth factors*, dan *tumor necrosis factors*.⁴⁶

Tumor Necrosis Faktor Alpha adalah protein 17 kDa yang terdiri dari 157 asam amino, salah satu bagian dari *family* TNF yang multipotensial sebagai sitokin proinflamasi, berperan penting dalam persinyalan sel pada regulasi sel imun, sebagai *endogenous pyrogen*

TNF- α mampu menginduksi demam, kakesia, inflamasi, dan menghambat tumorigenesis, replikasi virus, merespon sepsis melalui IL-1 dan IL-6⁴⁷ dan juga sebagai indikator untuk sel yang mengalami stress oksidatif, apoptosis ataupun nekrosis.⁴⁸ Di dalam serum manusia, kadar normal TNF- α yaitu ≤ 8.1 pg/mL, sedangkan untuk tikus sekitar 7.14 pg/ml.

Faktor yang dapat mempengaruhi kadar TNF- α antara lain adalah, usia, indeks massa tubuh (IMT), dan stress. Saat terjadi stress maka glukokortikoid dan kortisol yang keduanya merupakan hormon akan memicu reaksi anti-inflamasi sistem imun sehingga akan meningkatkan kadar TNF- α . Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Gupta dkk pada tahun 2003 menyebutkan bahwa seiring terjadinya proses penuaan, maka kadar TNF- α akan meningkat. Hal tersebut terjadi karena seiring bertambahnya usia maka kondisi sistem imun pun akan menurun sehingga tubuh akan lebih mudah terserang penyakit dan ini akan menstimulasi produksi TNF- α secara berlebihan.⁴⁹ Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Ivander dkk tentang profil TNF- α berdasarkan IMT mengemukakan bahwa IMT yang normal akan menghasilkan TNF- α yang normal juga. Jika terjadi kenaikan IMT maka jaringan adiposa akan mensekresikan lebih banyak TNF- α ,

karena merupakan organ endokrin yang berperan pada terjadinya inflamasi sistemik dan vaskular.⁵⁰

Disregulasi TNF- α terlibat dalam berbagai penyakit manusia termasuk penyakit kanker, Alzheimer, depresi berat, psoriasis, aterosklerosis, diabetes dan sindrom metabolik,⁴⁷ oleh karena itu TNF- α dapat menjadi target dalam pencegahan penyakit tersebut. Penelitian yang dilakukan oleh Branen dkk tahun 2004 dengan membagi 2 kelompok tikus yang dihilangkan apolipoprotein E (apoE) kemudian dibandingkan antara kelompok 1 yang dihambat TNF- α nya, sementara kelompok 2 tidak dihambat memberikan hasil bahwa kelompok 2 mampu menghambat terjadinya aterosklerosis.⁵¹

2.4.2 Sifat Fisikokimia TNF- α

Tabel 2.3. Sifat fisikokimia TNF- α ⁵²

Property	Human	Mouse
<i>PI</i>	5.6	5.6
<i>Amino acids – Precursor</i>	233	235
- <i>mature^a</i>	157	156
<i>Mr (K) – Predicted</i>	17.4	17.3
- <i>Expressed^b</i>	52	18-150 ^c
<i>Potential N-linked glycosylation sites</i>	0	1
<i>Disulfide bonds^d</i>	1	

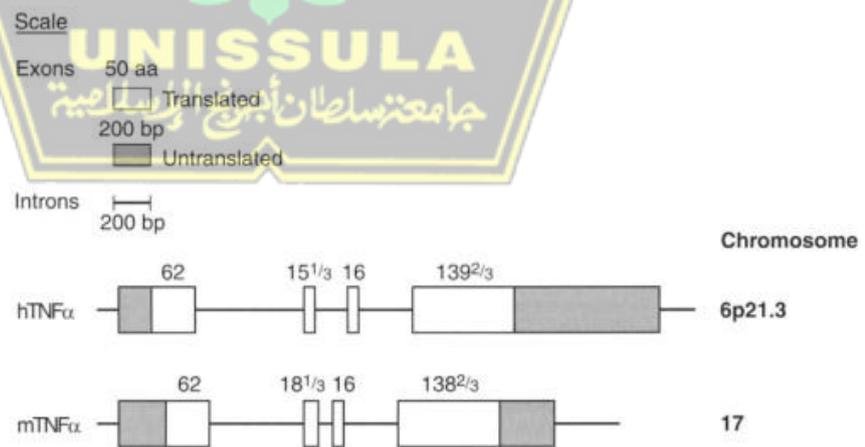
- a. Prosesnya melalui pembelahan proteolitik dari propeptida sinyal atipikal dari 76 residu pada TNF- α manusia dan 76 residu pada TNF- α

tikus. *Pro-form* dari TNF- α yang belum teraktivasi diekspresikan sebagai protein membran tipe II oleh domain sinyal di propeptida.

- b. TNF- α biasanya disekresikan sebagai homotrimer. TNF monomerik tidak aktif secara biologis
- c. Pemrosesan diferensial dari murine propeptida dan glikosilasi menghasilkan beberapa isoform dengan berat molekul yang lebih tinggi
- d. Ikatan disulfide tidak diperlukan untuk aktivitas biologis.⁵²

2.4.3 Struktur TNF- α

Struktur TNF α sebagai homotrimer yang dicirikan oleh asosiasi ujung ke depan dari struktur sandwich antiparalel dari monomer berbentuk baji. Struktur tersier sangat mirip dengan apa yang disebut motif 'jelly roll' dari beberapa cupids tumbuhan dan hewan.



Gambar 2.3. Struktur gen TNF α .⁵²

Gen TNF- α terletak pada kromosom manusia 6p21.3 dan mengandung empat ekson pengkode 62, 15^{1/3}, 16 dan 139^{2/3} asam amino. Gen tikus juga memiliki empat ekson dari 62, 18^{1/3}, 16 dan 138^{2/3} asam amino dan terletak pada kromosom 17.⁵²

2.4.4 Sintesis TNF- α

TNF- α disekresikan oleh monosit dan makrofag yang diaktifkan antigen, termasuk sel mast dan sel *Natural Killer* (NK),⁵⁰ dan juga diekspresikan pada tingkat lebih rendah oleh berbagai sel lain, termasuk fibroblast, sel otot polos, dan sel tumor. Lipopolisakarida merupakan rangsangan poten terhadap makrofag untuk mensekresikan TNF. IFN- γ yang disekresikan oleh sel T dan sel NK yang teraktifasi juga akan merangsang makrofag untuk meningkatkan sintesis TNF.⁵³

TNF seluler disintesis sebagai pro-TNF (26kDa), yang terikat pada membran dan dilepaskan pada fase pembelahan pro-domainnya oleh *TNF-Converting Enzyme* (TACE). *Nuclear factor kappa b* (NF κ B) dan *nuclear factor activated T cells* (NF-AT) berperan penting dalam proses regulasi pada fase transkripsi gen TNF- α , sedangkan pada fase translasi produksi TNF- α diatur oleh *UA-rich sequence* pada 3' *untranslated region* m-RNA TNF- α .

2.4.5 Persinyalan TNF- α

TNF- α bekerja dengan berikatan melalui dua reseptornya yaitu TNFR-1 dan TNFR-2 pada permukaan sel, dimana afinitas TNFR-2 adalah 5 kali lebih tinggi dibandingkan TNFR-1. TNFR-1 (p55) diekspresikan pada semua jenis sel, sedangkan ekspresi TNFR-2 (p75) terbatas pada sel-sel imun. Perbedaan utama antara dua reseptor tersebut adalah bahwa TNFR-2 terlibat dalam kelangsungan hidup sel dan proliferasi sel namun tidak memiliki *death domain* (DD) seperti yang dimiliki oleh TNFR-1, sementara TNFR-1 memainkan dua Peran: tidak hanya terlibat dalam menginduksi apoptosis, tetapi juga bisa mentransduksi sinyal kelangsungan hidup sel.⁵⁴

Pengikatan TNF- α dengan kedua reseptornya menghasilkan perekrutan transduser sinyal yang mengaktifkan setidaknya tiga efektor berbeda yang pada akhirnya akan mengaktifasi caspases dan factor transkripsi *activation protein-1* dan NF κ B.

a. Aktivasi persinyalan TNF RAF-1

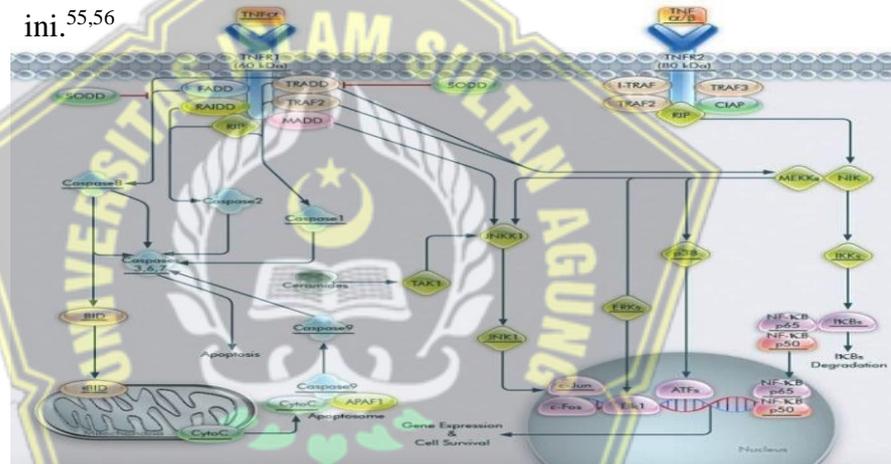
Awalnya, protein TRADD (TNFR-Associated Death Domain) berikatan dengan TNFR1. Kemudian, TRADD merekrut FADD (*Fas-Associated Death Domain*), RAIDD (*RIP-Associated ICH-1 / CED-3-homologous protein with a Death Domain*), MADD (*MAPK Activating Death Domain*) dan RIP (*Receptor-Interacting Protein*).

Pengikatan TRADD dan FADD ke TNFR1 mengarah pada perekrutan, oligomerisasi, dan aktivasi Caspase 8. Caspase 8 yang diaktifkan selanjutnya memulai kaskade proteolitik yang mencakup Caspase lain (Caspases 3, 6, dan 7) dan pada akhirnya menginduksi apoptosis. Caspase 8 juga memecah BID (*BH3 Interacting Death Domain*). tBID (*Truncated BID*) memecah membran luar mitokondria untuk menstimulasi pelepasan faktor pro-apoptosis CytoC (*Cytochrome-C*). CytoC yang dilepaskan dari ruang antarmembran berikatan dengan APAF1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*), yang merekrut Caspase 9 dan pada gilirannya dapat secara proteolitik mengaktifkan Caspase 3. Sebuah protein kinase RIP2 61-kDa yang baru terkait dengan RIP yang merupakan komponen dari TNFR1 memediasi perekrutan protease kematian Caspase. Ekspresi berlebihan RIP2 menandakan aktivasi NFκB dan kematian sel.

b. Aktivasi persinyalan TNF RAF-2

TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor-2*) dalam aktivasinya dapat melalui dua jalur berbeda yang mengarah pada aktivasi Protein Aktivasi-1 melalui JNK (Jun NH₂-terminal Kinase), MEKK (MEK Kinase), p38, dan bersama dengan RIP, aktivasi NFκB, melalui NIK (*NF-KappaB-Inducing Kinase*). TNF alpha

telah terbukti mengaktifkan MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) ERK1 dan ERK2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases*). Ekspresi berlebih SODD (*Silencer of Death Domains*), protein 60 kDa berkaitan dengan DD dari TNFR1 menekan kematian sel yang diinduksi TNF dan aktivasi NF-KappaB yang menunjukkan perannya sebagai protein regulasi negatif untuk jalur pensinyalan ini.^{55,56}



Gambar 2.4. *TNF signaling pathway*⁵⁶

2.4.6 Aspek Biologis TNF- α

Beberapa fungsi biologis TNF- α adalah:

- Menginduksi terjadinya kematian sel baik secara apoptosis maupun nekrosis. Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram dengan tujuan untuk mengeliminasi sel yang rusak atau sel normal yang tidak diperlukan lagi. Nekrosis adalah kematian sel karena adanya keadaan patologis pada sel.⁵⁷

- b. Memicu sel-sel endotel vaskular mengekspresikan reseptor pada permukaan sel yang baru (adhesi) dimana ini dapat menarik leukosit terutama neutrophil, monosit, dan limfosit melekat pada sel-sel endotel.
- c. Merangsang sel-sel endotel dan makrofag untuk mensekresikan sitokin yang disebut kemotaksis untuk menarik sistem imun lain, misal leukosit.
- d. Menginduksi demam di hipotalamus.
- e. Pada kadarnya yang sangat berlebih dapat menyebabkan gangguan metabolik berat, seperti turunnya konsentrasi glukosa darah, selain itu juga akan menghambat kontraktilitas miokard dan tekanan otot polos pembuluh darah.⁵⁸

2.4.7 Faktor-faktor yang mempengaruhi TNF- α

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kadar TNF- α yaitu:

- a. Usia
Seiring bertambahnya usia maka penuaan pun akan terjadi. Penuaan berhubungan dengan proses kompleks dan konstan dari fungsi kekebalan tubuh. Orang tua akan lebih rentan untuk terkena penyakit infeksi dan juga penyakit yang berkaitan dengan adanya sel-sel imun bawaan. Pada orang tua, monosit memproduksi basal TNF- α dan MCP-1 yang lebih tinggi dan TGF- β yang lebih rendah.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Aristo dkk tentang profil TNF- α pada orang lanjut usia yaitu terjadi peningkatan kadar TNF- α (>100 pg/mL) pada sebagian subjek yang berpartisipasi dalam penelitian.⁵⁹

b. Aktivitas fisik

Peningkatan sekresi TNF- α setelah latihan fisik dapat dihubungkan dengan reaksi inflamasi yang diinduksi kerusakan otot. Sitokin proinflamasi dapat menginduksi dan menjadi perantara dalam proses mekanisme katabolik lokal. Sesaat setelah latihan fisik akut, myofibers akan mengalami kerusakan secara mekanik dan karena adanya inflamasi maka sitokin proinflamasi akan mulai diproduksi.⁶⁰ Penelitian yang dilakukan oleh Rahman dkk mendapatkan hasil bahwa konsentrasi TNF- α dalam saliva pada grup atlet dan grup kontrol mengalami peningkatan sesaat setelah latihan fisik.⁶¹

c. Indeks Massa Tubuh

Sitokin proinflamasi termasuk TNF- α dapat diproduksi oleh berbagai jenis sel termasuk jaringan adiposa. TNF- α terlibat dalam reaksi inflamasi sistemik. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Sarhadi dkk mengemukakan bahwa level TNF- α plasma pada

subjek dengan obesitas 7,5 kali lebih tinggi daripada subjek yang tidak obesitas.⁶²

d. Stres

Stress dapat menginduksi respon inflamasi pada manusia, yang salah satunya menjadi pencetus depresi. Orang yang mengalami depresi dan cemas akan mengalami disregulasi sistem imun tubuh.

Hal tersebut dipengaruhi oleh adanya perubahan jalur aktivitas neuroendoktrin seperti HPA dan sistem saraf simpatis, dimana kedua jalur ini merupakan fungsi immunodulator.⁶³ Penelitian yang dilakukan oleh Felgel dan lotrich pada hewan coba dengan perlakuan *stressor* secara konik mengemukakan bahwa terjadi aktivasi NFkB yang dapat menstimulasi pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , sehingga TNF- α akan mengalami peningkatan.⁶⁴

2.5 Leukosit

2.5.1 Defenisi Leukosit

Asal kata leukosit diambil dari bahasa Yunani yaitu *leukos* (putih) dan *kytos* (sel) yang berarti sel darah putih / *White Blood Cells* (WBC). Tidak seperti sel darah merah (eritrosit) yang tidak mengandung inti, leukosit adalah jenis sel yang mengandung inti. Normalnya di dalam darah manusia leukosit akan berjumlah rata-rata 5.000-10.000 sel/mm³, dalam

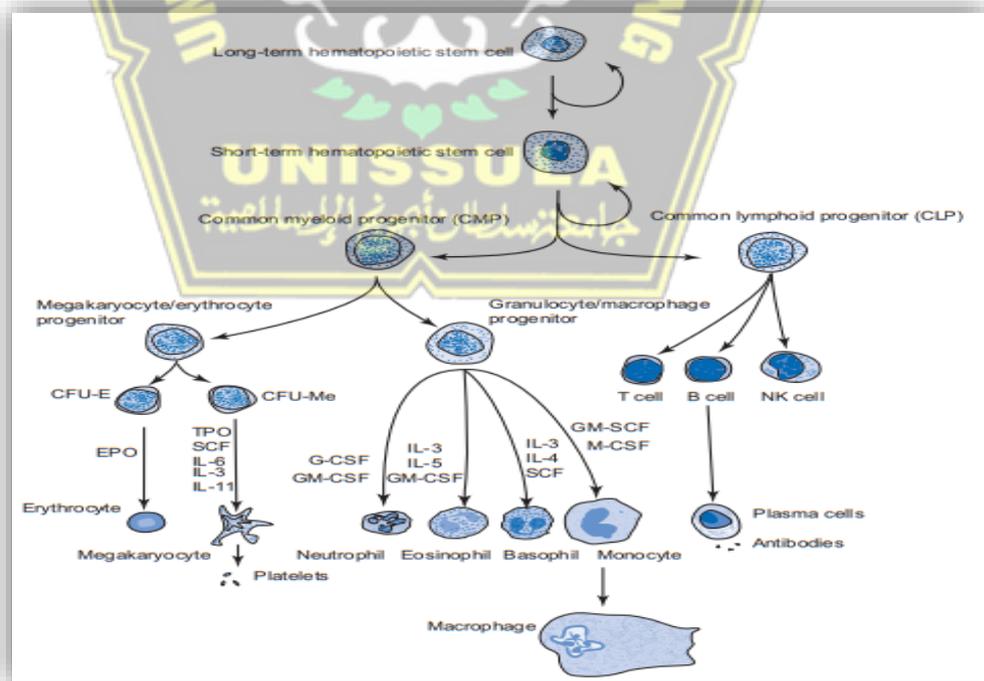
keadaan patologis ketika jumlah leukosit mengalami peningkatan melebihi 12.000 ini disebut sebagai leukositosis dan ketika terjadi penurunan dengan jumlah yang lebih rendah dari 5.000 ini disebut sebagai leukopenia.⁶⁵

Sel darah putih berperan penting dalam sistem imunitas melalui kemampuannya dalam memfagositosis antigen atau benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Asal Sel darah putih adalah dari stem sel pluripotent di sumsum tulang. Awalnya stem sel pluripotent akan memproduksi progenitor myeloid dan limfoid. Myeloid berdiferensiasi menjadi progenitor granulosit / makrofag yang selanjutnya berdiferensiasi lagi. Diferensiasi leukosit terdiri dari kelompok granulosit dan agranulosit. Granulosit dicirikan dengan adanya granula spesifik di dalam sitoplasma dan mempunyai inti yang memperlihatkan banyak variasi dalam bentuknya yang termasuk ke dalam kelompok granulosit yaitu neutrofil, eosinofil, dan basofil. Agranulosit dicirikan dengan sitoplasma yang tampak homogen dan intinya yang berbentuk bulat atau seperti bentuk ginjal yang termasuk kedalam kelompok agranulosit adalah limfosit dan monosit.⁶⁶

2.5.2 Proses Diferensiasi Leukosit

Thrombopoietin (TPO) adalah 332 asam amino glikoprotein yang dibuat terutama di hati yang merangsang pembentukan megakariosit dari CFU-Meg (*colony forming unit*, megakariosit). TPO mengikat reseptor yang mendimerisasi dan mengaktifkan kinase sitoplasma. Kinase tersebut

memfosforilasi STAT-1, 3, 5 (STAT; *Signal Transduction and activator of transcription*) dan CREB (*cyclic AMP response element binding protein*). Stem cell hematopoietic, progenitor megakariosit, megakariosit, dan trombosit mempunyai reseptor untuk TPO. Hati memproduksi TPO dengan kecepatan konstan, akan tetapi trombosit dapat menurunkan atau menghambat produksi TPO, oleh karena itu semakin rendah trombosit akan menghasilkan TPO yang semakin lebih banyak, yang dimana pada akhirnya ini merangsang diferensiasi megakariosit untuk menjadi trombosit lagi. Faktor pertumbuhan lain untuk diferensiasi sel darah putih ditunjukkan pada gambar 2.5.



Gambar 2.5. *Formation of white cells.*⁶⁷

Sel induk hematopoietic *long-term* dapat membelah untuk membentuk sel induk baru atau memulai diferensiasi. Proses diferensiasi sel punca hematopoietik *long-term* menjadi sel punca hematopoietik *short-term* yang juga dapat memperbarui diri atau memulai diferensiasi dengan memproduksi progenitor multipoten dapat melalui jalur limfoid dan myeloid. Jalur limfoid menghasilkan limfosit-T dan Limfosit B dan *Natural killer cells* (sel NK). Jalur myeloid menghasilkan dua progenitor yaitu progenitor megakariosit/ eritroid dan progenitor granulosit/makrofag. Jalur jalur tersebut akan mengarah ke pembentukan eritrosit, trombosit, dan leukosit. (*EPO = erythropoietin; TPO = thrombopoietin; IL-3, IL-4, IL-6, IL-11 = interleukins; SCF = stem cell factor (Steel factor); GM-CSF = granulocyte/megakaryocyte colony stimulating factor; G-CSF = granulocyte colony stimulating factor; M-CSF = monocyte colony stimulating factor*).⁶⁸

2.5.3 Jenis Sel Leukosit

a. Neutrofil

Neutrofil adalah jenis sel darah putih terbanyak di dalam tubuh yaitu sekitar 50-70%, mempunyai ukuran sekitar 14 μm , dengan ciri granulanya yang berwarna ungu atau merah muda yang samar. Secara umum Neutrofil berperan penting dalam melawan bakteri dengan sifatnya yang mampu memfagositosis dan masuk ke dalam jaringan

yang terinfeksi. Di dalam darah normalnya bersirkulasi sekitar 10 jam dan dapat hidup selama 1-4 hari saat berada dalam jaringan ekstrasvaskuler.⁶⁹ Terdapat dua macam netrofil yaitu neutrophil batang (stab) dan neutofil segmen (polimorfonuklear). Neutrophil batang merupakan bentuk muda dari neutrophil segmen. Neutrophil segmen biasanya mempunyai sitoplasma yang tampak pucat dengan inti selnya terdiri dari 2-5 segmen.⁶⁹

Pada keadaan patologis yaitu ketika terjadi peningkatan jumlah neutrofil yang disebut sebagai netrofilia biasanya disebabkan oleh karena adanya infeksi akut, inflamasi, kerusakan jaringan, dan gangguan metabolik. Sedangkan ketika terjadi penurunan jumlah neutrofil yang disebut neutropenia biasanya ditemukan pada penyakit yang disebabkan oleh virus, leukemia, anemia, dan granulositosis.⁷⁰

b. Eusinofil جامعنا سلطان أبجوج الإسلامية

Jumlah eusinofil di dalam tubuh sekitar 1-6% dengan ukuran sekitar 16 μm , granula sitoplasmanya lebih kasar dari neurofil dan berwarna lebih merah gelap, biasanya inti selnya hanya mempunyai 3 segmen. Waktu sirkulasi eusinofil di dalam darah lebih lama daripada neutrofil. Eusinofil dapat memasuki eksudat peradangan dan memainkan peran penting dalam merespon alergi, melawan parasite, dan dalam pengeluaran fibrin yang terbentuk selama peradangan.⁷¹

Pada keadaan patologis yaitu ketika terjadi peningkatan jumlah neutrofil ditemukan pada penyakit alergi, parasitik, penyakit kulit, kanker, leukemia mielositik kronik (CML), dan emfisema. Sedangkan ketika terjadi penurunan jumlah eosinofil biasanya ditemukan pada orang stress, pemberian steroid per oral maupun injeksi, luka bakar, dan syok.⁷⁰

c. Basofil

Basofil adalah jenis sel darah putih yang paling sedikit di dalam tubuh yaitu kurang dari 2% dari jumlah keseluruhan leukosit. Basofil berukuran 9-10 μm , mempunyai granula sitoplasma yang banyak, kasar dengan warna ungu atau biru tua dan seringkali menutupi inti sel, serta mengandung heparin dan histamine. Basophil di dalam jaringan akan berdiferensiasi menjadi "*mast cells*".⁷¹

Basofil memainkan peran penting dalam reaksi hipersensitifitas yang berhubungan dengan immunoglobulin E. Pada keadaan normal, basophil di dalam darah akan sangat jarang ditemukan, namun saat terjadi inflamasi sel ini akan menghasilkan senyawa kimia berupa heparin, beradikinin, dan serotonin sebagai respon imunitasnya.⁷²

d. Monosit

Monosit adalah jenis sel darah putih yang berjumlah sekitar 3-8% dari jumlah keseluruhan leukosit di dalam tubuh. Ciri dari monosit

adalah memiliki ukuran paling besar dari sel darah putih lainnya, yaitu sekitar 18 μm , mempunyai inti yang besar ditengah oval atau berlekuk dengan bentuk kromatin yang berkelompok, sitoplasmanya berwarna biru pucat, mengandung banyak vakuola halus. Monosit tergolong fagositik mononuklear dan mempunyai tempat reseptor-reseptor pada permukaan membrannya untuk imunoglobulin maupun komplemen.⁶⁵

Monosit berperan penting dalam memfagosit mikroorganisme khususnya jamur dan bakteri serta berperan pula dalam reaksi imun lainnya.⁶⁹ Di dalam sirkulasi monosit akan bertahan selama 20-40 jam. Monosit beredar melalui aliran darah, kemudian menembus dinding kapiler dan masuk kedalam jaringan penyambung. Saat monosit memasuki jaringan, monosit akan membesar, berkembang menjadi sejumlah besar lisosom yang kemudian disebut sebagai makrofag.⁶⁸ Di dalam jaringan bereaksi dengan limfosit dan memegang peranan penting dalam pengenalan dan interaksi sel-sel imunokompetent dengan antigen.⁶⁵

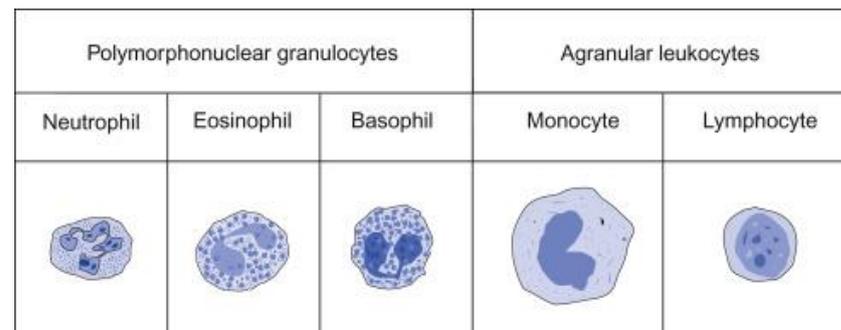
e. Limfosit

Limfosit adalah jenis sel darah putih yang jumlahnya paling banyak setelah neutrofil, sekitar 20-40 % dari jumlah keseluruhan leukosit di dalam tubuh. Sel progenitor limfosit berasal dari stem sel

hematopoietic di sumsum tulang. Limfosit yang bersirkulasi dapat berasal dari timus, organ limfoid perifer, limpa, limpanodus, dan lain-lain. Limfosit yang mengalami diferensiasi di sumsum tulang akan menjadi limfosit B. Limfosit B berperan dalam imunitas humoral dengan cara memproduksi antibodi setelah tubuh terpapar antigen, sedangkan yang tidak mengalami diferensiasi akan bermigrasi ke timus, lalu berproliferasi, kemudian berdiferensiasi menjadi limfosit T. Limfosit T berperan dalam imunitas selular dimana limfosit T berhubungan langsung dengan antigen untuk difagosit.⁷³

Tabel 2.3. Perbedaan jumlah jenis leukosit di dalam darah⁷⁴

Jenis Leukosit	Sel/ μ L (rata-rata)	Nilai normal (mm^3 darah)
Neutrofil	5400	3000-6000
Eosinofil	275	150-300
Basofil	35	00-100
Limfosit	2750	1500-4000
Monosit	540	300-600



Gambar 2.6. Jenis Leukosit⁶⁷

2.5.4 Fungsi Leukosit

Leukosit berperan penting dalam sistem imunitas seluler ataupun humoral organisme terhadap zat-zat asing. Leukosit dapat melakukan gerakan amuboid dan melalui proses diapedesis, leukosit dapat berpindah dari kapiler ke dalam jaringan penyambung dengan menerobos antara sel-sel endotel. Secara umum leukosit dan turunannya mempunyai fungsi untuk menahan invasi oleh patogen dapat berupa bakteri dan juga virus melalui proses fagositosis, menghancurkan sel-sel kanker di dalam tubuh, dan untuk memfagosit sel debris yang dapat berasal dari sel mati atau cedera.⁷⁵

2.5.5 Faktor-faktor yang mempengaruhi Jumlah leukosit

Ketidaknormalan jumlah leukosit dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu:

a. Usia

Semakin bertambahnya usia maka kemampuan jaringan untuk melakukan *repair* atau memperbaiki diri, serta untuk mempertahankan struktur dan fungsi normalnya akan semakin menurun, sehingga kemampuan untuk bertahan terhadap infeksi juga akan menurun. Hal ini akan berdampak kepada jumlah leukosit yang di produksi.

b. Aktivitas Fisik

Peningkatan jumlah leukosit setelah melakukan latihan terlebih lagi aktivitas fisik berat disebabkan karena konsumsi oksigen yang berlebihan. Konsumsi oksigen yang berlebihan akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas lebih banyak yang berakibat kepada terjadinya stress oksidatif yang memicu terjadinya kerusakan pada jaringan. Kerusakan pada jaringan akan mengakibatkan leukosit berdiapedesis ke jaringan yang rusak lalu memfagositosisnya. Hal tersebut akan menyebabkan mobilitas jumlah leukosit dalam darah meningkat. Penelitian yang dilakukan oleh Anisa mengemukakan bahwa terjadi peningkatan jumlah leukosit pada tikus setelah pemberian perlakuan aktivitas fisik berat.⁷⁴

c. Inflamasi

Inflamasi merupakan reaksi kompleks yang terjadi melalui beberapa mekanisme, menyebabkan perubahan di dalam sirkulasi darah lokal dan pelepasan beberapa mediator inflamasi. Inflamasi sering terjadi pada keadaan Hiperkolesterol. Hiperkolesterol menstimulasi peningkatan produksi sitokin proinflamasi berupa IL-1, TNF- α , *C-Reactive Protein* dan polaritas permukaan sel. Sitokin-sitokin ini akan mengaktivasi mediator inflamasi baik itu monosit, magrofag, maupun limfosit yang ini semua tergolong ke dalam jenis-jenis leukosit

- sehingga jumlah leukosit akan mengalami peningkatan.⁷⁶ Tujuan lain dari terjadinya inflamasi adalah menarik sel sel imun seperti leukosit ke tempat yang mengalami cedera untuk dapat menginaktifkan antigen yang masuk, membersihkan debris dan mempersiapkan jaringan untuk proses penyembuhan. Oleh karena itu, pada keadaan inflamasi akan dijumpai peningkatan kadar leukosit.
- d. Reaksi dari sumsum tulang langsung karena adanya stimulasi eksternal seperti infeksi, inflamasi (nekrosis jaringan, infark, luka bakar, artritis), stress (*over exercise*, kejang, cemas), dan anemia hemolitik.
 - e. Kelainan dari sumsum tulang primer seperti leukemia akut ataupun leukemia kronis.⁷⁴

2.6 *Virgin Coconut Oil* (VCO)

2.6.1 Defenisi

Virgin Coconut Oil atau minyak kelapa murni adalah minyak yang terbuat dari kelapa yang bukan kelapa hibrida melainkan dari kelapa dalam atau kelapa liar yang segar tanpa melalui proses pemanasan, pemurnian, pemucatan, penghilangan aroma dan tanpa menggunakan bahan kimia sehingga kandungannya yang bermanfaat untuk kesehatan tetap terjaga,⁷⁷ karena tidak melalui proses pemanasan atau dengan kata lain diproses dalam keadaan dingin maka VCO

terbebas dari asam lemak trans dimana asam lemak trans terbentuk melalui proses hidrogenasi dan hidrogenasi ini terjadi saat proses pengolahan minyak melalui tahap pemasanan.⁷⁸

2.6.2 Sifat Fisika-Kimia

Sifat fisika kimia dari VCO adalah tidak berwarna, berbentuk Kristal seperti jarum, dan mempunyai sedikit bau asam yang dipadukan dengan bau caramel. VCO tidak larut di dalam air namun larut di dalam alcohol dengan perbandingan 1 bagian VCO dan 1 bagian alcohol. VCO memiliki Ph dibawah 7. Pada suhu 20°C mempunyai berat jenis 0,883. Titik cair 20-26°C dan titik didihnya 225°C.⁷⁸

2.6.3 Kandungan dan Manfaat VCO

VCO mempunyai kandungan bioaktif, seperti *tocopherols*, *tocotrienols*, *polyphenols*, dan *flavonoid* yang ini semua adalah jenis antioksidan dan juga dari jenis lemak yang berupa *saturated fatty acid* (92%), *monounsaturated fatty acids* (6%), dan *polyunsaturated fatty acid* (2%). *Saturated fatty acid* atau disebut juga sebagai asam lemak jenuh dalam VCO terdiri dari 90% *medium chain triglycerides* (MCT) dan 10% *long chain triglycerides* (LCT). Sekitar dengan 44-55 % bagian dari MCT adalah asam laurat.⁷⁹

Kandungan antioksidan seperti tokoferol (0,5 mg/100 g minyak kelapa murni) dan polifenol (84 mg/100 gr minyak kelapa murni)⁸⁰ di dalam VCO dapat menangkal radikal bebas atau ROS dan mencegah terjadinya stress oksidatif. Antioksidan tersebut disebut juga antioksidan eksogen atau non enzimatis, cara kerjanya yaitu dengan memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas sehingga radikal bebas tidak akan dapat bereaksi dengan komponen seluler.

Medium Chain Triglyceride khususnya asam laurat (C-12) memainkan peran penting dalam sistem imun yaitu sebagai prekursor dari monolaurin yang dapat memodulasi proliferasi sel imun. Proliferasi sel imun diyakini dapat menekan proses inflamasi yang terjadi di dalam tubuh. Asam laurat ketika masuk ke dalam tubuh akan segera diubah menjadi monolaurin yang memiliki ukuran 300 kali lebih kecil dari ukuran semula. Proses ini dikatalisis oleh enzim lipase. Enzim lipase terdapat pada traktus gastrointestinal yang dimulai dari rongga mulut yang terdapat saliva hingga ke usus halus. Monolaurin yang terdapat dalam VCO merupakan senyawa yang bersifat antiinflamasi,⁸¹ antivirus, anti bakteri, dan anti protozoa.⁸²

Kombinasi kandungan MCT dan komponen polifenol pada VCO dapat bekerja secara sinergis mencegah hiperkolesterol dengan cara menurunkan lipogenesis dari hepar, meningkatkan β -oksidasi di

mitokondria dan peroksisom serta meningkatkan *reverse cholesterol transport*. VCO akan meningkatkan ekspresi pada mRNA dari PPAR- α , dimana aktivasi dari PPAR- α akan meningkatkan regulasi gen-gen yang berkaitan dengan oksidasi asam lemak seperti *Carnitine Palmitoyl Transferase* (CPT I) dan *acyl CoA oxidase* sehingga dapat mensupresi lipidemia postprandial dan akumulasi lipid. Jalur ini dinamakan PPAR- α -dependent pathways. Aktivasi dari PPAR- α juga akan meningkatkan aktivitas dari enzim lipoprotein lipase, *lecithin cholesterol acyltransferase* (LCAT) dan HDL yang berperan penting dalam *reverse cholesterol transport*.⁸³ Peningkatan HDL tersebut mampu memfasilitasi pengangkutan triasilgliserol dan kolesterol serum ke hati, kemudian triasilgliserol tersebut dieksresikan lewat tinja. Hal tersebut juga diikuti oleh adanya suatu penurunan enzim HMG-KoA dan penurunan sel busa akibat dari ekspresi gen CD36 yang mengalami penekanan. Rangkaian mekanisme tersebutlah yang mengakibatkan penurunan kadar kolesterol total, trigliserida dan LDL di dalam darah.¹³

Teori ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Agus dkk bahwa VCO 0,8 ml/200gram berat badan tikus memberikan perbedaan yang bermakna dari profil lipid, dimana kolesterol total, trigliserida, kolesterol LDL mengalami penurunan dan kolesterol HDL mengalami peningkatan.¹⁵

2.7 Efek VCO terhadap kadar kolesterol, TNF- α , dan Jumlah Leukosit pada Hiperkolesterol

Diet tinggi kolesterol menyebabkan terjadinya peningkatan kadar kolesterol di dalam plasma yang merupakan penanda terjadinya hiperkolesterol. Pada kondisi hiperkolesterol, sebagai kompensasinya tubuh akan berusaha untuk menyeimbangkan kadar kolesterol plasma dengan cara mengubah kolesterol menjadi asam empedu. Peningkatan konsentrasi kolesterol plasma akan berbanding lurus dengan sintesis asam empedu, dimana pada biosintesis tersebut memerlukan enzim sitokrom P-450 oksidase sebagai bagian dari katalisator reaksi pada tahap awal yaitu reaksi 7 α -hidroksilasi. Produk samping dari peningkatan aktivitas P-450 oksidase adalah terbentuknya lebih banyak radikal bebas atau ROS.¹²

ROS akan bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel, rangkaian proses tersebut dinamakan peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid dapat pula terjadi akibat terjadinya stress oksidatif. Peroksidasi lipid kemudian akan menyebabkan kerusakan oksidatif,⁸⁴ mengakibatkan penumpukan *free fatty acid* (FFA) dalam tubuh yang dalam waktu berkepanjangan dapat menjadi salah satu sebab terjadinya sindrom metabolik. selain itu akibat dari adanya induksi peroksidasi lipid yang berlebihan radikal bebas pun akan memicu timbulnya spesies reaktif lainnya, misal reaktif aldehida-melondialdehida.⁸⁵ Produksi radikal bebas yang terus

meningkat pada keadaan hiperkolesterol memicu timbulnya stress oksidatif yang akan menyebabkan suatu peradangan atau inflamasi. Inflamasi yang terjadi juga menghasilkan ROS yaitu pada proses perubahan NADPH menjadi NADP dengan katalisator NADPH Oksidase. Dalam proses ini terjadi kebocoran O_2 yang kemudian akan menjadi radikal superoksida. Proses tersebut akan merangsang terbentuknya sitokin proinflamasi seperti $TNF-\alpha$.⁸⁶

ROS juga berperan dalam memengaruhi persinyalan $NF\kappa B$. $NF\kappa B$ adalah keluarga faktor transkripsi yang memainkan peran penting dalam proses perkembangan, pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel, proliferasi, dan terlibat dalam banyak kondisi patologis.⁸⁷ $NF\kappa B$ berperan langsung terhadap aktifitas sitokin proinflamasi seperti $TNF-\alpha$. Sekresi sitokin proinflamasi akan mengaktifasi sel-sel inflamasi terutama monosit, makrofag, dan limfosit untuk berdiapedesis, keluar dari pembuluh darah dan menginfiltrasi jaringan yang rusak akibat dari stress oksidatif lalu memfagositnya (pembersihan sel-sel yang rusak), kemudian monosit dan makrofag yang teraktivasi tersebut pun akan mensekresikan sitokin proinflamasi lagi.³ Jumlah leukosit akan mengalami peningkatan seiring dengan adanya kerusakan oksidatif.

Diet tinggi kolesterol selain meningkatkan kadar kolesterol pada darah juga menyebabkan terjadinya akumulasi lemak pada jaringan adiposa. Lemak pada jaringan adiposa akan menghasilkan zat bioaktif yang disebut adipokines, mediator inflamasi seperti $TNF-\alpha$, IL-6, IL-18 dimana ini akan menginduksi

ROS dan akan mengaktivasi mediator inflamasi baik itu monosit, makrofag, maupun limfosit yang ini semua tergolong ke dalam jenis-jenis leukosit.¹⁴ Selain itu TNF- α yang melibatkan aktivasi NF κ B dapat menyebabkan meningkatnya molekul adhesi pada permukaan sel endotel dan sel otot polos dalam aliran pembuluh darah sehingga mengakibatkan terjadinya inflamasi kronik pada jaringan adiposa dan disfungsi endotel, dimana ini akan menjadi faktor resiko penyakit kardiovaskuler.⁸⁸ Pada peningkatan jaringan adiposa juga ditemukan penurunan secara signifikan aktivitas enzim antioksidan seperti SOD, CAT, dan *glutathion peroksidase*. Produksi ROS meningkat dan kapasitas antioksidan yang menurun menyebabkan kondisi stress oksidatif yang dapat menyebabkan berbagai kerusakan pada jaringan.¹⁴

Virgin Coconut Oil dengan kandungannya yang berupa Asam laurat berfungsi sebagai prekursor yang dapat memodulasi proliferasi sel dimana proliferasi sel ini diyakini dapat menekan proses inflamasi yang terjadi di dalam tubuh. Selain itu juga mampu mengurangi pembentukan transudat, pembentukan granuloma, dan aktivitas serum alami sehingga dapat menekan inflamasi, sebagai analgesik, dan antipiretik. Kandungan VCO yang lain adalah dari jenis antioksidannya. Kandungan antioksidan seperti tokoferol dan polifenol yang mempunyai gugus -OH di dalam VCO dapat menangkal radikal bebas atau ROS dengan cara memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi

berantai dari radikal bebas sehingga akan mencegah terjadinya stress oksidatif.⁸⁶

Kombinasi dari jenis asam lemak jenuh dan dari antioksidan yang dikandung VCO dapat mencegah terjadinya abnormalitas kadar kolesterol dengan cara menurunkan lipogenesis dari hepar, meningkatkan β -oksidasi di mitokondria dan peroksisom serta meningkatkan *reverse cholesterol transport*¹⁵. VCO akan meningkatkan ekspresi pada mRNA dari PPAR- α , dimana aktivasi dari PPAR- α akan meningkatkan regulasi gen-gen yang berkaitan dengan oksidasi asam lemak seperti *Carnitine Palmitoyl Transferase* (CPT I) dan *acyl CoA oxidase* sehingga dapat mensupresi lipidemia postprandial dan akumulasi lipid. Jalur ini dinamakan PPAR- α -dependent pathways. Aktivasi dari PPAR- α juga akan meningkatkan aktivitas dari enzim lipoprotein lipase, *lecithin cholesterol acyltransferase* (LCAT) dan HDL yang berperan penting dalam *reverse cholesterol transport*.⁸³ Peningkatan HDL tersebut mampu memfasilitasi pengangkutan triasilgliserol dan kolesterol serum ke hati, kemudian triasilgliserol tersebut dieksresikan lewat tinja. Hal tersebut juga diikuti oleh adanya suatu penurunan enzim HMG-KoA dan penurunan sel busa akibat dari ekspresi gen CD36 yang mengalami penekanan. Rangkaian mekanisme tersebutlah yang mengakibatkan penurunan kadar kolesterol total, trigliserida dan LDL di dalam darah.¹³

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

Diet tinggi kolesterol dapat meningkatkan sintesis kolesterol di hati melalui peningkatan aktivitas enzim HMG-CoA, dimana enzim ini merupakan katalisator dari tahap pertama dalam biosintesis kolesterol. Diet tinggi kolesterol akan berujung kepada peningkatan kolesterol dalam plasma yang disebut hiperkolesterol.¹ Hiperkolesterol akibat dari diet tinggi kolesterol dapat memicu terjadinya stress oksidatif. Pada kondisi hiperkolesterol, sebagai kompensasinya tubuh akan berusaha untuk menyeimbangkan kadar kolesterol plasma dengan cara mengubah kolesterol menjadi asam empedu.

Peningkatan konsentrasi kolesterol plasma akan berbanding lurus dengan sintesis asam empedu, dimana pada biosintesis tersebut memerlukan enzim sitokrom P-450 oksidase sebagai bagian dari katalisator reaksi pada tahap awal yaitu reaksi 7 α -hidroksilasi. Produk samping dari peningkatan aktivitas P-450 oksidase adalah terbentuknya lebih banyak radikal bebas atau ROS.¹² ROS akan mudah bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel, rangkaian proses tersebut dinamakan peroksidasi lipid⁸⁴. Peroksidasi lipid mengakibatkan penumpukan *free fatty acid* (FFA) dalam tubuh yang dalam waktu berkepanjangan dapat menjadi salah satu sebab terjadinya sindrom metabolik. Selain itu akibat dari adanya

induksi peroksidasi lipid yang berlebihan akan memicu timbulnya spesies reaktif lainnya, misal reaktif aldehida-melondialdehida.⁸⁵ Produksi radikal bebas yang terus meningkat pada keadaan hiperkolesterol menyebabkan stress oksidatif yang berakibat pada kerusakan jaringan. Hampir semua proses inflamasi mengakibatkan aktivasi makrofag jaringan dan infiltrasi monosit darah. Fagosit morfonuklear yang teraktifasi tersebut merupakan sumber utama dari tersekresinya sitokin proinflamasi yaitu TNF- α .⁵⁰

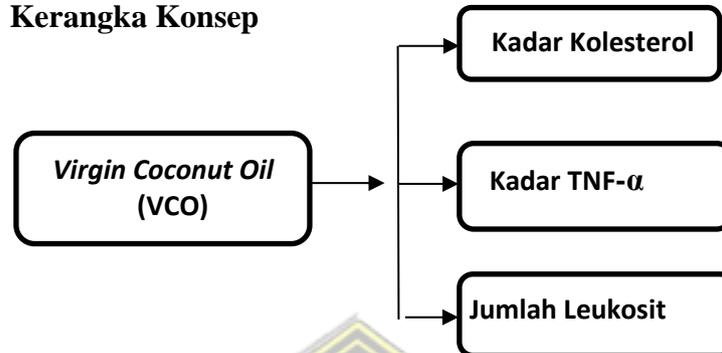
Peran lain dari ROS adalah mampu memengaruhi persinyalan NF κ B. NF κ B adalah keluarga faktor transkripsi yang memainkan peran penting dalam proses perkembangan, pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel, proliferasi, dan terlibat dalam banyak kondisi patologis.⁸⁷ NF κ B berperan langsung terhadap aktifitas sitokin proinflamasi. Sekresi sitokin proinflamasi pun akan memacu sel-sel inflamasi seperti leukosit untuk berdiapedesis ketempat inflamasi akibat dari stress oksidatif sebagaimana fungsinya untuk mempertahankan sistem imunitas.³ Jumlah leukosit akan mengalami peningkatan seiring dengan adanya kerusakan oksidatif.

Kandungan antioksidan seperti tokoferol dan polifenol di dalam VCO dapat memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas sehingga radikal bebas tidak akan dapat bereaksi dengan komponen seluler dan akan mencegah terjadinya stress oksidatif. Kandungan MCT khususnya asam laurat (C-12) di dalam VCO memainkan peran penting dalam sistem imun yaitu sebagai

prekursor dari monolaurin yang dapat memodulasi proliferasi sel imun. Proliferasi sel imun diyakini dapat menekan proses inflamasi yang terjadi di dalam tubuh. Asam laurat ketika masuk ke dalam tubuh akan segera diubah menjadi monolaurin yang memiliki ukuran 300 kali lebih kecil dari ukuran semula. Proses ini dikatalisis oleh enzim lipase. Enzim lipase terdapat pada traktus gastrointestinal yang dimulai dari rongga mulut yang terdapat saliva hingga ke usus halus. Monolaurin yang terdapat dalam VCO merupakan senyawa yang bersifat antiinflamasi,⁸¹ antivirus, anti bakteri, dan anti protozoa.⁸²

Kombinasi dari jenis asam lemak jenuh dan dari antioksidan yang terkandung dalam VCO dapat mencegah terjadinya abnormalitas kadar kolesterol dengan cara menurunkan lipogenesis dari hepar, meningkatkan β -oksidasi di mitokondria dan peroksisom serta meningkatkan *reverse cholesterol transport*¹⁵. VCO akan meningkatkan ekspresi pada mRNA dari PPAR- α , dimana aktivasi dari PPAR- α akan meningkatkan regulasi gen-gen yang berkaitan dengan oksidasi asam lemak seperti *Carnitine Palmitoyl Transferase* (CPT I) dan *acyl CoA oxidase* sehingga dapat mensupresi lipidemia postprandial dan akumulasi lipid. Jalur ini dinamakan PPAR- α -*dependent apaths*. Aktivasi dari PPAR- α juga akan meningkatkan aktivitas dari enzim lipoprotein lipase, *lecithin cholesterol acyltransferase* (LCAT) dan HDL yang berperan penting dalam *reverse cholesterol transport*.⁸³

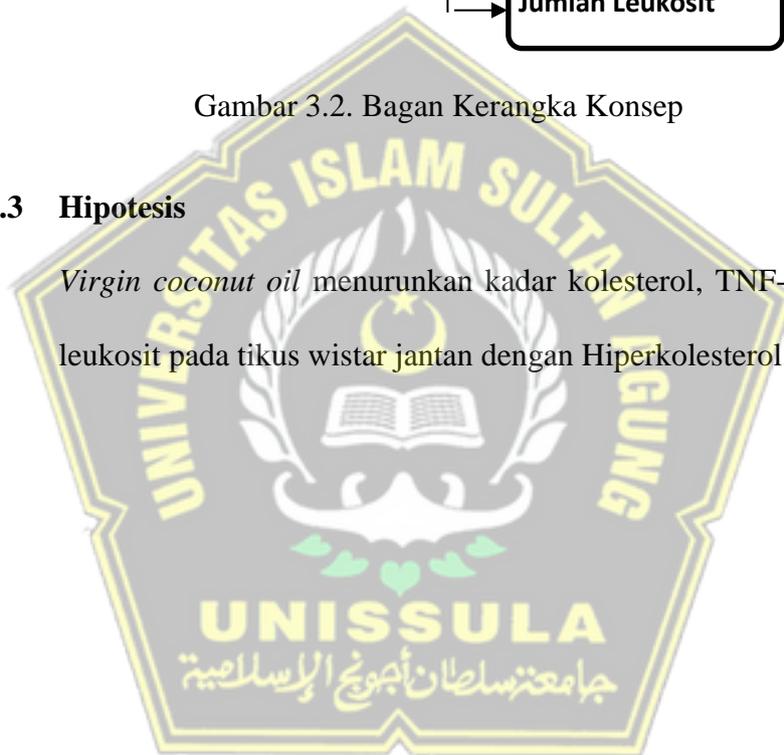
3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Bagan Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

Virgin coconut oil menurunkan kadar kolesterol, TNF- α , dan jumlah leukosit pada tikus wistar jantan dengan Hiperkolesterol.

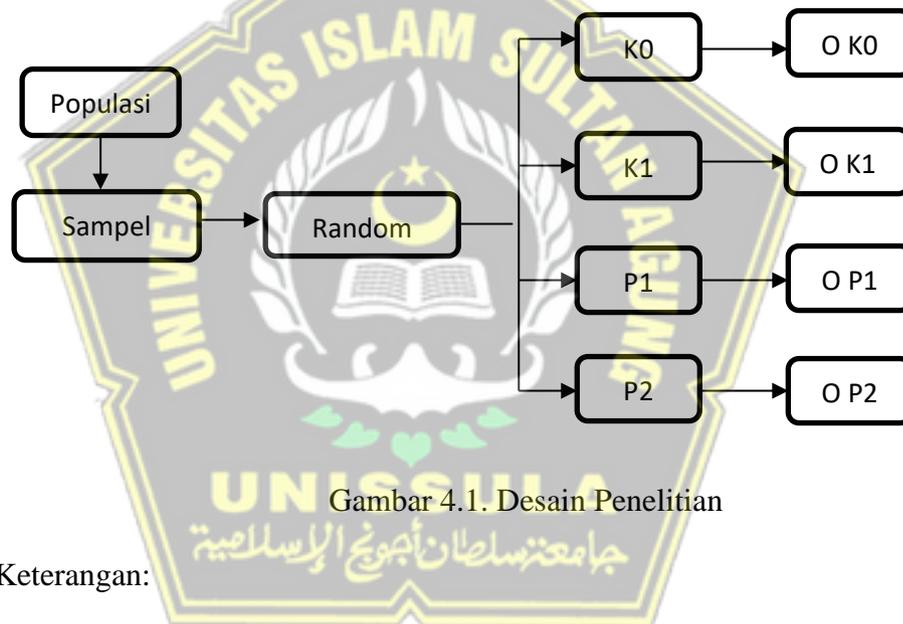


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *True eksperimental design* dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*.



Gambar 4.1. Desain Penelitian

Keterangan:

K0 : Kelompok dengan pemberian pakan standar tanpa diberi diet tinggi kolesterol.

K1 : Kelompok dengan pemberian pakan standar yang diberi diet tinggi kolesterol.

P1 : Kelompok perlakuan diberi VCO dengan dosis 0,9 mL/200 gr BB/ hari yang diberi diet tinggi kolesterol.

P2 : Kelompok perlakuan diberi VCO dengan dosis 0,45 mL/200 gr BB/ hari yang diberi diet tinggi kolesterol.

O K0 : Observasi kadar kolesterol total, TNF- α , dan Jumlah Leukosit pada kelompok kontrol negatif.

O K1 : Observasi kadar kolesterol total, TNF- α , dan Jumlah Leukosit pada kelompok kontrol positif.

O P1 : Observasi kadar kolesterol total, TNF- α , dan Jumlah Leukosit pada kelompok perlakuan dengan pemberian VCO dosis 0,9 mL/200 gr BB/ hari.
O P2 : Observasi kadar kolesterol total, TNF- α , dan Jumlah Leukosit pada kelompok perlakuan dengan pemberian VCO dosis 0,45 mL/200 gr BB/ hari.

4.2 Populasi

Populasi penelitian ini menggunakan tikus wistar jantan berumur 2-3 bulan, dengan berat 150-200 gr, yang diperoleh dari Laboratorium PSPG Universitas Gajah Mada.

4.3 Sampel

Pengambilan sampel penelitian menggunakan cara *simple random sampling* dan yang memenuhi kriteria inklusi, eksklusi, dan drop out.

4.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus wistar jantan
- b. Tikus dalam keadaan aktif, sehat, tingkah laku, dan aktivitas normal
- c. Umur 2-3 bulan
- d. Berat badan 150-200 gr

4.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Memiliki kelainan anatomis
- b. Tidak mau makan/sakit dalam penelitian

4.3.3 Drop Out

- a. Mati saat penelitian

4.4 Besar Sampel

Sampel penelitian merupakan sampel tikus wistar jantan yang sudah memenuhi kriteria inklusi. Besar sampel penelitian yaitu diperlukan 5 ekor perkelompoknya

Rumus Federer (2008):

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

$$(n-1)(4-1) = 15$$

$$(n-1)(3) = 15$$

$$n-1 = 5$$

$$n = 6 \text{ ekor per kelompok}$$

Dari rumus diatas maka setiap kelompok penelitian minimal memerlukan sampel sebanyak 6 ekor tikus putih jantan. Sehingga pada penelitian ini membutuhkan sampel total 24 ekor tikus wistar jantan.

4.5 Variabel dan Defenisi Operasional

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis VCO 0,9 mL/200 gr BB/ hari, dan 0,45 mL/200 gr BB/ hari.

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar kolesterol total, TNF- α , dan jumlah leukosit pada tikus wistar jantan.

4.5.3 Variabel Prakondisi

Tikus dibuat hiperkolesterol dengan pemberian makanan diet tinggi kolesterol yaitu menggunakan telur puyuh diberikan sebanyak 4 cc secara peroral selama 7 hari.

4.5.4 Defenisi Operasional

a. *Virgin Coconut Oil*

Virgin Coconut Oil yang digunakan dalam penelitian ini adalah merek SIOLA dari Desa Oting, Sulawesi Barat dengan komposisi lemak jenuh mencapai 60%. Pemberian VCO dengan dosis VCO 0,9 mL/200 gr BB/ hari, dan 0,45 mL/200 gr BB/ hari didapatkan dari hasil konversi dosis 50 ml dan 25 ml dari manusia dengan berat 70 kg ke tikus dengan berat 200 gr, diberikan secara oral setelah diberikan diet tinggi kolesterol, yaitu pada hari ke 8 hingga 14 hari. Skala : Ordinal.

b. Kolesterol Total

Kolesterol total adalah total dari keseluruhan jumlah kolesterol dalam darah. Serum untuk pemeriksaan kadar kolesterol total sebanyak 10 µl didapatkan dari hasil sentrifuge darah tikus wistar jantan. Diperiksa pada hari ke 21 yaitu dengan mengukur kadar kolesterol total menggunakan spektrofotometer, panjang gelombang λ 546 nm dengan satuan mg/dL, menggunakan

reagen dyasis. Pengukuran kadar kolesterol di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada. Skala : Rasio.

c. TNF- α

TNF- α adalah salah satu sitokin proinflamasi yang berperan dalam regulasi sistem imun. Serum untuk pemeriksaan kadar TNF- α sebanyak 100 μ l didapatkan dari hasil sentrifuge darah tikus wistar jantan. Diperiksa pada hari ke 21 dengan mengukur kadar TNF- α menggunakan ELISA kit Rat TNF- α dengan satuan ng/L. Skala : Rasio.

d. Leukosit

Leukosit atau sel darah putih adalah jenis sel yang berperan dalam sistem imunitas tubuh seperti melalui kemampuan fagositosisnya. Pemeriksaan leukosit dilakukan pada hari ke 21 dengan menggunakan alat hemositometer. Sampel yang digunakan adalah darah tikus 0,5 ml yang diambil dari sinus orbital kemudian dicampur dengan EDTA 10% 5 mikron. Diperiksa dengan menggunakan kamar hitung improve Neubauer. Rumus jumlah leukosit yaitu :

Sel leukosit per $\text{mm}^3 = N \times 50$ ($N =$ Jumlah leukosit pada 4 bidang sedang). Satuan jumlah leukosit adalah sel/mm^3 . Skala : Rasio.

4.6 Instrumen dan Bahan Penelitian

4.6.1 Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Mikroskop, kandang hewan coba, pipet leukosit, kamar hitung improve neubaecur, objek glass, jarum oval (Gavage), spuit ukuran 1 cc, bak bedah, dissecting Set, tabung reaksi, pipet tetes, mikro plate, mikro pipet, yellow tipe, blue tipe, Spektrofotometer ELISA Reader, Fotometer darah.

4.6.2 Bahan Penelitian

- a. Tikus wistar jantan usia 2-3 bulan dengan berat 150-200 gram, 24 ekor.
- b. *Virgin Coconut Oil*
- c. Pakan hiperkolesterol menggunakan kuning telur puyuh
- d. Sampel serum Tikus
- e. Sampel darah Tikus
- f. Reagen dyasis
- g. ELISA kit Rat TNF- α
- h. EDTA 10%
- i. Larutan Turk
- j. Aquades

4.7 Dosis VCO

Dosis VCO yang dianjurkan adalah 2,5-3 sendok makan 3 x sehari atau setara dengan 37,5-45 mL/hari untuk orang dewasa dengan berat badan 45-67 kg⁸⁹ dan 50 mL untuk orang dewasa dengan berat badan 70 kg.⁹⁰ Dosis optimal jika dikonversi dengan ketentuan : manusia 70 kg setara dengan tikus 200 gr adalah 0,018.⁹⁰ Dosis VCO yang diberikan pada penelitian ini adalah 50 mL x 0,018 = 0,9 mL/200 gr BB (dosis optimal) dan 25 mL x 0,018 = 0,45 mL /200 gr BB (dosis sedang) selama 14 hari.

4.8 Pemberian Makanan Diet Tinggi Kolesterol

Pemberian pakan pada hewan coba hiperkolestroemia menggunakan kuning telur puyuh diberikan sebanyak 4 mL secara peroral selama 7 hari.⁹¹ Hasil penelitian menggunakan kuning telur puyuh sebanyak 4 ml secara peroral selama 7 hari memberikan hasil rerata kadar kolesterol sebelum dan sesudah adalah 143,77 mg/dL dan 289,33 mg/dL.¹³ Kuning telur puyuh mengandung kolesterol sebanyak 2.139,17 mg/100 gr, kandungan kolesterol tersebut lebih tinggi dibanding bahan makanan lain.⁹²

4.9 Cara Kerja Penelitian

4.9.1 Prosedur Hewan Coba

Dipilih 24 ekor tikus berumur 2-3 bulan dengan 150-200 gr dan dibagi menjadi 4 kelompok; kelompok kontrol dan perlakuan dengan masing-masing terdiri atas 6 ekor tikus perkelompok.

K0 : Kelompok dengan pemberian pakan standar tanpa diberi diet tinggi kolesterol selama 20 hari

K1 : Kelompok dengan pemberian diet tinggi kolesterol selama 7 hari dan pakan standar selama 20 hari

P1 : Kelompok perlakuan diberi VCO dengan dosis 0,9 mL/200 gr BB/ hari yang diberi diet tinggi kolesterol pada hari ke 8 sampai hari ke 20.

P2 : Kelompok perlakuan diberi VCO dengan dosis 0,45 mL/200 gr BB/ hari yang diberi diet tinggi kolesterol pada hari ke 8 sampai hari ke 20.

Pada hari ke 21, tikus wistar jantan kemudian diambil darahnya untuk dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol total, kadar TNF- α , dan jumlah leukosit.

4.9.2 Cara Pengambilan Sampel Hewan Coba

- a. Tikus wistar jantan setelah 20 hari diberi perlakuan, pada hari ke 21 dilakukan pengambilan darah tikus melalui penusukan pada sinus orbitalis ditampung ke dalam vaculab untuk pemeriksaan kadar kolesterol total, kadar TNF- α , dan jumlah leukosit.
- b. Pengambilan darah tikus selesai, maka tikus dimatikan secara *dislocation*. Darah tikus yang didapat dicentrifuge 3000 rpm selama 10 menit sampai terbentuk serum.¹³

4.9.3 Pengukuran Kadar Kolesterol Total

- a. Siapkan blangko, standart dan sampel serum darah tikus.
- b. Masukkan reagent kolesterol sebanyak 1000 μ l kedalam tiga tabung (masing-masing 1000 μ l tiap tiga tabung)
- c. Masukkan sampel standar kolesterol sebanyak 10 μ l kedalam tabung yang berisi 1000 μ l reagen kolesterol.
- d. Masukkan sampel serum sebanyak 10 μ l kedalam reagen kolesterol.
- e. Inkubasi selama 10 menit di suhu 37 °C.
- f. Setelah 60 menit, baca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm.¹³

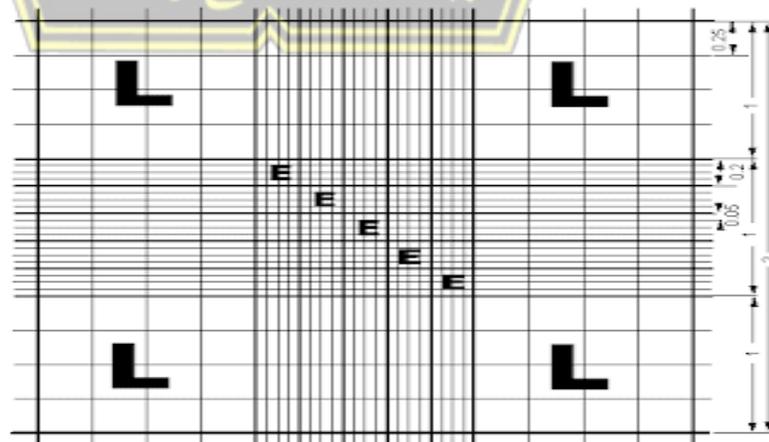
4.9.4 Pengukuran TNF- α

- a. 50 μ l anti tikus TNF- α , 100 μ l sampel atau standar ditambahkan ke plate yang berisi sumuran dan diinkubasi pada suhu kamar selama 3 jam.
- b. Sumuran pada plate dicuci sebanyak tiga kali, dan tambahkan 170 μ l streptavidin-HRP ke sumuran. diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit.
- c. Sumuran dicuci tiga kali lagi, dan ditambahkan 100 μ l larutan kromogen (3,3', 5,5' tetramethylbenzidine) dan diinkubasi selama 15 menit.

- d. Reaksi dihentikan dengan menambahkan stop solution yang terdiri dari H_2SO_4 .
- e. Dibaca dalam waktu 10 menit pada panjang gelombang 450 nm.¹³

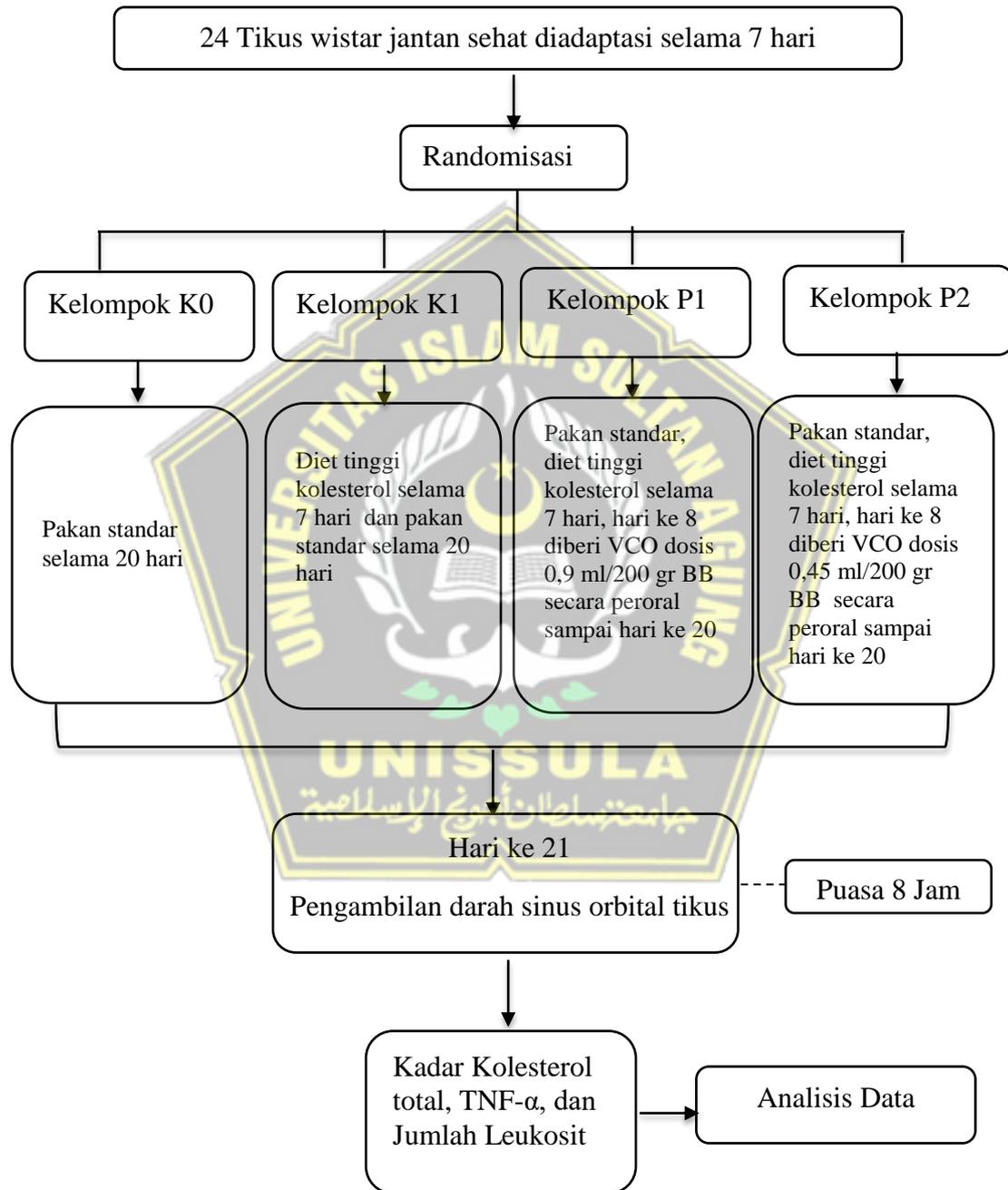
4.9.5 Pengukuran Jumlah Leukosit

- a. Diambil darah tikus sebanyak 0,5 ml melalui sinus orbital dan ditambahkan EDTA 10% sebanyak 5 mikron.
- b. Dilakukan pengenceran dengan pipet leukosit : darah dihisap sampai angka 0,5 lalu dihidap reagen sampai tanda 11. Pipet dihomogenkan beberapa kali, lalu didiamkan selama 3 menit. Buang 3-4 tetes pertama kemudian dimasukkan dalam bilik hitung
- c. Leukosit dihitung dalam bilik hitung dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x. Perhitungan di dalam 4 kotak besar, jumlah leukosit/mm³ darah dihitung dengan rumus $N \times 50$ dengan satuan sel/mm³.⁷⁴



Gambar 4.2 Kamar Hitung *Improved Neubauer*⁷⁴

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.3. Bagan Alur Penelitian

4.11 Tempat dan Waktu Penelitian

- a. Penelitian menggunakan hewan coba tikus wistar jantan dilakukan di Laboratorium PSPG UGM
- b. Pemeriksaan kadar kolesterol total, TNF- α , dan jumlah leukosit dilakukan di Laboratorium PSG UGM.

4.12 Analisa Data

Data rerata kadar Kolesterol total, TNF- α , dan jumlah leukosit disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan grafik. Kemudian data di uji normalitas dengan uji Shapiro Wilk dan uji homogenitas data dengan uji Levene test. Distribusi data kadar kolesterol total didapatkan hasil tidak normal dan homogen sehingga dilanjutkan dengan uji *kruskal wallis* antar kelompok di dapatkan nilai $p < 0.05$ dilanjut dengan uji beda non parametric dua kelompok menggunakan uji *Mann Whitney*. Distribusi data kadar TNF- α menunjukkan hasil normal dan tidak homogen sehingga dilanjutkan dengan menggunakan uji *one way anova* didapatkan nilai $p < 0.05$ dilanjut dengan uji post hoc Tamhane's. Distribusi data jumlah leukosit total menunjukkan hasil normal dan homogen sehingga dilanjutkan menggunakan uji *one way anova* didapatkan nilai $p < 0.05$ dilanjut dengan uji *post hoc* dengan uji *Tukey*.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian pengaruh pemberian VCO terhadap kadar kolesterol total, TNF- α , dan jumlah leukosit terhadap pada 24 tikus wistar jantan dengan hiperkolesterol selama 20 hari telah dilakukan. Hasil pengukuran kadar kolesterol total sebelum dan setelah perlakuan prakondisi selama 7 hari tertera pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Kadar Kolesterol Tikus Setelah 7 Hari Pemberian Diet Tinggi Kolesterol

Kelompok	Sebelum Perlakuan (mg/dL)	Setelah Perlakuan (mg/dL)
K1	139	200
K1	114	244
K1	110	260
K1	134	224
K1	111	253
K1	120	210
P1	137	211
P1	114	230
P1	122	223
P1	115	260
P1	100	249
P1	130	217
P2	100	280
P2	110	240
P2	124	216
P2	132	220
P2	103	251
P2	101	234

Hasil analisis rerata kadar kolesterol total, TNF- α , dan jumlah leukosit setelah perlakuan tertera pada tabel 5.2.

Tabel 5.2. Hasil analisis rerata kadar kolesterol total, TNF- α , dan Jumlah Leukosit

Variabel	Kelompok				Sig.(p)
	K0 N=6 Mean	K1 N=6 Mean	P1 N=6 Mean	P2 N=6 Mean	
Kadar Kolesterol Total (mg/dL)	48.4333	77.1067	53.2900	62.2650	
Std.deviasi	3.37293	4.81187	4.21094	1.58205	
Shapiro Wilk	0.658*	0.081*	0.001	0.962*	
Levene Test					0.125**
Kruskal Wallis					0.000***
Kadar TNF-α (ng/L)	142.50	202.17	160.67	183.33	
Std.deviasi	2.345	1.941	7.967	3.266	
Shapiro Wilk	0.614*	0.452*	0.304*	0.492*	
Levene Test					0.003
One Way Anova					0.000***
Jumlah Leukosit (sel/mm³)	4800.00	11150.00	6483.33	8350.00	
Std.deviasi	428.952	1019.313	808.497	539.444	
Shapiro Wilk	0.503*	0.476*	0.295*	0.651*	0.424**
Levene Test					0,000***
One Way Anova					

Keterangan: *Normal $p > 0,05$ **Homogen $p > 0,05$ ***Signifikan $p < 0,05$

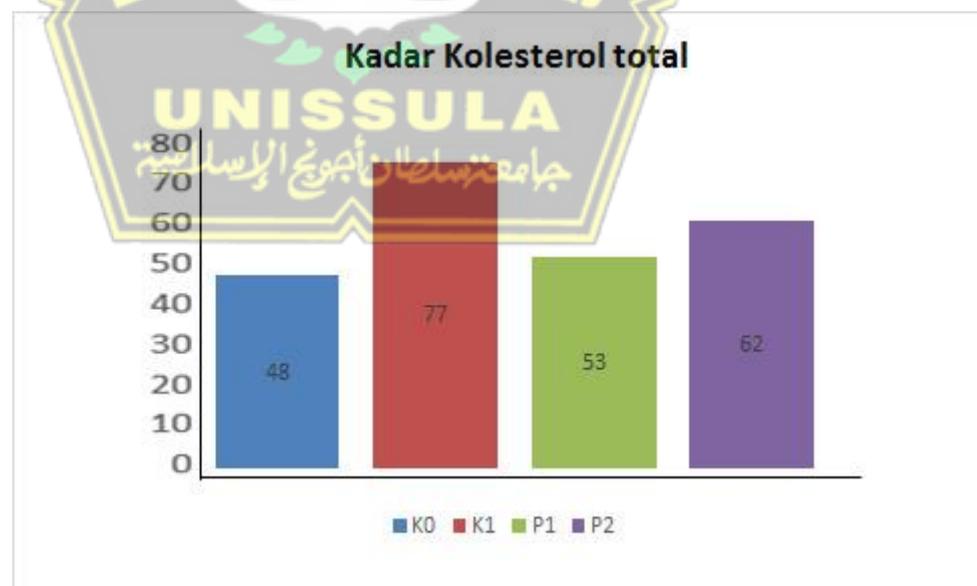
5.1.1 Kadar Kolesterol Total

Tabel 5.2 menunjukkan bahwa rerata kadar kolesterol total terendah yaitu pada kelompok kontrol (K0), kemudian berturut-turut diikuti kelompok perlakuan pertama (P1) dan kelompok perlakuan kedua (P2). Kelompok kontrol positif (K1) mendapatkan rerata kadar kolesterol total tertinggi. Kelompok diuji menggunakan uji *shapiro wilk* dengan hasil data ada yang

tidak berdistribusi normal ($p < 0.05$) dan menggunakan uji *levene test* untuk homogenitas menunjukkan hasil homogen ($p = 0.125$) maka analisis data menggunakan *kruskal wallis* dan menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok ($p = 0.000$) untuk mengetahui kelompok mana yang bermakna dilakukan uji *mann whitney* seperti yang disajikan pada tabel 5.3

Tabel 5.3 Perbedaan kadar kolesterol total antar 2 kelompok menggunakan uji Mann Whitney

Kelompok	<i>p-Value</i>
K0 vs K1	0.004*
K0 vs P1	0.109
K0 vs P2	0.004*
K1 vs P1	0.004*
K1 vs P2	0.004*
P1 vs P2	0.004*



Gambar 5.1. Rerata kadar kolesterol total (mg/dL)

Hasil uji Mann whitney pada tabel 5.2 menunjukkan kadar kolesterol total pada kelompok kontrol negative (K0) terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol positif ($p=0.004$), kelompok kontrol positif (K0) tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan P1 ($p=0.109$), K0 terdapat perbedaan yang signifikan dengan Kelompok P2 ($P=0.004$), K1 terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan P1 ($p=0.004$), K1 terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan P2 ($p=0.004$), P1 terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok P2 ($p=0.004$). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian VCO dengan dosis VCO 0,9 mL/200 gr BB/ hari, berpengaruh secara signifikan diikuti oleh dosis 0,45 mL/200 gr BB/ hari terhadap penurunan kadar kolesterol total pada tikus wistar jantan dengan hiperkolestrol sehingga pernyataan hipotesis dapat diterima.

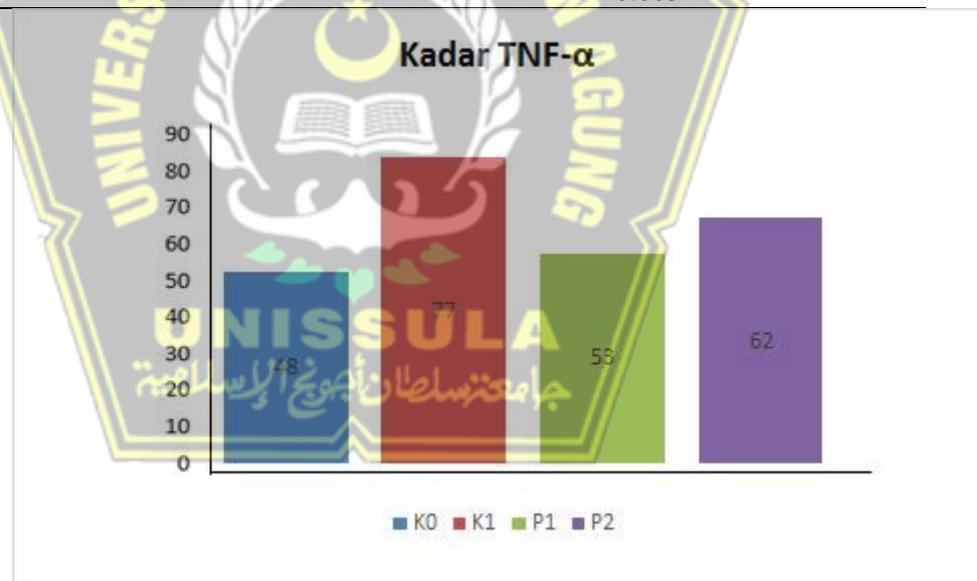
5.1.2 Kadar TNF- α

Tabel 5.2 menunjukkan bahwa rerata kadar TNF- α terendah yaitu pada kelompok kontrol (KO), kemudian berturut-turut diikuti kelompok perlakuan pertama (P1) dan kelompok perlakuan kedua (P2). Kelompok kontrol positif (K1) mendapatkan rerata kadar TNF- α tertinggi. Kelompok diuji menggunakan uji *shapiro wilk* dengan hasil data berdistribusi normal dan menggunakan uji *levne test* untuk homogenitas menunjukkan hasil homogen ($p=0.003$) maka analisis data menggunakan *one way anova* dan menunjukkan perbedaan

bermakna antar kelompok ($p=0.000$). Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda makna dilakukan uji Post Hoc dengan uji Tamhane's T2 seperti yang disajikan Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Perbedaan kadar TNF- α antar 2 kelompok menggunakan uji Tamhane's T2

Kelompok	<i>p-Value</i>
K0 vs K1	0.000*
K0 vs P1	0.011*
K0 vs P2	0.000*
K1 vs P1	0.000*
K1 vs P2	0.000*
P1 vs P2	0.003*



Gambar 5.2. Rerata kadar TNF- α (ng/L)

Hasil uji Tamhane's T2 pada tabel 5.4 menunjukkan kadar TNF- α pada kelompok kontrol negative (K0) terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol positif ($p=0.000$), kelompok kontrol positif (K0) terdapat

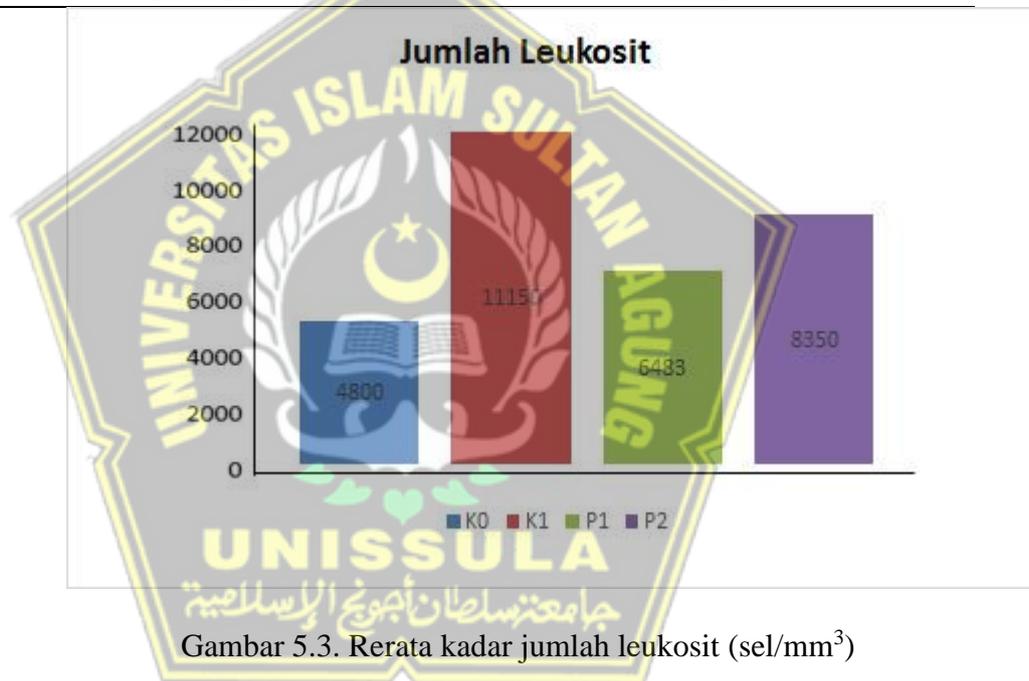
perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan P1 ($p=0.011$), K0 terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok P2 ($P=0.000$), K1 terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan P1 ($p=0.000$), K1 terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan P2 ($p=0.000$), P1 terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok P2 ($p=0.003$). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian VCO dengan dosis dosis VCO 0,9 mL/200 gr BB/ hari, berpengaruh secara signifikan diikuti oleh dosis 0,45 mL/200 gr BB/ hari terhadap penurunan kadar TNF- α pada tikus wistar jantan dengan hiperkolestrol sehingga pernyataan hipotesis dapat diterima.

5.1.3 Jumlah Leukosit

Tabel 5.2 menunjukkan bahwa rerata jumlah leukosit terendah yaitu pada kelompok kontrol (K0), kemudian berturut-turut diikuti kelompok perlakuan pertama (P1) dan kelompok perlakuan kedua (P2). Kelompok kontrol positif (K1) mendapatkan rerata kadar jumlah leukosit tertinggi. Kelompok diuji menggunakan uji *shapiro wilk* dengan hasil data berdistribusi normal dan menggunakan uji *levne test* untuk homogenitas menunjukkan hasil homogen ($p=0.424$) maka analisis data menggunakan *one way anova* dan menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok ($p=0.000$). Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda makna dilakukan uji Post Hoc dengan uji Tukey seperti yang disajikan Tabel 5.5.

Tabel 5.5 Perbedaan Jumlah Leukosit antar 2 kelompok menggunakan uji Tukey

Kelompok	<i>p-Value</i>
K0 vs K1	0.000*
K0 vs P1	0.004*
K0 vs P2	0.000*
K1 vs P1	0.000*
K1 vs P2	0.000*
P1 vs P2	0.001*



Gambar 5.3. Rerata kadar jumlah leukosit (sel/mm³)

Hasil uji Tukey pada tabel 5.5 menunjukkan jumlah leukosit pada kelompok kontrol negative (K0) terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol positif ($p=0.000$), kelompok kontrol positif (K0) terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan P1 ($p=0.004$), K0 terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan P2 ($P=0.000$), K1 terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan P1 ($p=0.000$),

K1 terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan P2 ($p=0.000$), P1 terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok P2 ($p=0.001$). berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian VCO dengan dosis dosis VCO 0,9 mL/200 gr BB/ hari, berpengaruh secara signifikan diikuti oleh dosis 0,45 mL/200 gr BB/ hari terhadap penurunan jumlah leukosit pada tikus wistar jantan dengan hyper kolestrol sehingga pernyataan hipotesis dapat diterima.

5.2 Pembahasan

Penelitian ini menggunakan sampel 24 ekor tikus wistar jantan yang terbagi menjadi 4 kelompok masing-masing berjumlah 6 ekor tikus, yaitu kelompok kontrol negatif (K) dengan pemberian pakan standar tanpa diberi diet tinggi kolesterol, kelompok kontrol positif (K1) dengan pemberian pakan standar yang diberi diet tinggi kolesterol, kelompok perlakuan (P1) diberi VCO dengan dosis 0,9 ml/200 gr BB/hari yang diberi diet tinggi kolesterol, dan kelompok perlakuan (P2) diberi VCO dengan dosis 0,45 ml/200 gr BB/hari yang diberi diet tinggi kolesterol. Hari ke 21 dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol total, TNF- α , dan jumlah leukosit. Penelitian ini menggunakan tikus wistar karena mempunyai kemiripan dengan manusia dalam hal fisiologi, anatomi, dan banyak gejala dan kondisi manusia yang dapat direplikasikan pada tikus.

Hiperkolesterol adalah keadaan dimana terjadi peningkatan kadar kolesterol di dalam darah dan yang menjadi pemicunya adalah pola hidup *High fat diet*. Hiperkolesterol berkontribusi terhadap terjadinya stress oksidatif yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada jaringan atau inflamasi. Kelompok perlakuan K1, P1, dan P2 menunjukkan adanya peningkatan kadar kolesterol (>200 mg/dL) setelah diberikan masing-masing diet tinggi kolesterol sebanyak 4 mL secara peroral selama 7 hari.

Hasil pemeriksaan kadar kolesterol total pada kelompok K1 yang diberikan diet tinggi kolesterol tanpa pemberian VCO mengalami peningkatan yang signifikan dibanding dengan kelompok kontrol (K0), kelompok yang diberi VCO dengan dosis 0,9 mL/200 g BB/hari (P1) dan 0,45 mL/200 g BB/hari (P2) seperti pada tabel 5.2. Penurunan kadar kolesterol total pada kelompok kontrol (K0) mendapatkan hasil yang sama dengan kelompok perlakuan (P1) yang diberi diet tinggi kolesterol dan diberi VCO dengan dosis 0,9 mL/200 g BB/hari, kemudian disusul oleh kelompok P2 yang diberi diet tinggi kolesterol dan diberi VCO dengan dosis 0,45 mL/200 g. Dosis 0,45 berbeda makna dengan kelompok normal akan tetapi dosis 0,45 sudah mulai memberikan efek walaupun penurunannya belum sampai mencapai kadar normal. Hal ini disebabkan karena VCO mempunyai kandungan berupa MCT yang dapat berfungsi sebagai ligan yang dapat mengaktivasi reseptor PPAR- α yang sangat berperan penting dalam metabolisme lipid..⁸³ Hasil penelitian

sebelumnya juga mengatakan bahwa pemberian VCO 10% pada tikus diabetes selama 3 minggu menunjukkan bahwa terjadi penurunan konsentrasi trigliserida, kolesterol total, LDL, VLDL, dan peningkatan pada parameter HDL.⁹ Penelitian yang dilakukan oleh Triaranti dkk mendapatkan hasil bahwa pemberian VCO dengan dosis 2 x 30 ml selama 2 minggu pada 19 orang penderita hipertensi mengalami perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) untuk parameter pemeriksaan kadar kolesterol sebelum dan setelah pemberian VCO.⁸

Hasil pemeriksaan kadar TNF- α pada kelompok yang diberi diet tinggi kolesterol tanpa pemberian VCO (K1) mengalami peningkatan yang signifikan dibanding dengan kelompok kontrol (K0), kelompok perlakuan yang diberi VCO dengan dosis 0,9 mL/200 g BB/hari (P1) dan 0,45 mL/200 g BB/hari (P2) seperti pada tabel 5.2. Hal ini menunjukkan adanya keterkaitan erat antara hiperkolesterol dengan produksi TNF- α sebagai sitokin proinflamasi.⁸⁶ Kadar TNF- α pada kelompok kontrol (K0) dan kelompok yang diberi diet tinggi kolesterol dengan pemberian VCO (K1) dengan dosis 0,9 mL/200 g BB/hari (P1) mengalami penurunan yang signifikan disusul dengan pemberian VCO 0,45 mL/200 g BB/hari (P2) dibanding dengan kelompok perlakuan tanpa diberi VCO (K1) seperti pada tabel 5.2. Dosis 0,45 berbeda makna dengan kelompok normal akan tetapi dosis 0,45 sudah mulai memberikan efek walaupun penurunannya belum sampai mencapai kadar normal. Pemberian VCO terbukti dapat menekan TNF- α sebagai sitokin proinflamasi yang mampu

menyebabkan inisiasi inflamasi atau peradangan, dimana hal ini disebabkan oleh kondisi stress oksidatif akibat pemberian diet tinggi kolesterol. Kandungan VCO berupa asam laurat yang dapat mencapai 44-55% memegang peranan penting dalam proses tersebut. Asam laurat ketika masuk ke dalam tubuh akan segera diubah menjadi monolaurin. Monolaurin tersebut dapat memodulasi proliferasi sel imun. Proliferasi sel imun diyakini mampu menekan proses inflamasi yang terjadi di dalam tubuh.⁷⁹ Penelitian yang dilakukan oleh Nasution secara invitro pada sel Raw 264.7 menggunakan VCO dengan konsentrasi 62,5 mikrogram/mL menunjukkan hasil bahwa VCO mampu menghambat ekspresi gen TNF- α , dan sitokin lainnya. Kesimpulan akhir VCO efektif memiliki aktivasi antiinflamasi. Penelitian yang dilakukan oleh Sandeep dkk juga menunjukkan hasil yang sama yaitu pada sel THP-1 yang dipapar *lipopolisakarida* setelah diberikan VCO mengalami penurunan kadar sitokin proinflamasi termasuk kadar TNF- α .¹⁰

Hasil pemeriksaan jumlah leukosit pada kelompok yang diberi diet tinggi kolesterol tanpa pemberian VCO (K1) mengalami peningkatan yang signifikan dibanding dengan kelompok kontrol (KO), kelompok perlakuan yang diberi VCO dengan dosis 0,9 mL/200 g BB/hari (P1) dan 0,45 mL/200 g BB/hari (P2) seperti pada tabel 5.2. Pemberian diet tinggi kolesterol akan menyebabkan peningkatan asam lemak bebas yang pada keadaan hiperkolesterol merusak mekanisme fisiologis membran sel. Hal tersebut

berpengaruh terhadap sinyal aktivasi sel inflamasi dan polaritas permukaan sel. Sel yang mengalami kerusakan akan mengekspresikan *damage-associated molecular pattern* (DAMP). DAMP kemudian akan dikenali oleh *pattern recognition receptor* (PRR) yang merupakan receptor yang terdapat pada sel imun seperti leukosit, untuk segera melakukan fagositosis pada sel yang rusak. Penelitian yang dilakukan oleh fathul hidayah mendapatkan hasil bahwa terdapat korelasi antara jumlah monosit dengan kadar kolesterol total dengan nilai $p = 0.038 (<0.05)$.³

Jumlah leukosit pada kelompok kontrol (K0) mengalami penurunan yang paling rendah dibanding yang diberi diet tinggi kolesterol dengan pemberian VCO (K1) dengan dosis 0,9 mL/200 g BB/hari (P1), VCO 0,45 mL/200 g BB/hari (P2) dan kelompok perlakuan tanpa diberi VCO (K1) seperti pada tabel 5.2. Dosis 0,45 berbeda makna dengan kelompok normal akan tetapi dosis 0,45 sudah mulai memberikan efek walaupun penurunannya belum sampai mencapai kadar normal. Kelompok kontrol mengalami penurunan yang paling rendah disebabkan karena tidak diberinya perlakuan disusul dengan kelompok P1 dan P2. Hal tersebut disebabkan oleh kandungan VCO berupa asam lemak jenuh rantai sedang atau MCT yang memberikan efek imunodulator.¹⁶ Penelitian yang dilakukan oleh Diyah mendapatkan hasil yaitu pada tikus wistar jantan yang dipapar *staphylococcus aureus* dan diberi VCO memiliki jumlah leukosit yang lebih rendah dibandingkan dengan

tikus yang tidak diberikan VCO.¹⁶ Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Noor Soesanti dan Ruben dimana pada hasil penelitiannya menyebutkan bahwa pemberian VCO 0.003 mL/hari pada mencit *Mus musculus* Balb/c jantan dengan hiperglikemik tersensitisasi ovalbumin mampu menurunkan persentase basophile, normalisasi persentase neutropil dan tidak meningkatkan kreatinin darah.⁹³

5.3 Keterbatasan Penelitian

Hiperkolesterol berkontribusi terhadap kejadian stress oksidatif yang dapat menyebabkan disregulasi respon proinflamasi dimana hal tersebut sangat berkontribusi terhadap kejadian sindrom metabolik. Pemeriksaan penanda stress oksidatif dengan parameter MDA sangat diharapkan untuk ditindak lanjuti baik melalui sampel serum maupun melalui pemeriksaan preparat histologis. Selain itu, untuk mengetahui secara pasti komposisi dari VCO sangat diharapkan untuk dilakukan pemeriksaan terlebih dahulu sebelum digunakan dalam penelitian.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan mengenai pengaruh pemberian VCO terhadap kadar kolesterol total, TNF- α , dan jumlah leukosit selama 20 hari dapat disimpulkan bahwa;

- 6.1.1 Pemberian VCO dengan dosis 0,9 mL/200 g BB/hari dan 0,45 mL/200 g BB/hari dapat menurunkan kadar kolesterol total darah pada tikus wistar jantan dengan hiperkolesterol
- 6.1.2 Pemberian VCO dengan dosis 0,9 mL/200 g BB/hari dan 0,45 mL/200 g BB/hari dapat menurunkan kadar TNF- α pada tikus wistar jantan dengan hiperkolesterol
- 6.1.3 Pemberian VCO dengan dosis 0,9 mL/200 g BB/hari dan 0,45 mL/200 g BB/hari dapat menurunkan jumlah leukosit total pada tikus wistar jantan dengan hiperkolesterol

6.2 Saran

Perlu dilakukan uji komposisi dari VCO terlebih dahulu sebelum digunakan dalam penelitian dan pemeriksaan MDA setelah pemberian VCO pada tikus wistar jantan dengan hiperkolesterol, baik itu menggunakan sampel serum maupun dengan pemeriksaan preparat histologi dan juga uji

pendahuluan untuk mengetahui secara pasti kandungan dari VCO yang digunakan.



DAFTAR PUSTAKA

1. Yani M. Mengendalikan Kadar Kolesterol Pada Hiperkolesterolemia. *J Olahraga Prestasi* [Internet]. 2015 [cited on 2021]; 11 (2):115737. Available from: doi:10.21831/jorpres.v11i2.5749
2. Indriputri C. Pengaruh Intermittent Fasting (Puasa Daud) terhadap Penurunan Meta-Inflamasi pada Tikus dengan Sindrom Metabolik. [Thesis]. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. 2019.
3. Hasanah HF. Korelasi Jumlah Sel Monosit dengan Kadar Kolesterol Total Pada Pasien Hiperkolesterolemia di Rumah Sakit X Kota Kediri. *J Wiyata* [Internet] 2016 [cited on 2021]; 3(1):23-30. Available from: <https://ojs.iik.ac.id/index.php/wiyata/article/download/67/66>
4. Harini M, Astirin OP. Kadar Kolesterol Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Hiperkolesterolemik setelah Perlakuan VCO. *Nusant Biosci.* 2009;1:53-58.
5. Zulkifli F, Agustini SM, Hasanah A. Pengaruh Ekstrak Biji Cokelat (*Theobroma Cacao L*) Terhadap Kadar Malondialdehid (Mda) Tikus Putih Jantan (*Rattus Norvegicus Strain Wistar*) Dengan Induksi Hiperkolesterol. *Saintika Med.* [Internet] 2016 [cited on 2021]; 12(1). doi:10.22219/sm.v12i1.5262
6. Paley CA, Johnson MI. Abdominal obesity and metabolic syndrome: exercise as medicine?. *BMC Sports science, Medicine and Rehabilitation.* [Internet] 2018 [cited on 2021];1-8. <https://doi.org/10.1186/s13102-018-0097-1>
7. Sari DM, Azrimaidaliza A, Purnakarya I. Faktor resiko kolesterol total pasien penyakit jantung koroner di rumah sakit achmad mochtar bukittinggi. *J Kesehat Masy.* 2010;4(2):77-81.
8. Ranti Maharani T, Herliawati, Rahmawati F. Perubahan Kadar Kolesterol Total Setelah Penggunaan Virgin Coconut Oil (VCO) pada Penderita Hipertensi di Desa Limbang Jaya Kabupaten Ogan Ilir. *J Public Knowledge Project.* 2019;000:0-3.
9. Akinnuga AM, Jeje SO, Bamidele O, Sunday VE. Dietary Consumption of Virgin Coconut Oil Ameliorates Lipid Profiles in Diabetic Rats. *Physiology Journal.* 2014. doi:10.1155/2014/256236

10. Varma SR, Sivaprakasam TO, Arumugam I, et al. In vitro anti-inflammatory and skin protective properties of Virgin coconut oil. 2019;9:5-14. doi:10.1016/j.jtcme.2017.06.012
11. Winarsi H (Universitas S, Soedirman) H (Universitas, Purwanto A (RS MSP. Suplemen antioksidan VCO (Virgin Coconut Oil) yang diperkaya dengan Zn bagi penderita Candidiasis Vagina. 2008;(32).
12. Wresdiyati T, Astawan M, Hastanti LY. Profil Imunohistokimia Superoksida Dismutase (SOD) pada Jaringan Hati Tikus dengan Kondisi Hiperkolesterolemia The Immunohistochemical Profile of Superoxide Dismutase (SOD) in the Liver Tissue of Hypercholesterolemic Rats. HAYATI J Biosci. 2006;13(3):85-89.
13. Rosidah U. Pengaruh Pemberian N-Acetyl Cysteine (Nac) Terhadap Profil Lipid Dan Tnf-A (Studi In Vivo Pada Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diberi Diet Tinggi Kolesterol). [Thesis]. Semarang: Unissula. 2021.
14. Rahmawati A. Mekanisme Terjadinya Inflamasi dan Stres Oksidatif pada Obesitas. J Chem Inf Model. 2014;53(9):0.
15. Venty A, Made Aman IG, Pangkahila W. Efek Pemberian Virgin Coconut Oil (Cocos nucifera) terhadap Dislipidemia pada Tikus Putih (Rattus norvegicus) Jantan Galur Wistar yang Diberi Diet Tinggi Kolesterol. WMJ Warmadewa Med Journal. 2017;1(2):58. doi:10.22225/wmj.1.2.28.58-65
16. Krisnawati D. Pengaruh Pemberian Virgin Coconut Oil (VCO) Terhadap Jumlah Leukosit Darah Tepi Tikus Wistar Jantan Yang Dipapar Staphylococcus aureus. J Unej. 2014.
17. Harimba A. Pengaruh Latihan Beban Terhadap Kadar Kolesterol Total Darah. [Skripsi]. Makassar: Unhas 2017.
18. Faridha dinur isna. Prevalensi Hiperkolesterolemia Pada Pasien Usia Remaja di Laboratorium Klinik Thamrin Medan Tahun 2017. [Skripsi]. Medan: Universitas Medan Area. 2019.
19. Irama A. Profil Trigliserida, Kolesterol Darah dan Respon Fisiologis Tikus Wistar yang diberi Ransum Mengandung Gulai Daging Sapi dan Jeroan. Published online 2009.
20. Wulansari V. Faktor-Faktor yang Berhubungan Hiperkolesterolemia (Studi Kasus pada Pegawai Wanita di Dinas Kesehatan Kota Pontianak). Skripsi Fak Ilmu Kesehat. Published online 2017:1-104.

21. Mukaromah A. Pengaruh Terapi Bekam Terhadap Kadar Kolesterol Total pada Penderita Hiperkolesterolemia di Klinik Bekam Assabil Holy Holistic [Skripsi]. Jakarta: Uin Syarif Hidayatullah. 2017.
22. Toha, Hamid A A. Ensiklopedia Biokimia Dan Biologi Molekuler. EGC; 2010.
23. Casvin. Hubungan Kadar Kolesterol Dalam Darah Dengan Kejadian Batu Empedu di Rumah Sakit Universitas Sumatera Utara. [Skripsi]. Medan: USU. 2018.
24. Zarrouk, Debbabi A and, Bezine M and, Mostafa M and, Dkk. Lipid Biomarkers In Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2017;15.
25. Aguslina Siregar F (Universitas SU), Makmur T (Universitas ISU. *Metabolisme Lipid Dalam Tubuh.* 2020;1 No. 2.
26. Widyaningsih W, Prabowo A, Sumiasih. Pengaruh Ekstrak Etanol Daging Bekicot Terhadap Kadar Kolesterol Total, HDL, dan LDL Serum Darah Tikus Jantan Galur Wistar. *Sains dan Teknol Farm.* Published online 2010.
27. Sri U. Hubungan antara Usia dan Jenis Kelamin dengan Kadar Kolesterol Penderita Obesitas RSUD Abdul Moeloek Provinsi Lampung. *J Kesehat.* 2015;6(1):43-48.
28. Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. *Biokimia Harper.* In: Buku Kedokteran EGC. ; 2013.
29. Ihsanto M. Pengaruh Rebusan Daun Kemangi (*Ocimum Sanctum*) Terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Total Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Hiperkolesterolemia (Dimanfaatkan Sebagai Sumber Belajar Biologi). Published online 2018.
30. III NA. *NCEP Cholesterol Guidelines.* Natl Inst Heal. 2001.
31. Wulandari R. Penerapan model regresi logistik robust pada status hiperkolesterolemia di RSUD DR. Moewardi Surakarta menggunakan estimasi bianco-yohai. *Jurnal UNS.* 2018.
32. Kasron. *Kelainan dan Penyakit Jantung, Pencegahan serta Pengobatannya.* In: Nuha Medika. Nuha Medika; 2012.
33. Hastuty YD. Perbedaan kadar kolesterol orang yang obesitas dengan orang yang non obesitas. 2015.:47-56.

34. Harsa IMS. Efek Pemberian Diet Tinggi Lemak Terhadap Profil Lemak Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). Univ Wijaya Kusuma. 2014;31(1):21-28.
35. Fitri, Jatmiko SW. Perbedaan Kolesterol Total pada Dewasa Obesitas dan Non Obesitas. Published online 2019:1-8.
36. Rita K, Sumiera M. Profil Lipid pada Penduduk Lanjut Usia di Jakarta. Univ Med. 2005;24, No. 4.
37. Solikin, Muradi. Hubungan Kadar Kolesterol Dengan Derajat Hipertensi Pada Pasien Hipertensi Di Puskesmas Sungai Jingah. J Keperawatan Suaka Insa. 2020;5(1):143-152. doi:10.51143/jksi.v5i1.230
38. Zuhroiyyah SF, Sukandar H, Sastradinanjanja SB. Hubungan Aktivitas Fisik dengan Kadar Kolesterol Total, Kolesterol Low-Density Lipoprotein, dan Kolesterol High-Density Lipoprotein pada Masyarakat Jatinangor. J Sist Kesehat. 2017;2(3):116-122. doi:10.24198/jsk.v2i3.11954
39. Stanbio L. Stanbip Cholesterol LiquiColor Procedure. Stanbio Laboratory; 2011.
40. Ekayanti IGAS (Universitas PG. Analisis Kadar Kolesterol Total Dalam Darah Pasien Dengan Diagnosis Penyakit Kardiovaskuler. 2019;1(1):6-11.
41. Mahmudati N. Seduhan Jahe Menurunkan Ekspresi TNF α pada Tikus Putih.pdf. Published online 2016.
42. Kesh SB, Sarkar D, Manna K. High Fat Diet Induced Oxidative Stress and its Impact on Metabolic syndrome. Asian J Pharm Clin Res. [Internet]. 2016 [cited on 2021]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/291699222_High-fat_diet-induced_oxidative_stress_and_its_impact_on_metabolic_syndrome_A_review
43. Grundy. 'Multifactorial etiology of hypercholesterolemia; implication for prevention of coronary heart disease' Arteriosclerosis and Thrombosis. Published online 1991:1619-1635.
44. Kammoun h l, Kraakman MJ, Febbraio MA. Adipose tissue inflammation in glucose metabolism. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. 2014;15 ():31-44.
45. Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A. The Subtle Balance between

- Lipolysis and Lipogenesis : A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients*. 2015;7 (1)(9453-9474).
46. Ware CF. *Tumor Necrosis Factors*. 2002;4:475-489.
 47. Brynskov J, Foegh P, Pedersen G, et al. Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. 2017;51 (1):37-43.
 48. Cahyani V. Efek Ekstrak Etanol Alga Coklat (*Sargassum Sp*) Terhadap Kadar Tumor Nekrosis Faktor Alpha, Tikus Wistar Dengan Diet Tinggi Lemak.; 2017.
 49. Gupta S, Chiplunkar S, Kim C, Yel L, Gollapudi S. Effect of age on molecular signaling of TNF-alpha induced apoptosis in human lymphocytes. *Pubmed*. 2003;124(4):503.
 50. Supit IA, Pangemanan DHC, Marunduh SR. Profil Tumor Necrosis Factor (Tnf-A) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (Imt) Pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran Unsrat Angkatan 2014 Profil Tumor Necrosis Factor (Tnf-A) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (Imt) [Internet]. 2015 [cited on 2021]; 3(2): 640-643: <https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/ebiomedik/article/view/8621/0>
 51. Masitahari MI. Pemberian Growth Hormone menurunkan Kadar Tumor Necrosis Faktor-A pada Tikus Jantan Dislipidemia. [Thesis]. Denpasar: Pascasarjana Universitas Udayana. 2011.
 52. Fitzgerald KA, O'Neill J, A. Gearing AJ., Callard RE. The Cytokine FactsBook and Webfacts. In: *Second. Academic, Press*; 2001:474-480. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-012155142-1/50103-2>
 53. Baratawidjaya K, Renggis I. *Imunologi Dasar*. 9th ed.; 2010.
 54. Atzeni F, Mary Q, Unit R. *Tumor Necrosis Factor*. Vol 7. Elsevier Inc.; 2013. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.01594-1
 55. Bradley J. TNF-mediated inflammatory disease. *J Phatol*. 2008;214(2):149.
 56. Coondoo A. Cytokines in dermatology - a basic overview. *Indian J Dermatol*. 2011;56 (4):368-74iNDIA.
 57. Wisse BE. The Inflammatory Syndrome : The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorder Linked to Obesity. *Am Soc Nephrol*.

- 2004;15 (11):2792-2800.
58. Janeway C, P T, Walport M, Capra J. Immunology : The Immune System in Health and Disease. In: Immunology Letters. Carland Pulishers; 1999.
 59. Lumentut AR, Marunduh S, Rampengan JJ. Profil TNF- α Pada Orang Lanjut Usia di Panti Wredha Bethania Lembean [Internet]. Jurnal eBm. 2015 (cited on 2021); 3(2);644-647. <https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/ebiomedik/article/view/8727>
 60. Ratulangi MRJ. Profil TNF- α sesaat setelah melakukan senam zumba. PAAI eBiomed; 2016;4:76-80.
 61. Rahman ZA, Abdullah N, Singh R, Sosroseno W. Effect of acute exercise on the levels of salivary cortisol,tumor necrosis factor- α and nitric oxide. J Oral Sci. 2010;52(1):133-136.
 62. Sarhadi M, Ghodratollah A, Khorjahani Z, Naghiloo. The effect of moderate running test on serum TNF- α in obese men. Int J Biosci. 2014; 4(3): 10-15.
 63. Febyan, Wijaya SH, Tannika A, Hudyono J. Role of Cytokines in Stressful Condition as A Trigger for A Depression. 2019;6(4):210-214.
 64. Felger JC, Shapiro LA. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. Neuroscience. 2013:199-229.
 65. Effendi Z. Peranan Leukosit sebagai Anti Inflamasi Alergik dalam Tubuh. In: USU Digital Library. 2003.
 66. Cahyaningsih U, Malichatin H, Hedianto YE. Diferensial Leukosit Pada Ayam Setelah Diinfeksi Eimeria Tanella Dan Pemberian Serbuk Kunyit (Curcuma Domestica) Dosis Bertingkat. 2007:593-599.
 67. Feher J. White Blood Cells and Inflammation. In: Quantitave Human Physiologe. Researchgate. 2012.
 68. Feher J. White Blood Cells and Inflammation. (Feher J, ed.). Academic Press; 2012. doi:10.1016/B978-0-12-800883-6.00046-X
 69. Kiswari R. Hematologi & Transfusi. Jakarta: Erlangga; 2014.
 70. Riswanto. Pemeriksaan Laboratorium Hematologi. Alfamedia & Kanal Medika; 2013.

71. Hoffbrand A V, Pettit JE, Moss PAH. Essential Haematology (Kapita Selekta Haematology). In: 2nd ed. Buku Kedokteran EG; 2005.
72. Swastini IG. 10 Swastini 63-68.pdf. Kerusakan Gigi Merupakan Fokal Infeksi Penyebab Timbulnya Penyakit Sist. 1(1):63-68.
73. Nugraha G. Panduan Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Dasar. CV Trans Info Medika; 2015.
74. Hikmah AN. Analisis Pengaruh Pemberian Ubi Ungu Terhadap Kadar CRP dan Jumlah Leukosit pada Aktivitas Fisik Berat. [Thesis]. Semarang: Fakultas Kedokteran Unissula. 2019.
75. Sherwood L. Fisiologi Manusia : Dari Sel Ke Sistem. 8th ed. EGC; 2014.
76. Beers MH, Fletcher AJ, Jones T V. Aneurysms and Aortic Dissection. In: The Merck Manual of Medical Information. Second. ; 2003.
77. Tanasale MLP. Aplikasi Starter Ragi Tape Terhadap Rendemen dan Mutu Virgin Coconut Oil (VCO). 2013;2 (01).
78. Darmoyuwono W. Gaya Hidup Sehat Dengan Virgin Coconut Oil. Gramedia; 2006.
79. Nasution MA. Aktivitas Antiinflamasi Minyak Kelapa Murni Dan Hasil Hidrolisisnya Secara In Vitro Terhadap Sel Raw 264.7. Published online 2020.
80. Venty A. Pemberian Virgin Coconut Oil (Cocos Nucifera) Mencegah Dislipidemia Pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Jantan Galur Wistar Yang Diberi Diet Tinggi Kolesterol. Published online 2016.
81. Kamadjaja SS, Nisa K, Sentosa A, Mulyawan. Pengaruh Virgin Coconut Oil Terhadap Jumlah Makrofag. Univ Airlangga, Surabaya. 2020.
82. Rahmi S. Pengaruh Pemberian Virgin Coconut Oil (Vco) Terhadap Profil Farmakokinetika Natrium Diklofenak.; 2016.
83. Arunima S, Rajamohan T. Influence of virgin coconut oil-enriched diet on the transcriptional regulation of fatty acid synthesis and oxidation in rats – a comparative study. Journal of Nutrition. 2014:1782-1790. doi:10.1017/S000711451400004X
84. Wahjuni S, Santi SR, Wulandari NNA. Uji Pemanfaatan Daun Sirsak

- (*annona muricata* L.) Dalam Menghambat Stres Oksidatif Pada Tikus Wistar Hiperkolesterolemia Melalui Peningkatan Aktivitas Superoxide Dismutase. *Jurnal Kimia*. 2015:67-70.
85. Suryadinata RV. Effect of Free Radicals on Inflammatory Process in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). SA license. 2018:317-324. doi:10.20473/amnt.v2.i4.2018.317-324
 86. Dr. Drs I Made Oka Adi Parwata MS. Antioksidan. 2016th ed. Universitas Udayana Denpasar; 2016.
 87. Chen X, Andresen BT, Hill M, Zhang J, Booth F, Zhang C. Role of Reactive Oxygen Species in Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Endothelial Dysfunction. 2010;4(4):245-255.
 88. Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab*. 2012;15:635-645.
 89. Bolang SL, Wongkar D, Ottay RI. Pengaruh Virgin Coconut Oil Terhadap Kadar Kolesterol Hdl Darah. 2012.:104-110.
 90. Cendhikalistya GO, Nabawiyati S, Makiyah N. Pengaruh Pemberian VCO (Virgin Coconut Oil) terhadap Berat Badan The Influence of VCO (Virgin Coconut Oil) to Body Weight in Rat. 2009;9(1):33-41.
 91. Eka-Pratiwi IGAP, Soetjningsih S, Mantik-Astawa IN, Trisna Windiani IGA. Virgin Coconut Oil Compared to Corn Oil in World Health Organization Formula on Glutathione, TNF- α , and Body Weight Gain in Severe Malnourished Wistar Rat. *Bali Med J*. Published online 2016. doi:10.15562/bmj.v5i3.321
 92. Agustina D. Pengaruh Pemberian Jus Biji Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Rasio Kolesterol LDL, HDL Tikus Sprague Dawley Dislipidemia. 2013.
 93. Handajani NS, Dharmawan R. Effect of VCO to leucocyte differential count , glucose levels and blood creatinine of hyperglycemic and ovalbumin sensitized *Mus musculus* Balb / c. 2009;1(1):1-8.
 94. Yani M. Mengendalikan Kadar Kolesterol Pada Hiperkolesterolemia. *J Olahraga Prestasi*. 2015;11(2):115737. doi:10.21831/jorpres.v11i2.5749

LAMPIRAN 1

TABEL KONVERSI DOSIS HEWAN DAN MANUSIA

	20 g Mencit	200 g Tikus	400 g Marmot	1,5 kg Kelinci	1 kg Kucing	4kg Kera	12 kg Anjing	70 kg Manusia
20 g mencit	1,00	7,00	12,29	27,80	23,70	64,10	124,20	287,90
200 g Tikus	0,14	1,00	1,74	3,30	4,20	9,20	17,80	56,00
400 g Marmot	0,08	0,57	1,00	2,25	2,0	5,20	10,20	31,50
1,5 kg Kelinci	0,04	0,25	1,44	1,00	1,08	2,40	4,50	14,20
1 kg Kucing	0,03	0,23	0,41	0,92	1,00	2,20	4,10	13,00
4 kg Kera	0,016	0,11	0,19	0,42	0,5	1,00	1,90	6,10
12 kg Anjing	0,008	0,06	0,10	0,22	0,2	0,52	1,00	3,10
70 kg Manusia	0,0026	0,018	0,31	0,07	0,13	0,16	0,32	1,00

(Sumber : Anisah⁷⁴)

LAMPIRAN 2

PERHITUNGAN PEMBUATAN DOSIS VCO

Dosis VCO yang dianjurkan adalah 2,5-3 sendok makan 3 x sehari atau setara dengan 37,5-45 mL/hari untuk orang dewasa dengan berat badan 45-67 kg⁸⁹ dan 50 mL untuk orang dewasa dengan berat badan 70 kg.⁹⁰ Dosis optimal jika dikonversi dengan ketentuan : manusia 70 kg setara dengan tikus 200 gr adalah 0,018.⁹⁰

- Dosis 1

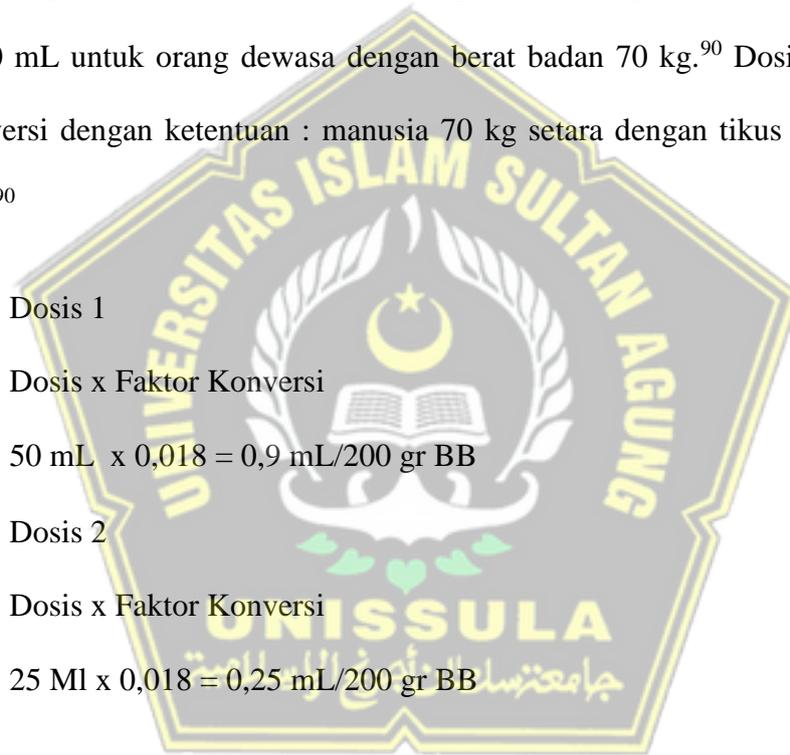
Dosis x Faktor Konversi

$$50 \text{ mL} \times 0,018 = 0,9 \text{ mL}/200 \text{ gr BB}$$

- Dosis 2

Dosis x Faktor Konversi

$$25 \text{ MI} \times 0,018 = 0,25 \text{ mL}/200 \text{ gr BB}$$



LAMPIRAN 3

BERAT BADAN TIKUS (gram)

Sebelum Perlakuan			
Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
I (1) : 169 gr	II (1) : 177 gr	III (1) : 164 gr	IV (1) : 158 gr
I (2) : 163 gr	II (2) : 178 gr	III (2) : 160 gr	IV (2) : 163 gr
I (3) : 165 gr	II (3) : 169 gr	III (3) : 161 gr	IV(3) : 162 gr
I (4) : 167 gr	II (4) : 161 gr	III (4) : 161 gr	IV (4) : 161 gr
I (5) : 163 gr	II (5) : 166 gr	III (5) : 164 gr	IV (5) : 173 gr
I (6) : 162 gr	II (6) : 164 gr	III (6) : 168 gr	IV (6) : 160 gr
Setelah Perlakuan			
Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
I (1) : 160 gr	II (1) : 172 gr	III (1) : 167 gr	IV (1) : 170 gr
I (2) : 168 gr	II (2) : 186 gr	III (2) : 160 gr	IV (2) : 168 gr
I (3) : 174 gr	II (3) : 176 gr	III (3) : 166 gr	IV(3) : 176 gr
I (4) : 166 gr	II (4) : 170 gr	III (4) : 169 gr	IV (4) : 170 gr
I (5) : 165 gr	II (5) : 172 gr	III (5) : 162 gr	IV (5) : 172 gr
I (6) : 165 gr	II (6) : 165 gr	III (6) : 177 gr	IV (6) : 165 gr

LAMPIRAN 4
HASIL KOLESTEROL TIKUS (mg/dL)

Sebelum Pemberian Diet Tinggi Kolesterol			
Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
I (1) : 118	II (1) : 139	III (1) : 137	IV (1) : 100
I (2) : 133	II (2) : 114	III (2) : 114	IV (2) : 110
I (3) : 120	II (3) : 110	III (3) : 122	IV(3) : 124
I (4) : 118	II (4) : 134	III (4) : 115	IV (4) : 132
I (5) : 107	II (5) : 111	III (5) : 100	IV (5) : 103
I (6) : 121	II (6) : 120	III (6) : 130	IV (6) : 101
Setelah Pemberian Diet Tinggi Kolesterol			
Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
I (1) : 114	II (1) : 200	III (1) : 211	IV (1) : 280
I (2) : 130	II (2) : 244	III (2) : 230	IV (2) : 240
I (3) : 122	II (3) : 260	III (3) : 223	IV(3) : 216
I (4) : 117	II (4) : 224	III (4) : 260	IV (4) : 220
I (5) : 104	II (5) : 253	III (5) : 249	IV (5) : 251
I (6) : 120	II (6) : 210	III (6) : 217	IV (6) : 234

LAMPIRAN 5
OLAH DATA SPSS

1. Rerata (Mean) dan Standar Deviasi

- **Kolesterol**

		Statistics			
		K0	K1	P1	P2
N	Valid	6	6	6	6
	Missing	0	0	0	0
Mean		48.4333	77.1067	53.2900	62.2650
Std. Deviation		3.37293	4.81187	4.21094	1.58205

- **TNF alfa**

		Statistics			
		K0	K1	P1	P2
N	Valid	6	6	6	6
	Missing	7	7	7	7
Mean		142.50	202.17	160.67	183.33
Std. Deviation		2.345	1.941	7.967	3.266

- **Leukosit**

		Statistics			
		K0	K1	P1	P2
N	Valid	6	6	6	6
	Missing	0	0	0	0
Mean		4800.00	11150.00	6483.33	8350.00
Std. Deviation		428.952	1019.313	808.497	539.444

2. Uji Normalitas (Shapiro Wilk)

- Kolesterol

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
K0	.164	6	.200 [*]	.940	6	.658
K1	.250	6	.200 [*]	.816	6	.081
P1	.426	6	.001	.627	6	.001
P2	.165	6	.200 [*]	.982	6	.962

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

- TNF alfa

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
K0	.190	6	.200 [*]	.934	6	.614
K1	.226	6	.200 [*]	.912	6	.452
P1	.207	6	.200 [*]	.887	6	.304
P2	.207	6	.200 [*]	.918	6	.492

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

- **Leukosit**

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
K0	.258	6	.200 [*]	.920	6	.503
K1	.205	6	.200 [*]	.916	6	.476
P1	.292	6	.119	.885	6	.295
P2	.242	6	.200 [*]	.939	6	.651

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

3. Uji Homogenitas (Levene test)

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
TNF alfa (ng/L)	6.415	3	20	.003
Leukosit (sel/mm ³)	.975	3	20	.424
Kolesterol Total (mg/dl)	2.154	3	20	.125

Jadi dapat disimpulkan bahwa

- Kadar TNF alfa menunjukkan normal dan tidak homogen sehingga dilakukan uji One Way Anova kemudian dilanjut dengan uji post hoc dengan uji Tamhane's T2
- Jumlah Leukosit menunjukkan normal dan homogen sehingga dilakukan uji One Way Anova kemudian dilanjut dengan uji post hoc dengan uji Tukey
- Kadar Kolesterol Total menunjukkan tidak normal dan homogen sehingga dilakukan uji Kruskal Wallis kemudian dilanjut dengan uji Man Whitney.

4. uji *One way Anova* pada TNF-alfa

ANOVA

TNF alfa (ng/L)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12222.333	3	4074.111	195.401	.000
Within Groups	417.000	20	20.850		
Total	12639.333	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TNF alfa (ng/L)

Tamhane

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K0	K1	-59.667*	1.243	.000	-63.76	-55.58
	P1	-18.167*	3.390	.011	-31.34	-5.00
	P2	-40.833*	1.641	.000	-46.32	-35.34
K1	K0	59.667*	1.243	.000	55.58	63.76
	P1	41.500*	3.347	.000	28.22	54.78
	P2	18.833*	1.551	.000	13.49	24.18
P1	K0	18.167*	3.390	.011	5.00	31.34
	K1	-41.500*	3.347	.000	-54.78	-28.22
	P2	-22.667*	3.515	.003	-35.64	-9.69
P2	K0	40.833*	1.641	.000	35.34	46.32
	K1	-18.833*	1.551	.000	-24.18	-13.49
	P1	22.667*	3.515	.003	9.69	35.64

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

5. Uji One Way Anova pada Leukosit

ANOVA

Leukosit (sel/mm³)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	133291250.000	3	44430416.667	81.988	.000
Within Groups	10838333.333	20	541916.667		
Total	144129583.333	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Leukosit (sel/mm³)

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K0	K1	-6350.000*	425.016	.000	-7539.59	-5160.41
	P1	-1683.333*	425.016	.004	-2872.93	-493.74
	P2	-3550.000*	425.016	.000	-4739.59	-2360.41
K1	K0	6350.000*	425.016	.000	5160.41	7539.59
	P1	4666.667*	425.016	.000	3477.07	5856.26
	P2	2800.000*	425.016	.000	1610.41	3989.59
P1	K0	1683.333*	425.016	.004	493.74	2872.93
	K1	-4666.667*	425.016	.000	-5856.26	-3477.07
	P2	-1866.667*	425.016	.001	-3056.26	-677.07
P2	K0	3550.000*	425.016	.000	2360.41	4739.59
	K1	-2800.000*	425.016	.000	-3989.59	-1610.41
	P1	1866.667*	425.016	.001	677.07	3056.26

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Uji Kruskal Wallis pada kadar kolesterol total

	Kolesterol Total (mg/dl)
Chi-Square	19.287
df	3
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

Uji Mann Whitney pada kolesterol total

- K0 dengan K1

K0 dengan P1

	Kolesterol Total (mg/dl)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

	Kolesterol Total (mg/dl)
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	29.000
Z	-1.601
Asymp. Sig. (2-tailed)	.109
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.132 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

- **K0 dengan P2**

Test Statistics ^a	
	Kolesterol Total (mg/dl)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

- **K1 dengan P2**

Test Statistics ^a	
	Kolesterol Total (mg/dl)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

- **K1 dengan P1**

Test Statistics ^a	
	Kolesterol Total (mg/dl)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

- **P1 dengan P2**

Test Statistics ^a	
	Kolesterol Total (mg/dl)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

LAMPIRAN 6
DOKUMENTASI PENELITIAN



Pembagian tikus *wistar* secara random menjadi 4 Kelompok



Bahan-bahan makanan diet tinggi kolesterol



Ektra Virgin Coconut Oil (VCO)
Merek Siola



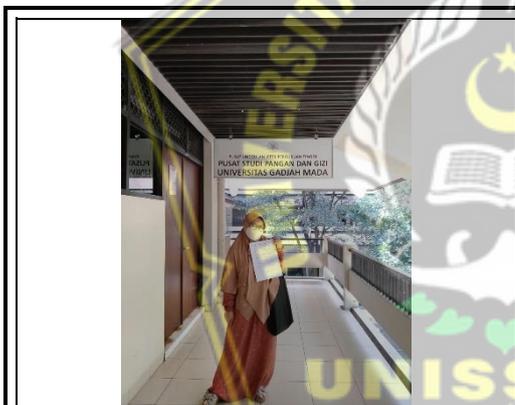
Pengambilan darah melalui sinus orbital



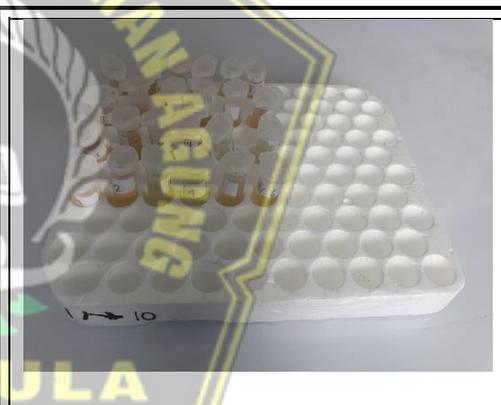
Pemberian diet tinggi kolesterol melalui oral dengan cara di Sonde



Pemberian larutan dosis VCO melalui oral dengan cara di Sonde



Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM



Serum tikus yang berjumlah 24 sampel

LAMPIRAN 7

SURAT KETERANGAN PENELITIAN



UNIVERSITAS GADJAH MADA
PUSAT STUDI PANGAN DAN GIZI

Alamat: Gedung PAU-UGM, Jalan Teknik Utara, Berek, Yogyakarta 55281, Telp./Fax. (0274) 589242 <http://cfns.ugm.ac.id>, E-mail: cfns@ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN

No. : 89/UN.1/PSPG/Sket/VIII/2021

Yang bertanda tangan di bawah ini, Kepala Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada menerangkan bahwa mahasiswa berikut :

Nama : Mutmainnah
 NIM : MBK1914010157
 Institusi : S-2 Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung
 Judul Penelitian : Pengaruh Pemberian VCO terhadap Kadar Kolesterol Total, TNF- α , dan Jumlah Leukosit (Studi Eksperimental pada Tikus Wistar Jantan dengan Hiperkolesterol)

Telah melakukan penelitian di Laboratorium Gizi (Kandang Hewan Coba) di Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada pada bulan Agustus 2021.

Demikian Surat Keterangan ini kami buat untuk dapat digunakan sebagaimana perlunya.

Yogyakarta, 20 Agustus 2021
 Kepala,

Prof. Dr. Ir. Endang Sutriswati Rahayu, M.S.
 NIP 195402221980032001

LAMPIRAN 8

SURAT ETHICAL CLEARANCE

KOMISI BIOETIKA PENELITIAN KEDOKTERAN/KESEHATAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG SEMARANG

Sekretariat : Gedung C Lantai I Fakultas Kedokteran Unissula

Jl. Raya Kaligawe Km 4 Semarang, Telp. 024-6583584, Fax 024-6594366

Ethical Clearance

No. 249/VIII/2021/Komisi Bioetik

Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, setelah melakukan pengujian atas usulan penelitian yang berjudul :

PENGARUH PEMBERIAN VCO TERHADAP KADAR KOLESTEROL TOTAL, TNF- α , DAN JUMLAH LEUKOSIT

Peneliti Utama : Mutiainnah
 Pembimbing : Dr. H. Ir. Trick Samsanenti, M.Kes
 Dr. dr. Chudiyah, M.Kes
 Tempat Penelitian : Laboratorium P&SPG Universitas Gajah Mada

dengan ini menyatakan bahwa usulan penelitian diatas telah memenuhi prasyarat etik penelitian. Oleh karena itu Komisi Bioetika merekomendasikan agar penelitian ini dapat dilaksanakan dengan mempertimbangkan prinsip-prinsip yang dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki dan panduan yang tertuang dalam Pedoman Nasional Etik Penelitian Kesehatan (PNEPK) Departemen Kesehatan RI tahun 2004.

Semarang, 15 Agustus 2021

Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran/Kesehatan
 Fakultas Kedokteran Unissula

Ketua,

(dr. Sofwan Dahlan, Sp.F(K))