

**PENGARUH VARIASI KOMPOSISI MAKRONUTRIEN DIET  
TERHADAP HORMON TESTOSTERON  
PADA TIKUS SPRAGUE DAWLEY**

**Skripsi**

Sebagai salah satu syarat mencapai gelar  
Sarjana Kedokteran FK UNISSULA



Oleh :

**Alif Sirajuddin Al-Azizi**

**30101900011**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG**

**Semarang**

**202**

**SKRIPSI**  
**PENGARUH VARIASI KOMPOSISI MAKRONUTRIEN DIET**  
**TERHADAP HORMON TESTOSTERON PADA TIKUS SPRAGUE**  
**DAWLEY**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh:

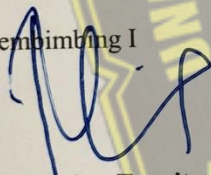
**Alif Sirajuddin A**

**30101900011**

Telah disetujui dipertahankan di depan Dewan Penguji  
pada tanggal 27 September 2022  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I



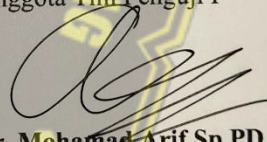
**dr. Nurina Tyagita, M. Biomed**

Pembimbing II



**Azizah Hikma Safitri, S.Si., M.Si**

Anggota Tim Penguji I



**dr. Mohamad Arif Sp.PD**

Anggota Tim Penguji II



**Dr. dr. Setvo Trisnadi, Sp.KF., SH**

Semarang, 28 September 2020  
Fakultas Kedokteran  
Universitas Islam Sultan Agung  
Dekan,



**Dr. dr. Setvo Trisnadi, Sp.KF., SH**

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama Mahasiswa : Alif Sirajuddin Al-Azizi

NIM : 30101900011

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul :

**“PENGARUH VARIASI KOMPOSISI MAKRONUTRIEN DIET TERHADAP HORMON TESTOSTERON PADA TIKUS SPRAGUE DAWLEY”**

Adalah benar hasil karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau Sebagian besar karya tulis orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan aturan yang berlaku.

Semarang, 31 Agustus 2022



Alif Sirajuddin Al-Azizi

## PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama Mahasiswa : Alif Sirajuddin Al-Azizi

NIM : 30101900011

Program Studi : Kedokteran Umum

Fakultas : Kedokteran

Alamat Asal : Jl. Priggodani RT 07 RW 03, Kenep, Mangunjiwan,  
Demak, Provinsi Jawa Tengah

No. Hp/Email : alifsirajuddinal1@std.unissula.ac.id

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul :

### **“PENGARUH VARIASI KOMPOSISI MAKRONUTRIEN DIET TERHADAP HORMON TESTOSTERON PADA TIKUS SPRAGUE DAWLEY”**

dan menyetujuinya menjadi hak milik Universitas Islam Sultan Agung serta memberikan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif untuk disimpan dialihmediakan, dikelola dalam pangkalan data, dan dipublikasikan di internet atau media lain untuk kepentingan akademis selama masih tetap mencantumkan nama penulis sebagai pemilik Hak Cipta

Pernyataan ini saya buat dengan sungguh-sungguh. Apabila dikemudian hari terbukti ada pelanggaran Hak Cipta/Plagiarisme dalam karya ilmiah ini, maka segala bentuk tuntutan hukum yang timbul akan saya tanggung probadi tanpa melibatkan pihak Universitas Islam Sultan Agung.

Semarang, 28 September 2022

Yang menyatakan,



Alif Sirajuddin Al-Azizi



## PRAKATA

*Assalamu'alaikum Warakhmatullahi Wabarakatuh,*

*Alhamdulillahirrabbi lalamin,* puji syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat, nikmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “pengaruh variasi komposisi makronutrien diet terhadap hormon testosteron pada tikus sprague dawley” ini dapat terselesaikan dengan baik dan tepat waktu.

Skripsi ini dibuat sebagai persyaratan untuk mencapai gelar Sarjana Kedokteran di Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Skripsi ini merupakan bagian dari penelitian payungan dosen yang didanai oleh pendanaan internal Fakultas Kedokteran Unissula. Penyusunan skripsi ini terselesaikan tidak luput dari proses bimbingan, proses perizinan, dan bantuan dari pihak laboratorium Pusat Studi Pangan Dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan banyak terimakasih kepada :

1. Dr. dr. Setyo Trisnadi, Sp.KF.,SH., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dr. Nurina Tyagita, M. Biomed dan Azizah Hikma Safitri, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing I dan II yang telah sabar membimbing, memberikan ilmu, dan meluangkan waktunya untuk membimbing penulis, dalam penyusunan skripsi sehingga dapat terselesaikan tepat waktu.
3. Dr. dr. Setyo Trisnadi, Sp.KF.,SH. dan dr. Mohamad Arif, Sp.PD selaku dosen penguji I dan II yang telah meluangkan waktunya untuk menguji, mengarahkan dan memberi saran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.

4. Laboratorium Pusat Studi Pangan Dan Gizi Universitas Gadjah Mada beserta staf (pak yulianto), yang telah membantu selama proses penelitian mulai dari awal hingga akhir penelitian di laboratorium Pusat Studi Pangan Dan Gizi Universitas Gadjah Mada.
5. Orang tua penulis Abah yamin S.Pd. dan Mama Siti Munifah S.Pd. yang telah memberikan do'a, kasih sayang, memberi semangat dan memfasilitasi penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
6. Sahabat pasangan seperjuangan Inayah Wulandari yang telah membantu dan memberikan dukungan selama proses skripsi ini.
7. Sahabat seperjuangan di FK Unissula Mutiara Purtri Novita, Rahmata Almas Sayyida, Achmad Burhansyah, Dinar Khaliq Ramadhan, dan semua yang tidak bisa saya sebutkan satu - persatu, yang telah membantu dan memberikan dukungan selama ini.
8. Keluarga besar Asisten Laboratorium Biokimia Angkatan 2017, 2018, 2019, dan 2020 yang telah memberikan semangat dalam penyelesaian skripsi ini.
9. Keluarga besar Vorticosa 2019 yang telah berbagi semangat, do'a, dan dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
10. Semua pihak yang terlibat secara langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan skripsi ini yang tidak bisa saya sebutkan satu - persatu
11. Terimakasih untuk diri sendiri karena sudah berjuang, tetap semangat dan pantang menyerah dalam menyelesaikan skripsi ini.

Sebagai penghujung kata penulis, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat kepada semua pihak.

*Wassalamualaikum Warakhmatullahi Wabarakatuh.*

Semarang, 28 September 2022



Alif Sirajuddin Al-Azizi



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	iv
PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH .....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
BAB I .....	1
PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian .....	4
1.3.1. Tujuan Umum .....	4
1.3.2. Tujuan Khusus .....	4
1.4. Manfaat Penelitian .....	5
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	5
1.4.2. Manfaat Praktis .....	5
BAB II.....	6
TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1. Hormon Testosteron.....	6
2.1.1. Definisi .....	6
2.1.2. Faktor yang Memengaruhi Hormon Testosteron.....	9
2.1.3. Peran Hormon Testosteron .....	13
2.2. Diet Gizi Seimbang.....	16
2.2.1. Definisi .....	16
2.2.2. Efek Diet Gizi Seimbang Secara Umum .....	17



2.2.3.	Efek Diet Gizi Seimbang terhadap Kadar Testosteron.....	17
2.3.	Diet Tinggi Karbohidrat.....	18
2.3.1.	Definisi .....	18
2.3.2.	Efek Diet Tinggi Karbohidrat Secara Umum .....	19
2.3.3.	Efek Diet Tinggi Karbohidrat terhadap Kadar Testosteron.....	21
2.4.	Diet Tinggi Lemak.....	23
2.4.1.	Definisi .....	23
2.4.2.	Efek Diet Tinggi Lemak Secara Umum .....	24
2.4.3.	Efek Diet Tinggi Lemak terhadap Kadar Testosteron.....	26
2.5.	Diet Tinggi Protein .....	28
2.5.1.	Definisi .....	28
2.5.2.	Efek Diet Tinggi Protein Secara Umum.....	29
2.5.3.	Efek Diet Tinggi Protein terhadap Kadar Testosteron .....	30
2.6.	Tikus Sprague Dawley.....	31
2.6.1.	Definisi .....	31
2.6.2.	Pakan yang Digunakan .....	32
2.7.	Hubungan Variasi Komposisi Makronutrien dan Hormon Testosteron .	34
2.8.	Kerangka Teori .....	38
2.9.	Kerangka Konsep.....	39
2.10.	Hipotesis .....	39
BAB III .....		40
METODE PENELITIAN.....		40
3.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian .....	40
3.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	41
3.2.1	Variabel.....	41
3.2.2	Definisi Operasional .....	42
3.3.	Subjek Uji .....	44
3.3.1	Kriteria Inklusi .....	44
3.3.2	Kriteria Eksklusi .....	44
3.3.3	Kriteria Drop Out.....	44
3.4.	Alat dan Bahan Penelitian.....	45

3.4.1.	Alat Penelitian .....	45
3.4.2.	Bahan Penelitian .....	45
3.5.	Cara Penelitian .....	46
3.5.1	Pembuatan Variasi Komposisi Makronutrien Diet.....	46
3.5.2	Adaptasi Hewan Uji.....	46
3.5.3	Prosedur Pemberian Variasi Diet masing-masing kelompok ...	47
3.5.4	Pengambilan Serum Darah Tikus .....	49
3.5.5	Cara Pemeriksaan Kadar Hormon Testosteron Serum .....	50
3.5.6	Euthanasia pada Tikus .....	52
3.6.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	52
3.6.1	Tempat Penelitian.....	52
3.6.1	Waktu Penelitian.....	52
3.7.	Alur penelitian .....	53
3.8.	Analisa Hasil.....	54
BAB IV	.....	55
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	.....	55
4.1.	Hasil Penelitian .....	55
4.2.	Pembahasan.....	59
BAB V	.....	65
KESIMPULAN DAN SARAN	.....	65
5.1	Kesimpulan .....	65
5.2	Saran .....	66
DAFTAR PUSTAKA	.....	67
LAMPIRAN	.....	74

## DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

AR	: <i>Andogenic Receptor</i>
ATP	: <i>Adenosine Triphosphate</i>
BMI	: <i>Body Mass Index</i>
DGS	: <i>Diet Gizi Seimbang</i>
DHT	: <i>Dihydrotestosterone</i>
DTK	: <i>Diet Tinggi Karbohidrat</i>
DTL	: <i>Diet Tinggi Lemak</i>
DTP	: <i>Diet Tinggi Protein</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
GH	: <i>Growth Hormone</i>
GLP-1	: <i>Glucagon Like Peptide 1</i>
IFN- $\gamma$	: <i>Interferon-<math>\gamma</math></i>
IGF-1	: <i>Insulin-Like Growth Factor-1</i>
iNOS	: <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
LDL	: <i>Low-Density Lipoprotein</i>
MDR	: <i>Minimal Daily Requirement</i>
NF- $\kappa$ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i>
PUGS	: <i>Pedoman Umum Gizi Seimbang</i>
RISKESDAS	: <i>Riset Kesehatan Dasar</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SFA	: <i>Saturated Fatty Acid</i>
SHGB	: <i>Sex Hormone Binding Globulin</i>

## DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Formulasi Pakan Standar AIN-93M (Reeves Dan Suppl, 1997) .....	32
Tabel 2. 2 Modifikasi Formulasi AIN-93M (Reeves Dan Suppl, 1997).....	33
Tabel 4. 1 Rerata Nilai Indeks Lee.....	56
Tabel 4. 2. Hasil Uji <i>Shapiro-Wilk</i> , Uji <i>Levene's Test</i> , Uji <i>One-Way Anova</i> , Dan Rerata Kadar Testosteron .....	58
Tabel 4. 3. Hasil Uji <i>Post Hoc Tamhane's</i> .....	59



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Struktur Molekul Testosteron 2D.....	6
Gambar 2. 2 Skema Sintesis Hormon Testosteron.....	8
Gambar 2. 3 Hubungan Metabolik Sindrom dengan Hipogonadisme .....	9
Gambar 2. 4 Struktur Lipid dipengaruhi ROS .....	11
Gambar 2. 5 Keseimbangan ROS dan Antioksidan .....	11
Gambar 2. 6 Penurunan Testosteron dipengaruhi Usia dan BMI .....	15
Gambar 2. 7 Pengaruh ROS terhadap Fungsi Sel Adiposa.....	27
Gambar 2. 8 <i>Hypogonadism</i> , <i>Obesitas</i> , dan <i>Adipocytokine</i> .....	28
Gambar 2. 9 Pengaruh ROS pada Penurunan Testosteron.....	35
Gambar 2. 10 Kerangka Teori Penelitian.....	38
Gambar 2. 11 Kerangka Konsep Penelitian .....	39
Gambar 3. 1. Skema Rancangan Penelitian .....	40
Gambar 3. 2 Alur Penelitian.....	53
Gambar 4. 1 Rerata Berat Badan Tikus Sprague Dawley setiap Minggu .....	55
Gambar 4. 2 Grafik Rerata ( $\pm$ standar deviasi) Kadar Hormon Testosteron Tikus Sprague Dawley (ng/mL).....	57



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Statistik.....	74
Lampiran 2. Ethical Clearance.....	76
Lampiran 3. Surat Ijin Penelitian di Laboratorium Pusat Studi pangan dan Gizi UGM .....	77
Lampiran 4. Surat Keterangan Selesai Penelitian .....	79
Lampiran 5. Surat Bebas Laboratorium.....	80
Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian.....	81
Lampiran 7. Surat Undangan Hasil Skripsi.....	84



## INTISARI

Komposisi makronutrien diet yang dikonsumsi secara kurang optimal dapat menyebabkan penurunan kadar dan fungsi hormon testosteron. Komposisi makronutrien diet yang sering dijumpai adalah diet gizi seimbang, diet tinggi karbohidrat, diet tinggi lemak, dan diet tinggi protein. Pengaturan komposisi makronutrien diet yang optimal berpengaruh pada kadar *reactive oxygen species* (ROS) yang terkendali, mencegah obesitas, dan menurunkan respon inflamasi tubuh, sehingga mencegah penurunan kadar dan fungsi hormon testosteron. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh variasi komposisi makronutrien diet terhadap hormon testosteron.

Metode penelitian ini adalah eksperimental dengan rancangan *post-test only control group design*. Penelitian menggunakan hewan coba tikus Sprague Dawley sebanyak 24 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok secara random, yaitu diet gizi seimbang (DGS), diet tinggi karbohidrat (DTK), diet tinggi lemak (DTL), dan diet tinggi protein (DTP). Jumlah pakan yang diberikan adalah 20 gram/hari dan bersifat isokalori selama 28 hari. Setiap tikus dilakukan penimbangan berat badan setiap minggunya sampai hari ke-28. Kadar hormon testosteron berasal dari serum darah tikus yang diukur dengan metode ELISA pada hari ke-29. Hasil penelitian selanjutnya dilakukan uji statistik dengan uji *one-way anova* dengan uji *post hoc tamhane's*.

Rerata kadar hormon testosteron didapatkan hasil tertinggi adalah DGS ( $162,75 \pm 1,17$  ng/mL), diikuti dengan DTP ( $150,11 \pm 1,88$  ng/mL), DTL ( $100,10 \pm 6,66$  ng/mL), dan DTK ( $70,84 \pm 1,35$  ng/mL). Hasil pengujian *one-way anova* 0,000 ( $p < 0,05$ ) dan hasil uji *Post Hoc Tamhane's* menunjukkan bahwa semua kelompok memiliki perbedaan yang bermakna yaitu 0,000 ( $p < 0,05$ ).

Kesimpulan penelitian ini, variasi komposisi diet makronutrien berpengaruh terhadap hormon testosteron.

Kata kunci: makronutrien diet, hormon, testosteron

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Komposisi diet yang paling sering dijumpai di Indonesia adalah diet tinggi karbohidrat (RISKESDAS, 2013). Komposisi tinggi karbohidrat berimplikasi pada asupan karbohidrat yang berlebihan, sehingga terjadi ketidakseimbangan proporsi dengan makronutrien yang lain. Komposisi karbohidrat yang tinggi akan menyisakan banyak glukosa yang disimpan ke jaringan adiposa, sehingga menyebabkan peningkatan berat badan dan obesitas (Joseph *et al.*, 2014). Penurunan testosteron akan terjadi seiring konsumsi diet tinggi karbohidrat secara berkepanjangan, dan merupakan dampak peningkatan berat badan yang terjadi (Kelly dan Jones, 2015). Dampak diet tinggi karbohidrat perlu diwaspadai, dan diperlukan komposisi diet makronutrien alternatif yang optimal untuk meminimalisir efek negatif, tetapi tetap memenuhi kecukupan nutrisi.

Konsumsi tinggi karbohidrat menyebabkan peningkatan kadar *reactive oxygen species* (ROS) dan peningkatan berat badan, sehingga berisiko menurunkan produksi hormon testosteron (Darbandi *et al.*, 2018), dan menyebabkan hipogonadisme (Traish *et al.*, 2011). Laporan dari *World Health Organization* pada tahun 2016 menyatakan bahwa sebanyak 39% orang dewasa (> 18 tahun) di seluruh dunia mengalami masalah kelebihan berat badan dan 13% orang diantaranya mengalami obesitas (*World Health Organization*, 2021). Jumlah penderita obesitas di Indonesia tahun 2014 pada

usia lebih dari 19 tahun sebanyak 16,5% pada laki-laki dan 10,9% pada perempuan (Oddo, Maehara dan Rah, 2019). Pasien dengan risiko penurunan kadar testosteron akan mengalami perburukan kualitas hidup, seperti rasa lelah yang berlebihan, dan kualitas tidur yang buruk (Khanal *et al.*, 2020). Prevalensi penurunan kadar testosteron juga meningkat seiring usia (Stanworth dan Jones, 2008). Beberapa studi menunjukkan pria berusia lebih dari 80 tahun 50% diantaranya menderita hipogonadisme (Harman *et al.*, 2001), dan pada pria dengan usia lebih dari 45 tahun, sebanyak 45% (Mulligan *et al.*, 2006). Seiring peningkatan usia pada pria dengan obesitas, memiliki risiko yang lebih tinggi untuk menyebabkan penurunan kadar testosteron (Kaufman *et al.*, 2019). Pencegahan obesitas dengan pengaturan komposisi makronutrien menjadi penting dilakukan, untuk menghindari percepatan penurunan kadar testosteron seiring bertambahnya usia.

Komposisi diet tinggi karbohidrat ditandai dengan konsumsi tinggi karbohidrat dan rendah lemak (Lee, Song dan Song, 2018). Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa konsumsi makanan tinggi karbohidrat menyebabkan peningkatan kadar indeks glikemik, sehingga menyebabkan peningkatan risiko obesitas, sindrom metabolik dan diabetes melitus tipe 2 (Lee, Song dan Song, 2018). Semakin tinggi dan sering konsumsi karbohidrat akan menjadi pemicu respon inflamasi dan peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) (Kagal dan Hogade, 2019), sehingga proses penuaan dan degenerasi akan semakin cepat (Minihane *et al.*, 2015). Komposisi diet alternatif lainnya adalah diet gizi seimbang, yang dampaknya secara efektif dapat menjaga berat badan ideal dan

meningkatkan *life span* (Most *et al.*, 2017). Komposisi diet gizi seimbang memiliki dampak negatif dikarenakan masih tingginya proporsi karbohidrat di dalamnya. Komposisi karbohidrat yang tinggi mengakibatkan peningkatan kadar ROS (Masschelin *et al.*, 2020), sehingga meningkatkan risiko potensi percepatan penurunan testosteron. Komposisi diet lainnya adalah diet tinggi lemak, merupakan pola pengaturan komposisi makronutrien dengan lebih banyak kandungan lemaknya. Konsumsi lemak yang tinggi, diikuti karbohidrat terbukti menyebabkan obesitas, peningkatan kadar ROS, percepatan penurunan konsentrasi serum testosteron dan menyebabkan sindrom metabolik (Traish *et al.*, 2011).

Pengaturan komposisi diet alternatif lainnya, yaitu dengan diet tinggi protein. Komposisi diet dengan asupan tinggi protein efektif memperbaiki kadar inflamasi dan peningkatan biomarker tertentu yang dapat meregenerasi dari sel lebih cepat (Hruby dan Jacques, 2019). Komposisi protein yang tinggi dapat berdampak pada pengaturan kadar indeks glikemik tubuh dan bermanfaat untuk membangun kembali serabut otot, dan meningkatkan kualitas fungsi secara seluler. Komposisi karbohidrat dan lemak yang tidak tinggi, dapat menyediakan cukup energi untuk tubuh baik secara basal maupun aktivitas fisik, dan menyebabkan tingkat ROS selular menjadi semakin rendah (Bhardwaj dan He, 2020). Komposisi diet tinggi protein menjadi sebuah jalan tengah untuk dapat mengatur kadar ROS dan dapat menurunkan kemungkinan obesitas (Campos-Nonato, Hernandez dan Barquera, 2017), sehingga produksi hormon testosteron dapat dijaga, dan tidak menyebabkan hipogonadisme.



Berdasarkan uraian permasalahan di atas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang pengaruh variasi komposisi makronutrien yang ada, untuk dapat menghambat penurunan kadar testosteron.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Bagaimana pengaruh variasi komposisi makronutrien diet terhadap hormon testosteron pada tikus Sprague Dawley?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan Umum**

Untuk mengetahui pengaruh variasi komposisi makronutrien diet terhadap hormon testosteron pada tikus Sprague Dawley.

### **1.3.2. Tujuan Khusus**

- a. Untuk mengetahui kadar testosteron pada tikus Sprague Dawley yang mendapatkan diet gizi seimbang.
- b. Untuk mengetahui kadar testosteron pada tikus Sprague Dawley yang mendapatkan diet tinggi karbohidrat.
- c. Untuk mengetahui kadar testosteron pada tikus Sprague Dawley yang mendapatkan diet tinggi lemak.
- d. Untuk mengetahui kadar testosteron pada tikus Sprague Dawley yang mendapatkan diet tinggi protein.
- e. Untuk mengetahui perbedaan kadar testosteron diantara kelompok tikus yang diberikan diet tinggi karbohidrat dengan diet gizi seimbang.

- f. Untuk mengetahui perbedaan kadar testosteron diantara kelompok tikus yang diberikan diet tinggi lemak dengan diet gizi seimbang.
- g. Untuk mengetahui perbedaan kadar testosteron diantara kelompok tikus yang diberikan diet tinggi protein dengan diet gizi seimbang.

#### **1.4. Manfaat Penelitian**

##### **1.4.1. Manfaat Teoritis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan di bidang kedokteran dan dasar penelitian lanjut mengenai pengaruh variasi komposisi makronutrien yang tepat untuk mempertahankan kadar testosteron.

##### **1.4.2. Manfaat Praktis**

Membuktikan pengaruh variasi komposisi makronutrien yang tepat untuk mempertahankan kadar testosteron sehingga dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk penatalaksanaan, dan pemberian edukasi yang lebih tepat.

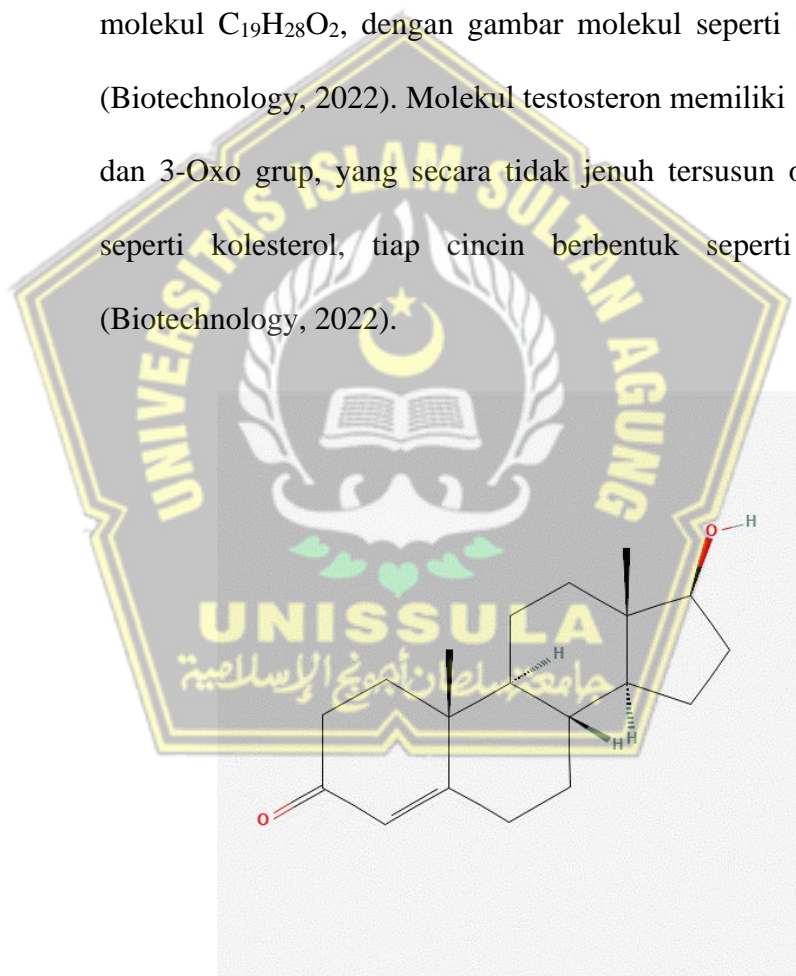
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Hormon Testosteron

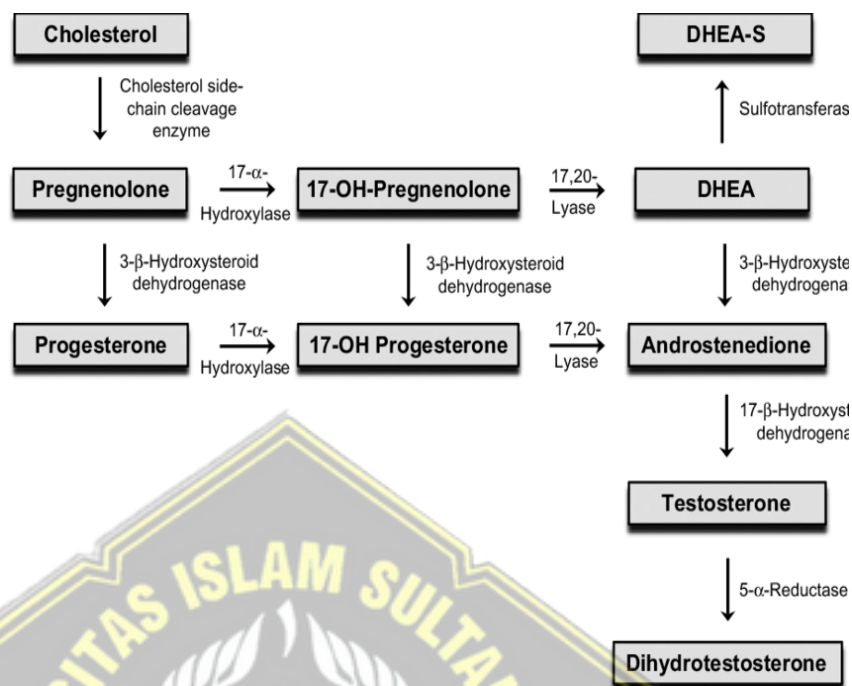
##### 2.1.1. Definisi

Testosteron merupakan hormon steroid androgen anabolik atau disebut juga molekul androstanoid yang memiliki rumus molekul  $C_{19}H_{28}O_2$ , dengan gambar molekul seperti Gambar 2. 1 (Biotechnology, 2022). Molekul testosteron memiliki 17 $\beta$ -Hydroxy dan 3-Oxo grup, yang secara tidak jenuh tersusun oleh 4 cincin seperti kolesterol, tiap cincin berbentuk seperti segi enam (Biotechnology, 2022).



Gambar 2. 1 Struktur Molekul Testosteron 2D  
(Biotechnology, 2022)

Molekul testosteron dibentuk dari prekursornya yaitu *cholesterol* seperti Gambar 2. 2, selanjutnya *cholesterol* oleh enzim *cholesterol sidechain cleavage* diubah menjadi *pregnenolone*, selanjutnya *pregnenolone* akan diubah oleh 17- $\alpha$ -Hydroxylase menjadi 17-OH *Progesterone*, molekul 17-OH *Progesterone* diubah menjadi *androstenedione* dibantu enzim 17,20-Lyase dan kemudian menjadi molekul testosteron lewat 17- $\beta$ -Hydroxysl dehydrogenase (Shea, Wong dan Chen, 2014). Molekul testosteron memiliki jalur pembentukan lain yaitu melalui *dehydroepiandrosterone* (DHEA) dengan bantuan dari 3- $\beta$ -Hydroxyste dehydrogenase (Shea, Wong dan Chen, 2014). Molekul testosteron dikonversi secara ireversibel menjadi *dihydrotestosteron* (DHT) pada jaringan target oleh enzim 5 $\alpha$ -Reductase seperti Gambar 2. 2 (Akmal, 2017). Testosteron juga secara *irreversibel* diubah menjadi estradiol oleh kompleks enzim aromatase di dalam hipotalamus (Tostes *et al.*, 2016).



Gambar 2. 2 Skema Sintesis Hormon Testosteron

(Shea, Wong dan Chen, 2014)

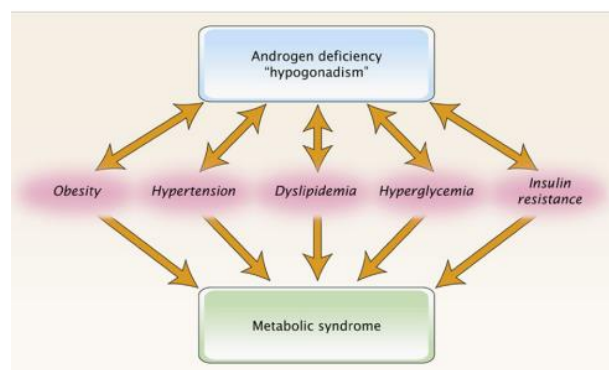
Testosteron adalah hormon steroid predominan yang penting dalam sistem androgen, sekaligus berkontribusi besar pada perkembangan jaringan reproduksi laki-laki (Tostes *et al.*, 2016). Sistem androgen merupakan hormon-hormon seks pria yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan sistem reproduksi pria, termasuk pada aktifitas organ aksesoris pada sistem reproduksi pria, dan perkembangan karakteristik sekunder dari pria (Akmal, 2017). Testosteron ataupun DHT memiliki respon yang sama secara molekuler yaitu memacu ekspresi gen sebagai *transcription factor* (Tostes *et al.*, 2016). Jumlah level testosteron yang terajaga menjadi



penting sebagai rangkaian kerja hormon seks dalam mencegah hipogonadisme hipogonadotropik.

### 2.1.2. Faktor yang Memengaruhi Hormon Testosteron

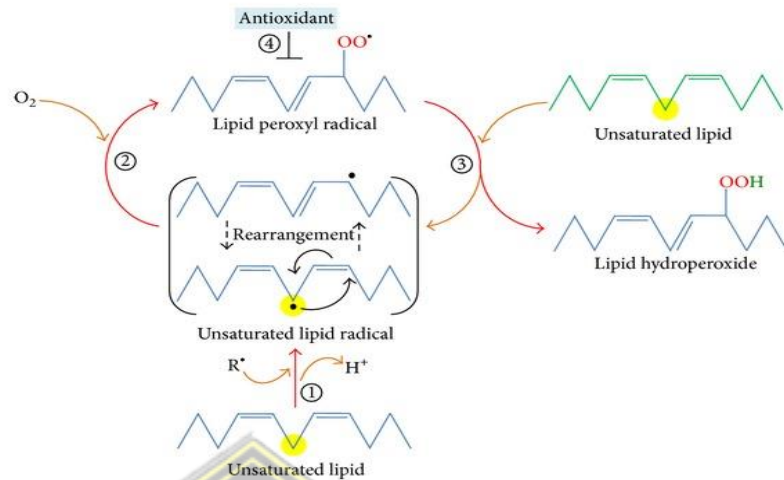
Testosteron merupakan salah satu hormon yang berperan penting didalam tubuh, sehingga konsentrasinya harus dipertahankan agar tetap stabil. Beberapa faktor diketahui dapat mempengaruhi kadar hormon testosteron, diantaranya adalah obesitas, hiperglikemia, resistensi insulin, kadar *Reactive oxygen species* (ROS), kadar antioksidan, usia dan dislipidemia (Traish *et al.*, 2011; Darbandi *et al.*, 2018; Kaufman *et al.*, 2019). Beberapa penelitian menjelaskan bahwa variasi komposisi makronutrien seperti asupan tinggi protein, tinggi lemak dan tinggi karbohidrat tidak akan secara langsung memengaruhi kadar testosteron, tetapi variasi dari masing-masing komposisi makronutrien dapat menyebabkan komplikasi seperti *metabolic syndrome* seperti pada Gambar 2. 3, yang menyebabkan percepatan penurunan kadar hormon testosteron secara signifikan (Traish *et al.*, 2011).



Gambar 2. 3 Hubungan Metabolik Sindrom dengan Hipogonadisme (Traish *et al.*, 2011)

Hormon testosteron dipengaruhi oleh adanya kadar *reactive oxygen species* (ROS) tubuh (Darbandi *et al.*, 2018). Karbohidrat dan lemak memicu Peningkatan kerja respirasi mitokondria yang berbanding lurus dengan tingkat superoksida yang tinggi. ROS yang tinggi dapat mempromosikan penuaan seluler, serta kerusakan oksidasi seluler dan molekuler (Masschelin *et al.*, 2020). Molekul ROS juga berdampak pada proses peroksidasi molekul makronutrien, seperti glukosa menjadi *glycoxidaton product*, protein menjadi *protein oxidation*, dan lemak menjadi *lipoxidation product* (V, 2000). Oksidasi ini selain merubah fungsi dan kegunaan molekul makronutrien, juga berimplikasi pada kenaikan kadar ROS.

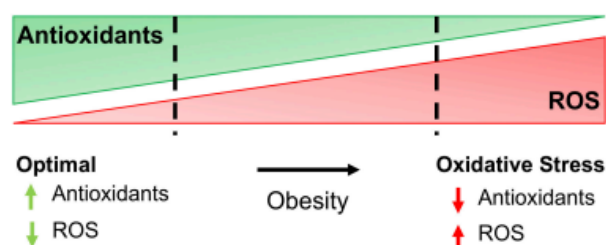
ROS berhubungan secara langsung pada kadar testosteron dikarenakan testosteron memiliki struktur lipid di dalamnya, dan memiliki prekursor molekul yaitu kolesterol (Shea, Wong dan Chen, 2014). ROS atau radikal bebas memicu proses peroksidasi, yang secara umum didefinisikan sebagai proses radikal bebas menyerang struktur lipid yang mengandung ikatan rangkap karbon-karbon, yang melibatkan abstraksi hidrogen dari karbon, dengan penyisipan oksigen menghasilkan radikal lipid peroksidasi dan hidroperoksida seperti Gambar 2. 4 (Ayala, Muñoz dan Argüelles, 2014). Peroksidasi ini yang merusak struktur lipid pada testosteron dan fungsinya dalam berbagai sel target di dalam tubuh (Ayala, Muñoz and Argüelles, 2014).



Gambar 2. 4 Struktur Lipid dipengaruhi ROS

(Ayala, Muñoz and Argüelles, 2014)

Komposisi makronutrien tinggi karbohidrat, dan tinggi lemak memicu peningkatan ROS, NADPH oksidase, dan peroksidasi lipid yang dapat merusak antioksidan (Masschelin *et al.*, 2020). Antioksidan memiliki peran penting dalam menyeimbangkan kadar ROS tubuh, yaitu menghambat dari proses yang melibatkan ROS. ROS yang terakumulasi disertai dengan rusaknya antioksidan, menyebabkan supremasi ROS terhadap antioksidan seperti Gambar 2. 5 (Masschelin *et al.*, 2020). Proses ketidakseimbangan ROS ini memperparah dampaknya pada kerusakan molekul testosteron.



Gambar 2. 5 Keseimbangan ROS dan Antioksidan

(Masschelin *et al.*, 2020)

Hormon testosteron dipengaruhi oleh kondisi stress tubuh, yang berhubungan langsung dengan keluarnya hormon kortisol. Kortisol dan testosteron memiliki hubungan terbalik, dan testosteron cenderung menurun apabila kadar kortisol tubuh meningkat (Barati, Nikzad dan Karimian, 2020). Proses berbalik ini karena efek hipotalamus pituitari adrenal sebagai respons terhadap stress, dimana pada stress yang bersifat kronis akan menyebabkan penurunan Testosteron secara signifikan, dan peningkatan kortisol secara signifikan (Barati, Nikzad dan Karimian, 2020).

Testosteron dipengaruhi oleh jenis kelamin, berdasarkan penelitian oleh Lee Ellis (2011) menyebutkan bahwa kadar rerata testosteron keseluruhan lelaki lebih tinggi dari perempuan. Kadar testosteron lelaki pada usia 10 tahun sedikit lebih tinggi dari perempuan, tetapi pada penambahan usia kadar testosteron lelaki menjadi lebih tinggi dari perempuan. Perempuan hanya memiliki kadar testosteron 40% dari total testosteron pada lelaki (Ellis, 2011). Kadar testosteron perempuan akan turun lebih cepat dari lelaki, pada saat usia 40 tahun kadar testosteron perempuan hanya 10% dari total rerata testosteron pada lelaki (Ellis, 2011).

Pengaturan komposisi makronutrien yang tepat dan berkepanjangan diperlukan agar kadar hormon testosteron tetap stabil, dan tidak mengalami defisiensi secara lebih cepat akibat

dampak dari ketidak seimbangan makronutrien (Kaufman *et al.*, 2019).

### 2.1.3. Peran Hormon Testosteron

Prinsip aksi dari testosteron adalah mengontrol pertumbuhan dan perkembangan sistem reproduksi laki-laki. Lebih dari 95% testosteron diproduksi di testis, dan disekresi oleh sel leydig, setelah rangkaian reaksi enzimatik menggunakan molekul kolesterol (Akmal, 2017). Sejumlah kecil testosteron juga disekresikan oleh zona retikularis kelenjar adrenal. Testosteron yang disintesis akan di keluarkan menuju ke darah dan diangkut oleh plasma protein yang disebut *sex hormone binding globulin* (SHGB) sebanyak 40%, dan sisanya diikat oleh protein plasma lainnya, pada fase pengangkutan ini testosteron disebut sebagai *free testoterone* (Tostes *et al.*, 2016). Testosteron memiliki waktu paruh pada peredarannya selama 10-100 menit.

Testosteron yang sudah masuk ke darah akan menuju ke sel target, di sel target testosteron dapat mengaktifkan kerja dari reseptor androgen baik dalam bentuk tetosteron itu sendiri atau diubah terlebih dahulu menjadi  $5\alpha$ -Dihidrotestosteron (DHT) oleh enzim  $5\alpha$ -Reduktase (Tostes *et al.*, 2016). Aktivasi dari reseptor androgen akan terjadi inisiasi kedalam inti sel dan mengikat sekuens gen pada DNA seluler yang terpengaruh respon homon (Tostes *et al.*, 2016).



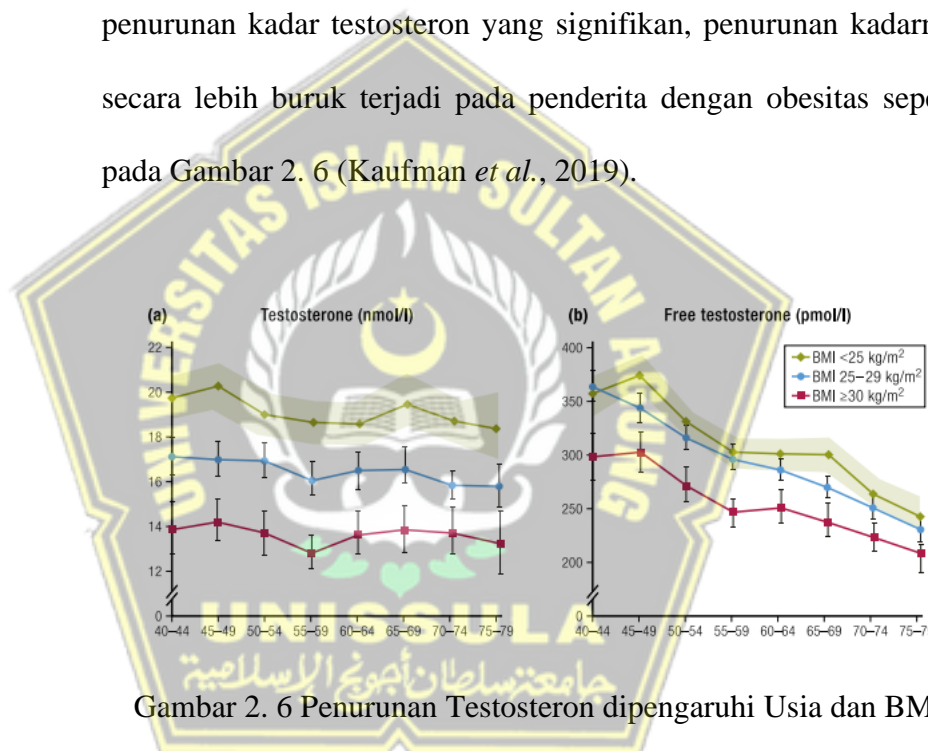
Respon hormon dari testosteron maupun DHT adalah memicu adanya transkripsi DNA dan sintesis berbagai protein, dan menimbulkan efek *androgenic*. Efek *androgenic* berdampak pada pertumbuhan karakteristik seksual primer seperti penis dan testis. Testosteron yang memasuki sel-sel targetnya, tetapi kemudian dimetabolisme oleh kompleks enzim aromatase akan membentuk estradiol di dalam hipotalamus yang mempengaruhi perilaku atau psikoseksual (*psychosexual behavior*) (Akmal, 2017).

Efek testosteron juga berpengaruh secara anabolik pada peningkatan masa otot, dan kepadatan tulang. Efek testosteron yang menginduksi hipertrofi otot rangka terjadi melalui berbagai mekanisme, misalnya dengan memodulasi dari sel mesenkim pluripoten yang meningkatkan kekuatan otot (Gharahdaghi *et al.*, 2021). Secara molekular, testosteron akan memicu aktivasi *androgenic receptor* (AR) dan memicu *transcription factor* yang mendukung terbentuknya *muscle hypertrophy*, ataupun memicu inisiasi translasi sehingga terjadi peningkatan sintesis protein yang memicu *muscle hypertrophy* (Gharahdaghi *et al.*, 2021).

Efek testosteron pada kepadatan tulang terjadi secara tidak langsung, sebelumnya akan diperantarai oleh *Insulin-Like Growth Factor-1* (IGF-1). IGF-1 berperan mempertahankan kepadatan tulang sehingga dikenal sebagai *bone growth promoting factor*. Sebuah penelitian melaporkan apabila kadar IGF-1 rendah di usia

lanjut maka akan berhubungan dengan kejadian fraktur dan meningkatkan resiko terkena osteoporosis (Locatelli dan Bianchi, 2014).

Usia lanjut dan obesitas merupakan penyebab terjadinya penurunan fungsi di berbagai organ, salah satunya penurunan kadar testosteron. Individu dengan usia di atas 45 tahun akan mengalami penurunan kadar testosteron yang signifikan, penurunan kadarnya secara lebih buruk terjadi pada penderita dengan obesitas seperti pada Gambar 2. 6 (Kaufman *et al.*, 2019).



Gambar 2. 6 Penurunan Testosteron dipengaruhi Usia dan BMI

(Kaufman *et al.*, 2019)

Penurunan kadar testosteron yang signifikan beresiko meningkatkan resiko terkena osteoporosis, *cardiovascular disease*, *erectile dysfunction*, gangguan mood, dan kognisi (Stanworth dan Jones, 2008). Peningkatan resiko ini terjadi karena diikuti juga penurunan berbagai biomarker tubuh akibat penurunan testosteron. Osteoporosis beresiko terjadi pada penderita obesitas karena

rendahnya kadar IGF-1 (Utami dan Kusumastuti, 2014). IGF-1 juga dapat dipengaruhi dari kadar testosteron, apabila kadar testosteron rendah maka kadar IGF-1 juga mengalami penurunan (Gharahdaghi *et al.*, 2021).

## 2.2. Diet Gizi Seimbang

### 2.2.1. Definisi

Konsumsi gizi harian diperlukan dalam mencukupi kebutuhan tubuh dalam beraktivitas. Kebutuhan yang dibutuhkan setiap orang akan berbeda, dipengaruhi oleh berbagai faktor dan intensitas kegiatan setiap orang. Standar kebutuhan gizi yang minimal dipenuhi disebut sebagai *minimal daily requirement* (MDR), apabila pada kondisi sehat, disebut sebagai preventif karena mencegah tubuh agar tidak sakit. MDR harus diikuti dengan komposisi makronutrien dan mikronutrien yang seimbang, sehingga angka kecukupan gizi seseorang terpenuhi. Angka kecukupan gizi bagi masyarakat dalam mencapai gizi seimbang telah ditetapkan dalam Pedoman Umum Gizi Seimbang (PUGS) nasional, yaitu pemenuhan sumber energi dan kebutuhan nutrisi adalah 60-75% bersumber dari karbohidrat, 10-15% bersumber dari protein, 20-25% bersumber dari lemak, dan kaya serat (Permenkes, 2014).

Persentase angka pemenuhan nutrisi dapat saja berubah mengikuti kebutuhan energi, yang dipengaruhi oleh *basal metabolic rate*, dan aktivitas fisik. Komposisi makronutrien yang digunakan

dalam penelitian ini adalah 60% karbohidrat, 15% protein dan 25% lemak.

### **2.2.2. Efek Diet Gizi Seimbang Secara Umum**

Gizi seimbang merupakan sebuah pola hidup dalam menjaga susunan komposisi pangan setiap hari yang mengandung zat gizi dalam jumlah dan jenis yang memadai, dengan tetap memperhatikan prinsip kecukupan nutrisi, keberagaman jenis pangan, aktivitas fisik, dan perilaku hidup bersih. Gizi seimbang yang sesuai dan dilakukan dalam waktu yang lama akan menyebabkan berat badan dapat dijaga serta dipertahankan pada kondisi ideal (Permenkes, 2014).

Gizi seimbang yang sesuai tidak didasarkan pada rasa kenyang, tetapi pada angka kebutuhan kalorinya yang dapat dipenuhi dengan komposisi makronutrien yang tepat. Komposisi makronutrien yang terlalu dominan pada karbohidrat dan lemak akan menyebabkan obesitas, sehingga dikatakan gizi seimbang apabila indikator berat badan yang tetap pada kondisi ideal. Gizi seimbang dengan memperhatikan kecukupan kebutuhan energi harian dapat mencegah penyakit akibat masalah gizi (Permenkes, 2014), seperti *stunting*, obesitas, dan gizi kurang.

### **2.2.3. Efek Diet Gizi Seimbang terhadap Kadar Testosteron**

Diet gizi seimbang merupakan standar pemenuhan nutrisi dengan manfaat dapat menjaga berat badan ideal tubuh, dan

menghindarkan dari penyakit akibat masalah gizi. Berat badan yang normal dapat menghindarkan setiap individu mengalami obesitas, yang merupakan kondisi kelebihan lemak dalam tubuh yang dapat berisiko terkena penyakit metabolik dan kardiovaskular. Peningkatan dari jumlah dan besar sel adiposit akan mempengaruhi jumlah hormon testosteron baik secara langsung maupun tidak langsung (Kelly dan Jones, 2015).

### **2.3. Diet Tinggi Karbohidrat**

#### **2.3.1. Definisi**

Karbohidrat merupakan salah satu makronutrien, Fungsi utama karbohidrat adalah berperan sebagai sumber energi utama. Karbohidrat dalam makanan diserap ke dalam aliran darah sebagai glukosa yang dibentuk melalui hidrolisis pati, yang selanjutnya dicerna dan disirkulasikan ke seluruh tubuh (Rodwell *et al.*, 2015). Karbohidrat dicerna dan diserap ke dalam tubuh, maka terjadi perubahan indeks glikemik (Sharma, 2016). Indeks glikemik menunjukkan bagaimana kadar glukosa darah berubah setelah mengonsumsi karbohidrat, dan setiap individu memiliki variasi dalam mengekspresikan peningkatan indeks glikemik (Sharma, 2016).

Proses peningkatan indeks glikemik diikuti proses metabolisme (Sharma, 2016). Proses metabolisme merupakan proses penguraian molekul monosakarida dengan proses

katabolisme yang bertanggung jawab dalam pembentukan, pemecahan, dan interkonversi pembentukan *Adenosina trifosfat* (ATP) (Koolman dan Roehm, 2005). ATP digunakan secara selular sebagai kompleks energi dalam mendukung kehidupan dan aktivitas selular. Beberapa penelitian tentang diet tinggi karbohidrat diketahui menggunakan komposisi makronutrien 50-70% untuk karbohidrat (Panchal *et al.*, 2011). Sementara dalam penelitian ini akan menggunakan diet tinggi karbohidrat dengan komposisi makronutrien 70% karbohidrat, 20% protein dan 10% lemak, dengan pertimbangan bahwa masyarakat Indonesia sering kali menggunakan pola diet tinggi karbohidrat (RISKESDAS, 2013).

### **2.3.2. Efek Diet Tinggi Karbohidrat Secara Umum**

Diet tinggi karbohidrat secara berkepanjangan memiliki korelasi erat dengan timbulnya obesitas. Penelitian Ehsan (2018) menyatakan makanan tinggi protein atau tinggi lemak akan menginduksi respon hormon kenyang dan nafsu makan postprandial yang lebih baik dan lebih lama. Respon hormon kenyang ini disebabkan oleh respon *Glucagon Like Peptide-1* (GLP-1) postprandial yang lebih tinggi pada makanan yang tinggi protein dan tinggi lemak dari pada tinggi karbohidrat (Rizi *et al.*, 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Mutiyani (2014) melaporkan bahwa pemberian diet tinggi karbohidrat dengan komposisi 50% karbohidrat dan 24% lemak serta diet tinggi lemak selama 8-16



minggu dapat menginduksi terjadinya obesitas, dislipidemia, hipertensi, gangguan glukosa dan disfungsi endotel.

Asupan karbohidrat yang terkontrol dan proporsional dapat berdampak pada peningkatan harapan hidup seseorang, begitu juga sebaliknya, pada konsumsi berkepanjangan baik asupan tinggi karbohidrat dan rendah karbohidrat akan menyebabkan penurunan angka harapan hidup, dan penurunan kualitas kesehatan (Seidemann *et al.*, 2018). Hal tersebut sesuai dengan penelitian Panchal (2011), yang menyatakan diet tinggi karbohidrat dan tinggi lemak menstimulasi terjadinya sindroma metabolik (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018).

Komposisi tinggi karbohidrat memiliki konsekuensi lain yaitu asupan kalori yang tinggi dan menyebabkan lebih banyak substrat yang masuk ke dalam respirasi mitokondria yang bersifat akumulatif (Masschelin *et al.*, 2020). Peningkatan kerja respirasi mitokondria berbanding lurus dengan jumlah elektron yang disumbangkan ke rantai transpor elektron, Setelah mencapai ambang batas, elektron-elektron ekstra akan dikembalikan ke kompleks III, yang menghasilkan tingkat superoksida yang tinggi. Stres oksidatif yang tinggi dapat mempromosikan penuaan seluler, serta kerusakan oksidasi seluler (Masschelin *et al.*, 2020). Peningkatan stress oksidatif berkaitan dengan peradangan kronis,

dan menjadi siklus permanen dalam peningkatan akumulasi sitokin proinflamasi (Kelly dan Jones, 2015).

Komposisi makronutrien tinggi karbohidrat memiliki konsekuensi jangka panjang yang berhubungan dengan peradangan dan obesitas (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018). Peradangan dimediasi jalur pensinyalan sel NF- $\kappa$ B, proses peradangan ini nantinya diikuti peningkatan stress oksidatif (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018). Molekul ROS didalam sel adiposa menginduksi sitokin Interleukin 6 dan proinflamasi monosit kemotaktik protein-1 (Kelly dan Jones, 2015). Jaringan adiposa menginduksi infiltrasi makrofag dan selanjutnya menghasilkan lingkungan proinflamasi (Kelly dan Jones, 2015). ROS juga merangsang jalur transduksi sinyal (terutama melalui NF- $\kappa$ B), yang mengaktifkan produksi faktor nekrosis tumor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) dan IL-6 (Kelly dan Jones, 2015; Tan, Norhaizan dan Liew, 2018). Peradangan yang terjadi dipengaruhi oleh indeks glikemik (*glycemic index* (GI)) serta beban glikemik (GL/*glycemic load* (GL)), pada kondisi yang tinggi menyebabkan proses peradangan meningkat (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018).

### **2.3.3. Efek Diet Tinggi Karbohidrat terhadap Kadar Testosteron**

Karbohidrat merupakan salah satu bahan makanan utama yang diperlukan tubuh dan mempunyai banyak manfaat, antara lain sebagai bahan bakar metabolik utama terutama bagi otak dan otot

dalam bentuk glukosa, mencegah pembentukan badan keton yang mengakibatkan ketosis (Giovannucci *et al.*, 2003; Genton, 2011; Geng *et al.*, 2021). Komposisi karbohidrat yang tinggi akan menyebabkan komposisi tubuh yang tidak sehat. Komposisi tubuh yang tidak sehat ditunjukkan dengan penurunan masa otot rangka, dan peningkatan *visceral fat mass* secara berlebihan (Howard, Ruotolo dan Robbins, 2003). Kadar hormon testosteron akan mengalami percepatan penurunan akibat komposisi tubuh yang tidak sehat, dan dampaknya diperkuat dengan penambahan usia, perubahan biomarker tubuh (Kelly and Jones, 2015; Tan, Norhaizan and Liew, 2018).

Konsumsi karbohidrat yang tinggi, menyebabkan kadar ROS seluler lebih tinggi (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018), karena aktivitas mitokondria yang lebih tinggi (Kagal dan Hogade, 2019). Komposisi tubuh yang tidak sehat dan peningkatan kadar ROS dari konsumsi karbohidrat yang tinggi, dapat menyebabkan percepatan timbulnya masalah pada penurunan produksi hormon testosteron (Darbandi *et al.*, 2018), dan percepatan timbulnya hipogonadisme (Traish *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2018). Di sisi lain, karbohidrat yang dikonsumsi secara berlebih akan mengakibatkan efek yang kurang baik bagi tubuh, meskipun diketahui banyak manfaat yang dihasilkan terutama bagi pemenuhan kebutuhan energi tubuh.

## 2.4. Diet Tinggi Lemak

### 2.4.1. Definisi

Lemak adalah salah satu makronutrien kelompok senyawa heterogen yang berkaitan dengan asam lemak. Lipid terdiri dari kumpulan unsur-unsur karbon (C), hydrogen (H), dan oksigen (O), yang meliputi asam lemak, vitamin-vitamin yang larut di dalam lemak (contohnya A, D, E, dan K), monogliserida, digliserida, fosfolipid, glikolipid, dan polimer triasilgliserol (TAG) (Koolman dan Roehm, 2005). Pemahaman tentang lemak adalah sesuatu yang penting dalam memahami berbagai gangguan yang berhubungan dengan lipid antaralain, obesitas dan *atherosclerosis*. Lemak juga bermanfaat bagi tubuh seperti, menjaga suhu tubuh tetap hangat, dan menjadi bahan dalam memproduksi hormon yang esensial bagi tubuh.

Secara umum lemak yang dikonsumsi dan berhubungan dengan kesehatan akan dibagi menjadi 4, meliputi *saturated fats*, *trans fats*, *monounsaturated fats*, dan *polyunsaturated fats* (American Heart Association, 2021). *Saturated fats* banyak berasal dari sumber makanan yang berhubungan dengan hewan seperti, daging ayam, daging sapi, *butter*, keju, dan berasal juga dari tumbuhan seperti kelapa, dan *palm oil*. *Trans fats* banyak berasal dari makanan seperti donat, biskuit, kerupuk, margarin, dan makanan yang dipanggang seperti kue. *Monounsaturated fats*

berasal dari makanan yang umumnya dari tumbuhan seperti, minyak zaitun, minyak wijen, dan kacang-kacangan. *Polyunsaturated fats* juga berasal dari makanan yang umumnya dari tumbuhan, tetapi dengan komposisi molekul yang lebih kompleks dan banyak. *Polyunsaturated fats* banyak ditemukan di makanan seperti, kedelai, jagung, dan biji bunga matahari. Lemak yang dapat dikonsumsi ini dibedakan karena struktur kimia, dan bentuk fisiknya. *Saturated fats* dan *trans fats* akan berbentuk padat pada kondisi suhu ruangan, sedangkan *monounsaturated fats* dan *polyunsaturated fats* memiliki bentuk lebih cair pada kondisi suhu ruangan (American Heart Association, 2021).

Penelitian dengan diet tinggi lemak yang akan dilakukan bersumber dari beberapa penelitian diet tinggi lemak sebelumnya yang menggunakan komposisi makronutrien 20-40% untuk lemak, sehingga komposisi makronutrien yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30% karbohidrat, 25% protein dan 45% lemak.

#### **2.4.2. Efek Diet Tinggi Lemak Secara Umum**

Diet tinggi lemak menyebabkan peningkatan faktor risiko bagi kesehatan. Lemak sendiri memiliki berbagai jenis yang dapat dikonsumsi seperti *saturated fats*, *trans fats*, *monounsaturated fats*, dan *polyunsaturated fats* (American Heart Association, 2021). Jenis lemak yang dapat dikonsumsi apabila dikonsumsi dalam

jumlah banyak akan menimbulkan efek terhadap level kolesterol yang berbeda pada setiap jenisnya. *Saturated fats* dan *trans fats* menyebabkan kadar lemak kolesterol jahat dalam tubuh atau LDL (*low density lipoprotein*) darah meningkat lebih tinggi, sedangkan dengan konsumsi *monounsaturated fats* dan *polyunsaturated fats* akan menurunkan dari kadar LDL darah. Kadar LDL yang tidak terkontrol dapat menyebabkan peningkatan risiko stroke dan penyakit jantung.

Penelitian dengan hewan coba dengan pemberian diet tinggi lemak jangka panjang menunjukkan peningkatan stres oksidatif dan disfungsi mitokondria di beberapa organ (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018). Diet tinggi lemak terbukti tidak hanya memperburuk profil lipid, tetapi juga lebih meningkatkan akumulasi ROS dan memicu kerusakan mitokondria. Penelitian lain menjelaskan bahwa ekspresi TNF- $\alpha$  diaktifkan setelah 2 sampai 6 minggu pemberian HFD dan menyebabkan penambahan berat badan dan peningkatan massa lemak tubuh (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018). Makanan *saturated fats* dan *trans fats* yang tinggi mendorong oksidasi mitokondria dari asam lemak bebas dan selanjutnya menyebabkan aliran elektron berlebih menggunakan sitokrom-C oksidase, yang meningkatkan akumulasi ROS. ROS dan peroksidasi lipid dapat merusak vitamin dan enzim antioksidan. ROS yang terakumulasi disertai dengan peningkatan ekspresi

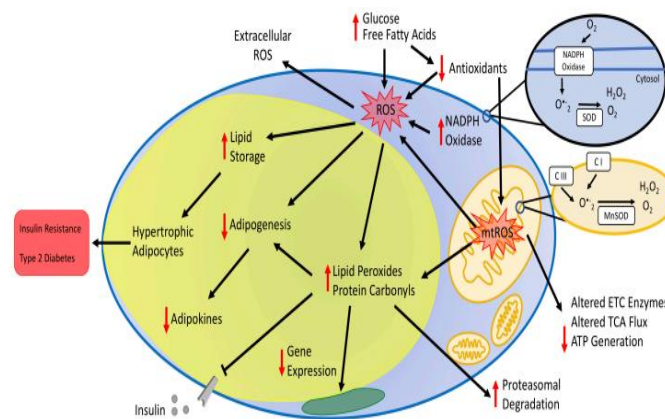


NADPH oksidase menurunkan antioksidan (Masschelin *et al.*, 2020). Penipisan antioksidan ini dapat menghambat inaktivasi ROS dan meningkatkan kerusakan yang dimediasi ROS dan peroksidasi lipid.

Diet tinggi lemak memicu peningkatan respons inflamasi dan meningkatkan keluarnya biomarker proinflamasi (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018). Diet tinggi lemak dapat memicu NF- $\kappa$ B, yang menginduksi agen proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), dan *interferon- $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ) (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018).

#### **2.4.3. Efek Diet Tinggi Lemak terhadap Kadar Testosteron**

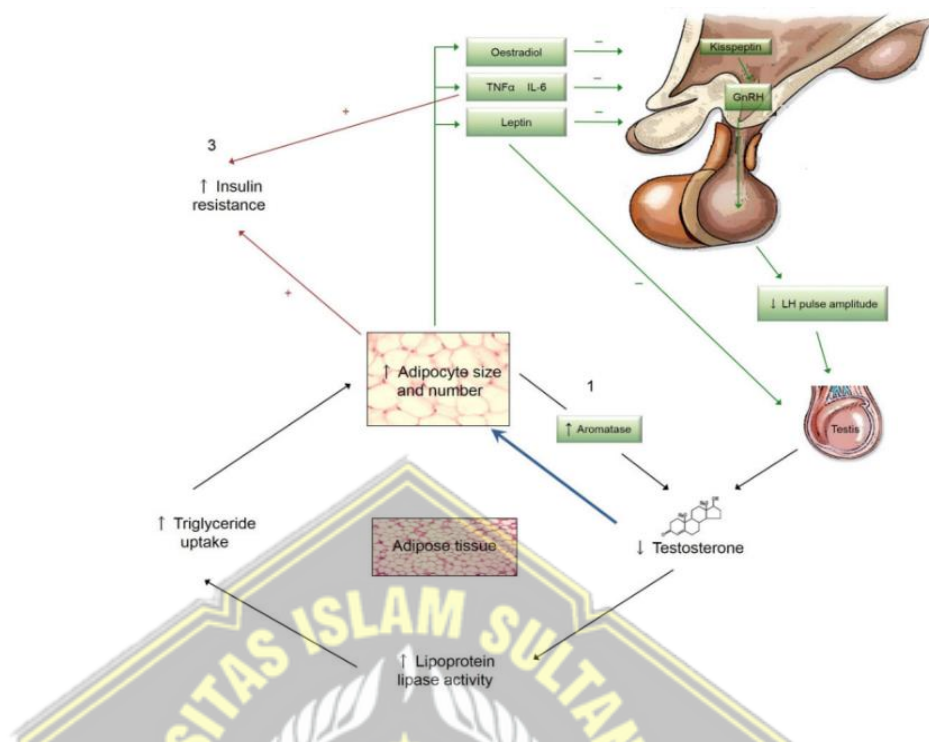
Diet tinggi lemak terutama pada konsumsi jenis *saturated fats* dan *trans fats* yang tinggi dan dalam jangka waktu yang lama akan merusak dari fungsi seluler sel adiposa seperti ditunjukkan Gambar 2. 7 (Masschelin *et al.*, 2020). Sel adiposa yang terganggu fungsinya akan menyebabkan produksi ROS yang meningkat dan terakumulasi secara permanen. Kadar ROS yang meningkat akan menyebabkan penurunan dari kadar antioksidan.



Gambar 2. 7 Pengaruh ROS terhadap Fungsi Sel Adiposa

(Masschelin *et al.*, 2020)

Dampak kadar ROS dan induksi sitokin proinflamasi yang tinggi dan berkepanjangan berdampak pada produksi dan kualitas sistem hormon, terutama pada testosteron. Secara langsung diet tinggi lemak akan menyebabkan dari pengaktifan enzim aromatase, ditambah dengan obesitas yang ditandai peningkatan ukuran dan jumlah sel adiposa juga berdampak pada produksi dan kualitas hormon testosteron seperti ditunjukkan Gambar 2. 8 (Kelly dan Jones, 2015).



Gambar 2. 8 *Hypogonadism, Obesitas, dan Adipocytokine*

(Kelly dan Jones, 2015)

## 2.5. Diet Tinggi Protein

### 2.5.1. Definisi

Protein adalah makronutrien yang terdiri dari satu atau lebih rantai asam amino, yang disatukan oleh ikatan peptida (Koolman dan Roehm, 2005). Protein memiliki efek yang baik dalam tubuh untuk proses pertumbuhan dan perkembangan pada manusia, jadi sangat perlu untuk memperhatikan adanya kekurangan protein dalam tubuh. Peran protein dalam tubuh sangat banyak antara lain untuk mempertahankan bentuk sel dan integritas fisik, menyusun filamen aktin miosin yang berperan dalam kontraktibilitas otot serta menyusun hemoglobin sebagai pengangkut oksigen (Rodwell *et al.*,

2015). Rekomendasi asupan protein yang diperlukan bagi dewasa adalah 0,80 g/kgBB/hari (Loss, 2020).

Diet tinggi protein memberikan pembatasan pada beberapa zona makronutrien terutama pada karbohidrat, sekaligus di waktu yang bersamaan memaksimalkan *intake protein*. Penelitian dengan diet tinggi protein yang akan dilakukan bersumber dari beberapa penelitian diet tinggi protein sebelumnya yang menggunakan komposisi makronutrien 30-45% untuk protein, sehingga komposisi makronutrien yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30% karbohidrat, 45% protein dan 25% lemak (Cuenca-Sánchez *et. al.*, 2015; Loss, 2020).

### **2.5.2. Efek Diet Tinggi Protein Secara Umum**

Penelitian menyatakan bahwa diet tinggi protein dapat menjaga kadar glukosa dalam darah sehingga dapat meminimalisir terjadinya resiko diabetes melitus dan telah terbukti menjadi alat potensial untuk menurunkan berat badan (Campos-Nonato, Hernandez dan Barquera, 2017). Mekanisme penurunan berat badan terjadi akibat peningkatan jumlah protein makanan dan pengurangan proporsi karbohidrat, sehingga meningkatkan oksidasi asam lemak bebas, dan meningkatkan rasa kenyang (Rizi *et al.*, 2018).

Efek kenyang yang dihasilkan dari asupan tinggi protein dapat menstimulasi hormon metabolik yang berperan sebagai energi pada otak melalui jalur mesolimbik dan *nucleus accumbent*

(Cuenca-Sánchez, Navas-Carrillo dan Orenes-Piñero, 2015). Efek penurunan berat badan pada diet tinggi protein diketahui karena efek kenyang yang dihasilkan lebih lama karena asupan protein menginduksi pensinyalan yang kompleks antara hormon peptida yang disekresi oleh sistem gastrointestinal dan asam amino darah (Campos-Nonato, Hernandez dan Barquera, 2017). Diet tinggi protein telah terbukti dalam menurunkan dan mengontrol berat badan, meskipun masih menjadi kontroversi dan masih belum diketahui efek metabolik dalam jangka panjang.

### **2.5.3. Efek Diet Tinggi Protein terhadap Kadar Testosteron**

Diet dengan proporsi protein yang lebih tinggi dan lebih sedikit karbohidrat telah terbukti efektif untuk menurunkan berat badan pada orang dewasa yang obesitas dan mengarah pada perbaikan biomarker peradangan dan mengatur kadar ROS (Campos-Nonato, Hernandez dan Barquera, 2017). Komposisi karbohidrat dan lemak yang tidak tinggi, dapat menyediakan cukup energi untuk tubuh baik secara basal maupun aktivitas fisik, dan menyebabkan tingkat ROS selular menjadi semakin rendah (Bhardwaj dan He, 2020).

Diet tinggi protein mencegah kemungkinan penurunan kadar hormon testosteron yang diakibatkan oleh konsumsi diet tinggi karbohidrat secara berkepanjangan (Kelly dan Jones, 2015).

Hormon testosteron merupakan hormon steroid yang bertanggung jawab dalam perkembangan organ seksual pria, produksi sperma, dan kekuatan otot secara keseluruhan yang kadarnya dapat dipertahankan dengan asupan protein yang optimal, dan untuk konsumsi protein yang disarankan tidak lebih dari 25% (Whittaker dan Harris, 2022). Menurut penelitian Joseph Whittaker (2022) menyatakan konsumsi komposisi makronutrien dengan protein dalam jumlah sedang, dan jumlah karbohidrat rendah tidak berdampak signifikan dan jangka panjang pada testosteron, tetapi komposisi diet tinggi protein dan rendah karbohidrat menyebabkan penurunan signifikan pada total hormon testosteron, sehingga berpotensi pada efek endokrin yang merugikan (Whittaker dan Harris, 2022). Konsumsi protein pada manusia umumnya sekitar 17% protein, Rata-rata penurunan kadar testosteron bagi mereka yang menjalani diet tinggi protein dan rendah karbohidrat adalah sekitar 37% ( $\sim 5,23$  nmol/L) (Whittaker dan Harris, 2022).

## **2.6. Tikus Sprague Dawley**

### **2.6.1. Definisi**

Tikus merupakan salah satu model penelitian yang sering digunakan karena masa hidup yang relative singkat, jinak dan masa gestasi singkat (Husna *et al.*, 2019). Tikus Sprague Dawley merupakan salah satu model penelitian yang belakangan ini sering digunakan terutama dalam studi toksikologi reproduktif,



perkembangan embrio dan nutrisi (Harnischfeger *et al.*, 2021). Keunggulan tikus Sprague Dawley adalah sifatnya lebih tenang dan penanganannya mudah (Lesmana, 2017).

Tikus jenis ini memiliki kemampuan reproduksi yang lebih baik dan stabil dibandingkan tikus jenis lain, yaitu jumlah anak yang dihasilkan sekitar 10,5 anak/kelahiran (Lesmana, 2017). Tikus Sprague Dawley memiliki ekor yang lebih panjang dari panjang tubuhnya. Berat tikus betina sekitar 250-300 gram, sedangkan berat tikus jantan dapat mencapai 450-520 gram. Usia hidupnya hampir sama dengan tikus wistar, yaitu 2,5-3,5 tahun (Lesmana, 2017).

#### 2.6.2. Pakan yang Digunakan

Pakan yang digunakan adalah pakan standar AIN-93M, dengan komposisi seperti yang tercantum dalam Tabel 2.1.

Tabel 2. 1 Formulasi pakan standar AIN-93M (Reeves dan Suppl, 1997)

BAHAN	(g/kg diet)
Cornstarch	465.992
Casein (>85% protein)	140.000
Dextrinized cornstarch (90-94% tetrasaccharides)	155.000
Sucrose	100.000
Soybean oil (no additives)	40.000
Fiber	50.000
Mineral mix (AIN-93G-MX)	35.000
Vitamin mix (AIN-93-VX)	10.000
L-cystine	1.800
Choline Bitartrate (41.1% choline)	2.500
Tert-Butylhydroquinone (TBHQ), mg	8.0

Komposisi makronutrien dalam penelitian ini menggunakan standar formula AIN-93M yang disesuaikan dengan variasi

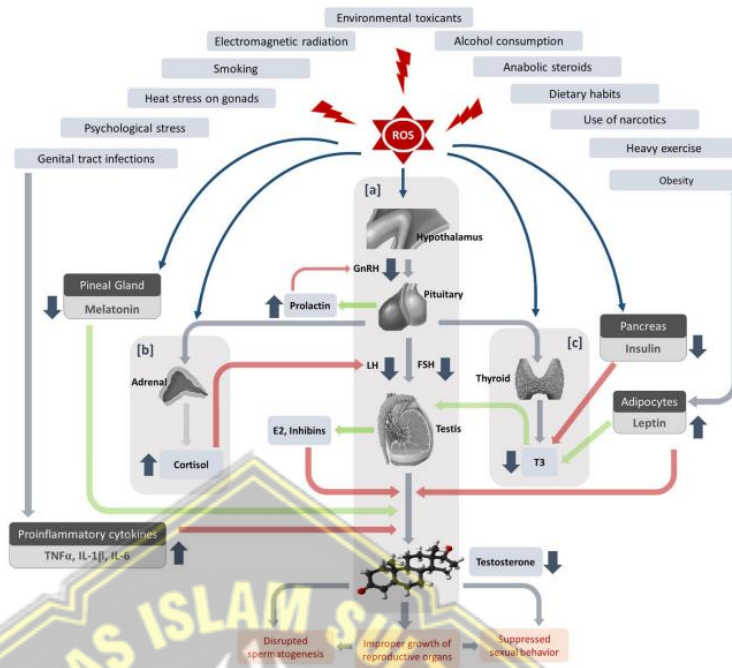
komposisi makronutrien dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok diet tinggi karbohidrat (DTK), diet gizi seimbang (DGS), diet tinggi lemak (DTL), dan diet tinggi protein (DTP). Kelompok DTK merupakan tikus dengan diet 70% karbohidrat, 10% lemak, dan 20% protein. Kelompok DGS merupakan tikus yang diberikan diet 60% karbohidrat, 15% protein, dan 25% lemak. Kelompok DTL yaitu tikus dengan diet 30% karbohidrat, 45% lemak, dan 25% protein. Kelompok DTP yaitu tikus dengan diet 30% karbohidrat, 25% lemak, dan 45% protein. Modifikasi komposisi makronutrien berdasarkan formula AIN-93M tertera dalam Tabel 2. 2.

Tabel 2. 2 Modifikasi formulasi AIN-93M (Reeves dan Suppl, 1997)

<b>BAHAN</b>	<b>DGS</b> (g/kg diet)	<b>DTK</b> (g/kg diet)	<b>DTP</b> (g/kg diet)	<b>DTL</b> (g/kg diet)
Cornstarch	143.08	192.79	49.07	49.072
Casein (>85% protein)	16.81	22.41	50.42	28,014
Dextrinized cornstarch (90-94% tetrasacch arides)	155,00	155,00	100.00	100.00
Sucrose	100,00	100,00	100,00	100,00
Soybean oil (no additives)	8.00	3.20	8.00	14.40
Fiber	50	50	50	50
Mineral mix (AIN-93G-MX)	35	35	35	35
Vitamin mix (AIN-93-VX)	10	10	10	10
L-cystine	1,80	1,80	1,80	1,80
Choline Bitartrate (41.1% choline)	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-Butylhydroquinone (TBHQ), mg	8	8	8	8

## 2.7. Hubungan Variasi Komposisi Makronutrien dan Hormon Testosteron

Pola komposisi makronutrien yang tidak proporsional dari berbagai variasi komposisi diet, menjadi kontributor untuk permasalahan metabolisme tubuh, dan diikuti induksi peradangan yang berkepanjangan atau permanen. Akumulasi lemak tidak tersaturasi dan konsumsi tinggi karbohidrat pada tubuh juga telah terbukti dalam peningkatan stres oksidatif secara sistemik. Stres oksidatif ini diperantarai oleh molekul ROS. Molekul ROS berdampak pada proses peroksidasi molekul makronutrien yang merubah fungsi dan kegunaan molekul makronutrien. ROS berhubungan secara langsung pada kadar testosteron dikarenakan testosteron memiliki struktur lipid di dalamnya, dan memiliki prekursor molekul yaitu kolesterol (Shea, Wong dan Chen, 2014). ROS memicu proses peroksidasi, yang secara umum didefinisikan sebagai proses radikal bebas menyerang struktur lipid yang mengandung ikatan rangkap karbon-karbon, yang melibatkan abstraksi hidrogen dari karbon, dengan penyisipan oksigen menghasilkan radikal lipid peroksidasi dan hidroperoksida (Ayala, Muñoz dan Argüelles, 2014). Peroksidasi ini yang merusak struktur lipid pada testosteron dan fungsinya didalam tubuh seperti gambar (Ayala, Muñoz and Argüelles, 2014).



Gambar 2. 9 Pengaruh ROS pada Penurunan Testosteron  
(Darbandi *et al.*, 2018)

Konsumsi karbohidrat yang tinggi dan diet tinggi lemak terutama konsumsi lemak yang didominasi *saturated fatty acid* (SFA), menyebabkan kadar ROS selular meningkat (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018). Kadar ROS yang meningkat dikarenakan aktivitas mitokondria yang lebih tinggi (Kagal dan Hogade, 2019). Konsumsi karbohidrat yang tinggi dan diet tinggi lemak terutama konsumsi lemak yang didominasi *saturated fatty acid* (SFA), juga berdampak pada penumpukan lemak yang terjadi didalam tubuh, sehingga meningkatkan risiko obesitas. Tubuh yang mengalami obesitas dan peningkatan kadar ROS, dapat menyebabkan percepatan timbulnya masalah pada penurunan produksi hormon testosteron (Darbandi *et al.*, 2018), dan percepatan timbulnya hipogonadisme (Traish *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2018).

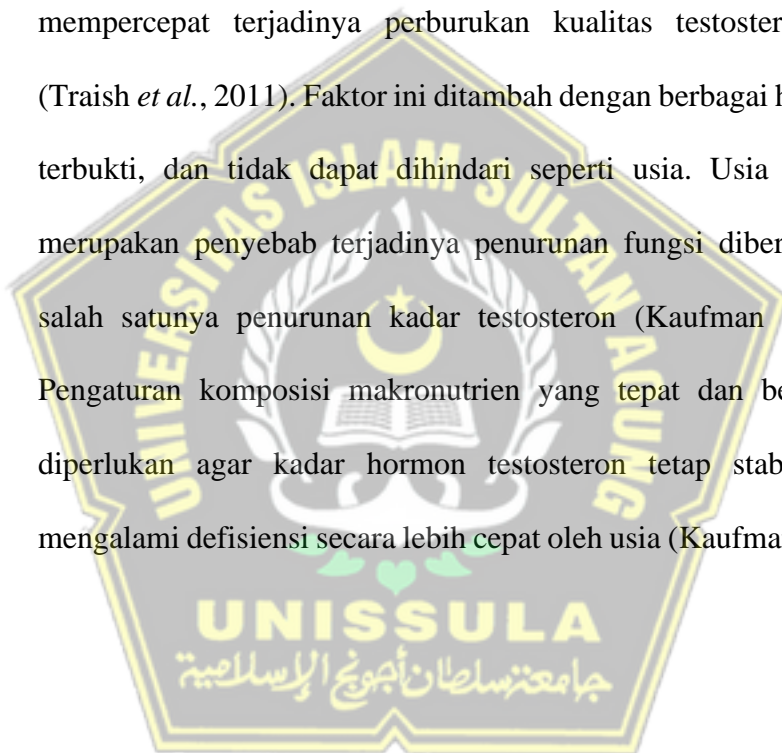
Komposisi lemak di dalam tubuh yang meningkat memicu peningkatan respons inflamasi dan meningkatkan keluarnya biomarker proinflamasi (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018). Inflamasi yang terjadi dimediasi *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells* (NF- $\kappa$ B), yang menginduksi agen proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), dan *interferon- $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ) (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018). Sitokin proinflamasi yang tinggi dan berkepanjangan berdampak pada kualitas sistem hormon, terutama pada testosteron (Darbandi *et al.*, 2018).

Komposisi diet gizi seimbang merupakan standar pemenuhan nutrisi yang bermanfaat menjaga berat badan ideal tubuh. Berat badan yang normal dan ideal dapat menghindarkan setiap individu mengalami obesitas, yang merupakan kondisi kelebihan lemak dalam tubuh yang dapat berisiko terkena penyakit metabolik. Peningkatan dari jumlah dan besar sel adiposit akan mempengaruhi jumlah hormon testosteron baik secara langsung maupun tidak langsung (Kelly dan Jones, 2015).

Diet dengan proporsi protein yang lebih tinggi dan lebih sedikit karbohidrat telah terbukti efektif untuk menurunkan berat badan pada orang dewasa yang obesitas dan mengarah pada perbaikan biomarker peradangan dan mengatur kadar ROS (Campos-Nonato, Hernandez dan Barquera, 2017). Diet tinggi protein mencegah kemungkinan penurunan kadar hormon testosteron yang diakibatkan oleh konsumsi diet tinggi karbohidrat secara berkepanjangan (Kelly dan Jones, 2015). Kadar ROS

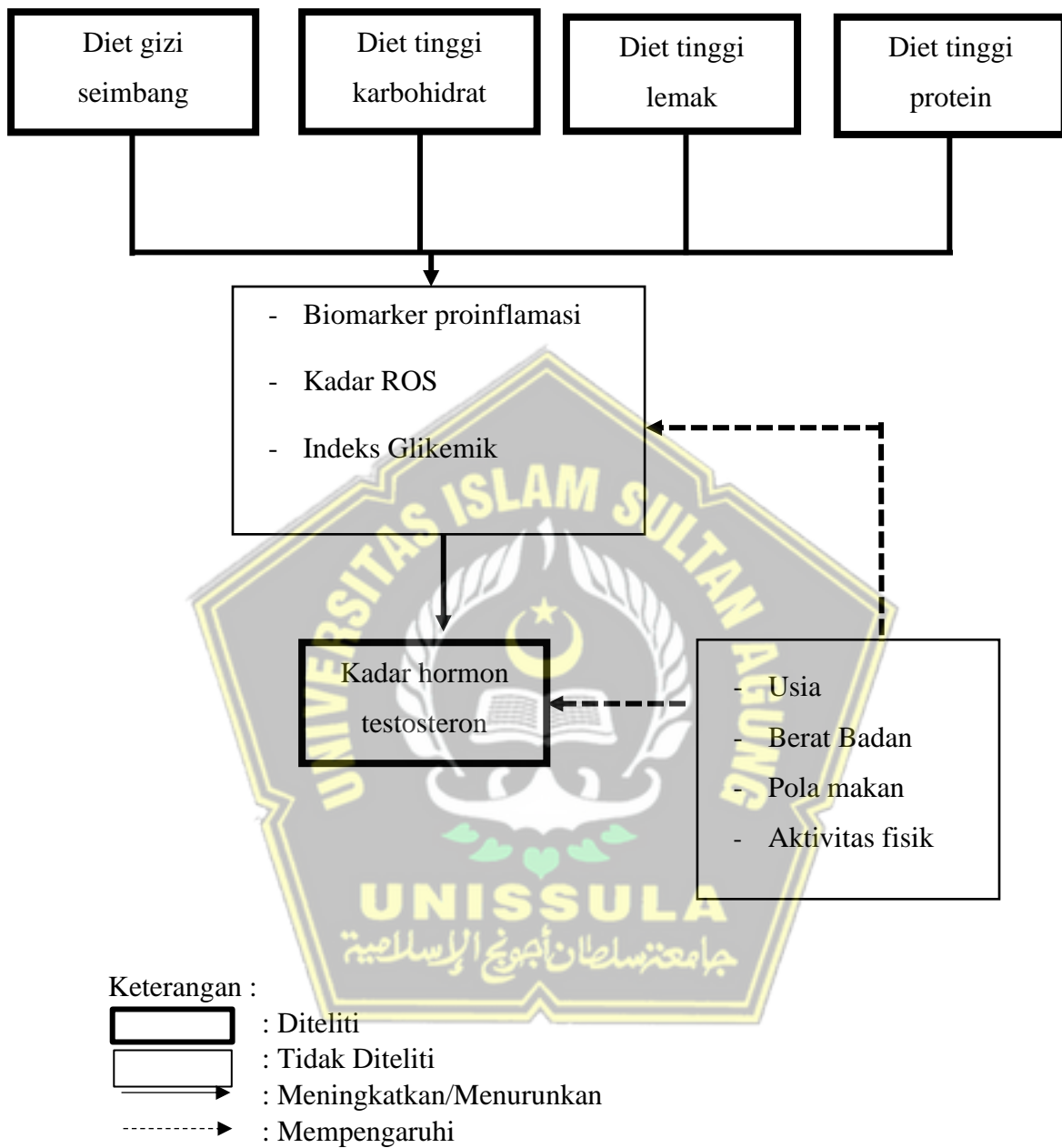
yang terkontrol pada diet tinggi protein, menurunkan percepatan penurunan produksi hormon testosteron (Darbandi *et al.*, 2018), dan mencegah hipogonadisme terjadi lebih cepat (Traish *et al.*, 2011).

Perburukan kualitas testosteron tidak terjadi secara instan dan dalam waktu yang singkat, diperlukan kombinasi beberapa faktor, yang menjadi sebuah siklus yang permanen berjalan, sehingga dapat mempercepat terjadinya perburukan kualitas testosteron seseorang (Traish *et al.*, 2011). Faktor ini ditambah dengan berbagai hal yang sudah terbukti, dan tidak dapat dihindari seperti usia. Usia atau penuaan merupakan penyebab terjadinya penurunan fungsi diberbagai organ, salah satunya penurunan kadar testosteron (Kaufman *et al.*, 2019). Pengaturan komposisi makronutrien yang tepat dan berkepanjangan diperlukan agar kadar hormon testosteron tetap stabil, dan tidak mengalami defisiensi secara lebih cepat oleh usia (Kaufman *et al.*, 2019).



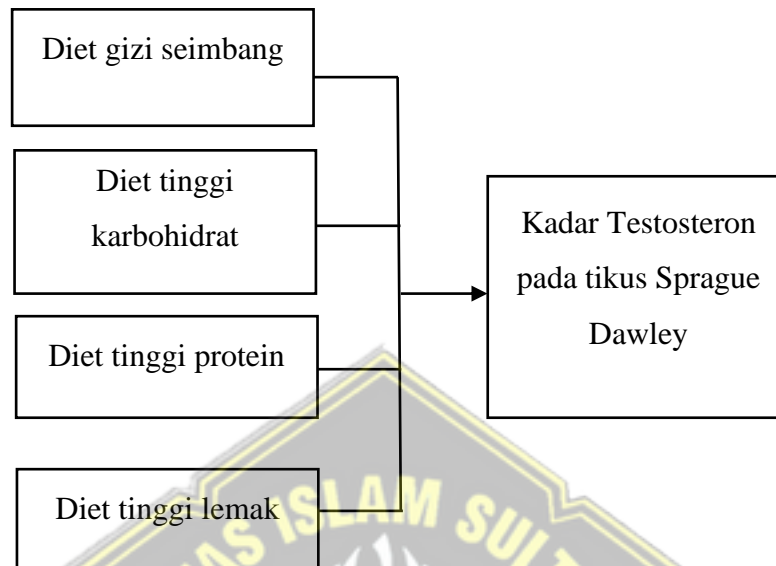


## 2.8. Kerangka Teori



Gambar 2. 10 Kerangka Teori Penelitian

## 2.9. Kerangka Konsep



Gambar 2. 11 Kerangka Konsep Penelitian

## 2.10. Hipotesis

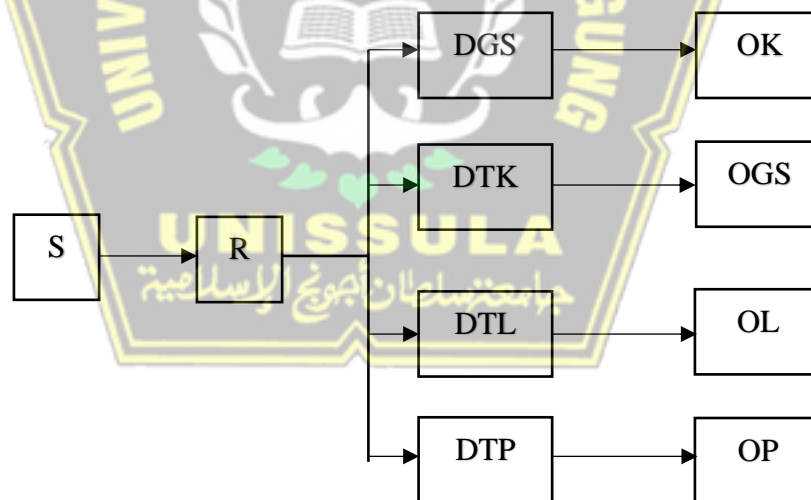
Variasi komposisi makronutrien berupa diet gizi seimbang, diet tinggi karbohidrat, diet tinggi lemak, dan diet tinggi protein berpengaruh terhadap kadar hormon testosteron pada tikus Sprague Dawley.

### BAB III

#### METODE PENELITIAN

##### 3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan yaitu penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design* terhadap 24 ekor tikus putih jantan galur Sprague Dawley. Perlakuan yang diberikan yaitu pemberian variasi komposisi makronutrien pada tikus Sprague Dawley, sedangkan keluaran berupa kadar hormon testosteron. Tikus putih jantan galur Sprague Dawley sebanyak 24 ekor dibagi menjadi 4 kelompok seperti pada Gambar 3.1. berikut :



Gambar 3. 1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

- S = Sampel berupa tikus putih jantan galur Sprague Dawley 24 ekor
- R = Randomisasi

- DGS = Terdiri dari 6 ekor tikus putih jantan galur Sprague Dawley, diberikan pakan sesuai dengan modifikasi AIN-93M yaitu 60% karbohidrat, 25% lemak, 15% protein selama 28 hari.
- DTK = Terdiri dari 6 ekor tikus putih jantan galur Sprague Dawley, diberikan pakan sesuai dengan modifikasi AIN-93M yaitu 70% karbohidrat, 10% lemak, dan 20% protein selama 28 hari.
- DTL = Terdiri dari 6 ekor tikus putih jantan galur Sprague Dawley, diberikan pakan sesuai dengan modifikasi AIN-93M yaitu 30% karbohidrat, 45% lemak, 25% protein selama 28 hari.
- DTP = Terdiri dari 6 ekor tikus putih jantan galur Sprague Dawley, diberikan pakan sesuai dengan modifikasi AIN-93M yaitu 30% karbohidrat, 25% lemak, 45% protein selama 30 hari.
- OGS = Observasi kadar hormon testosteron kelompok DGS
- OK = Observasi kadar hormon testosteron kelompok DTK
- OL = Observasi kadar hormon testosteron kelompok DTL
- OP = Observasi kadar hormon testosteron kelompok DTP

## 3.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 3.2.1 Variabel

#### 3.2.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi komposisi makronutrien diet meliputi komposisi diet gizi seimbang, komposisi diet tinggi karbohidrat, komposisi diet tinggi lemak, dan komposisi diet tinggi protein.

### 3.2.1.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar hormon testosteron.

## 3.2.2 Definisi Operasional

### 3.2.2.1 Komposisi Makronutrien

#### a. Diet dengan Gizi Seimbang

Tikus diberikan variasi komposisi makronutrien dengan proporsi sebanyak 60% karbohidrat, 25% lemak, dan 15% protein, dengan jumlah pakan yang dikonsumsi tikus adalah 20 gram/hari. Pakan diberikan dalam bentuk pakan standar selama 28 hari, dengan bersifat isokalori pada setiap kelompoknya.

Skala : Nominal

#### b. Diet Tinggi Karbohidrat

Tikus diberikan variasi komposisi makronutrien dengan proporsi sebanyak 70% karbohidrat, 10% lemak, dan 20% protein, dengan jumlah pakan yang dikonsumsi tikus adalah 20 gram/hari. Pakan diberikan dalam bentuk pakan standar selama 28 hari, dengan bersifat isokalori pada setiap kelompoknya.

Skala : Nominal

c. Diet Tinggi Lemak

Tikus diberikan variasi komposisi makronutrien dengan proporsi sebanyak 30% karbohidrat, 45% lemak, dan 20% protein, dengan jumlah pakan yang dikonsumsi tikus adalah 20 gram/hari. Pakan diberikan dalam bentuk pakan standar selama 28 hari, dengan bersifat isokalori pada setiap kelompoknya.

Skala : Nominal

d. Diet tinggi Protein

Tikus diberikan variasi komposisi makronutrien dengan proporsi sebanyak 30% karbohidrat, 25% lemak, dan 45% protein, dengan jumlah pakan yang dikonsumsi tikus adalah 20 gram/hari. Pakan diberikan dalam bentuk pakan standar selama 28 hari, dengan bersifat isokalori pada setiap kelompoknya.

Skala : Nominal

3.2.2.2 Kadar Testosteron

Kadar testosteron adalah kadar hormon testosteron darah tikus putih jantan galur Sprague Dawley. Sampel Darah diambil pada area sinus orbita tikus Sprague Dawley. Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-29 setelah aklimatisasi selama 7 hari, pemberian induksi diet sesuai kelompok masing-masing 28 hari, dan pengukuran



Kadar testosteron dari serum darah tikus yang telah berpuasa selama 12 jam, dan analisisnya menggunakan ELISA pada hari ke 31.

Satuan : ng/mL

Skala : rasio

### 3.3. Subjek Uji

Perlakuan pada penelitian ini dilakukan pada 4 kelompok, dengan jumlah sampel keseluruhan adalah 24 sampel. Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO, dengan jumlah minimal 5 ekor tiap kelompok, ditambah 1 sampel apabila *drop out* selama adaptasi dan perlakuan.

#### 3.3.1 Kriteria Inklusi

- Tikus Sprague Dawley jantan
- Standar Berat badan tikus Sprague Dawley usia 12 minggu berdasarkan WHO yaitu 150-200 gram
- Usia tikus 12 minggu
- Sehat pada penampilan luar :
  - Bergerak aktif
  - Makan dan minum normal

#### 3.3.2 Kriteria Eksklusi

- Kelainan anatomi pada tikus

#### 3.3.3 Kriteria Drop Out

- Perubahan perilaku (tidak mau makan, lemas)
- Tikus mati saat penelitian

### 3.4. Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.4.1. Alat Penelitian

- a. Kandang hewan
- b. Tempat pakan hewan
- c. Tempat minum hewan
- d. Timbangan digital
- e. Alat tulis
- f. Tabung sentrifugasi
- g. *Eppendorf*
- h. *Mikrohematokrit*
- i. *Microtip*
- j. Sumuran (well)
- k. Spektrofotometer
- l. ELISA reader (Biotek)

#### 3.4.2. Bahan Penelitian

- a. Ransum Pakan Standar
- b. Kit ELISA testosteron
- c. Hewan Uji
- d. Pakan sesuai modifikasi berdasarkan AIN-93M

Bahan yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu pakan standar AIN-93M, pakan AIN-93M yang sudah dimodifikasi untuk gizi seimbang, pakan AIN-93M yang sudah dimodifikasi tinggi karbohidrat, pakan AIN-93M yang sudah dimodifikasi

tinggi tinggi protein, dan pakan AIN-93M yang sudah dimodifikasi tinggi tinggi lemak.

### 3.5. Cara Penelitian

#### 3.5.1 Pembuatan Variasi Komposisi Makronutrien Diet

Variasi komposisi makronutrien yang dilakukan dalam penelitian didapat dari modifikasi formula AIN-93M sesuai dengan kelompok masing-masing. Variasi komposisi makronutrien terdiri dari 4 kelompok diet, meliputi diet gizi (DGS), diet tinggi karbohidrat (DTK), diet tinggi lemak (DTL) dan diet tinggi protein (DTP). Bahan diet yang digunakan untuk karbohidrat adalah *cornstarch*, *casein* untuk protein dan *soybean oil* untuk lemak. Diet gizi seimbang memodifikasi formulasi AIN-93M dengan *cornstarch* 60%, *casein* 15%, dan *soybean oil* sebesar 25%. Diet tinggi karbohidrat memodifikasi formulasi AIN-93M dengan *cornstarch* 70%, *casein* 20%, dan *soybean oil* sebesar 10%. Diet tinggi protein memodifikasi formulasi AIN-93M dengan *cornstarch* sebesar 30%, *casein* 45%, dan *soybean oil* sebesar 25%. Diet tinggi lemak memodifikasi formulasi AIN-93M dengan *cornstarch* sebesar 30%, *casein* 25%, dan *soybean oil* sebesar 45%.

#### 3.5.2 Adaptasi Hewan Uji

Sebelum percobaan, disiapkan tempat pemeliharaan hewan yang memenuhi prinsip *Freedom from hunger and thirst*, *Freedom*

*from discomfort, Freedom from pain, injury and disease, Freedom to express normal behaviour, dan Freedom from fear and distress,* meliputi kandang, lingkungan, tempat makan, dan tempat minum (Wahyuwardani, Noor dan Bakrie, 2020). Adaptasi hewan uji dilakukan selama 7 hari (Hari ke-1 s/d ke-7) dengan tujuan agar tikus dapat menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang baru sehingga menghindari stress pada tikus. Tikus diadaptasikan selama 7 hari yaitu pada hari pertama hingga hari ke-7 penelitian dengan diberi pakan standar secara *ad libitum* dan air. Tikus dilakukan pengukuran berat badan pada hari ke-1 dan hari ke-7 pada saat proses adaptasi dengan timbangan digital.

### **3.5.3 Prosedur Pemberian Variasi Diet masing-masing kelompok**

Pada penelitian ini tikus diinduksi menggunakan variasi komposisi pakan pada masing-masing kelompok. Variasi dilakukan dengan membedakan komposisi makronutrien, meliputi diet gizi seimbang, diet tinggi karbohidrat, diet tinggi lemak, dan diet tinggi protein. Perlakuan hewan coba dalam penelitian ini telah disesuaikan dengan prinsip kesejahteraan hewan yaitu prinsip 3R yaitu *replacement* (penggantian), *reduction* (pengurangan), dan *refinement* (perbaikan). Prinsip 3R dilaksanakan untuk mewujudkan penelitian yang sesuai dengan prinsip kesejahteraan hewan dengan cara mencari alternatif lain yang memungkinkan untuk mengurangi jumlah hewan coba yang digunakan, dan

membuat prosedur yang baik untuk mengurangi dan menghilangkan potensi rasa sakit hewan coba. Penelitian ini juga menerapkan prinsip 5F (*Five freedom*) yang menjamin hewan coba bebas rasa lapar dan haus (akses mudah untuk minum dan pakan); rasa panas dan tidak nyaman (kandang yang nyaman); nyeri dan penyakit (pencegahan dan pengobatan penyakit pada hewan); ketakutan dan stress (meminimalkan potensi sakit hewan coba); dan melakukan kegiatan alami hewan coba (ruang gerak dan fasilitas sesuai kebutuhan hewan) (Wahyuwardani, Noor dan Bakrie, 2020).

#### **Pemberian Perlakuan**

##### 1) Kelompok DGS

Tikus putih jantan galur Sprague Dawley diberi variasi pakan komposisi diet 60% karbohidrat, 15% protein, 25% lemak, dan aquades selama 28 hari yaitu dari hari ke-1 sampai hari ke-28 penelitian.

##### 2) Kelompok DTK

Tikus putih jantan galur Sprague Dawley diberi variasi pakan komposisi diet 70% karbohidrat, 20% protein, 10% lemak, dan aquades selama 28 hari yaitu dari hari ke-1 sampai hari ke-28 penelitian.

### 3) Kelompok DTL

Tikus putih jantan galur Sprague Dawley diberi variasi pakan komposisi diet 30% karbohidrat, 25% protein, 45% lemak, dan aquades selama 28 hari yaitu dari hari ke-1 sampai hari ke-28 penelitian.

### 4) Kelompok DTP

Tikus putih jantan galur Sprague Dawley diberi variasi pakan komposisi diet 30% karbohidrat, 45% protein, 25% lemak, dan aquades selama 28 hari yaitu dari hari ke-1 sampai hari ke-28 penelitian.

#### **Pengukuran Berat Badan Tikus dan Indeks Lee**

1. Pengukuran berat badan tikus dengan timbangan digital dilakukan pada hari ke-7, ke-14, ke-21, ke-28.

2. Indek Lee diukur pada hari ke-28 dengan mengukur panjang badan dan berat badan pada tikus Sprague Dawley, jika nilai indeks obesitas Lee  $> 0,3$  tikus dapat dikatakan

obesitas. rumus perhitungan indeks Lee dihitung dengan =  
 $\text{Weight (g}^{0,33}) : \text{nasoanal length (mm)}$  (Rogers, P dan Webb, 1980).

#### **3.5.4 Pengambilan Serum Darah Tikus**

1) Pengambilan sampel darah pada hari ke-29, hewan uji dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam, sebelum darahnya diambil.



- 2) Alat – alat yang akan digunakan dibersihkan menggunakan alkohol 70%.
- 3) Sinus orbitalis ditusuk menggunakan alat yang sudah dibersihkan untuk mengambil darah sebanyak 3 ml.
- 4) Darah kemudian ditampung dan didiamkan 15 menit di dalam tabung sentrifugasi.
- 5) *Mikrohaematokrit* dicabut dan swab sisa darah di sudut bola mata tikus.
- 6) Darah yang sudah diambil *disentrifuge* dengan kecepatan 3000 *rpm* selama 20 menit, kemudian didiamkan 15 menit untuk mendapatkan serum.
- 7) Serum diambil menggunakan mikropipet, kemudian dimasukan kedalam tabung *eppendorf* yang telah diberi label.
- 8) Serum tersebut disimpan dalam *freezer* suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai hari pengukuran.

### 3.5.5 Cara Pemeriksaan Kadar Hormon Testosteron Serum

Pengukuran kadar hormon testosteron pada serum menggunakan metode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Sampel yang digunakan adalah sampel serum yang sudah disimpan, dan melewati proses sentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm. Pengukuran dilakukan di laboratorium di Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gajah Mada Yogyakarta

dengan menggunakan kit ELISA testosteron. Kadar hormon minimal yang dapat terdeteksi pada kit ini adalah 100 $\mu$ L.

Masing-masing kelompok perlakuan diambil sebanyak 25  $\mu$ L serum, selanjutnya dimasukkan kedalam sumuran pada plat. *Enzyme conjugate* sebanyak 200  $\mu$ L dimasukkan ke dalam setiap sumuran (*well*) yang berjumlah 96 dan dilakukan pencampuran menyeluruh kurang lebih 10 detik. Plat dilakukan inkubasi selama 60 menit pada suhu ruangan (dengan tanpa menutup plat). Proses dilakukan dengan menumpahkan isi dari sumuran, dan cuci dengan *wash solution* (400  $\mu$ L), proses dilakukan berulang sebanyak 3 kali, lalu pada plat dibenturkan pada kertas penyerap untuk menghilangkan sisa tetesan pada sumuran. Sebanyak 200  $\mu$ L *substrate solution* dimasukkan kedalam setiap sumuran lalu inkubasi selama 15 menit pada suhu ruangan. Reaksi enzimatik dihentikan dengan menambahkan 100  $\mu$ L *stop solution* kedalam setiap sumuran. Lakukan absorbansi dari masing, masing sumuran ditentukan dengan menggunakan microtiter plate ELISA *reader* pada Panjang 450 $\pm$ 10nm. Pembacaan pada masing-masing sumuran sebaiknya dilakukan tidak lebih dari 10 menit setelah pemanbahan *stop solution* dan dilanjut dengan pembuatan kurva standar pada Ms. Excel curve fitting.

### **3.5.6 Euthanasia pada Tikus**

Setelah percobaan selesai, setiap tikus pada 4 kelompok, dengan total 24 sampel dilakukan euthanasia. Euthanasia pada tikus dilakukan dengan mempertimbangkan dampak, meminimalkan rasa sakit, dan penderitaan pada hewan akibat proses penelitian (Shomer *et al.*, 2020). Euthanasia yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode inhalasi. Metode inhalasi digunakan dengan menginduksikan gas pada tikus menggunakan gas carbon dioksida (CO<sub>2</sub>), sehingga kematian dapat diinduksi secara cepat dan tidak merasakan sakit (Shomer *et al.*, 2020).

## **3.6. Tempat dan Waktu Penelitian**

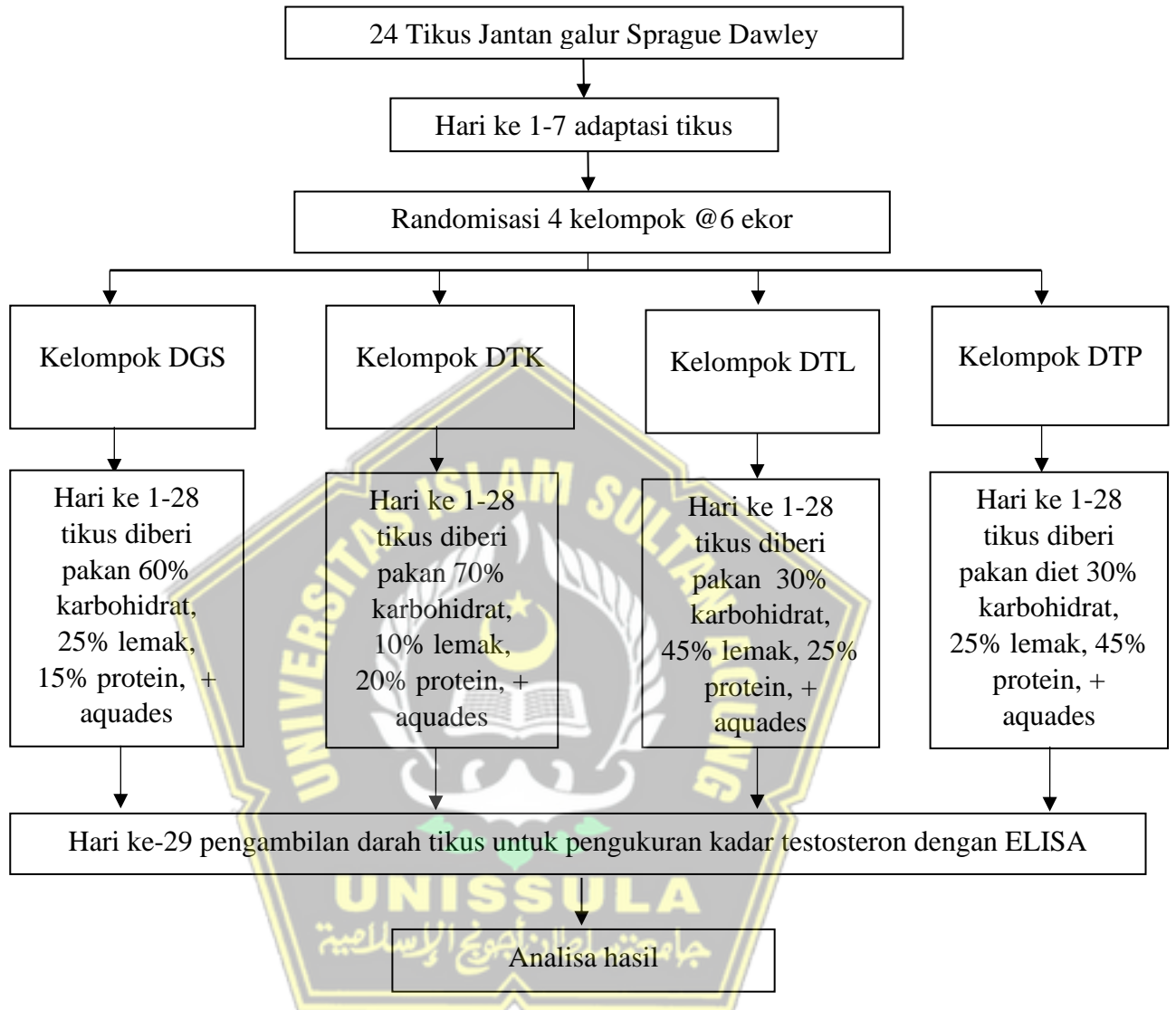
### **3.6.1 Tempat Penelitian**

Pemeliharaan serta penelitian pada hewan uji coba akan dilakukan di Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

### **3.6.1 Waktu Penelitian**

Penelitian tersebut akan dilakukan pada bulan Juni hingga bulan Juli 2022.

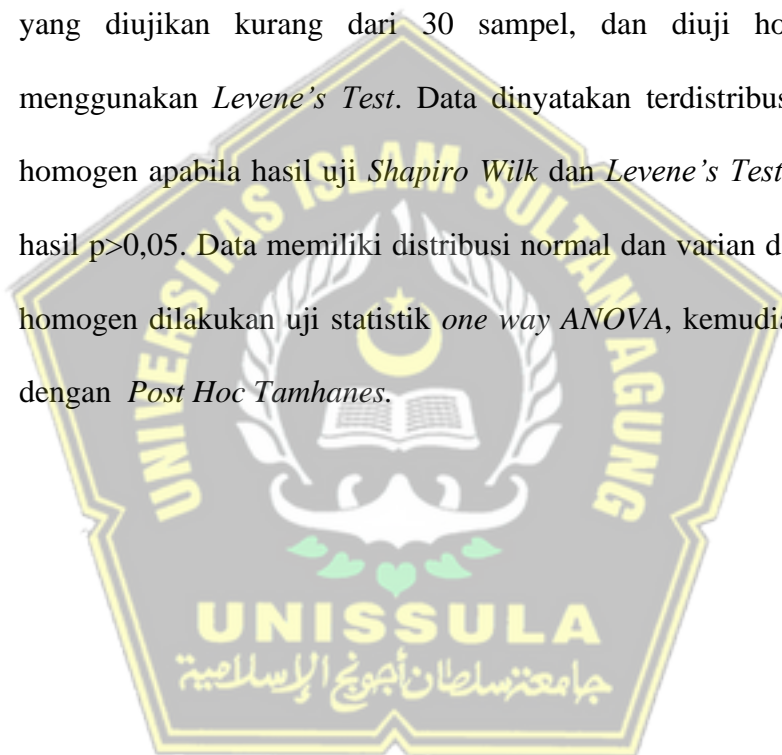
### 3.7. Alur penelitian



Gambar 3. 2 Alur Penelitian

### 3.8. Analisa Hasil

Data didapatkan dengan melakukan perhitungan kadar testosteron menggunakan metode ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), selanjutnya dianalisis statistik. Data hasil pengukuran dianalisis statistik menggunakan SPSS *software* Ver. 16.0 for Windows. Data kadar testosteron diuji normalitasnya menggunakan *Shapiro-Wilk* karena sampel yang diujikan kurang dari 30 sampel, dan diuji homogenitasnya menggunakan *Levene's Test*. Data dinyatakan terdistribusi normal dan homogen apabila hasil uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test* mendapatkan hasil  $p > 0,05$ . Data memiliki distribusi normal dan varian data yang tidak homogen dilakukan uji statistik *one way ANOVA*, kemudian dilanjutkan dengan *Post Hoc Tamhanes*.

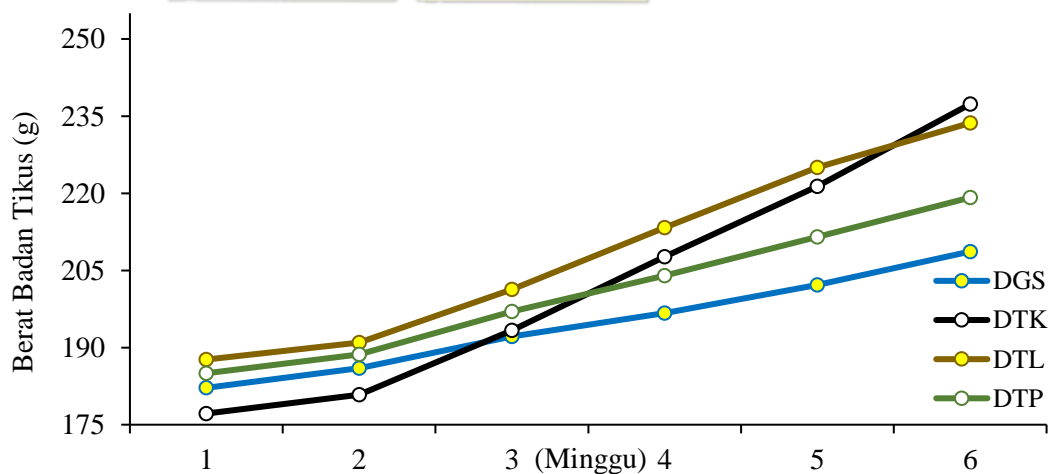


## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Hasil Penelitian

Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh variasi komposisi makronutrien diet terhadap hormon testosteron pada 24 ekor tikus Sprague Dawley jantan yang diberikan perlakuan selama 28 hari. Tikus dibagi menjadi 4 kelompok random yaitu diet gizi seimbang (DGS), diet tinggi karbohidrat (DTK), diet tinggi lemak (DTL), dan diet tinggi protein (DTP). Semua tikus Sprague Dawley tetap hidup hingga akhir penelitian, dan tidak ada yang mengalami perubahan perilaku seperti, tidak mau makan dan sakit. Penelitian pada 4 kelompok perlakuan dilakukan dengan menimbang berat badan tikus setiap minggu, serta pengukuran kadar hormon testosteron diakhir penelitian dengan metode ELISA. Hasil pengukuran rerata berat badan tikus setiap minggu ditampilkan pada Gambar 4.1, sedangkan hasil pengukuran rerata kadar serum hormon testosteron menggunakan metode ELISA tertera pada Gambar 4.2.



Gambar 4. 1 Rerata Berat Badan Tikus Sprague Dawley setiap Minggu



Gambar 4.1 menunjukkan penambahan berat badan setiap minggu pada semua kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan dengan rerata peningkatan berat badan tertinggi setiap minggunya yaitu pada kelompok diet tinggi karbohidrat ( $12,03 \pm 4,33$  gram), diikuti kelompok diet tinggi lemak ( $8,67 \pm 3,16$  gram), kelompok diet tinggi protein ( $6,83 \pm 1,64$  gram), dan kelompok diet gizi seimbang ( $5,30 \pm 1,00$  gram). Kelompok perlakuan dengan penambahan berat badan tertinggi dari awal penelitian sampai akhir penelitian yaitu kelompok diet tinggi karbohidrat ( $60,17 \pm 4,33$  gram), diikuti kelompok diet tinggi lemak ( $46,00 \pm 3,16$  gram), kelompok diet tinggi protein ( $34,17 \pm 1,64$  gram), dan kelompok diet gizi seimbang ( $26,50 \pm 1,00$  gram).

Obesitas pada hewan coba dapat dinilai dari indeks Lee seperti Tabel 4.1. Tikus dapat dikatakan obesitas jika nilai indeks obesitas Lee  $> 0,3$ . Indeks Lee diukur dengan rumus =  $Weight (g^{0,33}) : nasoanal length (mm)$  (Rogers dan Webb, 1980).

Tabel 4. 1 Rerata Nilai Indeks Lee

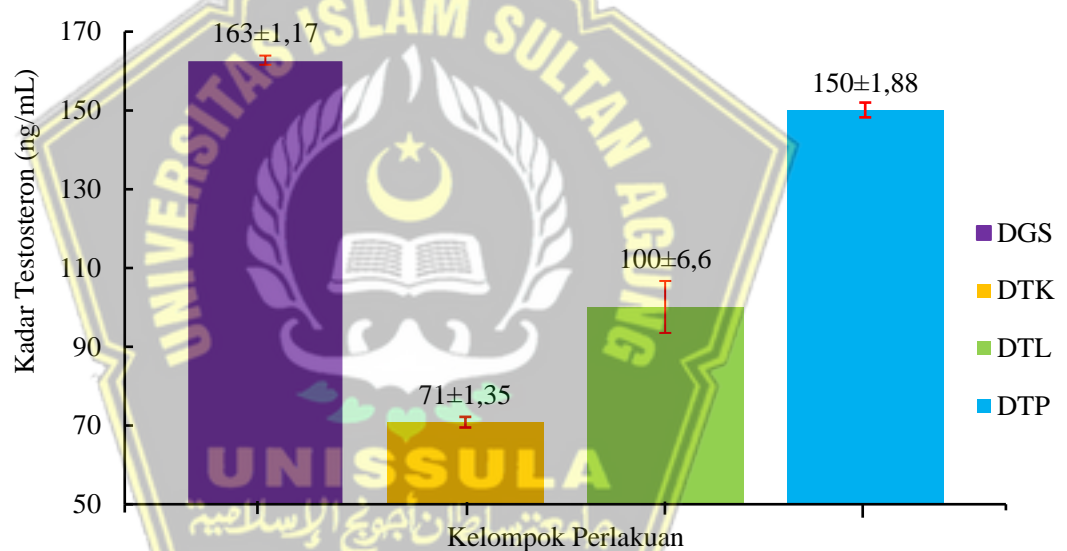
	DGS	DTK	DTL	DTP
Indeks LEE ( $>0,3$ )	0,296	0,342**	0,320**	0,299

Keterangan : \*\*= Obesitas

Kelompok perlakuan dengan rerata nilai indeks Lee tertinggi yaitu kelompok diet tinggi karbohidrat (0,342), kemudian diikuti kelompok diet tinggi lemak (0,320), kelompok diet tinggi protein (0,299), dan kelompok diet gizi seimbang (0,296). Kelompok yang mengalami obesitas yaitu kelompok

diet tinggi karbohidrat dan kelompok diet tinggi lemak, sedangkan kelompok diet gizi seimbang dan diet tinggi protein tidak mengalami obesitas.

Rerata kadar testosteron di akhir penelitian ditunjukkan pada Gambar 4.2. Kadar testosteron terendah pada kelompok diet tinggi karbohidrat ( $70,84 \pm 1,35$  ng/mL), diikuti kelompok diet tinggi lemak ( $100,10 \pm 6,66$  ng/mL), kemudian diet tinggi protein ( $150,11 \pm 1,88$  ng/mL). Kelompok yang diberi diet gizi seimbang menunjukkan rerata kadar testosteron tertinggi ( $162,75 \pm 1,17$  ng/mL).



Gambar 4. 2 Grafik Rerata ( $\pm$  standar deviasi) Kadar Hormon

Testosteron Tikus Sprague Dawley (ng/mL)

Hasil pengukuran kadar testosteron kemudian dilakukan uji normalitas dan homogenitas untuk menentukan apakah dapat dilakukan uji parametrik *One-Way Anova*. Uji normalitas dalam penelitian ini menggunakan *Saphiro-Wilk*, karena jumlah sampel  $\leq 50$ . Berdasarkan Tabel 4.2 hasil pengolahan uji normalitas rerata kadar hormon testosteron tikus adalah  $p > 0,05$ ,

menunjukkan data berdistribusi normal. Hasil uji homogenitas *Lavene's test* berdasarkan Tabel 4.2 menunjukkan data tidak homogen dengan nilai  $p = 0,002$  ( $p < 0,05$ ). Oleh karena data berdistribusi normal dan tidak homogen maka dilanjutkan uji parametrik *One-Way Anova*, dengan uji *Post Hoc Tamhane's* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan kadar hormon testosteron yang bermakna. Hasil uji *One-Way Anova* berdasarkan Tabel 4.2 diperoleh nilai  $p$  sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ), maka  $H_0$  ditolak,  $H_1$  diterima. Hasil tersebut dapat diartikan bahwa terdapat sedikitnya dua kelompok yang mempunyai perbedaan rerata kadar testosteron yang signifikan.

Tabel 4. 2. Hasil Uji *Shapiro-Wilk*, uji *Levene's Test*, Uji *One-way Anova*, dan Rerata kadar testosteron

Kelompok Penelitian	Rerata ( $\pm$ standar deviasi) Kadar Testosteron	Hasil Uji Normalitas	Hasil Uji Homogenitas	Uji <i>One-way Anova</i>
DGS	162,75 $\pm$ 1,17	0,585	0,002	0,000*
DTK	70,84 $\pm$ 1,35	0,604		
DTL	100,10 $\pm$ 6,6	0,326		
DTP	150,11 $\pm$ 1,88	0,307		

Keterangan : \* = perbedaan signifikan

Berdasarkan Tabel 4.3 menunjukkan Uji *Post Hoc Tamhane's* terdapat perbedaan bermakna rerata kadar hormon testosteron pada kelompok diet gizi seimbang, diet tinggi karbohidrat, diet tinggi lemak, dan diet tinggi protein, dengan kelompok variasi komposisi makronutrien diet yang lain ( $p=0,000$ ).

Tabel 4. 3. Hasil Uji *Post Hoc Tamhane's*

Kelompok	DGS	DTK	DTL	DTP
DGS	-	0.000*	0.000*	0.000*
DTK	0.000*	-	0.000*	0.000*
DTL	0.000*	0.000*	-	0.000*
DTP	0.000*	0.000*	0.000*	-

Keterangan : \* = perbedaan bermakna

#### 4.2. Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan pola peningkatan berat badan pada tikus yang serupa dengan pola indeks Lee. Hasil pengukuran rerata penambahan berat badan dan indeks Lee pada tikus dari tertinggi hingga terendah sebagai berikut: diet tinggi karbohidrat (12,03 gram dan 0,342), diet tinggi lemak (8,67 gram dan 0,320), diet tinggi protein (6,83 gram dan 0,299), dan diet gizi seimbang (5,30 gram dan 0,296). Kelompok yang mengalami obesitas yaitu kelompok diet tinggi karbohidrat dan kelompok diet tinggi lemak, sedangkan kelompok diet gizi seimbang dan diet tinggi protein tidak mengalami obesitas. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Mohd Esa Norhaizan (2018) pada kelompok diet tinggi karbohidrat, dan kelompok diet tinggi lemak menyebabkan peningkatan berat badan yang signifikan dan obesitas (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018). Makronutrien tinggi karbohidrat, dan tinggi lemak terutama pada konsumsi jenis *saturated fats* dan *trans fats* yang dikonsumsi secara berkepanjangan, memicu penambahan peningkatan aktivitas penyimpanan trigliserid pada jaringan adiposa, sehingga menyebabkan penambahan ukuran dan jumlah sel adiposa (Pipoyan *et al.*, 2021). Hasil penelitian yang menunjukkan kelompok diet tinggi protein tidak

mengalami obesitas, sesuai dengan penelitian Drummen (2019) yang menyatakan bahwa konsumsi protein yang lebih tinggi dapat mengurangi kelebihan berat badan dan obesitas (Drummen *et al.*, 2018).

Asupan kalori yang berlebihan oleh konsumsi diet tinggi karbohidrat dan tinggi lemak menyebabkan lebih banyak substrat yang masuk ke dalam respirasi mitokondria yang bersifat akumulatif (Masschelin *et al.*, 2020). Peningkatan kerja respirasi mitokondria berbanding lurus dengan jumlah elektron yang disumbangkan ke rantai transpor elektron. Elektron ekstra akan dikembalikan ke kompleks III, setelah mencapai ambang batas, menghasilkan tingkat superoksida yang tinggi, sehingga *reactive oxygen species* (ROS) diproduksi secara berlebihan (Masschelin *et al.*, 2020). Komposisi makronutrien tinggi karbohidrat, dan tinggi lemak memicu peningkatan ROS, NADPH oksidase, dan peroksidasi lipid yang dapat merusak antioksidan (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018; Masschelin *et al.*, 2020). ROS yang terakumulasi disertai dengan rusaknya antioksidan, menyebabkan supremasi ROS terhadap antioksidan.

Jaringan adiposa yang berlebihan dan kondisi obesitas menyebabkan kondisi tubuh mengalami peradangan berkepanjangan, menyebabkan kadar ROS meningkat secara kronis sehingga menyebabkan resistensi insulin, peningkatan kerja leptin, dan mengaktifkan mediator inflamasi seperti TNF $\alpha$  dan IL-6, sehingga menyebabkan kondisi inflamasi (Darbandi *et al.*, 2018; Khodamoradi *et al.*, 2022). Kondisi obesitas yang disebabkan konsumsi diet tinggi karbohidrat dan diet tinggi lemak menyebabkan kondisi tubuh

mengalami kondisi inflamasi berkepanjangan, sehingga memicu penurunan kadar hormon testosteron (Kaufman *et al.*, 2019). Obesitas menyebabkan induksi leptin sehingga terjadi inhibisi dari kerja testis (Kelly dan Jones, 2015). Orang dengan obesitas menyebabkan produksi enzim aromatasenya menjadi meningkat signifikan, yang merubah secara *irreversibel* hormon testosteron menjadi estradiol, sehingga hormon testosteron mengalami penurunan jumlah dan fungsi (Kelly dan Jones, 2015).

Hasil penelitian menunjukkan kadar hormon testosteron pada kelompok yang mengalami obesitas sesuai indeks Lee memiliki rerata kadar hormon testosteron lebih rendah, yaitu kelompok diet tinggi karbohidrat ( $70,84 \pm 1,35$  ng/mL) dan diet tinggi lemak ( $100,10 \pm 6,66$  ng/mL), dibandingkan dengan diet tinggi protein ( $150,11 \pm 1,88$  ng/mL) dan diet gizi seimbang ( $162,75 \pm 1,17$  ng/mL). Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Hlaing (2019), dan Darbandi (2018) yang menyatakan bahwa hormon testosteron merupakan hormon steroid androgen anabolik yang akan mengalami penurunan disebabkan oleh obesitas, tingginya *reactive oxygen species* (ROS), dan inflamasi (Darbandi *et al.*, 2018; Hlaing, 2019; Khodamoradi *et al.*, 2022). Penelitian oleh Zarchi (2019) menyatakan penurunan hormon testosteron diperantarai peningkatan aromatase, gangguan pada testis, dan gangguan hormon leptin, yang disebabkan oleh obesitas (Hlaing, 2019). Hasil penelitian lain oleh Khodamoradi (2022) menyatakan hasil yang sama dengan penjelasan yang lebih luas, penurunan hormon testosteron utamanya disebabkan oleh peningkatan ROS yang tidak terkendali, yang berimplikasi



pada jumlah mediator inflamasi seperti  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ , peningkatan hormon leptin karena kejadian obesitas, dan gangguan hormon aksis hipotalamus-pituitari-testis (Khodamoradi *et al.*, 2022). obesitas menyebabkan produksi enzim aromatasenya menjadi meningkat signifikan, yang merubah secara *irreversibel* hormon testosteron menjadi estradiol, sehingga hormon testosteron mengalami penurunan jumlah dan fungsi (Kelly dan Jones, 2015). Penelitian oleh Ayala (2014) menjelaskan tentang mekanisme kerusakan yang diperantarai ROS, dengan menyebabkan peroksidasi pada struktur lipid testosteron yang menyebabkan kerusakan struktur dan fungsinya (Ayala, Muñoz dan Argüelles, 2014). Inflamasi, kadar ROS, enzim aromatase, dan leptin yang berlebihan didalam tubuh akan menyebabkan kerusakan pada hormon testosteron secara struktur, fungsi, dan jumlah (Hlaing, 2019).

Hasil penelitian menunjukkan kadar hormon testosteron lebih tinggi pada kelompok diet tinggi protein dan diet gizi seimbang, dibandingkan diet tinggi karbohidrat dan diet tinggi lemak. Hasil penelitian menunjukkan kadar hormon testosteron yang lebih tinggi terjadi pada kelompok diet yang tidak mengalami obesitas, yaitu pada kelompok diet gizi seimbang dan diet tinggi protein. Hasil ini sesuai dengan penelitian Kelly dan Jones (2015) menyatakan peningkatan dari jumlah dan besar sel adiposit pada obesitas akan mempengaruhi jumlah hormon testosteron baik secara langsung maupun tidak langsung (Kelly dan Jones, 2015). Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan Tan (2018) bahwa komposisi lemak dan

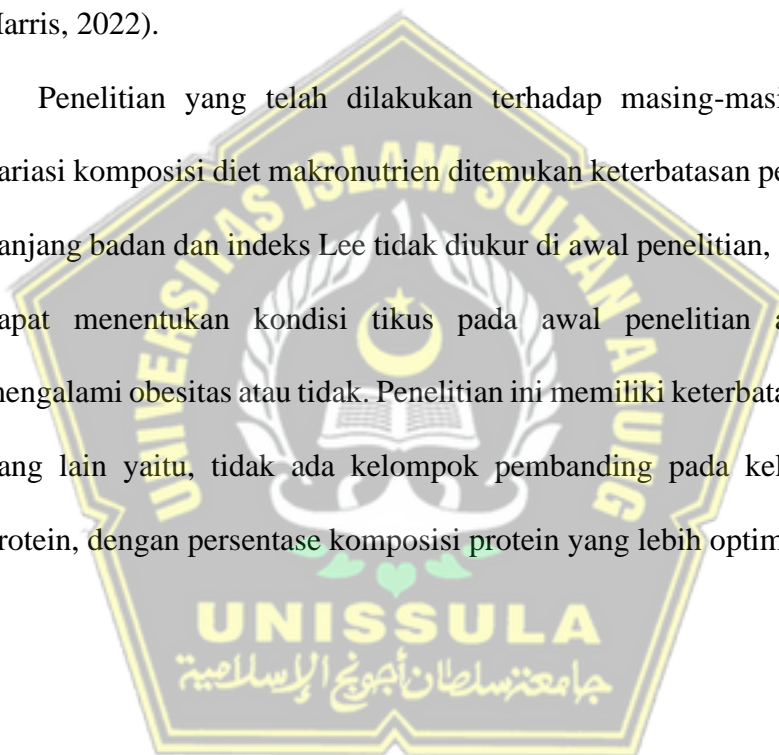
karbohidrat yang optimal menyebabkan kadar ROS dan mediator inflamasi yang lebih rendah (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018). Kadar ROS dan peradangan yang terkendali mencegah penurunan kadar hormon testosteron. Penelitian oleh Darbandi (2018) menjelaskan dampak ROS pada kualitas hormon testosteron, seperti terganggunya spermatogenesis, gangguan pertumbuhan organ reproduksi, dan penurunan kebiasaan seksual, sehingga dengan terkendalinya ROS dapat mencegah penurunan kualitas dan jumlah hormon testosteron (Darbandi *et al.*, 2018; Hlaing, 2019).

Hasil pengukuran rerata kadar hormon testosteron pada kelompok diet tinggi protein ( $150,11 \pm 1,88$  ng/mL) merupakan jumlah rerata kadar hormon testosteron yang lebih tinggi dari kelompok diet tinggi lemak dan kelompok diet tinggi karbohidrat. Kadar hormon testosteron yang tinggi disebabkan kadar ROS terkendali (Darbandi *et al.*, 2018). Kadar ROS terkendali berasal dari komposisi karbohidrat dan lemak yang optimal (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018). Komposisi diet tinggi protein yang optimal mencegah percepatan penurunan produksi hormon testosteron (Whittaker dan Harris, 2022), dan mencegah hipogonadisme terjadi lebih cepat (Traish *et al.*, 2011).

Hasil penelitian menunjukkan kadar hormon testosteron pada diet tinggi protein lebih rendah daripada diet gizi seimbang. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Joseph Whittaker (2022) menyatakan konsumsi komposisi diet tinggi protein namun rendah karbohidrat menyebabkan penurunan signifikan pada total hormon testosteron, rerata penurunan pada konsumsi diet tinggi protein dan rendah karbohidrat adalah sekitar 37% ( $\sim 5,23$  nmol/L)

(Whittaker dan Harris, 2022). Hasil penelitian oleh Darbandi (2018) menjelaskan penurunan biosintesis hormon testosteron disebabkan gangguan produksi hormon LH, dan penurunan penangkal radikal bebas (Darbandi *et al.*, 2018). Komposisi diet tinggi protein yang menyebabkan penurunan jumlah testosteron signifikan, apabila dikonsumsi lebih dari 35%, dan konsumsi protein yang disarankan tidak lebih dari 25% (Whittaker dan Harris, 2022).

Penelitian yang telah dilakukan terhadap masing-masing kelompok variasi komposisi diet makronutrien ditemukan keterbatasan penelitian, yaitu panjang badan dan indeks Lee tidak diukur di awal penelitian, sehingga tidak dapat menentukan kondisi tikus pada awal penelitian apakah sudah mengalami obesitas atau tidak. Penelitian ini memiliki keterbatasan penelitian yang lain yaitu, tidak ada kelompok pembanding pada kelompok tinggi protein, dengan persentase komposisi protein yang lebih optimal yaitu 35%.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian tentang pengaruh variasi komposisi makronutrien diet terhadap hormon testosteron pada tikus Sprague Dawley, dapat disimpulkan seperti berikut :

- 5.1.1 Pemberian variasi komposisi makronutrien berpengaruh secara bermakna terhadap hormon testosteron tikus Sprague Dawley.
- 5.1.2 Rerata kadar hormon testosteron pada tikus Sprague Dawley yang mendapatkan diet gizi seimbang sebesar  $162,75 \pm 1,17$  ng/mL.
- 5.1.3 Rerata kadar hormon testosteron pada tikus Sprague Dawley yang mendapatkan diet tinggi karbohidrat sebesar  $70,84 \pm 1,35$  ng/mL.
- 5.1.4 Rerata kadar hormon testosteron pada tikus Sprague Dawley yang mendapatkan diet tinggi lemak sebesar  $150,11 \pm 1,88$  ng/mL.
- 5.1.5 Rerata kadar hormon testosteron pada tikus Sprague Dawley yang mendapatkan diet tinggi protein sebesar  $100,10 \pm 6,66$  ng/mL.
- 5.1.6 Terdapat perbedaan bermakna rerata kadar hormon testosteron pada tikus Sprague Dawley yang mendapatkan diet tinggi karbohidrat dengan diet gizi seimbang ( $p=0,000$ ).
- 5.1.7 Terdapat perbedaan bermakna rerata kadar hormon testosteron pada tikus Sprague Dawley yang mendapatkan diet tinggi lemak dengan diet gizi seimbang ( $p=0,000$ ).

5.1.8 Terdapat perbedaan bermakna rerata kadar hormon testosteron pada tikus Sprague Dawley yang mendapatkan diet tinggi protein dengan diet gizi seimbang ( $p=0,000$ ).

## 5.2 Saran

- 5.2.1 Perlu dilakukan pengukuran panjang badan dan indeks Lee di awal penelitian untuk menentukan apakah sampel dalam kondisi obesitas atau tidak.
- 5.2.2 Perlu menambah kelompok pembanding pada diet tinggi protein, dengan persentase komposisi protein yang lebih optimal yaitu 35%.



## DAFTAR PUSTAKA

- Akmal, M. (2017) 'Androgen Dihydrotestosterone dan Perannya pada Sistem Reproduksi Pria', *Veterina Medika*, 10(1), pp. 119–130.
- American Heart Association (2021) 'Dietary Fats'. Available at: <https://www.heart.org/en/healthy-living/healthy-eating/eat-smart/fats/polyunsaturated-fats>.
- Antonio, J. *et al.* (2016) 'A High Protein Diet Has No Harmful Effects: A One-Year Crossover Study in Resistance-Trained Males', *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2016. doi: 10.1155/2016/9104792.
- Ayala, A., Muñoz, M. F. and Argüelles, S. (2014) 'Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. doi: 10.1155/2014/360438.
- Barnosky, A. R. *et al.* (2014) 'Intermittent fasting vs daily calorie restriction for type 2 diabetes prevention: A review of human findings', *Translational Research*, 164(4), pp. 302–311. doi: 10.1016/j.trsl.2014.05.013.
- Berrington de Gonzalez, A. *et al.* (2010) 'Body-Mass Index and Mortality among 1.46 Million White Adults', *New England Journal of Medicine*, 363(23), pp. 2211–2219. doi: 10.1056/nejmoa1000367.
- Biotechnology, N. C. for (2022) *Testosterone*. Retrieved, *PubChem Compound Summary for CID 6013*. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Testosterone>.
- Campos-Nonato, I., Hernandez, L. and Barquera, S. (2017) 'Effect of a High-Protein Diet versus Standard-Protein Diet on Weight Loss and Biomarkers of Metabolic Syndrome: A Randomized Clinical Trial', *Obesity Facts*, 10(3), pp. 238–251. doi: 10.1159/000471485.
- Carbone, S. *et al.* (2019) 'Obesity paradox in cardiovascular disease: Where do we stand?', *Vascular Health and Risk Management*, 15, pp. 89–100. doi: 10.2147/VHRM.S168946.
- Cava, E., Yeat, N. C. and Mittendorfer, B. (2017) 'Preserving healthy muscle during weight loss', *Advances in Nutrition*, 8(3), pp. 511–519. doi: 10.3945/an.116.014506.
- Cuenca-Sánchez, M., Navas-Carrillo, D. and Orenes-Piñero, E. (2015) 'Controversies surrounding high-protein diet intake: Satiating effect and kidney and bone health', *Advances in Nutrition*, 6(3), pp. 260–266. doi: 10.3945/an.114.007716.
- Darbandi, M. *et al.* (2018) 'Reactive oxygen species and male reproductive drus', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12958-018-0406-2.



- Dominik, P. and Varman, S. (2014) 'A high-protein diet for reducing body fat : mechanisms and possible caveats', *Nutrition and Metabolism*, 11(53), pp. 1–8.
- Drummen, M. et al. (2018) 'Dietary protein and energy balance in relation to obesity and co-morbidities', *Frontiers in Endocrinology*, 9(AUG), pp. 1–13. doi: 10.3389/fendo.2018.00443.
- Dudek, P., Kozakowski, J. and Zgliczyński, W. (2017) 'Late-onset hypogonadism', 16(2), pp. 66–69.
- Fruh, S. M. (2017) 'Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management', *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 29, pp. S3–S14. doi: 10.1002/2327-6924.12510.
- Fui, M. N. T., Dupuis, P. and Grossmann, M. (2014) 'Lowered testosterone in male obesity: Mechanisms, morbidity and management', *Asian Journal of Andrology*, 16(2), pp. 223–231. doi: 10.4103/1008-682X.122365.
- Geng, L. et al. (2021) 'The IGF-1/GH-GLUTs-plasma glucose regulating axis in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *epinephelus lanceolatus*♂) fed a high-carbohydrate diet', *General and Comparative Endocrinology*, 307(February). doi: 10.1016/j.ygcen.2021.113744.
- Genton, L. (2011) 'Clinical Nutrition University: Calorie and macronutrient requirements for physical fitness', *e-SPEN*, 6(2), pp. e77–e84. doi: 10.1016/j.eclnm.2011.01.008.
- Gharahdaghi, N. et al. (2021) 'Links Between Testosterone, Oestrogen, and the Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor Axis and Resistance Exercise Muscle Adaptations', *Frontiers in Physiology*, 11(January), pp. 1–12. doi: 10.3389/fphys.2020.621226.
- Giovannucci E, Pollak M, Liu Y, Platz EA, Majeed N, Rimm EB, Willett WC. Nutritional predictors of insulin-like growth factor I and their relationships to cancer in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 Feb;12(2):84-9. PMID: 12582016.
- Goldman, A. L. et al. (2017) 'A reappraisal of testosterone's binding in circulation: Physiological and clinical implications', *Endocrine Reviews*, 38(4), pp. 302–324. doi: 10.1210/ER.2017-00025.
- Harman, S. M. et al. (2001) 'Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(2), pp. 724–731. doi: 10.1210/jcem.86.2.7219.
- Harnischfeger, F. et al. (2021) 'Sprague dawley rats gaining weight on a high energy diet exhibit damage to taste tissue even after return to a healthy diet', *Nutrients*, 13(9). doi: 10.3390/nu13093062.

- He, L. *et al.* (2017) 'Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), pp. 532–553. doi: 10.1159/000485089.
- Henry, C. J. K. (2000) 'Mechanisms of changes in basal metabolism during ageing', *European Journal of Clinical Nutrition*, 54, pp. S77–S91. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601029.
- Hlaing, Z. T. T. (2019) 'Serum Testosterone Level and Obesity', *Asian Journal of Research and Reports in Endocrinology*, (May), pp. 1–8.
- Howard, B. V., Ruotolo, G. and Robbins, D. C. (2003) 'Obesity and dyslipidemia', *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 32(4), pp. 855–867. doi: 10.1016/S0889-8529(03)00073-2.
- Hruby, A. and Jacques, P. F. (2019) 'Dietary protein and changes in biomarkers of inflammation and oxidative stress in the Framingham Heart Study offspring cohort', *Current Developments in Nutrition*, 3(5), pp. 1–9. doi: 10.1093/cdn/nzz019.
- Hu, T. Y. *et al.* (2018) 'Testosterone-associated dietary pattern predicts low testosterone levels and hypogonadism', *Nutrients*, 10(11), pp. 1–16. doi: 10.3390/nu10111786.
- Husna, Fauzul *et al.* (2019) 'Model Hewan Coba pada Penelitian Diabetes', *Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(3), pp. 131–141. doi: 10.7454/psr.v6i3.4531.
- Joseph, J. *et al.* (2014) 'Lipid regulation in lipodystrophy versus the obesity-associated metabolic syndrome: The dissociation of HDL-C and triglycerides', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(9), pp. E1676–E1680. doi: 10.1210/jc.2014-1878.
- Kagal, U. A. and Hogade, A. P. (2019) 'Effect of high carbohydrate diet on complete Freund's adjuvant induced inflammation in rats', *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(3), pp. 1457–1462. doi: 10.13005/bpj/1775.
- Kaufman, J. M. *et al.* (2019) *Aging and the Male Reproductive System*, *Endocrine Reviews*. doi: 10.1210/er.2018-00178.
- Kelly, D. M. and Jones, T. H. (2015) 'Testosterone and obesity', *Obesity Reviews*, 16(7), pp. 581–606. doi: 10.1111/obr.12282.
- Kementrian kesehatan republik indonesia (2020) 'Tetap Produktif, Cegah Dan Atasi Diabetes Mellitus', *pusat data dan informasi kementrian kesehatan RI*.
- Khanal, N. *et al.* (2020) 'The effects of hypogonadism on quality of life in survivors of germ cell tumors treated with surgery alone versus surgery plus platinum-based chemotherapy', *Supportive Care in Cancer*, 28(7), pp. 3165–3170. doi: 10.1007/s00520-019-05117-0.

- Khodamoradi, K. et al. (2022) 'The role of leptin and low testosterone in obesity', *International Journal of Impotence Research*, (March). doi: 10.1038/s41443-022-00534-y.
- Koolman, J. and Roehm, K.-H. (2005) *Color Atlas of Biochemistry Second edition, revised and enlarged*.
- Lee, Y. J., Song, S. J. and Song, Y. J. (2018) 'High-carbohydrate diets and food patterns and their associations with metabolic disease in the Korean population', *Yonsei Medical Journal*, 59(7), pp. 834–842. doi: 10.3349/ymj.2018.59.7.834.
- Lesmana, R. (2017) *Pedoman Penggunaan Tikus Sebagai Hewan Uji Laboratorium*. Edited by D. Sajuthi. Jakarta: EGC.
- Locatelli, V. and Bianchi, V. E. (2014) 'Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis', *International Journal of Endocrinology*, 2014. doi: 10.1155/2014/235060.
- Loss, D. W. (2020) 'Clinical Evidence and Mechanisms of High-Protein', pp. 166–173.
- Ma, R. C. W. and Tong, P. C. Y. (2010) 'Testosterone levels and cardiovascular disease', *Heart*, 96(22), pp. 1787–1788. doi: 10.1136/hrt.2010.207068.
- Masschelin, P. M. et al. (2020) 'The Impact of Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance', *Frontiers in Physiology*, 10(January), pp. 1–8. doi: 10.3389/fphys.2019.01638.
- Minihane, A. M. et al. (2015) 'Low-grade inflammation, diet composition and health: Current research evidence and its translation', *British Journal of Nutrition*, 114(7), pp. 999–1012. doi: 10.1017/S0007114515002093.
- Most, J. et al. (2017) 'Calorie restriction in humans: An update', *Ageing Research Reviews*, 39, pp. 36–45. doi: 10.1016/j.arr.2016.08.005.
- Mulligan, T. et al. (2006) 'Prevalence of hypogonadism in males aged at least 45 years: The HIM study', *International Journal of Clinical Practice*, 60(7), pp. 762–769. doi: 10.1111/j.1742-1241.2006.00992.x.
- Mutiyani, M., Soeatmadji, D. W. and Sunindya, B. R. (2014) 'Effect of High Carbohydrate Diet and High Fat Diet on Blood Glucose and Beta Cell Pancreas Density in Wistar Rats', *Indonesian Journal of Human Nutrition*, 1(2), pp. 106–113.
- Nowicka-bauer, K. and Nixon, B. (2020) 'Molecular changes induced by oxidative stress that impair human sperm motility', *Antioxidants*, 9(2). doi: 10.3390/antiox9020134.
- Oddo, V. M., Maehara, M. and Rah, J. H. (2019) 'Overweight in Indonesia: An observational study of trends and risk factors among adults and children', *BMJ Open*, 9(9). doi: 10.1136/bmjopen-2019-031198.

- Park, S. *et al.* (2012) 'Calorie restriction with a high-fat diet effectively attenuated inflammatory response and oxidative stress-related markers in obese tissues of the high diet fed rats', *Mediators of Inflammation*, 2012(June 2012). doi: 10.1155/2012/984643.
- PERKENI (2019) *Pedoman pengelolaan dan pencegahan diabetes melitus tipe 2 di Indonesia*, Perkeni.
- Permenkes (2014) 'Pedoman Umum Gizi Seimbang', *English Language Teaching*, 39(1), pp. 1–24. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025><http://dx.doi.org/10.1038/nature10402><http://dx.doi.org/10.1038/nature21059><http://journal.stainkudus.ac.id/index.php/equilibrium/article/view/1268/1127><http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2577>
- Pipoyan, D. *et al.* (2021) 'The effect of trans fatty acids on human health: Regulation and consumption patterns', *Foods*, 10(10), pp. 1–24. doi: 10.3390/foods10102452.
- Ray, P. D., Huang, B. W. and Tsuji, Y. (2012) 'Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling', *Cellular Signalling*, 24(5), pp. 981–990. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
- Reeves, P. G. and Suppl, M. (1997) 'Symposium : Animal Diets for Nutritional and Toxicological Research Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet 1 , 2', *Experimental Biology*, 127(March), pp. 838–841.
- RISKESDAS (2013) 'Riset Kesehatan Dasar', *Science*, 127(3309), pp. 1275–1279. doi: 10.1126/science.127.3309.1275.
- Rizi, E. P. *et al.* (2018) 'A high carbohydrate, but not fat or protein meal attenuates postprandial ghrelin, PYY and GLP-1 responses in Chinese men', *PLoS ONE*, 13(1), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0191609.
- Roberts, S. B. and Rosenberg, I. (2006) 'Nutrition and aging: Changes in the regulation of energy metabolism with aging', *Physiological Reviews*, 86(2), pp. 651–667. doi: 10.1152/physrev.00019.2005.
- Rodwell, V. W. *et al.* (2015) *Harper's Illustrated Biochemistry*. 30th edn.
- Rogers, P and Webb, P. (1980) 'Estimation of Body Fat in Normal and Obese Mice.', Department of paramedical science, North East London, Polytechnic Romford Road. London E15 4LZ.
- Safitri, A., Jahari, A. B. and Ernawati, F. (2017) 'Konsumsi Makanan Penduduk Indonesia Ditinjau Dari Norma Gizi Seimbang (Food Consumption in Term of the Norm of Balanced Nutrition)', *Penelitian Gizi dan Makanan (The Journal of Nutrition and Food Research)*, 39(2), pp. 87–94. doi: 10.22435/pgm.v39i2.6971.87-94.



- Saylam, B. and Çayan, S. (2020) 'Do antioxidants improve serum sex hormones and total motile sperm count in idiopathic infertile men?', *Turkish Journal of Urology*, 46(6), pp. 442–448. doi: 10.5152/tud.2020.20296.
- Schulte, D. M. *et al.* (2014) 'Caloric restriction increases serum testosterone concentrations in obese male subjects by two distinct mechanisms', *Hormone and Metabolic Research*, 46(4), pp. 283–286. doi: 10.1055/s-0033-1358678.
- Seidemann, S. B. *et al.* (2018) 'Dietary carbohydrate intake and mortality: a prospective cohort study and meta-analysis', *The Lancet Public Health*, 3(9), pp. e419–e428. doi: 10.1016/S2468-2667(18)30135-X.
- Shea, J. L., Wong, P. Y. and Chen, Y. (2014) *Free testosterone. Clinical utility and important analytical aspects of measurement*. 1st edn, *Advances in Clinical Chemistry*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-800094-6.00002-9.
- Shock, N. W. (1982) 'The role of nutrition in aging', *Journal of the American College of Nutrition*, 1(1), pp. 3–9. doi: 10.1080/07315724.1982.10718072.
- Shomer, N. H. *et al.* (2020) 'Review of rodent euthanasia methods', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 59(3), pp. 242–253. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-19-000084.
- Stanworth, R. D. and Jones, T. H. (2008) 'Testosterone for the aging male; current evidence and recommended practice', *Clinical Interventions in Aging*, 3(1), pp. 25–44. doi: 10.2147/cia.s190.
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E. and Liew, W. (2018) 'Review Article Nutrients and Oxidative Stress: Friend or Foe?', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, pp. 1–24.
- Tostes, R. C. *et al.* (2016) 'Reactive oxygen species: Players in the cardiovascular effects of testosterone', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 310(1), pp. R1–R14. doi: 10.1152/ajpregu.00392.2014.
- Traish, A. M. *et al.* (2011) 'Testosterone deficiency', *American Journal of Medicine*, 124(7), pp. 578–587. doi: 10.1016/j.amjmed.2010.12.027.
- V, J. (2000) 'The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease', *Bratisl Lek Listy*, 101(10), pp. 541–551.
- Wahyuwardani, S., Noor, S. M. and Bakrie, B. (2020) 'Animal Welfare Ethics in Research and Testing: Implementation and its Barrier', *Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*, 30(4), p. 211. doi: 10.14334/wartazoa.v30i4.2529.
- Whittaker, J. and Harris, M. (2022) 'Low-carbohydrate diets and men's cortisol and testosterone: Systematic review and meta-analysis', *Nutrition and Health*. doi: 10.1177/02601060221083079.

- World Health Organization (WHO) (no date) *10 Facts on obesity*. Available at: <https://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/en/>.
- Wrzosek, M., Woźniak, J. and Włodarek, D. (2020) 'The combination of a diversified intake of carbohydrates and fats and supplementation of vitamin d in a diet does not affect the levels of hormones (Testosterone, estradiol, and cortisol) in men practicing strength training for the duration of 12 weeks', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(21), pp. 1–11. doi: 10.3390/ijerph17218057.
- Zamir, A. and Tavor, B.-Z. (2021) 'Manipulation of Dietary Intake on Changes in Circulating Testosterone Concentrations'. doi: doi.org/10.3390/nu13103375.

