

EFEK ANTIATEROGENIK EKSTRAK PAKIS SAYUR (*DIPLAZIUM ESCULENTUM*) MELALUI PENGHAMBATAN VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE-1 PADA TIKUS MODEL ATEROGENIK

Tristira Urvina^{1*}, Erma Sulistyaningsih², Ika Rahmawati Sutejo³

¹ Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Rumah Sakit Umum Daerah Dungus

² Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

³ Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Email Korespondensi: tristira.urvina@gmail.com

Disubmit: 05 September 2022

Diterima: 16 September 2022

Diterbitkan: 01 Oktober 2022

DOI: <https://doi.org/10.33024/mnj.v4i10.7722>

ABSTRACT

Atherosclerosis is one cause of death. The thickening of the arterial walls which form atherosclerotic plaque can cause a blockage of the artery lumen and lead to thrombosis and blood flow. VCAM-1 activation causes increased adhesion of monocytes to endothelial walls and foam cell formation which is the key to the occurrence of atherosclerosis. Diplazium esculentum contains antioxidants and is able to inhibit the activation of VCAM-1. This study aimed to determine the effect of vegetable fern extract on the expression of VCAM-1 as an anti-atherogenic effect and the effective dose required. Experimental studies using randomized post test only control group design. Samples were grouped into 7 groups, namely K, KN, P1, P2, P3, P4, and P5. All group except K induced by atherogenic diet and followed by the granting of vegetable fern extracts of 300 mg/kgBW in P1 groups, 600 mg/kgBW in P2 groups, 900 mg/kgBW in P3 groups, 1200 mg/kgBW in P4 groups, and 1500 mg/kgBW in P5 groups. The results showed a correlation between the dose of the extract given by the expression of VCAM-1, the greater the dose given VCAM-1 will be further hampered. The effective dose in rats was 2707, 19 mg/kg, this dose is equivalent to 4 kg of fresh vegetables fern in humans.

Keywords: Atherosclerosis, Vegetable Fern Extract, VCAM-1

ABSTRAK

Aterosklerosis merupakan salah satu penyebab kematian. Penebalan dinding arteri yang membentuk plak aterosklerosis dapat menyebabkan penyumbatan lumen arteri dan mengakibatkan trombosis dan gangguan aliran darah. Aktivasi VCAM-1 menyebabkan peningkatan perlekatan monosit pada dinding endotel dan pembentukan *foam cell* yang merupakan kunci terjadinya atherogenesis. *Diplazium esculentum* mengandung senyawa aktif yang bersifat antioksidan dan mampu menghambat aktivasi VCAM-1. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak pakis sayur terhadap ekspresi VCAM-1 sebagai efek antiaterogenik dan dosis efektif yang diperlukan. Studi eksperimental menggunakan *randomized post test only control group design*. Sampel dikelompokkan menjadi 7 kelompok, yaitu K, KN, P1, P2, P3, P4, dan P5. Tiap kelompok diinduksi diet atherogenik dilanjutkan dengan pemberian ekstrak

pakis sayur sebesar 300 mg/kgBB, 600 mg/kgBB, 900 mg/kgBB, 1200 mg/kgBB, dan 1500 mg/kgBB. Hasil penelitian menunjukkan terdapat hubungan antara dosis ekstrak yang diberikan dengan ekspresi VCAM-1, semakin besar dosis yang diberikan ekspresi VCAM-1 akan semakin terhambat. Dosis efektif pada tikus adalah 2707, 19 mg/kgBB, dosis ini setara dengan 4 kg pakis sayur segar pada manusia.

Kata Kunci: Aterosklerosis, Ekstrak Pakis Sayur, VCAM-1

PENDAHULUAN

Aterosklerosis merupakan salah satu penyebab kematian di Indonesia. Penebalan dinding arteri yang membentuk plak aterosklerosis dapat menyebabkan penyumbatan lumen arteri dan mengakibatkan trombosis dan gangguan aliran darah. Menurut WHO, 60% dari seluruh penyebab kematian penyakit jantung adalah penyakit jantung koroner dan pencetus utama penyakit ini adalah aterosklerosis (Yohana et al., 2020). Sementara itu, data Riset Kesehatan dasar pada tahun 2013 menunjukkan prevalensi penyakit jantung koroner sebesar 0,5% melalui diagnosis dokter dan 1,5% melalui gejala yang ditimbulkan. Estimasi jumlah penderita penyakit jantung koroner Provinsi Jawa Timur sebanyak 375.127 orang (1,3%) (Rulitasari, 2016).

Manifestasi klinis dini aterosklerosis adalah terjadinya *injury* pada dinding pembuluh darah khususnya endotel yang diikuti pengerahan limfosit dan monosit, pembentukan makrofag, deposisi lipid, proliferasi otot polos dan sintesis matriks ekstraseluler. Transmigrasi monosit ke ruang subendotelial selanjutnya ditransformasi menjadi makrofag atau sel busa (*foam cell*). Aktivasi VCAM-1 menyebabkan peningkatan perlekatan monosit pada dinding endotel dan pembentukan *foam cell* yang merupakan kunci terjadinya aterogenesis (PerlakuanVCO & Harini, 2022). Secara klinis gejala

aterosklerosis adalah klaudikasio intermiten, peka terhadap rasa dingin, perubahan warna kulit, penurunan denyut arteri di sebelah hilir dari lesi aterosklerotik, nekrosis sel dan gangrene (Berawi & Agverianti, 2017; Sargowo, 2015).

Kerusakan endotel akibat adanya plak aterosklerosis dapat dicegah dengan pemberian senyawa yang dapat menghapus radikal bebas intermediet dan menghambat reaksi oksidasi pada endotel, salah satunya adalah komponen antioksidan. Salah satu tanaman yang memiliki kadar antioksidan tinggi adalah daun pakis sayur (*Diplazium esculentum*). Pakis sayur memiliki kandungan kimia meliputi steroid, triterpenoid, fenol, flavon, dan flavonoid yang dapat menghambat peningkatan LDL teroksidasi sehingga mampu menghambat pelepasan sitokin dan sel radang serta menurunkan aktivasi VCAM-1 (Jayadi; Muhammad, 2020). Dengan penurunan aktivasi VCAM-1, pembentukan *foam cell* dan kerusakan endotel dapat dihambat sehingga mampu mencegah terjadinya plak aterosklerosis. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui penghambatan ekspresi VCAM-1 tikus wistar jantan model aterogenik sesudah pemberian ekstrak pakis sayur dan mengetahui dosis efektif ekstrak yang diperlukan.

KAJIAN PUSTAKA

Ekstrak Pakis Sayur (*Diplazium Esculentum*)

Tumbuhan paku (Pterydophyte) merupakan tumbuhan berpembuluh, peralihan antara tumbuhan rendah ke tinggi (tumbuhan kormofita) (Wulandari & Rahmawati, 2019).

Tumbuhan paku merupakan tumbuhan kosmopolit dengan distribusi sangat luas mulai daerah tropis hingga dekat kutub utara dan selatan, hutan primer, hutan sekunder, alam terbuka, dataran rendah hingga dataran tinggi, lingkungan yang lembab, basah, rindang, kebun tanaman, bahkan di pinggir jalan. Indonesia merupakan salah satu Negara tropis dimana tumbuhan paku tersebar di seluruh bagian. Tumbuhan paku masih jarang diperhatikan padahal memiliki banyak fungsi serta sebagai sumber keragaman hayati yang perlu dijaga (Abadi, 2022).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan *true experimental design* menggunakan *randomized post test only control group design* dengan empat kelompok perlakuan (P1, P2, P3, P4, dan P5) serta kelompok kontrol (K) dan kelompok kontrol negatif (KN). Kelompok perlakuan dan kelompok kontrol negatif diberikan diet atherogenik menggunakan injeksi adrenalin 0,006 mg/200 gBB dilanjutkan dengan kuning telur 4mL/ekor/hari kemudian pada kelompok perlakuan diberikan ekstrak pakis sayur dengan dosis 300 mg/kgBB, 600 mg/kgBB, 900

mg/kgBB, 1200 mg/kgBB, dan 1500 mg/kgBB selama 21 hari. Kemudian tikus dieutanasia untuk diambil aortanya dan dilakukan pewarnaan dengan metode imunohistokimia dan dihitung VCAM-1 yang terekspresi.

Ekstrak pakis dibuat dengan metode maserasi dengan pelarut metanol 100% dengan perbandingan 1:7 selama 4 x 24 jam dan disaring setiap 24 jam dan direndam kembali dalam metanol 100% sampai terekstraksi sempurna yang ditandai dengan warna metanol menjadi bening kembali. Setelah itu, pelarut alkohol yang masih tersisa diuapkan dengan rotavapor sehingga didapatkan ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%,

Pengelompokan sampel penelitian dilakukan menggunakan metode randomisasi dengan jumlah 28 ekor tikus yang harus memenuhi kriteria inklusi, yaitu *Ratus novergicus strain Wistar* jantan; berbulu putih dan sehat (bergerak aktif), umur 2 bulan, dan berat rata-rata 200 gram. Sedangkan kriteria eksklusi pada sampel penelitian ini adalah tikus yang sakit sebelum randomisasi dan selama perlakuan.

Data dianalisis menggunakan uji korelasi Pearson dengan $p < 0,05$. Pengolahan data dilakukan dengan komputerisasi menggunakan *software IBM Statistical Product and Service Solution 20* (IBM SPSS 20). Untuk menentukan dosis efektif ekstrak yang diperlukan dilakukan uji analisis *regresi linier*. Data hasil analisis disajikan dalam bentuk $mean \pm SD$.

HASIL PENELITIAN

Hasil pengukuran didapatkan

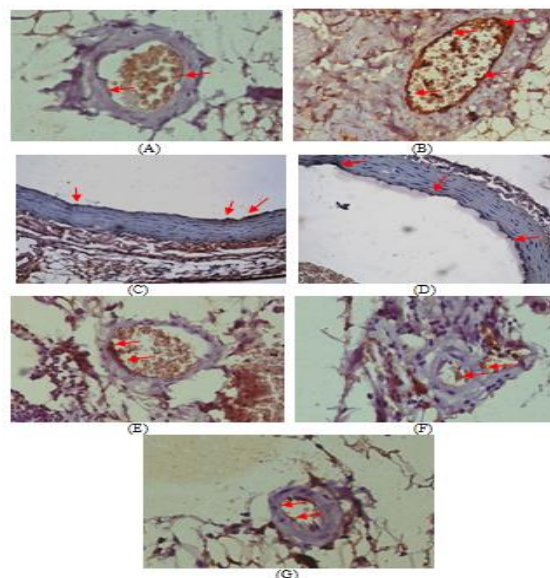
ekspresi VCAM-1 setelah perlakuan sebagai berikut.

Tabel 1. Rata-rata Skor Ekspresi VCAM-1

Kelompok	Ekspresi VCAM-1 (skor ± SD)
Kontrol	51,53 ±9,814
Kontrol Negatif	158,31 ±12,056
Perlakuan 1	148,58 ±19,115
Perlakuan 2	133,83 ±12,109
Perlakuan 3	126,97 ±15,454
Perlakuan 4	116,81 ±2,755
Perlakuan 5	95,00 ±16,640

Berdasarkan uji normalitas *Shapiro Wilk* didapatkan nilai $p > 0,05$ untuk semua kelompok. Uji homogenitas *Levene's test* menunjukkan nilai $p < 0,05$. Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai $p = 0,001$ yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Uji ini kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* ($p < 0,05$). Uji korelasi

Pearson menunjukkan $p < 0,001$ dengan nilai $R = -0,85$, yang artinya terdapat korelasi yang kuat antara pemberian dosis ekstrak pakis sayur terhadap ekspresi VCAM-1, semakin besar ekstrak pakis sayur yang diberikan ekspresi VCAM-1 semakin sedikit. Dari hasil analisis regresi linier diketahui bahwa dosis efektif pakis sayur terhadap ekspresi VCAM-1 adalah 2.707,19 mg/kgBB.



Gambar 1. Sediaan histologi endotel aorta

Keterangan:

(A) kelompok kontrol tanpa diet aterogenik (B) kelompok kontrol negatif diet aterogenik

tanpa pemberian ekstrak pakis sayur (C) kelompok diet aterogenik dengan pemberian ekstrak pakis sayur 300 mg/kgBB (D) kelompok

diet aterogenik dengan pemberian ekstrak pakis sayur 600 mg/kgBB (E) kelompok diet aterogenik dengan pemberian ekstrak pakis sayur 900 mg/kgBB (F) kelompok diet aterogenik dengan pemberian ekstrak pakis sayur 1200 mg/kgBB (G) kelompok diet aterogenik dengan pemberian ekstrak pakis sayur 1500 mg/kgBB. Tanda panah menunjukkan ekspresi VCAM-1.

Secara histologis, terdapat

PEMBAHASAN

Keuntungan penelitian menggunakan model hewan adalah faktor genetik dan lingkungan yang dapat mempengaruhi jalannya penyakit tertentu dapat dikendalikan (Hastuti, 2019). Penggunaan tikus wistar jantan pada model aterogenik dikarenakan secara hormonal tikus jantan lebih stabil dari pada tikus betina (Huda et al., 2020).

Tikus model aterogenik didapatkan dengan pemberian induksi diet aterogenik. Pemberian diet aterogenik pada penelitian ini mengacu pada metode Constatinides. Adrenalin yang berlebihan dapat menyebabkan jejas pada pembuluh darah yang mengawali suatu patogenesis aterosklerosis (Lamanepa, 2005). Diet aterogenik dilakukan dengan menginjeksikan adrenalin 0,006 mg/200 gBB secara intravena melalui vena ekor tikus pada hari pertama perlakuan dan dilanjutkan dengan memberikan diet kuning telur 4 mL/ekor/hari hingga hari ke-21. Dosis tersebut bertujuan untuk menghindari pemuntahan volume kuning telur yang berlebihan dan perlakuan selama tiga minggu supaya lesi aterosklerosis dapat dievaluasi menggunakan metode imunohistokimia dan dilihat dengan mikroskop.

Pakis sayur (*Diplazium*

perbedaan gambaran morfologi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol (K) ditemukan adanya sel endotel yang terekspresi VCAM-1 berwarna coklat dengan jumlah minimal. Kelompok kontrol negatif menunjukkan ekspresi VCAM-1 hampir pada keseluruhan endotel. Ekspresi VCAM-1 semakin terhambat seiring dengan peningkatan dosis ekstrak.

esculentum) diberikan pada tikus kelompok perlakuan dengan cara disonde. Dosis ekstrak yang diberikan dihitung berdasarkan penelitian konversi dosis dari penelitian sebelumnya dengan membandingkan senyawa aktif pada *Momordica charantia* dan pakis sayur sehingga didapatkan rentang dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 300 mg/kgBB, 600 mg/kgBB, 900 mg/kgBB, 1200 mg/kgBB, dan 1500 mg/kgBB.

Efek antiaterogenik ekstrak pakis sayur dievaluasi melalui penghambatan VCAM-1 pada endotel aorta tikus Wistar. Penghitungan VCAM-1 dilakukan menggunakan metode imunohistokimia dan dihitung dengan *Intensity Distribution Score* (IDS). Metode imunohistokimia dipilih karena dalam histopatologi, imunohistokimia secara rutin digunakan untuk diagnosis. Teknik imunohistokimia memungkinkan visualisasi secara langsung ekspresi biomarker pada sediaan histologis jaringan yang diperiksa. Hal ini dapat meminimalisasi hasil negatif palsu yang disebabkan oleh terlarutnya sedikit sel biomarker positif pada elemen biomarker negatif.

Berdasarkan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan $P < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Untuk mengetahui kelompok mana saja

yang berbeda secara signifikan dilakukan uji *Mann-Whitney*. Berdasarkan hasil uji tersebut sebagian besar kelompok menunjukkan perbedaan yang signifikan, tetapi kelompok dengan perbedaan dosis yang berdekatan menunjukkan tidak berbeda secara bermakna. Hal ini diduga karena rentang antar dosis pada penelitian ini terlalu sempit sehingga secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan meskipun sebenarnya dosis tersebut berefek.

Eksresi VCAM-1 pada kelompok kontrol (K) pada penelitian ini menunjukkan nilai minimal. Hal ini disebabkan karena VCAM-1 yang merupakan gen *inducible* (disintesis bila terinduksi) selain dapat teraktivasi oleh adanya LDL teroksidasi melalui mekanisme pembentukan sitokin dan NF- κ B juga dapat teraktivasi oleh adanya faktor internal lain seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *endothelial Notch1-Jagged1 circuit*. VEGF merupakan faktor angiogenik kuat yang kegiatannya meliputi kelangsungan hidup endotel sel, proliferasi, migrasi, dan pembentukan *tube*. VEGF juga bertindak sebagai sitokin proinflamasi dengan meningkatkan permeabilitas endotel dan merangsang molekul adhesi yang mengikat leukosit pada sel endotel. VEGF menstimulasi ekspresi VCAM-1 melalui aktivasi NF- κ B dan supresi PI 3'-kinase. VEGF pada postnatal merupakan variasi normal pada arteri maupun vena yang berperan dalam proses angiogenesis dan pemeliharaan maupun perbaikan endotel luminal. Sel otonom, *endothelial Notch1-Jagged1 circuit*, yang merupakan sel proinflamasi dapat memicu ekspresi VCAM-1 bahkan tanpa adanya sitokin inflamasi. Melalui mekanisme tersebut, VCAM-1 dapat teraktivasi pada individu normal tanpa adanya

pengaruh oksidasi lipid. Hal ini menunjukkan bahwa pada sediaan imunohistokimia VCAM-1 dapat terekspresi pada kondisi normal.

Penghambatan ekspresi VCAM-1 terlihat pada kelompok perlakuan dosis 300 mg/kgBB, 600 mg/kgBB, 900 mg/kgBB, 1200 mg/kgBB, dan 1500 mg/kgBB dimana rata-rata ekspresi VCAM-1 pada kelompok tersebut lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif. Kelompok perlakuan dosis 1500 mg/kgBB memiliki rata-rata ekspresi VCAM-1 paling rendah kadarnya diantara kelompok perlakuan lain dan kelompok kontrol negatif. Fenomena ini membuktikan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun pakis sayur terhadap ekspresi VCAM-1 secara bermakna seiring dengan peningkatan dosis ekstrak daun pakis sayur yang diberikan. Berdasarkan hasil analisis korelasi *Pearson* antara dosis ekstrak dengan ekspresi VCAM-1, didapatkan kekuatan korelasi -0,85, yang berarti semakin banyak dosis yang diberikan maka ekspresi VCAM-1 akan semakin sedikit. Sesuai persamaan regresi linier yang diperoleh, dosis efektif ekstrak pakis sayur dalam menghambat ekspresi VCAM-1 adalah 2.707,93 mg/kgBB.

Migrasi transendotelial dari sel peradangan (leukosit) merupakan langkah awal penting dalam aterosklerosis dan dimediasi oleh kehadiran molekul adhesi sel, termasuk VCAM-1 pada endotel vaskular. Penelitian menunjukkan bahwa tingkat lesi aterosklerotik secara signifikan berkurang pada model hewan dengan penurunan ekspresi VCAM-1. Oleh karena itu, VCAM-1 telah diidentifikasi sebagai potensi target terapi antiinflamasi. Dengan mengurangi ekspresi VCAM-1 akan memperlambat perkembangan aterosklerosis.

Aktivasi VCAM-1 pada sel endotel terjadi melalui mekanisme *redox-sensitive* yang melibatkan aktivasi faktor transkrip *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B). Pemberian diet aterosogenik akan menyebabkan pembentukan LDL teroksidasi melalui ikatan antara LDL dan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang terbentuk selama pembuatan ATP menyebabkan stres oksidatif dalam sel endotel. Hal ini memicu terjadinya jejas endotel. Sel endotel yang rusak akan teraktivasi sehingga dihasilkan sitokin (TNF- α). Rangsangan dari TNF- α dan LPS ini akan menyebabkan fosforilasi dari NF- κ B yang menyebabkan degradasi I κ B sehingga NF- κ B menjadi aktif. NF- κ B akan meregulasi pembentukan molekul adhesi seperti ICAM-1, VCAM-1 dan E-selectin [19]. Meningkatnya jumlah VCAM-1 menyebabkan sel-sel yang membawa *counter reseptor* dari VCAM-1 (monosit dan limfosit) menempel ke endotel yang teraktivasi tersebut. Monosit yang menempel pada VCAM-1 kemudian masuk ke tunika intima dan berubah menjadi makrofag. Dengan adanya kemoatraktan yang ada di tunika intima, makrofag mencerna LDL melalui reseptor *scavenger*. Makrofag mengeluarkan zat oksidan berupa *nitric oxide* (yang juga dihasilkan oleh sel endotel) yang mengakibatkan sel makrofag nampak seperti busa (*foam cell*), sel busa makrofag berkumpul menjadi satu dan membentuk plak (*fatty streak*).

Flavonoid dalam ekstrak pakis sayur berupa flavon berfungsi sebagai antioksidan kuat yang dapat melindungi tubuh dari ROS yang diproduksi selama metabolisme oksigen. Selain itu, radikal bebas yang ditangkap akan mencegah terjadinya LDL yang teroksidasi sehingga tidak terjadi aterosklerosis. Flavonoid juga

menghambat lipopolisakarida (LPS) yang menstimulasi NF- κ B dengan induksi fosforilasi I κ B pada makrofag dan dapat menghambat oksidasi LDL sehingga keutuhan endotel pembuluh darah terjaga dan mengurangi risiko terjadinya aterosklerosis. Terpenoid dapat menghambat sinyal NF- κ B. Hal ini menyebabkan proses inflamasi pada endotel pembuluh darah tidak terjadi. Tanin di dalam tubuh akan berikatan dengan protein tubuh dan akan melapisi dinding usus sehingga penyerapan lemak dihambat. Tanin melindungi usus terhadap asam lemak tak jenuh sehingga menghambat penyerapan zat-zat makanan (termasuk lemak dan kolesterol) oleh saluran pencernaan. Saponin dan polifenol dalam ekstrak daun pakis sayur bersifat antiinflamasi dengan cara menghambat migrasi sel-sel netrofil ke dalam jaringan. Sel-sel netrofil ini akan mengaktivasi makrofag dalam jaringan dan mengakibatkan inflamasi jaringan tersebut. Saponin dan flavon secara teoritis banyak terdapat dalam pakis sayur terutama dalam ekstrak metanol.

Konversi dosis untuk manusia dengan menggunakan rumus *Human Equivalent Doses* (HED), didapatkan dosis efektif 4 kg pakis segar. Jumlah ini terlalu besar sehingga menurut penelitian ini tidak direkomendasikan sebagai salah satu pangan antiaterogenik berdasarkan pengaruhnya terhadap ekspresi VCAM-1. Namun, tidak menutup kemungkinan pakis sayur dapat digunakan sebagai alternatif pangan antiaterogenik menggunakan indikator aterosogenik yang lain, maupun alternatif pangan pada kondisi medis yang lain.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data dapat disimpulkan

bahwa pemberian ekstrak daun pakis sayur (*Diplazium esculentum*) berpengaruh terhadap ekspresi VCAM-1 pada aorta tikus putih (*Rattus norvegicus strain Wistar*) yang diberi diet aterogenik. Semakin besar dosis yang diberikan maka ekspresi VCAM-1 semakin sedikit. Dosis efektif efek antiaterogenik adalah 2.707,19 mg/kgBB pada tikus. Apabila dikonversi pada manusia, dosis ini setara dengan 4 kg pakis sayur segar.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak daun pakis sayur dengan indikator aterosklerosis lain, baik dengan serum darah seperti kolesterol HDL, kolesterol LDL, trigliserida, ataupun mekanisme selular seperti NF- κ B, TNF- α , atau ICAM-1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan mengombinasikan ekstrak pakis sayur dengan agen antiaterogenik lain agar dapat terjadi efek yang sinergis sehingga dosis ekstrak pakis sayur yang digunakan dapat diminimalkan. Perlu juga dilakukan penelitian pada vaskular lain yang lebih dekat dengan jantung seperti arteri kornaria.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Kemenristek Dikti atas pendanaan yang diberikan untuk terselenggaranya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abadi, F. F. (2022). *Hubungan resiliensi dengan stress akademik pada santri kelas X sepuluh IPS Al Izzah Leadership School Batu Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim*.
Berawi, K. N., & Agverianti, T. (2017). Efek aktivitas fisik pada proses pembentukan radikal bebas sebagai faktor risiko aterosklerosis. *Jurnal Majority*, 6(2), 86-91.
- Hastuti, P. (2019). *Genetika obesitas*. UGM PRESS.
- Huda, N., Herowati, R., & Nurrochmad, A. (2020). Aktivitas Fraksi-Fraksi Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus Australis Poir.*) Terhadap Fungsi Hati Tikus Putih Model Hiperkolesterolemia Yang Diberi Diet Tinggi Lemak. *Jurnal Farmasi & Sains Indonesia*, 3(2), 28-36.
- Jayadi, Y. I. *Potensi Manfaat Madu: Obesitas, Profil Lipid dan Diabetes Mellitus tipe 2*. GUEPEDIA.
- Lamanepa, M. E. L. (2005). *Perbandingan Profil Lipid Dan Perkembangan Lesi Aterosklerosis Pada Tikus Wistar Yang Diberi Diet Perasan Pare Dengan Diet Perasan Pare Dan Statin (The Comparison Of Lipid Profile And The Progression Of Atherosclerotic Lesion Between Momordica Charantia Juice Dietary With And Without Statin On Wistar Rats)(The Comparison Of Lipid Profile And The Progression Of Atherosclerosis Lesion Between Momordica Charantia Juice Dietary With And Without Statin On Wistar Rats)* program Pascasarjana Universitas Diponegoro].
- Muhammad, R. F. (2020). *Pengaruh ekstrak Etanolik Daun Lampes (Ocimum sanctum L.) terhadap luas Fatty Streak Aorta kelinci model Aterosklerosis Universitas Islam Negeri Maulana Malik*

- Ibrahim].
- PerlakuanVCO, S., & Harini, M. (2022). Kadar Kolesterol Darah Dan Ekspresi VCAM-1 Pada Endotel Aorta Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L) Hiperkolesterolemik.
- Rulitasari, D. D. (2016). *Pemodelan Prevalensi Penyakit Jantung Koroner Dengan Pendekatan Geographically Weighted Regression Di Jawa Timur Tahun 2013* Institut Technology Sepuluh Nopember].
- Sargowo, D. (2015). *Patogenesis aterosklerosis*. Universitas Brawijaya Press.
- Wulandari, A., & Rahmawati, R. D. (2019). Tingkat Ploidi Paku Sayur (*Diplazium Esculentum*) Pada Ketinggian Yang Berbeda Di Gunung Merbabu, Boyolali, Jawa Tengah, Indonesia. *Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi*, 5(1), 11-15.
- Yohana, Y., Rahayu, C., & Destriana, B. S. (2020). Hubungan Nilai D-Dimer Dan LDL Kolesterol Pada Penderita Stroke Iskemik Di RSUD BUDHI ASIH Jakarta Timur. *Anakes: Jurnal Ilmiah Analisis Kesehatan*, 6(2), 114-125.