

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit kardiovaskuler adalah penyebab kematian nomor satu di dunia. *World Health Organization* (WHO) melaporkan 30% dari total kematian dunia disebabkan karena penyakit jantung koroner atau sekitar 17,3 juta orang meninggal karena penyakit kardiovaskuler pada tahun 2008. Jumlah angka tersebut diperkirakan 7,3 juta orang meninggal karena jantung koroner, dan 6,2 juta orang karena *stroke*, jika tidak diantisipasi dengan baik diperkirakan 23,3 juta orang akan meninggal karena penyakit jantung koroner pada tahun 2030 (WHO, 2013).

Salah satu faktor penyebab penyakit jantung koroner adalah hiperkolesterolemia. Hiperkolesterolemia adalah suatu keadaan dimana terdapat peningkatan kadar kolesterol dalam darah di atas 200mg/dl setelah 9-12 jam puasa pada manusia, di atas 300mg/dl pada anjing, dan di atas 200mg/dl pada kucing (Kreisberg and Reusch, 2005). Hiperkolesterolemia dapat menyerang anjing dan kucing, hiperkolesterolemia sering menyerang ras anjing *Schnauzer, German Shepherd, Cocker Spaniel, Bichon Frise, dan cross-breed* (Barriga, 2011).

Hiperkolesterolemia sangat berkaitan dengan sistem peredaran darah karena kolesterol akan beredar keseluruh tubuh melewati jantung sebagai regulator darah dari dan ke seluruh tubuh, LDL teroksidasi akan mengendap pada endotel jantung dan mempengaruhi kinerja jantung. Kadar kolesterol yang mengalami peningkatan akan memacu peningkatan LDL teroksidasi didalam tubuh. LDL teroksidasi akan melekat pada endotel, selanjutnya terjadi adhesi

leukosit pada endotel, leukosit akan terdifrensiasi menjadi makrofag, LDL yang teroksidasi ditangkap oleh makrofag melalui reseptor LDL scavenger sehingga makrofag dipenuhi oleh lemak, yang dinamakan foam cell (Kontush, et al., 2006). Foam cell yang teraktifasi akan mensekresi sitokin proinflammatory yaitu TNF- $\alpha$  serta IL-1.

Kolesterol akan diubah menjadi asam empedu sebelum dikeluarkan dari tubuh. Sintesis asam empedu melibatkan asam kolat dan asam kenodoksilat dikatalis dengan 7 $\alpha$ -hidroksilase melibatkan NADPH, sitokrom p-450 oksidase dan oksigen. Oksigen ini mudah tereduksi menjadi radikal bebas (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), yang mampu berikatan dengan PUFA (Polyunsaturated Fatty Acid) menjadi peroksida lipid. Peroksida lipid akan terbentuk dalam rantai panjang yang akan merusak organisasi sel, terutama membran sel. Pengukuran tingkat peroksidase lipid tersebut diukur dengan mengukur produk akhirnya yaitu malondialdehyde (MDA)

Usaha penanganan pasien hiperkolesterolemia harus terus ditingkatkan diantaranya, melalui terapi medis, mengubah kebiasaan, dan mengonsumsi makanan yang dapat menurunkan kolesterol. Yogurt diduga dapat menurunkan kolesterol dalam darah karena yogurt susu kambing mengandung biopeptida-biopeptida seperti alfa lactalbumin, immunoglobulin, dan lactoferin. Peptida tersebut diduga memiliki sifat yang dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah dengan mekanisme antioksidan yang nantinya akan menurunkan lipid peroksidase dan menurunkan LDL yang teroksidasi, sehingga kadar kolesterol didalam darah akan berkurang. Yogurt mengandung probiotik yang mampu menghasilkan enzim BSH yang membantu menghidrolisis garam empedu sehingga

kolesterol yang dibuang dari tubuh semakin tinggi, yogurt juga mengandung vitamin E dan biopeptida yang diduga dapat menurunkan radikal bebas dalam tubuh melalui mekanismenya sebagai antioksidan (Voet *et al.*,1999). Berdasarkan latar belakang belakang di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek terapi *yogurt* susu kambing terhadap tikus model hiperkolesterolemia dengan pengamatan ekspresi TNF- $\alpha$  dan kadar MDA organ jantung.

### 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat pengaruh kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada organ jantung tikus model hiperkolesterolemia dari pemberian *yogurt* susu kambing?
2. Apakah terdapat pengaruh ekspresi TNF- $\alpha$  pada organ jantung tikus model hiperkolesterolemia dari pemberian *yogurt* susu kambing?

### 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari UHP Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan umur 8-12 minggu dan berat badan antara 130-180 gram. Penggunaan hewan model telah mendapatkan sertifikat Laik Etik No: 217-KEP-UB.
2. Pembuatan keadaan hiperkolesterolemia pada hewan model tikus dilakukan dengan cara induksi diet hiperkolesterolemia yang dilakukan selama 14 hari (Gani, 2013).

3. *Yogurt* susu kambing dibuat menggunakan starter *Yogourtmet* dengan No. Seri (*Lyo-SAN INC:500 Aeroparc, C. P. 598 Lachute, QC. Canada*) dengan kandungan starter *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, dan *Lactobacillus bulgaricus*, komposisi  $10^9$  CFU/ml dalam bentuk *freeze dried*. Terapi *yogurt* diberikan selama 28 hari dengan dosis 300mg/BB, 600mg/BB, dan 900 mg/BB.
4. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- $\alpha$  dengan metode imunohistokimia dan kadar MDA dengan menggunakan uji TBA (*Tiobarbituric Acid*).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui kemampuan *yogurt* susu kambing dalam mempengaruhi kadar MDA pada jantung tikus model hiperkolesterolemia.
2. Mengetahui kemampuan *yogurt* susu kambing dalam mempengaruhi ekspresi TNF- $\alpha$  pada jantung tikus model hiperkolesterolemia.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan memberi informasi pemanfaatan *yogurt* susu kambing dapat digunakan sebagai bahan alternatif terapi hiperkolesterolemia serta memberikan referensi untuk penelitian *yogurt* susu kambing terhadap perkembangan penyakit hiperkolesterolemia.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Hewan Model Tikus Hiperkolesterolemia

Tikus putih adalah hewan model yang paling sering digunakan sebagai hewan coba karena memiliki beberapa kelebihan diantaranya, mudah mendapatkan kelompok dengan ukuran yang seragam, mudah untuk melakukan sonde lambung karena tidak akan terjadi respon muntah. Tikus putih juga memiliki fisiologi dan respon endokrin yang mirip dengan manusia sehingga cocok untuk hewan coba (Zidni, 2010).

*Rattus norvegicus* adalah golongan tikus putih yang sering digunakan sebagai hewan coba karena telah diketahui sifat-sifatnya secara lebih lengkap, mudah dipelihara, kemudian memiliki kesehatan yang relatif stabil, dan ukuran tubuhnya tidak terlalu besar ataupun kecil. Morfologi dari *Rattus norvegicus* antara lain memiliki berat 150-600 gram, panjang badan sekitar 18-25 cm, hidung tumpul, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23mm (Depkes 2011).

Berikut ini klasifikasi tikus putih menurut Myres & Armitage (2004).

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Subkelas	: Theria
Ordo	: Rodensia
Subordo	: Sciurognathi

Famili : Muridae  
Subfamili : Murinae  
Genus : *Rattus*  
Species : *Rattus norvegicus*

Tikus putih jantan galur *wistar* sering digunakan sebagai hewan coba karena hormonalnya lebih stabil dibandingkan dengan tikus betina yang cenderung berfluktuasi sehingga akan mempengaruhi hasil penelitian. Persiapan hewan coba (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan model hiperkolesterolemia melalui pemberian diet hiperkolesterol. Diet hiperkolesterol terdiri dari kuning telur puyuh yang telah direbus, minyak babi serta asam kholat. Diet ini akan mendorong peningkatan kadar *Trigliserida* (TG) dan kolesterol dalam tubuh tikus, yang akan menyebabkan aktivitas enzim *lipoprotein lipase* menurun sehingga terjadi keadaan hiperkolesterolemia (Gani *et al.*, 2013). Kadar normal kolesterol total dari tikus adalah 10-54mg/dl (Kusumawati, 2004). Kadar normal LDL tikus 17-22 mg/dl, HDL 77-84 mg/dl, dan kadar normal *trigliserida* tikus adalah 26-145 mg/dl (Ratnayanti, 2011).

## 2.2 Hiperkolesterolemia

Kolesterol disintesis di banyak jaringan di seluruh tubuh dari *asetil* KoA dan prekursor lain berupa steroid, diantaranya asam empedu, hormon seks, kortikosteroid, dan vitamin D. Tubuh dapat mensintesis kolesterol sendiri setengah dari kebutuhannya dan sisanya dipenuhi dari asupan makanan. Jaringan yang memiliki sel bernukleus juga melakukan sintesis kolesterol, sintesisnya berada di *reticulum endoplasma* dan sitosol (Murray *et al.*, 2003).

Kolesterol disintesis di dalam tubuh melalui beberapa tahapan diantaranya, *Asetil-CoA* disintesis menjadi *mevalonat*, *mevalonat* di bentuk menjadi unit-unit *isoprenoid* dengan disertai kehilangan  $\text{CO}_2$ . Enam unit *isoprenoid* terkondensasi membentuk *lanosterol*, *lanosterol* membentuk kolesterol. Sintesis kolesterol melibatkan kondensasi dua molekul *asetil-KoA* menjadi *asetoasetil-KoA*, kemudian dikatalis oleh tiolase. *Asetoasetil-KoA* terkondensasi kembali dengan *asetil-KoA* yang lain dan akhirnya membentuk *3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA* (HMG-KoA), selanjutnya dikatalis oleh HMG-KoA sintase. HMG-KoA yang terbentuk kemudian direduksi oleh NADPH menjadi *mevalonat*, lalu dikatalis oleh HMG-KoA *reduktase*. Proses ini adalah proses regulasi dari sintesis kolesterol dan merupakan tahapan yang digunakan kebanyakan obat penurun kolesterol untuk menghambat pembentukan kolesterol (Murray *et al.*, 2003)

Proses terjadinya hiperkolesterolemia berasal dari lemak berlebih dari makanan yang mengalami proses pencernaan melewati usus yang disebut sebagai asam lemak bebas, *trigleserida*, *phosfolipid* dan kolesterol yang akan diserap usus dalam bentuk *kilomikron* selanjutnya dipecah dan beredar ke hati dan mengalami proses seleksi menjadi kolesterol. Sebagian kolesterol akan dialirkan ke empedu sebagai asam empedu dan bagian lainnya bersamaan dengan *trigliserida* berikatan dengan protein tertentu (*apoprotein*) lalu membentuk *Very Low Lipoprotein* (VLDL), kemudian oleh enzim lipoprotein memecah VLDL menjadi *Intermediet Density Lipoprotein* (IDL). IDL ini tidak akan bisa bertahan selama 2-6 jam karena akan diubah menjadi *Low Density Lipoprotein* (LDL) (Soeharto, 2004).

### 2.3 Efek Hiperkolesterol Terhadap Kadar MDA pada Jantung

Radikal bebas didefinisikan sebagai suatu atom, gugus, atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak memiliki pasangan pada orbital terluarnya, termasuk atom hidrogen, logam-logam transisi dan molekul oksigen. Radikal bebas dapat bermuatan positif (*kation*), negatif (*anion*), atau tidak bermuatan (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Radikal bebas dapat bersumber dari dalam tubuh (endogen) dan luar tubuh (eksogen), dari dalam tubuh contohnya berasal dari proses metabolisme tubuh seperti superoksida ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan oksida nitrit ( $NO^+$ ). Radikal bebas dari luar tubuh meliputi asap rokok, polusi udara, sinar UV, pestida, makanan yang tidak sehat (Halliwell and Gutteridge, 2000).

Normalnya radikal bebas berdiri sendiri hanya dalam waktu yang singkat sebelum menyatu dengan atom lainnya. Radikal bebas dapat bereaksi secara cepat dengan atom lain untuk mengisi orbital yang tidak memiliki pasangan. ROS (*Reactive Oxygen Species*) adalah turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif dan merupakan senyawa pengoksidasi terdiri atas kelompok radikal bebas dan non radikal. Berikut ini beberapa kelompok radikal bebas antara lain *Superoxide Anion* ( $O_2^-$ ), *Hydroxyl Radicals* (OH), dan *Peroxyl Radicals* ( $RO_2$ ), non radikal misalnya *Hydrogen Peroxide* ( $H_2O_2$ ), dan *Organic Peroxides* (ROOH) (Halliwell and Whiteman, 2004).

Tubuh dalam keadaan normal memproduksi radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif lainnya jumlah tertentu sebagai bentuk pertahanan tubuh, misalnya sel darah putih menghasilkan  $H_2O_2$  untuk membunuh beberapa jenis bakteri dan



jamur serta pertumbuhan sel, namun mekanisme ini sasarannya tidak spesifik, akibatnya selain menyerang target juga akan menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membran sel, organel sel, atau DNA, sehingga berdampak pada kerusakan struktur dan fungsi sel (Winarsi, 2007). Tubuh dilengkapi perangkat pertahanan antioksidan antara lain *Superoxidase Dismutase* (SOD) pada mitokondria dan sitosol, *Glutathione Peroxidase* (GPX), *Glutathione reductase*, dan *kalatase* untuk mencegah kerusakan akibat radikal bebas (Jackson, 2005). Stres oksidatif terjadi apabila produksi radikal bebas melebihi sistem pertahanan tubuh (Agarwal *et al.*, 2005).

Stres oksidatif merupakan keadaan ketika jumlah antioksidan tubuh tidak mencukupi untuk meredam efek buruk radikal bebas yang merusak membran sel dan protein DNA, dalam waktu berkepanjangan maka akan mengakibatkan penumpukan hasil kerusakan oksidatif di dalam sel atau jaringan yang menyebabkan kehilangan fungsi normalnya dapat berujung kematian sel (Bagiada, 2001).

Hubungan kolesterol dan radikal bebas terletak pada sintesis asam empedu, karena kolesterol dieliminasi dari tubuh harus terlebih dahulu menjadi asam empedu. Sintesis asam empedu melibatkan dua komponen yaitu asam kolat dan asam kenodoksilat yang dikatalis dengan  $7\alpha$ -hidroksilase. Reaksi  $7\alpha$ -hidroksilase melibatkan NADPH, sitokrom p-450 dan oksigen, oksigen ini sangat mudah tereduksi menjadi  $O_2^-$  atau sering disebut *Reactive Oxygen Spesies* (ROS). Radikal bebas akan berikatan dengan *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) menjadi lipid peroksidase.  $O_2^-$  yang terikat dengan sitokrom p-450 merupakan intermediet

dalam pengaktifan oksigen pada berbagai reaksi hidroksilasi, dengan demikian peningkatan aktifitas sitokrom p-450 dalam memperantari reaksi hidroksilase membuat radikal bebas yang terbentuk semakin banyak (Mayes, 2012). Peningkatan produksi ROS akan diikuti dengan meningkatnya kadar MDA dalam sel sebagai produk akhir dari lipid peroksidase (Winarsih, 2007).

#### **2.4 Efek Hiperkolesterol Terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) pada Jantung**

Kolesterol memiliki peranan penting pada kerusakan sel-sel endotel, LDL yang teroksidasi akan merusak endotel. Endotel akan lebih *permeable* terhadap lipoprotein, sehingga LDL dapat melakukan penetrasi ke dinding *vascular* menuju tunika intima dan kemudian terjadi oksidasi LDL. Oksidasi LDL akan merangsang ekspresi dari VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) dan MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein-1*). VCAM-1 dan MCP-1 akan menarik monosit ke dinding arteri, akibat adanya respon atas diproduksinya agen lokal *Monocyte Colony Stimulating Factor* (MCSF) monosit akan terdifrensiasi menjadi makrofag. Makrofag akan mengalami immobilisasi pada *subendotel*. LDL yang teroksidasi ditangkap oleh makrofag melalui reseptor LDL *scavenger* sehingga makrofag dipenuhi oleh lemak, ini yang dinamakan *foam cell* (Kentush, *et al.*, 2006). Peranan HDL disini adalah penghambatan proses aterosklerosis dengan mempertahankan integritas endotel, relaksasi pembuluh darah, menghambat adesi sel pada endotel, menurunkan platelet dan sistem koagulasi, (Martens, *et al.*, 2001). *Foam cell* mensekresi sitokin-sitokin diantara TNF- $\alpha$  maupun IL-1 serta *Matrix Metalloproteinase* (MMP), sitokin ini berperan dalam pecahnya *plaque*

dan *aterogenesis*. Peningkatan Kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 akan meningkatkan ekspresi molekul-molekul adhesi dan perekrutan monosit dalam perkembangan lesi (Hartanto, 2009).

*Tumor Nekrosis Factor-alpha* atau sering dikenal TNF- $\alpha$  adalah molekul pleiotropik yang disekresikan terutama oleh makrofag yang teraktivasi dan sel T, molekul ini juga dapat dihasilkan oleh sel-sel lain seperti sel mast, sel NK, neutrofil, sel endotel, sel otot jantung, sel otot polos, *fibroblast*, dan osteoklas (Fiers, 1991). TNF- $\alpha$  bermanfaat bagi organisme, diantaranya untuk kekebalan bawaan dan respon awal terhadap patogen, tetapi juga membantu untuk mempromosikan Th1 kekebalan (Palladino, 2003). TNF- $\alpha$  juga memiliki efek biologis sebagai protein *immunomodulator* (memodulasi pertumbuhan dan difrensiasi sel B dalam produksi antibodi), mengaktifkan makrofag dan monosit, merangsang hemapoitis, sitotoksik dan sitostatik langsung terhadap berbagai tahap pertumbuhan sel tumor. TNF- $\alpha$  juga memiliki kemampuan untuk menginduksi sitokin lain seperti IL-1, IL-6, IL-8 dan IFN- $\beta$ . Sitokin-sitokin *proinflamantory* yang memiliki peran yang paling penting adalah TNF- $\alpha$ , sehingga kehadiran TNF- $\alpha$  dapat digunakan sebagai indikator bahwa sel mengalami stres oksidatif, apoptosis, atau nekrosis (Park, *et al.*, 1994)

## 2.5 Susu Kambing

Susu kambing memiliki kelebihan pada komposisinya yang mendekati air susu ibu (ASI), yang mengandung *fluorine* kadarnya 10-100 kali lebih tinggi daripada susu sapi, susu kambing bersifat basa sehingga aman bagi tubuh, memiliki protein yang lembut, tidak mudah menyebabkan diare karena efek

laksatifnya rendah. Lemak susu kambing juga mudah dicerna karena memiliki tekstur yang lembut dan halus, lebih kecil dibandingkan dengan butiran lemak susu sapi atau susu lainnya, dan bersifat homogen alami. Butiran lemak susu sapi sebesar 4,55  $\mu\text{m}$ , sedangkan susu kambing hanya 3,49  $\mu\text{m}$ , ini mempermudah hati dalam pencernaannya sehingga menekan timbulnya reaksi alergi. Susu kambing mengandung vitamin A, B1, B2, B3, B4, C, dan E (Park, *et al.*, 2007).

Susu kambing berbeda dengan susu lainnya, susu kambing dapat digunakan sebagai pengganti susu sapi pada bayi yang mengalami *Hypo-Allergenic Infant Food*. Susu kambing tidak mengandung aglutinin, akibatnya globula lemak susu kambing tidak mengalami klasterisasi sehingga lebih mudah dicerna, susu kambing mengandung kadar laktosa yang lebih rendah (4,5%) sedangkan susu sapi (4,7%). Kondisi ini sangat baik bagi orang mengalami intoleransi laktosa (Setiawan dan Tanius, 2002). Susu kambing juga mengandung MCT (*medium-chain triglycerides*) sehingga mudah dicerna (Lopez, *et al.*, 2005).  $\alpha_{\text{s1}}$ -casein dan  $\beta$ -lactoglobulin pada susu kambing relatif lebih sedikit dibandingkan dengan susu sapi, sehingga susu kambing cenderung tidak menyebabkan alergi. Kedua peptida tersebut yang biasanya dapat menyebabkan alergi, namun  $\beta$ -lactoglobulin mudah rusak jika dipanaskan sehingga yang paling berpengaruh terhadap alergi adalah  $\alpha$ -casein (Tomotake, *et al.*, 2006).

Pengonsumsi susu kambing yang telah diasamkan atau disebut juga *yogurt*, akan mempermudah tubuh untuk mencerna susu tersebut, ini dikarenakan saluran pencernaan lebih mudah mencerna bahan makanan yang melewati saluran pencernaan jika sifatnya sama. *Yogurt* berkhasiat untuk mengaktifkan bakteri baik

di dalam usus sehingga dapat memperbaiki dan menyempurnakan fungsi pencernaan makanan dalam usus (Damayanti, *et al.*, 2002)

*Yogurt* susu kambing mengandung peptida yang bermanfaat bagi tubuh diantaranya *lactoferin*, *alfa lactalbumin*, *beta lactoglobulin* dan *alfa casein*. Susu kambing diduga terdapat *beta lactoglobulin* dalam jumlah yang besar, *beta lactoglobulin* ini adalah bagian molekul hidropobik yang dapat mengikat vitamin A, vitamin D, calcium dan FAs. *Beta lactoglobulin* ini memiliki sifat antihipersensitif, antitrombotik, opioid, antimikroba, immunomodulator, dan hipokolesterolemik (Bealieu, 2006). Dilaporkan pula diduga *beta lactoglobulin* ini juga memiliki sifat mencegah aktifitas radikal bebas (Hernandez, *et al.*, 2007). Peptida ini juga dapat menstimulasi kontraksi otot polos (Yoshida and Owen, 2005) dan dapat digunakan sebagai pencegahan bagi penderita alergi terhadap susu. Karena peptide ini mengurangi produksi IgE yang berperan sebagai alergi terhadap beberapa protein tertentu (Pecquet, *et al.*, 2000). Lactoferin juga memiliki kemampuan untuk menurunkan tingkat stres oksidatif dengan mengikat besi ( $Fe^{+2}$ ) dan membawanya keluar tubuh, besi berfungsi sebagai katalisator dalam mempercepat terjadinya stres oksidatif (Rousseou, *et al.*, 2013).

## 2.6 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat memiliki potensi menguntungkan bagi inangnya apabila dikonsumsi dalam keadaan hidup dan akan tetap hidup dalam saluran pencernaan (Gunawan, 2003). Keuntungan mengkonsumsi probiotik lainya adalah untuk

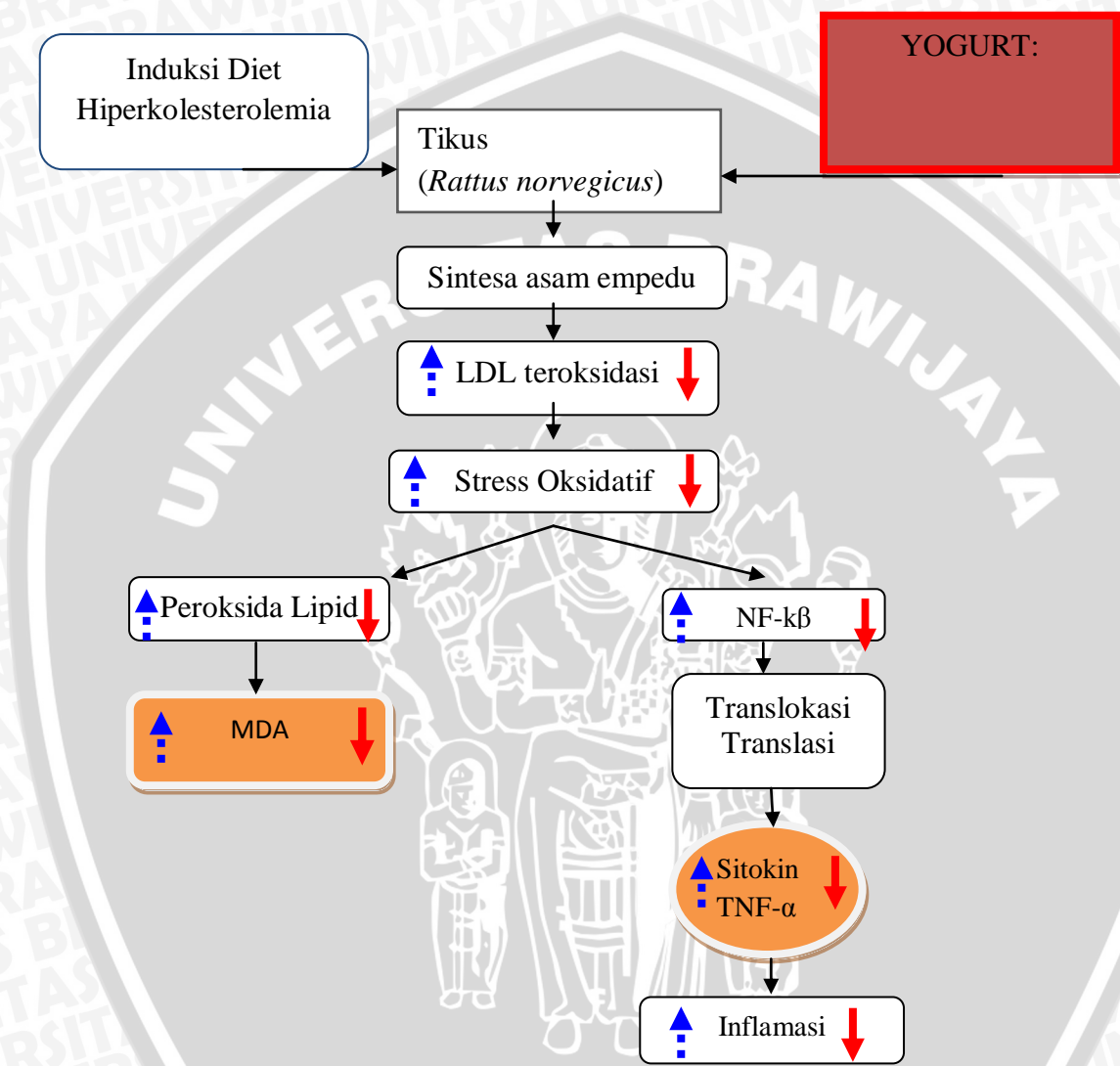
menstabilkan mikroflora usus, mereduksi konsentrasi kolesterol pada serum, mencegah terjadinya diare, dan sembelit (Kartini, 2002).

Bakteri asam laktat dapat mengurangi kolesterol dengan jalan mengikat kolesterol di aliran darah kemudian dibawa menuju usus halus untuk dibuang melalui feses (Usman dan Hasono, 2000). Menurut Voet, *et al.*, (1999), penurunan kolesterol terjadi dikarenakan mikroba menghasilkan senyawa yang akan berkompetisi dengan HMG KoA untuk berikatan dengan enzim HMG KoA reduktase.

Menurut Shrivastava, *et al.*, (2013) pemberian bakteri asam laktat *Lactobacillus acidophilus* terhadap hewan coba berpengaruh signifikan terhadap penurunan kolesterol di dalam plasma darah. *Lactobacillus acidophilus* memiliki potensi antioksidan yang tinggi sehingga dapat mengurangi lipid peroksida dan dapat menormalkan aktifitas enzim antioksidan.

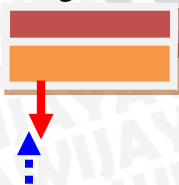
### BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan Gambar :



- : Variabel bebas
- : Variabel terikat
- : Penurunan akibat pemberian Yogurt susu kambing
- : Peningkatan akibat pemberian diet hiperkolesterol

Pemberian diet hiperkolesterol berupa rebusan kuning telur puyuh, minyak babi, dan asam kolat seperti pada **Lampiran 4** akan mengakibatkan suatu gangguan metabolik kolesterol yang menyebabkan terjadinya penyakit hiperkolesterolemia, mekanismenya adalah *feed intake* diet kolesterol maupun pakannya akan diserap usus. Kolesterol yang terserap akan dibawa ke jaringan ekstra hepatic untuk dihidrolisis yang selanjutnya dilakukan proses sintesa empedu. Dalam proses ini kolesterol akan diubah menjadi asam empedu untuk dapat dikeluarkan oleh tubuh sebagaimana lain akan diedarkan keseluruh tubuh dalam bentuk LDL. Semakin banyak kolesterol yang disintesa menjadi asam empedu maka semakin banyak pula radikal bebas yang terbentuk. Radikal bebas berupa  $O_2^-$  (*Reactive Oxygen Spesies*) akan beredar mengikuti aliran darah bersama LDL yang akan teroksidasi dan menempel pada sel otot jantung. Pada keadaan normal mitokondria akan merespon radikal bebas dengan menghasilkan anti oksidan tubuh berupa *Super Oxidase Dismutase* (SOD) yang akan berikatan dengan ion ( $Cu^{+2}$ ) dan ROS menghasilkan  $H_2O_2$  yang berikatan dengan enzim katalase dan *Glutation Peroxidase* (GPX) menjadi senyawa tidak reaktif berupa  $H_2O$  dan  $O_2$ . Namun dalam keadaan hiperkolesteolemia jumlah ROS berlebih yang menyebabkan antioksidan dalam tubuh tidak mencukupi, akibatnya  $H_2O_2$  yang terbentuk akan berikatan dengan  $Fe^{+2}$  membentuk radikal hidroksil (OH). Radikal hidroksil ini sangat reaktif terhadap membran sel yang terdiri dari *Poly Unsaturated Faty Acid* (PUFA) membentuk peroksida lipid yang akan menghasilkan produk berupa MDA.



Terjadinya stress oksidatif akibat oksidasi LDL pada membran sel akan merangsang ikatan *Inhibitor Kappa Beta* ( $I\kappa\beta$ ) dengan *Nuclear Factor Kappa Beta* ( $NF-\kappa\beta$ ) terlepas dan mengaktifkan  $NF-\kappa\beta$  pada sitosol untuk melakukan translokasi ke inti dan menempel pada gen inflamasi. Selanjutnya terjadi transkripsi mRNA, dan translasi yang akan berakhir dengan disintesisnya berbagai protein pada sistem imun seperti protein sitokin proinflamasi ( $TNF-\alpha$ ,  $IL-1$ ) yang berperan mengendalikan respon imun inflamasi.

Bakteri asam laktat dapat menempati filia-filia usus kemudian menyerap sebagian kolesterol untuk perkembangannya, bakteri asam laktat juga dapat mengkonjugasi asam empedu dan menghasilkan enzim BSH. Mekanisme-mekanisme itulah yang dapat mengurangi level kolesterol. Di dalam yogurt susu kambing terdapat pula vitamin E, dan peptida yang diduga memiliki mekanisme dalam menurunkan inflamasi dengan mengurangi keadaan stress oksidatif.

### **Hipotesis Penelitian**

Berdasarkan rumusan masalah, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Pemberian terapi yogurt susu kambing pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hiperkolesterolemia dapat menurunkan kadar MDA organ jantung.
2. Pemberian terapi yogurt susu kambing pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hiperkolesterolemia dapat menurunkan ekspresi  $TNF-\alpha$  pada organ jantung.

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Laboratorium Fisiologi Hewan dan Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Gedung FAAL Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Farmasi Universitas Airlangga, dan Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit dr. Soetomo Surabaya. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2013-Juli 2014.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat pendukung yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: kandang tikus, botol minum tikus, *animal restrain*, alat sonde lambung, timbangan, gelas ukur, labu ukur, corong kaca, tabung *erlenmeyer*, spuit, tabung *polypropilen*, pipet ukur, *bulb*, *aluminium foil*, *scalpel*, *pinset*, cawan *petri*, bunsen, *spatula*, auto mikro pipet, gunting, alat *sentrifuge*. Alat Utama yang digunakan antara lain pH meter (*Eutech Instrument Cyberscan pH 310*), *pH indicator*, objek glass, *bekker glass*, mesin *freeze dry (Christ Beta I-8 K)*, *thermometer*, spektrofotometer (*Genesys 20*), mikroskop cahaya (*Olympus BX51*) dan kamera (*Olympus DP71*).

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan (usia 8-12 minggu berat 130-180 gram) diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta, susu kambing yang diperoleh dari Balai Besar Pelatihan Peternakan (BBPP), kuning telur puyuh, asam kholat, minyak babi, PBS, PFA, starter yogurt (*Yogourmet Yogurt Starter*

LYO-SAN.INC 500 Aeroparc.C.P.598, Lachute, QC. CANADA, J8H 4G4), alkohol, spiritus, water steril, akuades dan NaCl fisiologis 0,9%, PFA, xylol, paraffin, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95% dan pakan SP(standar)

### 4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian sebagai berikut:

1. Rancangan percobaan dan preparasi hewan coba tikus.
2. Preparasi *Yogurt*
  - Starter
  - *Yogurt*
  - Freeze dried
3. Pemberian pakan standart, diet kolesterol dan terapi hiperkolesterolemia
4. Preparasi hewan model hiperkolesterolemia hasil diet hiperkolesterol.
5. Pengukuran kadar MDA organ jantung
6. Pengukuran ekspresi TNF- $\alpha$  organ jantung hewan model hiperkolesterolemia

### 4.4 Prosedur Kerja

#### 4.4.1 Rancangan Percobaan dan Preparasi Hewan Coba Tikus

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan meliputi kelompok kontrol sehat, kontrol hiperkolesterolemia, terapi dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan terapi 900 mg/kg BB. Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan rumus perhitungan menurut Montgomery and Kowalsky (2011) sebagai berikut:

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan

P = jumlah kelompok (terdiri dari empat macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk sampel menjadi 5 kelompok diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

**Tabel 4.1 Rancangan penelitian**

Variabel yang Diamati	
Ekspresi TNF- $\alpha$ dan Kadar MDA Jantung	Perlakuan
Kelompok A	Kontrol sehat
Kelompok B	Kontrol hiperkolesterol
Kelompok C	Terapi <i>yogurt</i> dengan dosis 300 mg/kg/BB
Kelompok D	Terapi <i>yogurt</i> dengan dosis 600 mg/kg/BB
Kelompok E	Terapi <i>yogurt</i> dengan dosis 900 mg/kg/BB

Untuk diagram alir kerangka operasional dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

Berikut adalah variabel yang diamati dalam penelitian ini:

- Variabel bebas : Dosis *yogurt* susu kambing 300 mg/kg BB, 600 mg/kg

BB, dan 900 mg/kg BB.

- Variabel terikat : Ekspresi TNF- $\alpha$  dan kadar MDA organ jantung
- Variabel kontrol: Umur, berat badan, jenis kelamin, tikus jenis wistar

Saat pertama tikus datang, tikus ditimbang kemudian diberi pakan dan air minum *ad libitum*, ditempatkan dalam kandang dengan ukuran 17,5 cm x 23,75 cm x 17,5 cm berbahan plastik dilengkapi penutup berupa anyaman kawat besi. Kandang diletakkan di tempat yang tidak terpapar matahari secara langsung, memiliki suplai udara yang cukup. Sebelum diberikan perlakuan, semua tikus diaklimatisasi selama 7 hari.

#### 4.4.2 Preparasi *Yogurt*

##### 4.4.2.1 Starter

Susu kambing sebanyak 50ml dimasukkan *erlenmeyer* dan ditutup *aluminium foil* kemudian dipasteurisasi pada suhu 72<sup>0</sup>C selama  $\pm$ 5 menit, suhu susu ditunggu turun hingga menjadi 45<sup>0</sup>C. Sebanyak 0,25 gram starter ditambahkan 50 ml susu kemudian dihomogenkan, selanjutnya diinkubasi pada suhu 45<sup>0</sup>C selama  $\pm$  4 jam. Tahap selanjutnya *mother culture* didiamkan selama 4-5 menit, kemudian diukur pH hingga mencapai 4,5-5.

##### 4.4.2.2 *Yogurt*

Pembuatan *yogurt* dimulai dengan melakukan persiapan alat dan bahan, 1,4 liter susu kambing yang telah dipasteurisasi kedalam tabung penyimpanan dan ditutup menggunakan *aluminium foil*. Starter sebanyak 50 ml dari sediaan *mother culture* ditambahkan ke dalam susu kambing, dosis *starter* yang diberikan adalah 3% dari volume susu kambing, starter yang telah dicampur ke dalam susu

kambing diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 45°C selama 4 jam. Ditunggu 4 sampai 5 menit dilanjutkan pengukuran pH *yogurt* dengan menggunakan pH meter hingga mencapai pH 4,5 sampai 5.

#### 4.4.2.3 *Freeze dried Yogurt*

Pembuatan *freeze dried* dilakukan di laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia UNAIR menggunakan alat dengan merek *Christ*. Langkahnya adalah *yogurt* dimasukan kedalam *beker glass* sebanyak 250 ml. Botol dipasang pada alat pemutar, botol harus menyentuh permukaan etanol. Botol diputar selama 5-7 menit pada suhu -33°C sampai *yogurt* berbentuk es. Botol dilepas kemudian dipasangkan pada selang penyublim vakum. Proses berikutnya dilakukan penyubliman dimana udara hangat dialirkan ke dalam tabung yang berisi *yogurt* beku sampai menimbulkan uap. Uap yang dihasilkan ditangkap oleh mesin spiral sehingga air pada *yogurt* akan terserap keluar dan yang tertinggal sari-sari dari *yogurt*. *Yogurt* akan berubah menjadi serbuk dalam waktu 14 jam. Penguapan diatur oleh sensor di alat, dan proses pembuatan *yogurt freeze dried* selesai *freeze dried* disimpan di dalam refrigerator dengan suhu sekitar 4°C sampai dibutuhkan kembali.

#### 4.4.3 Pemberian Diet Kolesterol dan Terapi Hiperkolesterolemia

##### 4.4.3.1 Diet Kolesterol

Metode pakan diet kolesterol yang digunakan berdasarkan Gani, *et al.*,(2013), pakan diet hiperkolesterol dibuat dari asam kholat 0,02 gram, minyak babi 2 gram, dan kuning telur puyuh rebus 1 gram yang dicampurkan. Pakan diet hiperkolesterol diberikan setiap hari dengan metode *force feeding* dengan sonde

lambung per tikus sebesar 3,02g yang diencerkan dengan air 2ml, kemudian setelah  $\pm$  1 jam dilakukan pemberian pakan standart SP sejumlah 20 gram per ekor. Diagram alir pembuatan pakan diet *hiperkolesterol* dapat dilihat pada **Lampiran 4**. Pemberian diet hiperkolesterol dilakukan selama 14 hari pada kelompok tikus Kontrol *hiperkolesterolemia*, tikus terapi dosis 300, 600, dan 900 mg/kg BB.

#### 4.4.3.2 Terapi Hiperkolesterolemia

Metode pemberian *yogurt force feeding* dengan sonde lambung tikus setiap ekor tikus dengan dosis 300 mg/kg BB digunakan untuk kelompok C, dosis 600 mg/kg BB untuk tikus kelompok D, dan dosis 900 mg/kg BB untuk tikus kelompok E. Masing-masing kelompok terdapat 4 ekor tikus. Tikus diberi *yogurt* pada hari ke-15 sampai hari ke-42 dengan dicampur 1,5 ml air atau akuades. Perhitungan dosis yang diberikan dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

#### 4.4.3.3 Pakan Standar

Tikus diberikan pakan SP (pakan standar) sebanyak 20 gram per ekor diletakkan di cup dan ditempatkan di dalam kandang. Setiap box dengan jumlah tikus 4 ekor, pakan yang diberikan sebesar 80 gram setiap harinya dan diberikan setelah pemberian diet kolesterol dan terapi hiperkolesterol disetiap pagi.

#### 4.4.4 Preparasi Hewan Model Hiperkolesterolemia Hasil Diet Hiperkolesterolemia

Tikus terlebih dahulu diletakkan di alat *restrain tikus*, darah diambil melalui *vena coccygealis* di ekor, pengambilan sampel dengan cara memotong sedikit ujung ekor tikus. Pemeriksaan serum dilakukan pada hari ke-1, hari ke-14 dan

hari ke-28 tiap kelompok diambil satu sampel. Darah yang diambil ditampung ke dalam tabung polypropilen dan diletakkan dengan posisi miring 45°C agar serum dan darah bisa terpisah dengan sempurna dan dibiarkan mengendap pada suhu kamar 27°C selama  $\pm$  3-4 jam kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan serum  $\pm$ 500 $\mu$ l. Serum tersebut diambil, dimasukkan dalam tabung *polypropilen* yang lain dan masih bersih lalu disimpan pada *refrigerator* dengan suhu 4°C. Pengambilan organ jantung tikus dilakukan pada hari ke-14 untuk kelompok (B) kontrol sehat dan hari ke-42 untuk kelompok (A), (C), (D), dan (E) seperti pada **Lampiran 2**.

Prosedur koleksi organ jantung dapat dilihat pada **Lampiran 5**. Tikus dilakukan dislokasi leher terlebih dahulu, selanjutnya dilakukan pembedahan. Tikus diposisikan rebah dorsal, pembedahan dilakukan pada rongga abdomen sampai thorax, dilakukan pemisahan isi abdomen, setelah terlihat paru-paru dipotong bagian *trachea* dan aorta abdominalis sehingga paru-paru, dan jantung dapat diangkat, pisahkan jantung dan paru-paru. Jantung dicuci dengan NaCl fisiologis 0.9% kemudian dibagi menjadi 2 bagian, sebagian dari potongan jantung direndam pada larutan *Paraformaldehid* (PFA) 4% untuk dilanjutkan uji ekspresi TNF- $\alpha$  dan sebagian dari potongan jantung direndam pada *Phospat Buffer Saline* (PBS) untuk dilanjutkan uji kadar MDA.

#### 4.4.5 Pengukuran Kadar MDA Organ Jantung

Pengukuran kurva standar MDA dilakukan menggunakan metode yang digunakan Aulanni'am, *et al.*,(2012). Larutan kit MDA dengan konsentrasi 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8mg/ml, diambil masing-masing 100  $\mu$ L, ditambahkan 550  $\mu$ L



aquades dan 100  $\mu$ L TCA 100%, selanjutnya di homogenkan. 250  $\mu$ L HCL 1N dan 100  $\mu$ L Na-Thio 1% ditambahkan kedalam tabung dan dihomogenkan menggunakan *vortex*, dilakukan perebusan selama 20 menit dalam suhu 100 derajat celcius, setelah dingin dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil kemudian dibaca pada panjang gelombang maksimum ( $\lambda$  maks =532 nm) menggunakan spektrofotometer. Absorbansi larutan diperoleh dan dibuat kurva standar MDA (**Lampiran 8**)

Organ jantung yang akan dilihat kadar MDA digerus sampai lembut, kemudian memasukkannya kedalam tabung yang berisi EDTA. MDA diukur menggunakan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*. Sebanyak 750  $\mu$ l asam fosfat dimasukan dengan pipet kedalam tabung *polypropilen* 13 ml. Sebanyak 50  $\mu$ l TEP standar/pengontrol kualitas /sampel plasma/ aquades ditambahkan ke dalam tabung. Campuran dikocok sampai homogen, kemudian ditambahkan 250  $\mu$ l larutan TBA 40 mM, lalu ditambahkan aquades sebanyak 450  $\mu$ l ke dalam tabung dan tabung ditutup rapat. Campuran tersebut kemudian dipanaskan selama 1 jam, lalu tabung ditempatkan dalam *ice bath* untuk mendinginkan sampel. Sampel yang telah dingin selanjutnya di masukan kedalam *Set Pack C 18-column*. Diukur absorbansinya dengan menggunakan alat *spectofotometri* dengan panjang gelombang 532 nm (Aulani'am, *et al.*,2012).

#### 4.4.6 Pengukuran Ekspresi TNF- $\alpha$ Organ Jantung

Langkah pertama diawali dengan persiapan alat dan bahan serta mempersiapkan organ yang akan diamati, direndam dalam *xylol* I, *xylol* II lalu di *alkhohol* bertingkat 100%, 90%, 80%,70%, selanjutnya direndam dalam *akuades*

selama 1x5 menit, Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan 3% hidrogen peroksida (dalam *dionize water*) selama 20 menit, dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit dan diblok dengan menggunakan BSA 1% dalam PBS pH 7,4 selama 30 menit dengan suhu ruang. Proses selanjutnya dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan *antibodi primer (Rat Anti TNF- $\alpha$ )* perbandingan 1:100, selama 24 jam dengan suhu 4<sup>0</sup>C dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Berikutnya ditambahkan *Antibodi sekunder berlabel biotin (goat anti rat biotin labeled)* dengan perbandingan 2497,5: 2,5 selama 1 jam suhu ruang, dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit.

Preparat kemudian ditambahkan SA-HRP (*Strepta avidin-Horseradish Peroxidase*) selama 40 menit suhu ruang lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit, selanjutnya *counterstaining* menggunakan *Hematoxylen* selama 5 menit dalam suhu ruang, selanjutnya dicuci dengan air mengalir, dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Tahapan terakhir *dimounting* dengan *entellan*, dilanjutkan pengamatan dengan mikroskop pembesaran 400 kali (Calnek, 1997).

#### 4.5 Analisis data

Data yang diperoleh dari metode *post examination* dari hasil pengukuran ekspresi TNF- $\alpha$  dan kadar MDA organ jantung ditabulasi menggunakan *Microsoft Office Excel*. Data dianalisis menggunakan *SPSS rev.20,0* dengan analisis ragam ANOVA (*Analysis of Variance*). Apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan uji *Tukey*  $\alpha = 5\%$ . Selain itu, ekspresi TNF-  $\alpha$  juga dianalisis secara deskriptif.

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh pemberian yogurt susu kambing terhadap kadar Malondialdehida (MDA) jantung tikus (*Rattus norvegicus*) model hiperkolesterolemia

Pemberian yogurt susu kambing memberikan pengaruh yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar *Malondialdehyde* (MDA) jantung tikus hiperkolesterolemia dengan berbagai perlakuan (**Tabel 5.1**). Hasil perhitungan statistik dianalisis menggunakan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji Tukey dengan tingkat kepercayaan 95%, lebih lengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 12**.

**Tabel 5** Kadar MDA jantung tikus pada setiap perlakuan.

Kelompok Perlakuan	Rata-rata kadar MDA $\mu\text{g/ml}$	Peningkatan terhadap kelompok kontrol sehat (%)	Penurunan Terhadap kelompok hiperkolesterolemia (%)
Tikus kontrol Sehat	0,144 $\pm$ 0,040 <sup>a</sup>	0	-
Tikus Hiperkolesterolemia	0,581 $\pm$ 0,413 <sup>d</sup>	303	-
Terapi yogurt dosis 300 mg/kg	0,368 $\pm$ 0,0361 <sup>c</sup>	-	36,69
Terapi yogurt dosis 600 mg/kg	0,230 $\pm$ 0,023 <sup>b</sup>	-	60
Terapi yogurt dosis 900 mg/kg	0,152 $\pm$ 0,028 <sup>a</sup>	-	73,75

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan ( $p < 0,05$ ).

Berdasarkan **Tabel 5.1** Kadar MDA tikus kontrol sehat digunakan sebagai acuan standar kadar MDA tikus dalam keadaan normal. Kadar MDA tikus sehat sebesar 0,144  $\mu\text{g/ml}$ , ini membuktikan pada keadaan normal juga terdapat stress

oksidatif namun dalam jumlah kecil. Stres oksidatif dalam jumlah kecil dapat bersumber dari lingkungan seperti makanan, asap rokok atau zat radikal lainnya, juga dapat bersumber dari respirasi sel yang menghasilkan produk superoksida ( $O_2^-$ ) dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) sebagai pertahanan sel contohnya pertahanan terhadap bakteri patogen, hal ini sesuai dengan pendapat Jackson (2005) yang menyatakan tubuh dalam keadaan normal didalam tubuh terdapat radikal bebas yang menyebabkan terjadinya stress oksidatif dalam jumlah kecil yang pada akhirnya akan memunculkan MDA.

Hasil analisa statistika menunjukkan kadar MDA kelompok tikus hiperkolesterolemia ( $0,581 \pm 0,413$ )  $\mu\text{g/ml}$  berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dibandingkan kelompok kontrol sehat ( $0,144 \pm 0,040$ )  $\mu\text{g/ml}$  dan terdapatnya peningkatan kadar MDA kelompok hiperkolesterolemia sebesar 303%. Hal ini menunjukkan bahwa diet hiperkolesterolemia menyebabkan jumlah kolesterol dalam tubuh meningkat serta diikuti peningkatan sintesa asam empedu yang menghasilkan produk samping berupa radikal bebas ( $O_2^-$ ). Pada kondisi hiperkolesterolemia jumlah radikal bebas melebihi antioksidan endogen maka terjadi kondisi stress oksidatif pada miosit jantung. Radikal bebas akan menyebabkan kerusakan mitokondria pada miosit jantung karena 40% sitoplasma miosit jantung dipenuhi oleh mitokondria (Nicholas, 2012). Radikal hidroksil yang terbentuk akan berikatan dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) kemudian akan terjadi peroksidasi lipid, produk akhir peroksida lipid berupa MDA (Repetto *et al.*, 2012), sehingga MDA dapat digunakan sebagai marker adanya stress oksidatif. Sesuai dengan Muller, *et al.*, (2006) yang menyatakan MDA adalah senyawa aldehid yang

digunakan sebagai indikator atau marker pengukuran aktifitas senyawa radikal bebas dalam tubuh. Mekanisme tersebut yang menyebabkan pada kelompok tikus kontrol hiperkolesterolemia terjadi peningkatan kadar MDA, ini sesuai dengan Gani, *et al.*(2013) yang menyatakan pemberian pakan hiperkolesterolemia yang meliputi asam kolat 0,02 gram, telur puyuh 2 gram, dan minyak babi 1 gram yang disonde lambung pada tikus selama 4 minggu akan menyebabkan kadar kolesterol meningkat yang memicu meningkatnya kadar MDA kelompok tikus hiperkolesterolemia.

Hasil analisis statistika menunjukkan kadar MDA tikus kelompok hiperkolesterolemia ( $0,581 \pm 0,413$ )  $\mu\text{g/ml}$  berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) jika dibandingkan dengan kelompok dosis 300mg/kg BB ( $0,368 \pm 0,0361$ )  $\mu\text{g/ml}$ , 600mg/kg BB ( $0,230 \pm 0,023$ )  $\mu\text{g/ml}$ , dan 900mg/kg BB ( $0,152 \pm 0,028$ )  $\mu\text{g/ml}$ . Penurunan terjadi masing-masing sebesar 36%, 60%, dan 73,7%, yang artinya terdapat pengaruh yang signifikan masing-masing dosis terhadap penurunan kadar MDA kelompok tikus hiperkolesterolemia. Penurunan kadar MDA kelompok hiperkolesterolemia diakibatkan pengaruh beberapa kandungan didalam *yogurt* yang diduga dapat menurunkan kolesterol. *Yogurt* didalamnya terdapat beberapa bakteri asam laktat diantaranya *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, dan *Lactobacillus bulgaricus*. *Lactobacillus acidophilus* dapat menurunkan kolesterol dengan cara mengasimilasi kolesterol didalam pencernaan, dekonjugasi empedu, hal yang sama ditunjukkan oleh Barautkoub, *et al.* (2010) melalui penelitian yang menunjukkan penurunan kadar LDL dan HDL dengan pemberian probiotik. Dilaporkan pula oleh penelitian Liong and Shah

(2005) bahwa *Lactobacillus acidophilus* memiliki kemampuan paling baik dalam melakukan dekonjugasi asam empedu, dan aktifitas BSH (*Bile Salt Hydrosilase*) dibandingkan 11 strain *Lactobacillus* lainnya sehingga kadar kolesterol didalam tubuh dapat diturunkan. Di dalam *yogurt* juga terdapat biopeptida aktif, dan vitamin yang berfungsi sebagai antioksidan yang dapat menurunkan radikal bebas dalam tubuh sehingga menurunkan peroksida lipid.

Kadar MDA terapi *yogurt* dosis 300mg/kgBB( $0,368 \pm 0,0361$ )  $\mu\text{g/ml}$ , dan 600mg/kgBB( $0,230 \pm 0,023$ )  $\mu\text{g/ml}$  berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok kontrol sehat ( $0,144 \pm 0,040$ )  $\mu\text{g/ml}$ , ini menunjukkan kedua terapi *yogurt* tersebut belum mampu menurunkan kadar MDA mendekati kadar MDA normal. *Yogurt* susu kambing didalamnya terdapat bakteri probiotik yang mampu menurunkan kadar kolesterol didalam darah dengan jalan berikatan dengan HMG-CoA reduktase, dan menghasilkan BSH, didalam *yogurt* juga terkandung biopeptida yang diduga dapat menurunkan kadar kolesterol yang berperan sebagai antioksidan yang akan menekan terjadinya stress oksidatif. Jumlah radikal bebas didalam tubuh kemungkinan melebihi jumlah antioksidan dari asupan *yogurt* dosis 300mg/kgBB dan 600mg/kgBB serta kadar kolesterol dalam tubuh belum dapat diturunkan dengan kemampuan BAL dari dosis tersebut, sehingga belum mampu menurunkan MDA mendekati kelompok normal. Hal ini sejalan penelitian Jafari (2009) yang mengungkapkan bahwa *yogurt* yang mengandung probiotik dalam jumlah kecil tidak dapat menurunkan kadar LDL dalam tubuh namun dalam dosis yang tertentu mampu menurunkan kadar LDL.

Terapi *yogurt* dengan dosis 900mg/kgBB ( $0,152 \pm 0,028$ )  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan kadar MDA yang tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kelompok tikus kontrol sehat ( $0,144 \pm 0,040$ )  $\mu\text{g/ml}$ , hal ini membuktikan kandungan *yogurt* terapi dosis 900mg/kgBB sudah mampu menurunkan kadar MDA mendekati normal, sehingga dapat digunakan sebagai terapi hiperkolesterolemia yang akan menurunkan kadar MDA dalam tubuh. Aktifitas antioksidan dari biopeptida di dalam *yogurt* dosis 900mg/kgBB sudah mampu mengurangi radikal bebas yang ada, serta BAL mampu mengurangi kolesterol dengan jalan berikatan dengan HMG-CoA reduktasi dan menghasilkan enzim BSH. Kesimpulannya dosis terbaik yang dapat menurunkan kadar MDA tikus model hiperkolesterolemia adalah dosis 900mg/kgBB. Mekanisme ini sesuai dengan Chen *et al.*, (2003) bahwa BAL dapat menurunkan kolesterol dengan meningkatkan aktifitas BSH yang dapat menurunkan level kolesterol tubuh. Aktivitas BSH pada BAL akan menghidrolisis garam empedu dan merubahnya menjadi glisin, taurin dan garam empedu terkonjugasi sehingga garam terkonjugasi ini dapat dikeluarkan melalui feses. Semakin banyak garam empedu yang dikeluarkan dari tubuh maka akan merangsang untuk disintesisnya garam empedu lebih banyak sehingga kolesterol dalam tubuh berkurang.

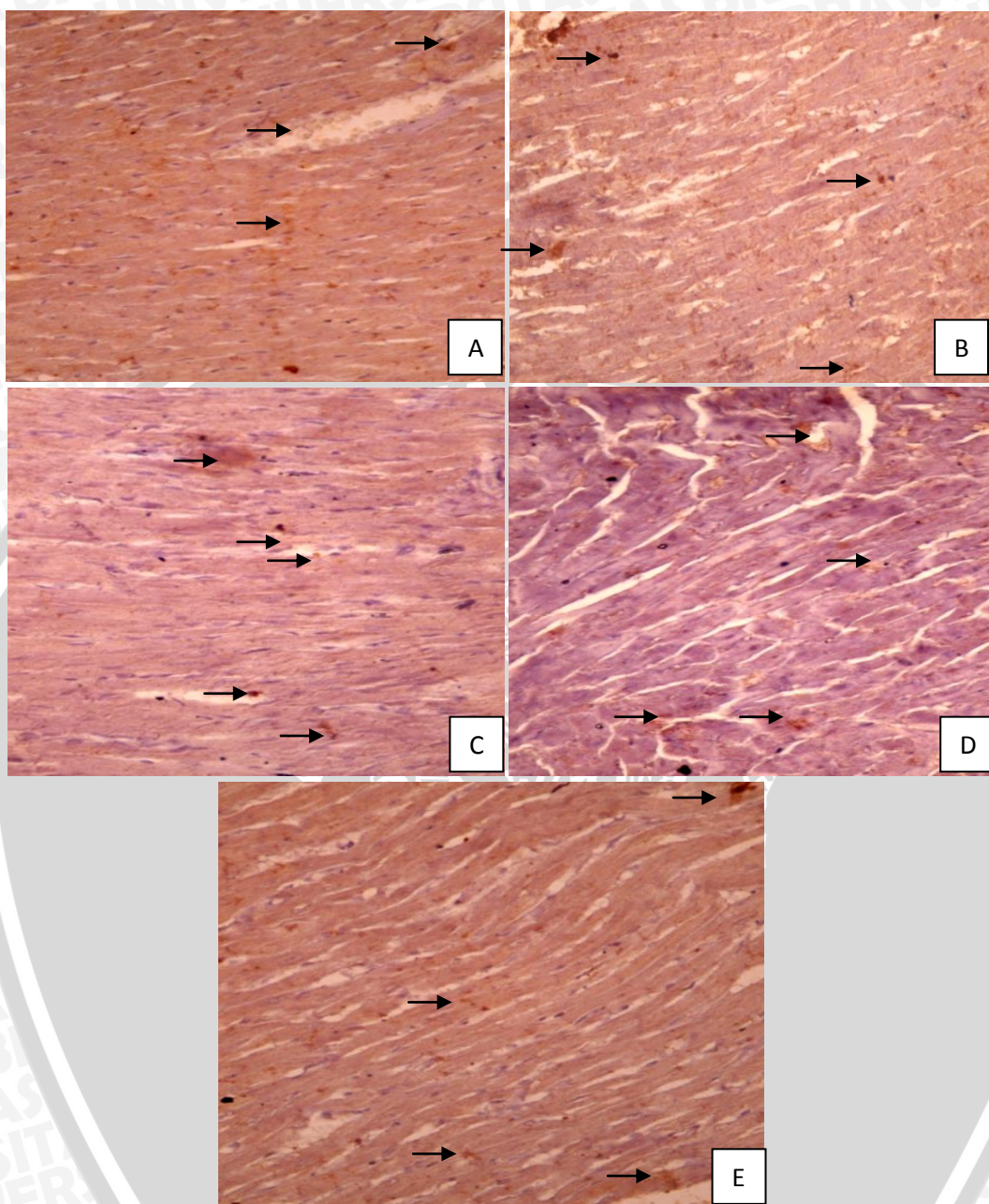
## **5.2 Pengaruh pemberian *yogurt* susu kambing terhadap kadar *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) jantung tikus (*Rattus norvegicus*) model hiperkolesterolemia**

Kerusakan organ jantung tikus dapat dilihat dengan mengamati adanya ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) pada jaringan organ jantung tikus dengan menggunakan pewarnaan immunohistokimia (IHK). Keberadaan TNF- $\alpha$

pada jantung ditandai dengan warna coklat yang menunjukkan interaksi antara TNF- $\alpha$  pada jaringan dengan antibodi yang ditambahkan (antibodi primer *rat anti TNF- $\alpha$*  berikatan dengan antibodi sekunder *goat anti rat labeled biotin*) ditambahkan enzim SA-HRP dan substrat *Diaminobenzidine* (DAB) agar tercipta warna coklat pada sitokin (TNF-  $\alpha$ ). Hasil ekspresi TNF- $\alpha$  dilihat menggunakan *software Axio vision* dengan menggunakan uji ANOVA dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk menentukan perlakuan yang memberikan hasil terbaik(**Lampiran 13**).

Hasil ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) jantung pada setiap kelompok tikus perlakuan dengan perwarnaan imunohistokimia ditandai dengan warna kecoklatan seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 5.1**. Hasil perhitungan rata-rata setiap kelompok perlakuan selanjutnya diamati dengan menggunakan program *axio vision* untuk mengetahui presentasi area dari ekspresi TNF- $\alpha$  yang dimunculkan oleh kelompok perlakuan dapat dilihat pada **Tabel 5.2**. **Gambar 5.1 A** terdapat ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 0,353%, ekspresi TNF- $\alpha$  terdapat didalam sitoplasma sel otot jantung. **Gambar 5.1.B** terdapat ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 2,99% seperti yang ditunjukkan oleh tanda panah, ekspresi TNF- $\alpha$  mayoritas terdapat pada sel miosit jantung. **Gambar 5.1.C** menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 2,27%. **Gambar 5.1.D** menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 1,9% yang terdapat pada sitoplasma sel otot jantung. Sedangkan **Gambar 5.1.E** menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 1,44%.





**Gambar 5.1** Gambar pewarnaan IHK organ jantung tikus (400x)

Keterangan: (A)kontrol sehat, (B) kontrol hiperkolesterolemia, (C) terapi dosis 300mg/kg BB, terapi (D)dosis 600mg/kg BB, (E) terapi dosis 900mg/kg BB, ekspresi TNF- $\alpha$  ditandai dengan tanda panah (  $\Rightarrow$ ).

**Tabel 5.2** Rata-rata ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) pada setiap perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$	Peningkatan terhadap kelompok sehat (%)	Penurunan Terhadap kelompok hiperkolesterol (%)
Tikus Kontrol sehat	0,355 $\pm$ 0,0452 <sup>a</sup>	0	-
Tikus Hiperkolesterolemia	2,99 $\pm$ 0,0483 <sup>e</sup>	742,25	-
Terapi <i>yogurt</i> dosis 300 mg/kg	2,27 $\pm$ 0,1145 <sup>d</sup>	-	24,08
Terapi <i>yogurt</i> dosis 600 mg/kg	1,935 $\pm$ 0,0721 <sup>c</sup>	-	35,38
Terapi <i>yogurt</i> dosis 900 mg/kg	1,435 $\pm$ 0,0483 <sup>b</sup>	-	52

Keterangan: Perbedaan notasi (a,b,c,d,e) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ).

Dari hasil analisis statistika pada **Tabel 5.2** menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$  kelompok kontrol sehat sebesar 0,355  $\pm$ 0,0452 yang digunakan sebagai acuan ekspresi TNF- $\alpha$  tikus sehat. Keadaan normal pada tubuh terdapat pula ekspresi TNF- $\alpha$  sebagai reaksi imun spesifik, nonspesifik serta pada *remodeling* pertumbuhan sel jantung dalam jumlah kecil sesuai pernyataan Sack (1999) bahwa dalam keadaan normal TNF- $\alpha$  berguna untuk homeostatis tubuh meliputi pertumbuhan, adaptasi terhadap respon akut dan subakut.

Ekspresi TNF- $\alpha$  kelompok tikus hiperkolesterolemia (2,99 $\pm$ 0,0483) berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok tikus kontrol sehat (0,355  $\pm$ 0,0452), dengan peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 742% yang artinya pemberian diet hiperkolesterolemia berpengaruh signifikan terhadap peningkatan

ekspresi TNF- $\alpha$  kelompok tikus hiperkolesterolemia. Peningkatan ini diakibatkan adanya asupan diet hiperkolesterol yang diberikan akan menyebabkan terjadi penyerapan kolesterol pada usus dan terbentuk LDL yang akan bereaksi dengan radikal bebas, hal ini sesuai dengan Stapleton, *et al.*, (2010) menyatakan bahwa selama keadaan hiperkolesterolemia, reaksi antara radikal oksigen atau enzim oksidasi dan lipoprotein dapat menghasilkan produk berupa LDL oksidasi. LDL teroksidasi akan menuju endotel jantung yang menyebabkan terjadinya stress oksidatif. Saat terjadi stres oksidatif dapat mengaktifasi NF- $\kappa$ B (*nuclear faktor kappa Beta*). NF- $\kappa$ B adalah faktor transkripsi yang menginduksi aktivitas gen peradangan (*Inflamantory gene*), saat tidak aktif NF- $\kappa$ B berada pada sitoplasma dan berikatan dengan IK $\beta$  (*Inhibitor Kappa Beta*). Terputusnya ikatan NF- $\kappa$ B dengan IK $\beta$  akan merangsang NF- $\kappa$ B melakukan translokasi menuju inti dan menempel pada gen target (gen protein radang), selanjutnya terjadi transkripsi mRNA, dilanjutkan dengan translasi berupa sintesis berbagai protein pada sistem imun seperti protein sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-1 ) yang berperan mengendalikan respon imun inflamasi sejalan dengan penelitian Lee (2003) dan Murray (2005) bahwa stress oksidatif akan menginduksi aktifnya NF- $\kappa$ B dan disintesisnya sitokin proinflamasi yang akan mengawali proses inflamasi. Aktivasi NF- $\kappa$ B juga akan menginduksi molekul adhesi seperti VCAM-1, ICAM-1 dan peningkatan ekspresi gen iNOS. Keberadaan *nitrooxide synthase* (NOS) dalam sel dan jaringan tubuh yang akan merangsang terbentuknya NO (nitrooksida) berlebih yang mempercepat proses inflamasi. Monosit akan terdiferensiasi menjadi makrofag juga akan melepaskan TNF- $\alpha$ .

Hasil analisa statistika menunjukkan kelompok tikus hiperkolesterolemia ( $2,99 \pm 0,048$ ) berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) antar kelompok terapi *yogurt* dosis 300mg/kgBB ( $2,27 \pm 0,114$ ), 600mg/kgBB ( $1,93 \pm 0,072$ ), dan 900mg/kgBB ( $1,435 \pm 0,0483$ ), yang artinya terdapat pengaruh signifikan dosis terapi terhadap penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  tikus hiperkolesterolemia. Penurunan masing-masing sebesar 24,1%, 35,4%, dan 52%. Penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  disebabkan kandungan *yogurt* diantaranya vitamin E dan C, sesuai dengan Yamauci (2007) yang menyatakan vitamin C dan E memiliki kemampuan melindungi sel dari radikal bebas. Vitamin E dapat menurunkan stres oksidatif dengan cara menembus sel menuju mitokondria dan memberikan atom hidrogennya untuk berikatan dengan radikal bebas sehingga atomnya lebih stabil dan mengurangi stres oksidatif. Di dalam *yogurt* juga terdapat bakteri asam laktat yang dapat menurunkan kolesterol yang menjadi sumber radikal bebas dengan cara mengasimilasi kolesterol yang ada di usus dengan membran BAL yang terdiri dari polysakarida sehingga kolesterol dapat langsung dikeluarkan dari tubuh melalui feses. BAL juga dapat menurunkan kolesterol dengan cara menghasilkan senyawa yang berkompetisi dengan HMG KoA untuk berikatan dengan enzim katalis HMG KoA reduktase, sehingga sintesis kolesterol di hati dapat dihambat. *Yogurt* didalamnya juga terkandung biopeptida yang dapat menurunkan stres oksidatif tubuh diantaranya adalah laktoferin. Peptida ini memiliki kemampuan mengikat zat besi ( $Fe^{+2}$ ) sehingga dapat menurunkan tingkat inflamasi dan stres oksidatif lebih lanjut, karena zat besi pada keadaan stress oksidatif akan berikatan dengan  $H_2O_2$  membentuk  $OH\cdot$  yang akan meningkatkan tingkat stres oksidatif, sesuai

dengan Legrand, *et al.*, (2005) yang menyatakan lactoferin dapat mencegah dan mengurangi pembentukan inflamasi dan kerusakan jaringan yang disebabkan agen sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6.

Terapi *yogurt* dengan dosis 300mg/kgBB, 600mg/kgBB dan 900mg/kgBB memiliki perberbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok tikus kontrol sehat, ini menunjukkan terapi *yogurt* dosis 300mg/kgBB, 600mg/kgBB, dan 900mg/kgBB belum mampu menekan ekspresi TNF- $\alpha$  ke dalam kondisi normal, hal ini didukung dengan dosis 900mg/kgBB menunjukkan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  tertinggi sebesar 52% pada miosit jantung. Sel jantung tidak memiliki kemampuan perbaikan dan berubah menjadi jaringan parut. *Yogurt* susu kambing belum mampu menurunkan kadar TNF- $\alpha$  normal kemungkinan disebabkan kandungan antioksidan didalam *yogurt* jumlahnya belum cukup untuk mengurangi terjadinya stres oksidatif yang pada akhirnya tetap mengaktifasi NF-k $\beta$  di sitoplasma dan tidak didukung kemampuan regenerasi sel otot jantung untuk melakukan regenerasi. Dosis terapi *yogurt* susu kambing 300mg, 600mg, dan 900mg berpengaruh signifikan terhadap penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  kelompok hiperkolesterolemia, namun belum mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  mendekati normal.

## BAB 6. PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan data hasil penelitian maka didapat kesimpulan bahwa:

1. Dosis terapi *yogurt* susu kambing terbaik yang dapat menurunkan kadar MDA jantung tikus model hiperkolesterolemia pada kondisi normal adalah dosis 900mg/kgBB, sehingga dosis 900mg/kgBB dapat digunakan sebagai terapi hiperkolesterolemia.
2. Dosis terapi *yogurt* susu kambing terbaik dalam menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  adalah dosis 900mg/kgBB, namun dosis tersebut belum mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  kembali ke kondisi normal.

### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian mengenai kandungan peptida aktif pada *yogurt* susu kambing secara lebih spesifik yang dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adlerova, L. Bartoskova. A, Faldyna, M, 2008. Lactoferin Review. Veterinary Research Institute Czech Republic. 53, 457-468.
- Agarwal, A. Prabakaran, S. Said, T. 2005. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. *J. Androl.* 26, 60-654.
- Almatsir, S. 2002. Prinsip Dasar Ilmu Gizi. PT Gramedia Pustaka Utama. Jkarta. 332.
- Aulani'am, A. Roosdiana, and N. I. Rahmah. 2012. *The Potency of Sargassum duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in Rattus norvegicus.* *J. Life Sci.* 6:144-154.
- Aviati, V. Mardiaty, S, M. dan Saraswati, T, R. 2014. *Kadar Kolesterol Telur Puyuh Setelah Pemberian Terapi Kunyit Dalam Pakan.* *Universitas Diponegoro.* 58-64
- Bagiada, N. A. 2001. Proses Penuaan dan Penanggulangannya. Denpasar: Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana. Hal : 22.
- Baroutkoub, A. Mehdi, Z. R. Belgarian, R. Hassan, J. Zahra, S. Mohammad, S. M. and. Hadi, M. E. 2010. *Effects of Probiotic Yogurt Consumption on The Serum Cholesterol Level in Hypercholestromic Casesin Shiraz (Southern Iran).* Shiraz. Iran. 5:16.
- Barriga, 2011. *Cholesterol, Glucose and Triglycerides Role in The Prevalence of Hyperlipidemia In Dogs At Higher Elevations,* Santiago, Redalyc. 21:22-26.
- Beaulieu. J, Dupont. C, Lemieux P. 2006. Whey Proteins and Peptides: Beneficial Effects on Immune Health. *Therapy*, 3: 69-78.
- Calnek, B. 1997. Immunohistokimia. Jowa State University Press. Ames.10:194-202.
- Chen, J. R. Chou, S. R, Suetsuna, K. Yang, N.Y. Yang and, Yang, S. C. 2003. *Lipid Metabolism in Hypocholesterolemic Rats Affected by Feeding Cholesterol-Free Diets Containing Different Amount of Non-Dialyzed Soybean Protein Fraction.* *Journal of Nutrition.*13:101-105.
- Delima, Laurentia. M, Hadi. S. 2009. Prevalensidan Faktor Determinan Penyakit Jantung Di Indonesia. *Puslitbang Biomedis dan Farmasi.* 37:142-159.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2011. Pedoman Pengendalian Tikus. <http://www.depkes.go.id/downloads/Pengendalian%20tikus.pdf>. Diakses tanggal 04 September 2014.

- Fadini G. P., A. Avogaro, C. Agostini. 2007. *Critical Assessment of Putative Endothelial Progenitor Phenotypes. Exp. Hematol.* 35:1479–1480.
- Fiers, W. 1991. *Tumor Necrosis Factor: Characterization at The Molecular, Cellular and In Vivo Level. FEBS Lett.* 285(2):199-212.
- Gani, N., I. Lidya dan P. Mariska. 2013. *Profil Lipida Plasma Tikus Wistar yang Hiperkolesterolemia pada Pemberian Gedi Merah (Abelmoschus manihot L.). Jurusan Kimia FMIPA Unsrat.*2(1):22-49.
- Gunawan. 2003. *Uji Kemampuan Probiosis Lactobacillus Strain lokal dan Analisis Asam Organik Yang Dihasilkan Dalam Menurunkan Kolesterol Secara In Vitro.* Purwokerto: Fakultas Biologi. Universitas Jenderal Soedirman.
- Halliwell, B. and J. M. C., Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press. 225-230
- Halliwell, B. and M. Whiteman. 2004. *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture. Br. J. Pharmacol.* 142, 231-255.
- Hartanto, O. S. 2009. Peran Sitokin dan Metabolisme Lipid dalam Stroke. *Berkala Neurosains.*10(2): 63-67.
- Hernández-Ledesma B, Amigo L, Recio I, Bartolomé B. 2007. *ACE-Inhibitory and Radical-Scavenging Activity of Peptides Derived from B-Lactoglobulin F (19-25). Interactions with ascorbic acid. J. Agric. Food Chem.* 55: 3392–3397.
- Jackson, M.J. 2005. *Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise.*Philosophical Transactions of The Royal Society. 360:2285-2291.
- Jafari, A. A, Larijani, B, Majd, H.A, and Tahbaz, F. 2009. *Cholesterol-lowering Effect of Probiotic Yogurt in Comparison with Ordinary yogurt in Mildly to Moderately Hypercholesterolemic Subjects.* Nutrition & Metabolism; 54:22-27.
- Johnson, M.C. 2005. Hyperlipidemia disorder in dogs. *Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian*, 27, 361-364.
- Kartini, T. A. 2002. *Potensi Probiotik Lactobacillus acidophilus dan Mikroflora Kefir Sebagai Antihiperkolesterolemia.* Jurusan Ilmu Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.
- Kasim, E., Y. Kurniawati and N. Nurhidayat. 2006. *Pemanfaatan Isolat Lokal Monascus purpureus untuk Menurunkan Kolesterol Darah pada Tikus Putih Galur Sprangue dawley. Biodiversitas,* 7(2): 122-124.



- Kershaw, E.E. and J.S. Flier. 2004. Adiposa Tissue as An Endocrine Organ. *J. Clin. Endocrinal Metab.* 89: 2548.
- Kontush, A. and Chapman, M.J. 2006. *Functionally Defective High-Density Lipoprotein: a New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis.* *Pharmacol. Rev.* 58:342-374.
- Kreisberg, R.A. and Reusch, J.E.B. 2005. Hiperlipidemia. The Hormon Foundation. *Endojournal*, 90:1-3.
- Kullisaar, T. Songisepp, E. Mikelsaar, M. Zilmer, K. Vihalemm, T. Zilmer, M. 2003. *Antioxidative Probiotic Fermented Goat' Milk Decrease Oxidative Stress-Mediated Atherogenicity in Human Subjects.* *Br. J. Nutr.*90(2):449-56.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba.* Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Lee, Y.j., Yu, W.k. and Heo, T,-R. 2003. *Identification and screening for antimicrobial activity against species isolated from healthy infant faeces.* *Int. J. Antimicrob. Ag.* 21, 340-346.
- Legrand, D. Eclass, E. Carpentier, M. and Mazurier, J. 2005. a Modulator of Immune and Inflammatory Responses. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 62, 2549-2559.
- Liong, M.T. and Shah, N.P. 2005. *Effect of a Lactobacillus casei Synbioticon Serum Lipoprotein, Intestinal Microflora, and Organic Acids in Rats.* *J. Dairy Sci.*89:1390-1399.
- Lopez, A.I, Alferez, M.J, Nestares, M.T, Barrionuevo, M, and Campos, M.S. 2005. *Goat Milk Feeding Cause an Increase in Biliary Secretion of Cholesterol and Decrease in Plasma Cholesterol Level in Rats.* *J. Dairy Sci.* 88(3):1024-30.
- Martens, A. and Holvoet, P. 2001. Oxidized LDL and HDL : Antagonists in Atherotrombosis. *The Faseb J.* 15:2073-2084.
- Mayer, B. 2012. Nitric Oxide. Departement of Pharmacology and Toxicology. Springer Science & Business Media Austria.
- Montgomery, D. and S. Kowalsky. 2011. Design and Analysis of Experiment. John Willey and Sains Inc.
- Murwani,S. Ali, M. dan Muliarta, K. 2008. *Diet Aterogenik pada Tikus Putih ( Rattus novegicus strain Wistar) Sebagai Model Hewan Aterosklerosis.* Fakultas Kedokteran Brawijaya.
- Muller, F.L. Song, W. Liu, Y. Chandhuri, A. Pieke-Dahl,S.csete, M. Faulkner, J.A and Van Remmen, H. 2006. *Absence of CuZn superoxide dismutase*

leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radical Biology and Medicine*. 40:1993-2004.

Muntiha, M. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hemaktosilin Eosin (H&E). Balai penelitian veteriner.

Murray, K. Robert., Granner, K. Daryl., Mayes, A. Peter., Rodwell, W. Victor. 2003. *Tocopherol Merupakan Antioksidan Alami yang Sangat Penting*. Biokimia Harper Ed.25. EGC. 618-619.

Murray, R.K., Granner, D.K, Mayes, P.A, Rodwell, V.W. 2003. Harper's Illustrated Biochemistry Twenty-Sixth Edition. McGraw-Hill. New York. 26:144-146.

Myers, P. and D. Armitage. 2004. *Rattus norvegicus*. [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus\\_norvegicus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html). Diakses pada tanggal 02 Juni 2014.

Nababan, S. dan Okki. 2010. Peranan Endothelial Progenitor Cell (EPC) pada Neovaskularisasi. [www.selpunca.org](http://www.selpunca.org).

Nicholas, S. 2012. *Cell Physiology Essentials of Membrane Biophysics*. Elsevier Ed.5rd. 107

Palladino, A. 2003. *Carotid Atherosclerosis is Associated With Inflammation and Endothelial Cell Adhesion Molecules in Chronic Haemodialysis Patients*. *Nephrol. Dial Transplant*. 18: 113-119.

Park, R, S.D. Yan, C. Huang. 1994. *Tumor Nekrosis Factor Alpha Production in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. *Laryngoscope*. 104(7):860-864.

Park, Y.W, Juarez. M, Ramos. M, and Haenlein, G.F.W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68:88-113.

Pecquet S, Bovetto L, Maynard F, Fritsche R. 2000. *Peptides Obtained by Tryptic Hydrolysis of Bovine  $\beta$ -lactoglobulin Induce Specificoral Tolerance in Mice*. *J. Allergy Clin. Immunol*. 105: 514-521.

Pereira, D.I.H, and Gibson, G.R. 2002. *Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut*. *Appl. Environ. Microbiol*. 68: 4689-4693.

Ratnayanti. 2011. [Thesis], *Pemberian Growth Hormone Memperbaiki Profil Lipid dan Menurunkan Kadar MDA(Malondyaldehyde) pada Tikus Jantan yang Dislipidemia*. Progam Studi Biomedik Udayana.

Repetto, M, Semprina, J, and Boveris, A. 2012. *Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination*. Intech.

- Sarkar, S. 2003. Potential of Acidophilus Milk to Lower Cholesterol. *Nutrition & Food Science* 33(6):273-277.
- Setiawan, T. dan A. Tanius. 2004. *Beternak Kambing Perah Peranakan Etawa*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rosita, I. 2005. *Aplikasi Gelatin Tipe A dan Yoghurt dalam Pembuatan Permen Jelly*. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan. Fakultas Peternakan. IPB. 17 Desember 2008.
- Rousseau, E. Michel, P.P. and Hirsch, E.C. 2013. *The Iron-Binding Protein Lactoferrin Protects Vulnerable Dopamine Neurons from Degeneration by Preserving Mitochondrial Calcium Homeostasis*. *Mol Pharmacol* 84:888-898.
- Sack, M.N, Robert, M. Lionel, H, and Opie. 1999. *Tumor Necrosis Factor in Myocardial Hypertrophy and Ischaemia an Anti-Apoptotic Perspective*. *Cardiovascular Research*. Elsevier 45:688-695.
- Shrivastava, A. Upma, C. and Gitika, A. 2013. *Hypolipidemic And Antioxidative Effect Of Lactobacillus Acidophilus Bacteria in Hyperlipidemic Rats*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*.6:84-87.
- Soeharto, I. 2004. *Serangan Jantung dan Stroke, Hubungannya dengan Lemak dan Kolesterol*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Hal 42-43.
- Staels, B. 2005. *Gamma and atherosclerosis*. *Curr Med Res Opin*. 21:13-20 .
- Stapleton, A. P. Adam, G.G, James E M Brock R W Frisbee J C. 2010. *Hypercholesterolemia and Microvascular Dysfunction: Interventional Strategies*. *Journal of inflammation*. 7:54.
- Tomotake, H. Okuyama, R. Katagiri, M. Fuzita, M. Yamato, M. and Ota, F. 2006. *Comparison Between Holstein Cow's Milk and Japanese-Saanen Goat's Milk in Fatty Acid Composition, Lipid Digestibility and Protein Profile*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*.70:2771-2774.
- Usman, H. A. and Hosono, A. 1999. *Bile tolerance, taurocholate deconjugation and binding of cholesterol by Lactobacillus gasseri strain*. *Journal of Dairy Science* 82:243-248.
- Voet, D., J.G. Voet, and C.W. Pratt. 1999. *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley and Sons. Brisbane. 2: 8-12.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Kanisius. Yogyakarta. 189.
- World Health Organization (WHO). 2013. *Cardiovascular Disease (CVDs)* <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>. Diakses pada 24 November 2013.

- Wresdiyati, T. dan M. Astawan. 2005. *Deteksi Secara Imunohistokimia Antioksidan Superoksida Dismutase (SOD) pada Jaringan Tikus Hiperkolesterolemia yang Diberi Pakan Rumput Laut*. [Laporan Penelitian]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, IPB.
- Yamauchi, R. 2007. Addition Products of Alpha-Tocopherol with Lipid-Derived Free Radicals. *Vitamins and Hormones*. Japan.76:309-27.
- Yoshida T, Owens G.K. 2005. Molecular Determinant of Vascular Smooth Muscle Diversity. *Circul. Res*. 96: 280–291.
- Zmijewski, J.W, Douglas, R. M, Claire Le Goffe, Aimee, L, Anup, R, and Victor, M.D.U. 2005. *Oxidized LDL Induce Mitochondrially Associated Reactive Oxygen/Nitrogen Species Formation in Endothelial Cells*. *Am J Physiol Heart circ Pyhsiol*, 289
- Zidni, S. 2010. *Hubungan Paparan Arus Listrik Secara Langsung Terhadap Kerusakan Histopatologik Otot Gastroknemius Tikus Wistar*. Fakultas Kedokteran Hewan Diponegoro, Semarang.

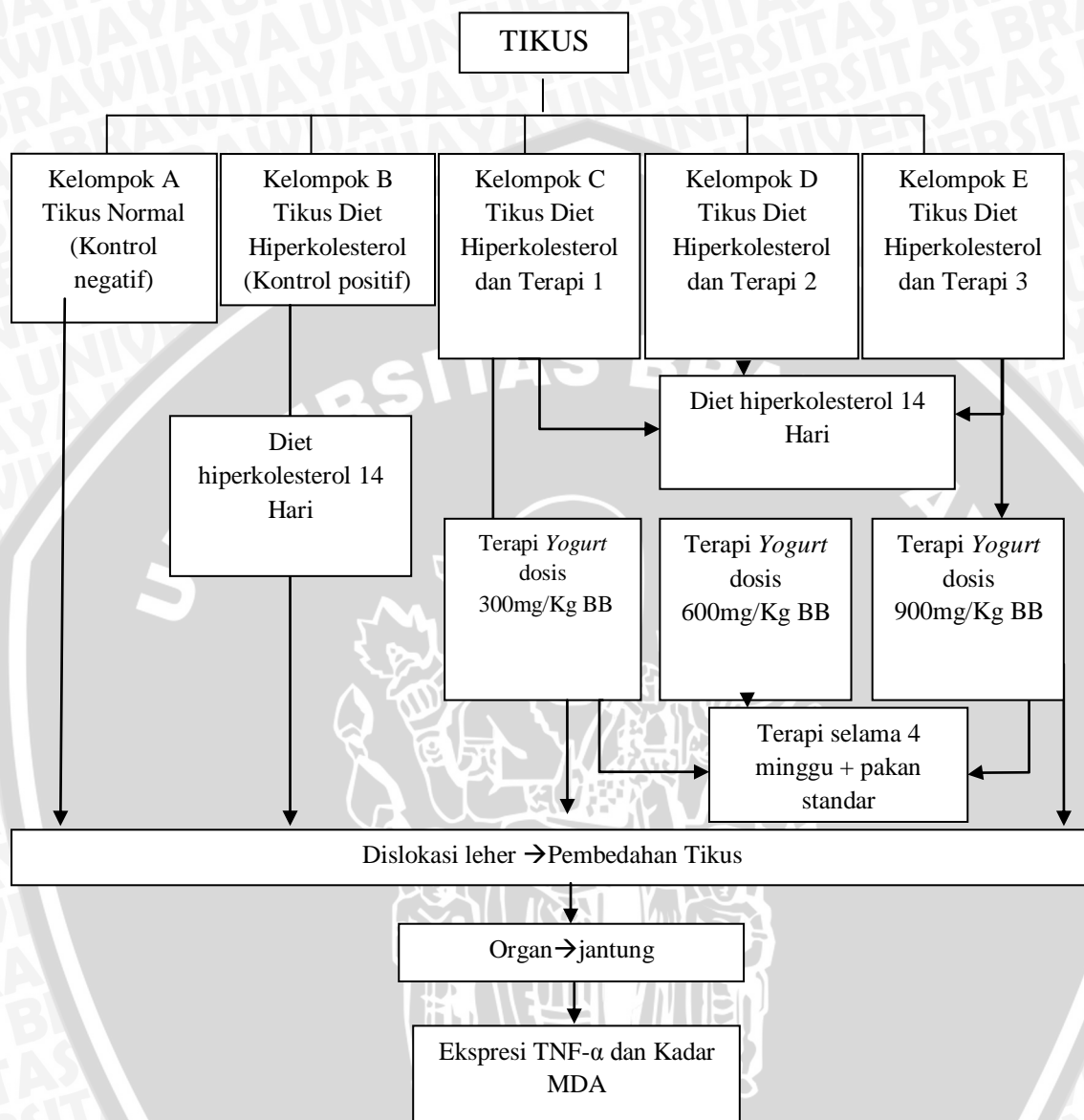


## Lampiran 1. Sertifikat laik etik

	
<b>KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA</b>	
<b>KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"</b>	
No:217-KEP-UB	
<b>KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE) UNIVERSITAS BRAWIJAYA TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:</b>	
PENELITIAN BERJUDUL	: PENGARUH TERAPI DAN PENCEGAHAN YOGURT SUSU KAMBING PERANAKAN ETAWA TERHADAP HEWAN TIKUS ( <i>Rattus norvegicus</i> ) MODEL HIPERKOLESTEROLEMIA
PENELITI	: HENDRA SATRIAWAN
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: UNIVERSITASBRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK
Malang, 24 Maret 2014 Ketua Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya	
 Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES. Nip. 19600903 198802 2 001	

Gambar L1. Sertifikat Laik Etik

Lampiran 2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian



### Lampiran 3. Yogurt Susu Kambing

#### 2.1 Pembuatan Yogurt Susu Kambing

##### Pembuatan Mother Culture

Susu kambing 50 ml

- Dimasukan kedalam tabung Erlenmeyer lalu ditutup alumunium foil dan dimasukan ke panci yang berisi air
- Dipanaskan pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 5$  menit
- Diangkat dan tabung Erlenmeyer dimasukan kedalam panac yang berisi air dingin  $\pm 3$  menit hingga suhu menjadi  $45^{\circ}\text{C}$
- Diinokulasikan starter yogurtmet 0,25 gram untuk 50 ml susu kambing
- Starter dicampurkan kedalam susu kambing
- Botol penyimpanan digoyang ringan jangan sampai berbuih
- Diinkubasi pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 4$  jam
- Didiamkan 4-5 menit dalam suhu ruang ( $27^{\circ}\text{C}$ )
- Diukur pH dengan pH meter dan pH indikator

*Mother culture*

## Pembuatan Yogurt Susu Kambing

### Susu kambing

- Susu kambing dituang kedalam 3 botol penyimpanan masing-masing 500 ml
- Botol ditutup aluminium foil dan dimasukkan ke dalam panci yang berisi air
- Dipanaskan sampai suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 5$  menit
- Botol penyimpanan dimasukkan kedalam panci yang berisi air dingin sampai susu kambing mencapai suhu  $45^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3$  menit)
- Dilakukan inokulasi starter dari *mother culture* yang sudah dibuat sebelumnya sebanyak 15 ml starter untuk 500 ml susu kambing
- Botol penyimpanan digoyang ringan jangan sampai berbuih
- Diinkubasi pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$  selama 4 jam
- Diletakan pada suhu ruang  $27^{\circ}\text{C}$  selama 4-5 menit
- Dilakukan pengujian pH dengan pH meter dan pH indikator

### Yogurt susu kambing



## Pembuatan Freeze Dry

### Yogurt Susu Kambing

- Dimasukan ke dalam labu penyimpanan, per labu penyimpan diisi 250 ml
- Labu penyimpanan dipasangkan pada mesin *Freeze dry* dan ditempelkan dipermukaan etanol
- Labu penyimpanan didinginkan pada suhu  $-33^{\circ}\text{C}$  sampai *yogurt* didalamnya beku
- Labu penyimpanan dipasangkan ke selang penyublim vakum dan dilakukan proses penyubliman sampai menimbulkan uap
- Uap akan ditangkap mesin spiral pada mesin *freeze dry* sehingga air terhisap semua sampai yogurt menjadi serbuk selama 14 jam

### Yogurt Freeze Dried



### Lampiran 3. *Yogurt* Susu Kambing Etawa

#### 3.1 Perhitungan Dosis *Yogurt* Susu Kambing

##### Kelompok C ( Dosis terapi = 300 mg/kg BB )

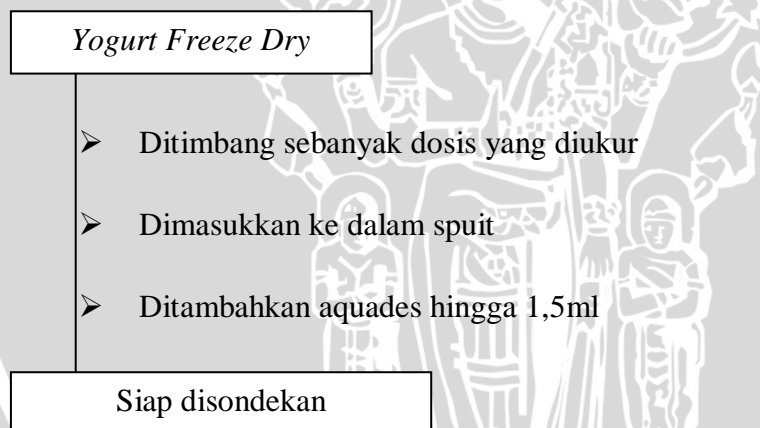
Dengan pemisalaan rata-rata BB tikus 150 g dengan pemberian *Yogurt* dosis 200mg/kg BB

Jumlah *yogurt* = Dosis pemberian x Berat badan

$$\begin{aligned} &= 300 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g} \\ &= 45 \text{ mg/ekor} \end{aligned}$$

Volume yogurt yang diberikan untuk tikus dengan dosis 300 mg/kg adalah 45 mg/ekor dilarutkan dalam aquades 1,5 ml/ekor.

Diagram :



Dosis tambahan untuk mengantisipasi volume yogurt yang berkurang karena tersisa didalam tabung Polypropilen sehingga ditambahkan aquades 1 ml.

$$V1.M2=V2.M1$$

$$6. M2 = 7 .180$$

$$M2 = 210 \text{ mg}$$

##### Kelompok D ( Dosis terapi = 600 mg/kg BB )

Dengan pemisalaan rata-rata BB tikus 150 g dengan pemberian *Yogurt* dosis 200mg/kg BB

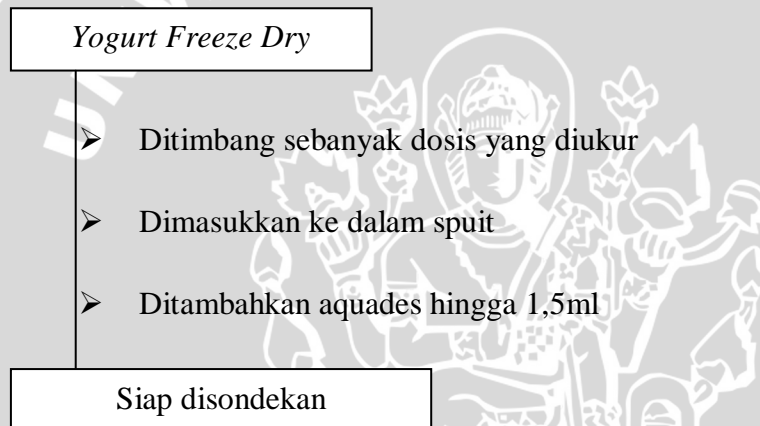
jumlah *yogurt* = Dosis pemberian x Berat badan

$$= 600 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g}$$

$$= 90 \text{ mg/ekor}$$

Volume yogurt yang diberikan untuk tikus dengan dosis 600 mg/kg adalah 90 mg/ekor dilarutkan dalam aquades 1,5 ml/ekor.

Diagam :



Dosis tambahan untuk mengantisipasi volume yogurt yang berkurang karena tersisa didalam tabung Polypropilen sehingga ditambahkan aquades 1 ml, maka digunakan permisalan  $V_1/M_1 = V_2/M_2$  untuk menghitung jumlah *yogurt freeze dried* yang dibutuhkan dengan memisalkan  $V_1$  = volume aquades tanpa penambahan  $V_2$  = volume aquades setelah penambahan,  $M_1$  = Jumlah *yogurt freeze dried* sebelum penambahan dan  $M_2$  = Jumlah *yogurt freeze dried* setelah penambahan.

$$V_1.M_2 = V_2.M_1$$

$$6. M_2 = 7.360$$

$$M_2 = 420 \text{ mg}$$

**Kelompok E ( Dosis terapi = 900 mg/kg BB )**

Dengan pemislaan rata-rata BB tikus 150 g dengan pemberian *Yogurt* dosis 200mg/kg BB

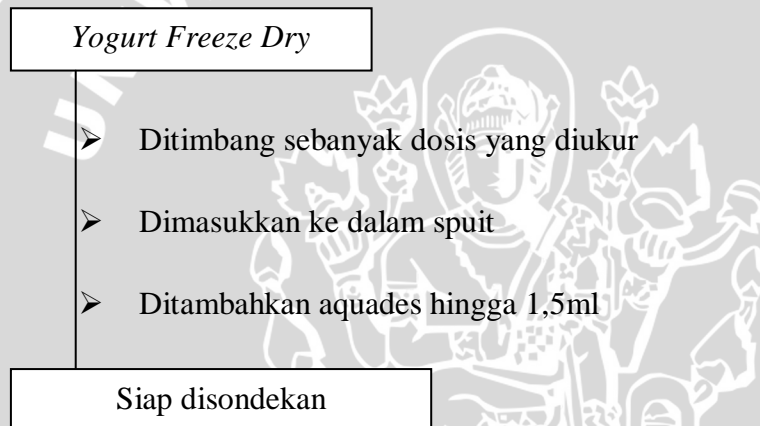
Jumlah *yogurt* = Dosis pemberian x Berat badan

$$= 900 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g}$$

$$= 135 \text{ mg/ekor}$$

Volume yogurt yang diberikan untuk tikus dengan dosis 900 mg/kg adalah 135 mg/ekor dilarutkan dalam aquades 1,5 ml/ekor.

Diagam :



Dosis tambahan untuk mengantisipasi volume yogurt yang berkurang karena tersisa didalam tabung Polypropilen sehingga ditambahkan aquades 1 ml.

$$V1.M2=V2.M1$$

$$6. M2 = 7 .540$$

$$M2 = 630 \text{ mg}$$

#### Lampiran 4. Diet Hiperkolesterol

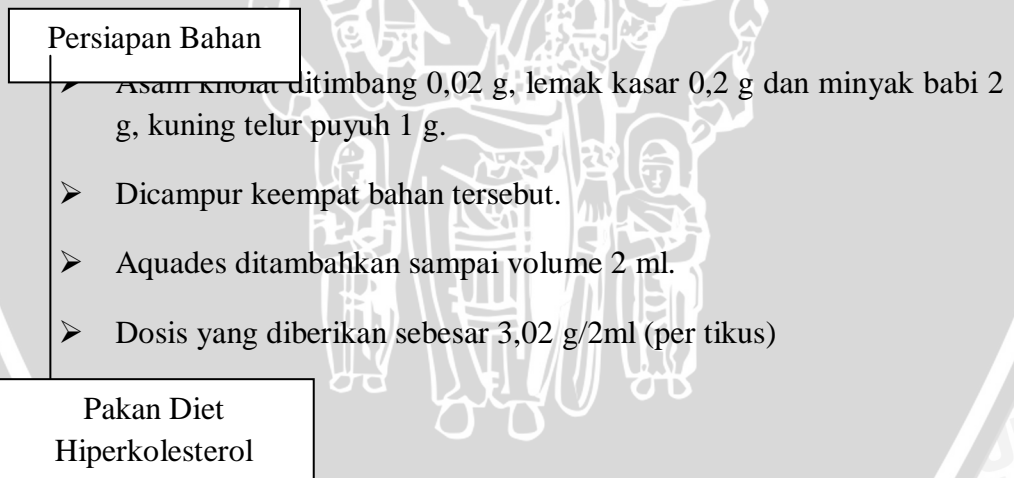
##### 4.1 Pembuatan pakan diet hiperkolesterol

Komposisi pakan : asam kholat 0,1 %, minyak babi 10 %, kuning telur puyuh rebus 5%

Untuk pembuatan pakan per tikus (20 g/hari) → susunan komposisi pakan:

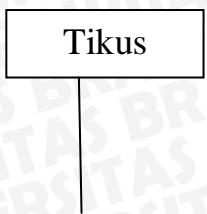
- Asam kholat = 0,1 % x 20 g = 0,02 g
- Minyak babi = 10 % x 20 g = 2 g
- Kuning telur puyuh rebus = 5% x 20 g = 1 g
- Dilakukan penyondean setiap hari sebesar 3,02 g yang ditambahkan air sampai volume 2 ml.
- Pembuatan pakan diet hiperkolesterol dilakukan setiap hari agar pakan tidak tengik dan berjamur.

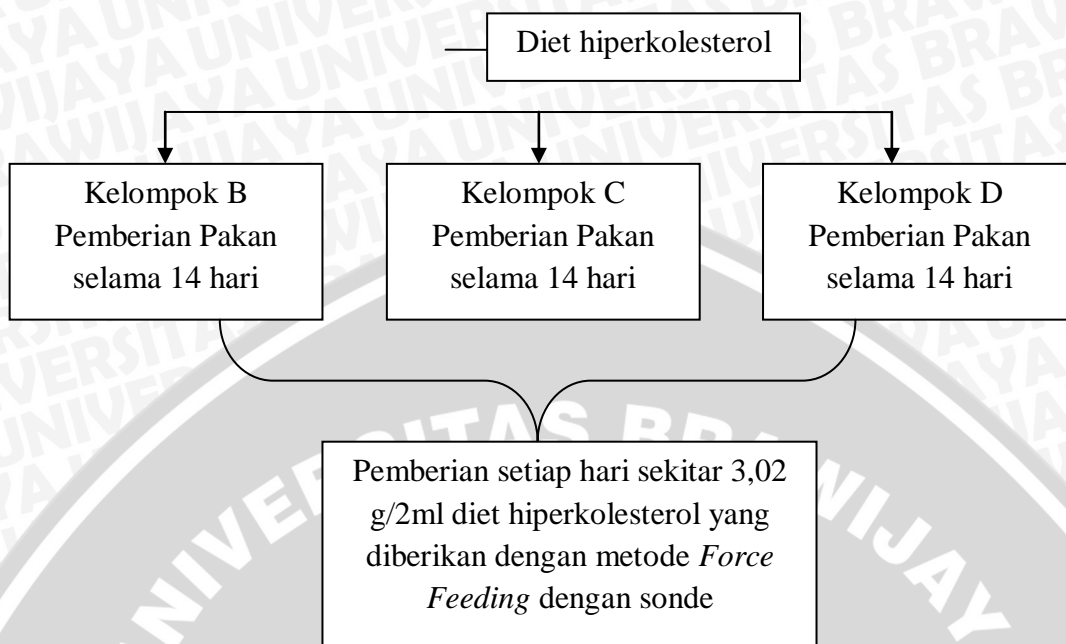
Diagam:



#### 4.2 Pemberian diet hiperkolesterol

Kelompok C dan D : Diberikan pakan diet hiperkolesterol selama 14 hari





**Lampiran 5.** Koleksi Serum dan Pengambilan Organ Jantung

**5.1 Koleksi Organ Jantung**

Tikus

- Tikus direstrain
- Dilakukan dislokasi leher
- Dibedah bagian abdomen dan thoraks
- Diambil organ jantung,
- Organ jantung dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9%
- Dibagi menjadi 2 bagian , satu bagian dimasukkan kedalam PFA 4% dan satu bagian dimasukkan dalam PBS
- Dimasukan kedalam refrigerator untuk organ pada PBS
- Ditempatkan pada suhu ruang untuk organ pada PFA 4%

### Organ Jantung



## Lampiran 6. Persiapan Larutan Sebelum Bedah

### 6.1 Pembuatan PBS

#### Bahan

- |                            |   |          |
|----------------------------|---|----------|
| • KCl                      | → | 0,2 gram |
| • $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | → | 0,2 gam  |

- NaCl → 8 gram
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> → 2,16 gram

#### Prosedur

##### Bahan

- Dilarutkan dengan aquades steril 500 ml di dalam gelas beker 1000 ml kemudian kemudian dihomogenkan dengan stirel
- dikondisikan pada pH 7,4 dengan penambahan NaOH atau HCl
- dimasukkan kedalam labu ukur 1000 ml

##### PBS

## 6.2 Pembuatan PFA 4%

#### Bahan

- Formalin 4%
- NaCl fisiologis

#### Rumus

1. Formalin 37% : 110 g
2. Aquades steril : 1000 mL

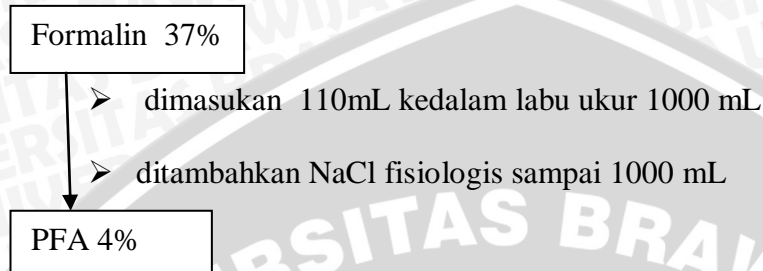
Perhitungan :



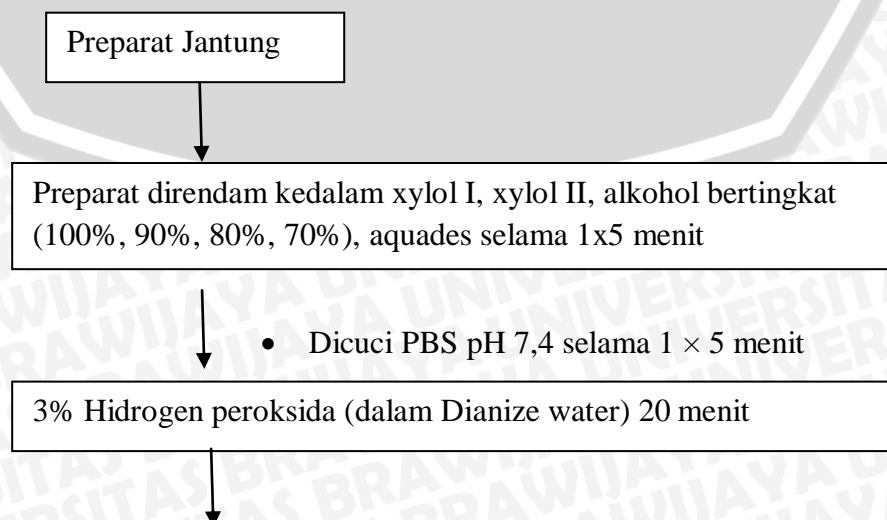
$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

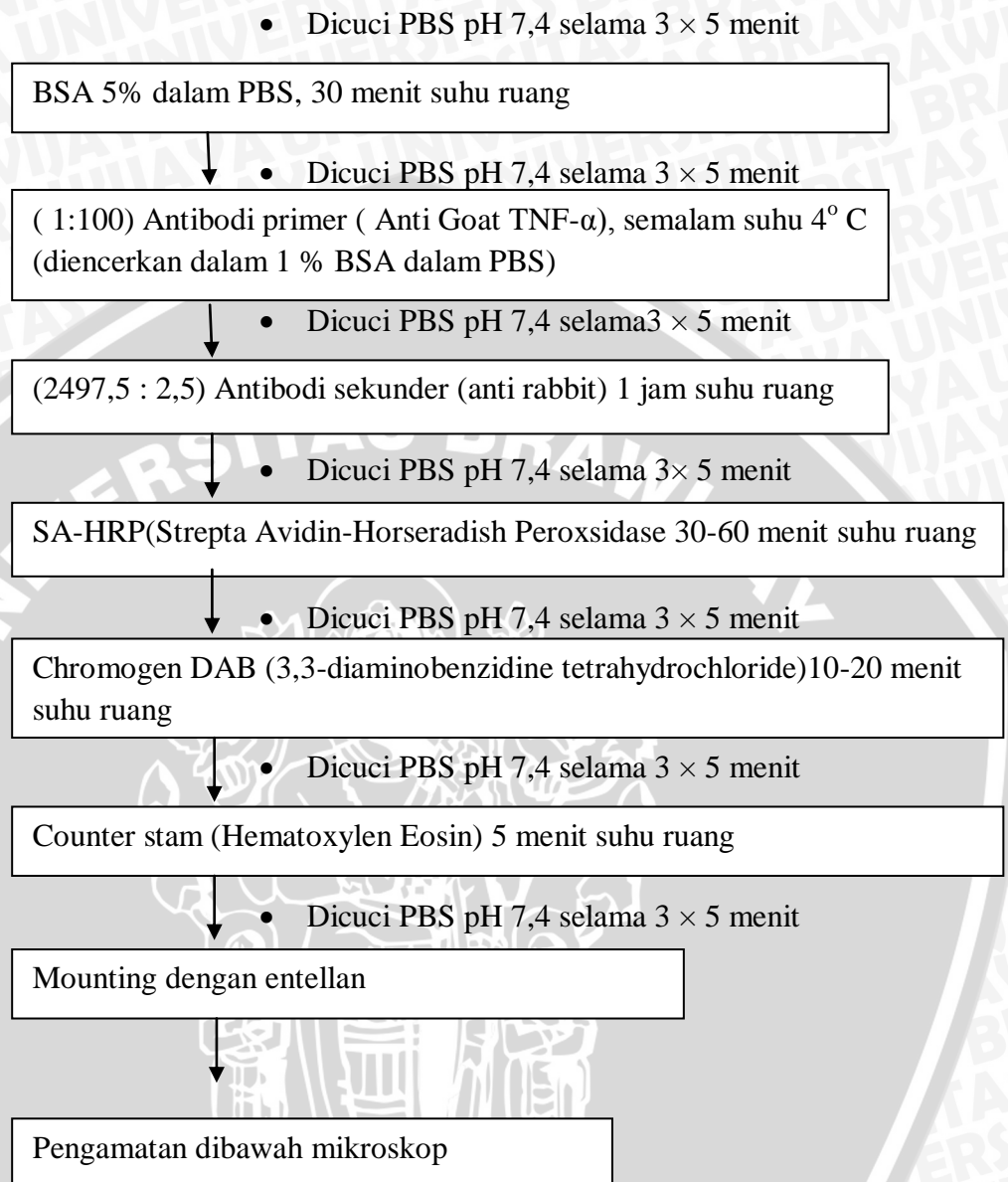
$$37\% \times X = 4\% \times 1000 \text{ mL}$$

Prosedur



**Lampiran 7. Metode Imunohistokimia (TNF- $\alpha$ )(Calnek, 1997)**





**Lampiran 8.** Pembuatan Kurva Standar MDA (Aulanni'am *et al.*, (2012)

100  $\mu$ l stok kit standart MDA  
Konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 mg/ml

- Dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda
- Ditambahkan aquades 550  $\mu$ l
- Ditambahkan 100  $\mu$ l TCA 100%
- Dihomogenkan
- Ditambahkan 250  $\mu$ l Na-Thio 1%
- Dihomogenkan dengan vortex
- Direndam dalam *water bath* pada suhu 100°C selama 20 menit
- Disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit

Supernatan

- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada  $\lambda_{\text{maks}}$  ( $\lambda_{\text{maks}} = 532$  nm)

Absorbansi larutan standart dan kurva baku MDA

**Lampiran 9** Pengukuran Kadar MDA Organ Jantung Dengan Menggunakan Uji TBA (Wuryastuti, 2000).

0,5 gram Jantung

- Dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda
- Ditambahkan aquades 550  $\mu$ l
- Ditambahkan 100  $\mu$ l TCA 100%
- Dihomogenkan
- Homogenat dipindahkan ke dalam tabung reaksi
- Disentrifugasi 8000 rpm selama 20 menit

**Supernatan**

- Dimasukan kedalam tabung berisi EDTA
- Dimasukan 750  $\mu$ l asam folat
- Ditambahkan 50  $\mu$ l TEP standar
- Dikocok
- Ditambahkan 250  $\mu$ l TBA 40 mM
- Ditambahkan 450  $\mu$ l Aquades
- Dipanaskan 1 jam dengan suhu 100°C
- Didinginkan
- Dimasukan kedalam set pack C 18-column

**Supernatan**

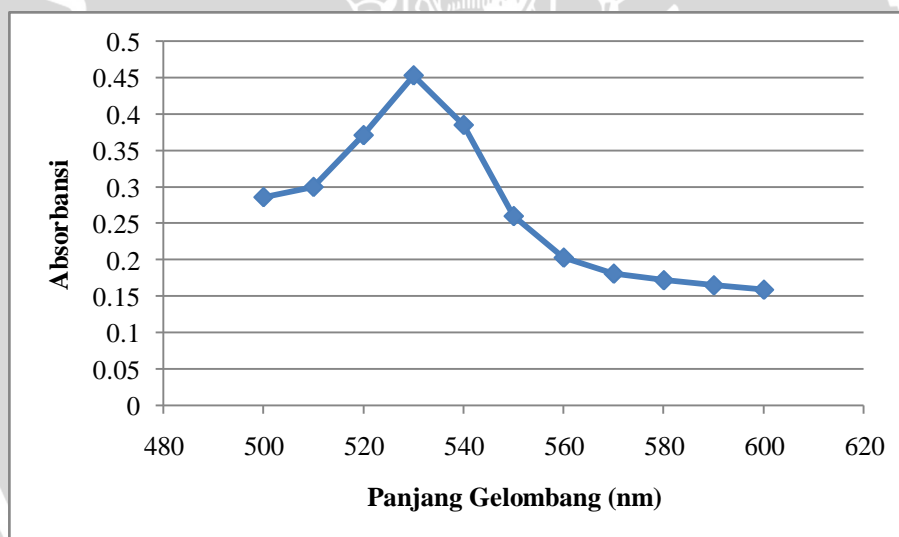
- Dipindahkan ke tabung reaksi baru
- Diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda_{maks}$  ( $\lambda_{maks}$  = 532 nm)
- Diplotkan pada kurva standart

**Kadar MDA organ Jantung**

### Lampiran 10. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum MDA

**Tabel 10.1.** Absorbansi larutan standar malondialdehida 4 ppm pada berbagai panjang gelombang

$\lambda$ (nm)	Absorbansi
500	0,286
510	0,3
520	0,371
530	0,453
540	0,385
550	0,26
560	0,203
570	0,181
580	0,172
590	0,165
600	0,159

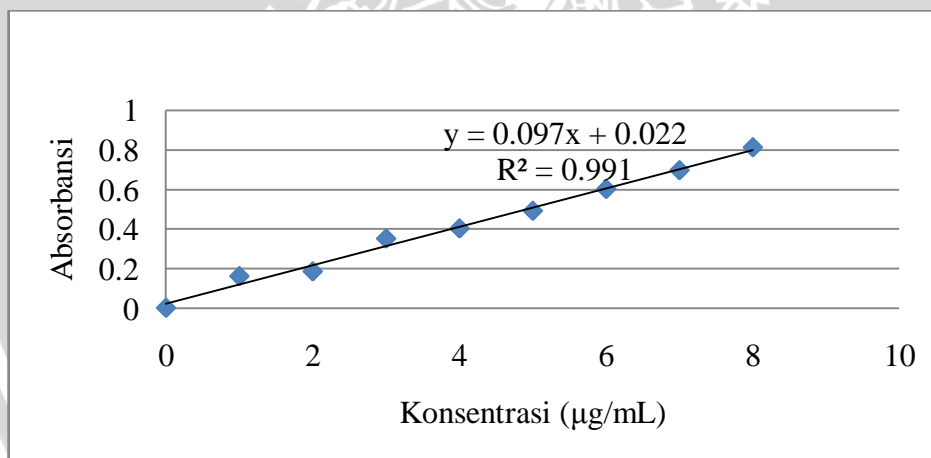


**Gambar L.8.1.** Kurva Serapan MDA

Absorbansi larutan standar MDA terbesar didapatkan pada panjang gelombang 532 nm, pengukuran menggunakan larutan MDA 4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  dengan variasi panjang gelombang. Panjang gelombang ini merupakan panjang gelombang maksimum yang digunakan untuk pengukuran absorbansi larutan standar MDA dan sampel.

**Lampiran 11.** Pembuatan Kurva Baku MDA**Tabel L.11.1** Absorbansi Larutan Standard Malodialdehid  $\lambda$  maksimal = 532nm pada berbagai konsentrasi.

Konsentrasi Larutan Standar ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi
0	0,000
1	0.160
2	0.184
3	0.350
4	0.401
5	0.490
6	0.600
7	0.695
8	0.811

**Gambar L.2.** Kurva Baku MDA pada  $\lambda$  maksimal 532nm.

**Lampiran 12.**Absorbansi dan Konsentrasi MDA pada Jantung

Konsentrasi MDA dapat dihitung dengan menggunakan kurva baku MDA yang sudah ada dan memasukkan data absorbansi yang didapat.

Contoh perhitungan konsentrasi MDA sebagai berikut:

$$y = 0,097x + 0,022$$

$$0,03257 = 0,097x + 0,022$$

$$x = (0,03257-0,022) / 0,097$$

$$= 0,109 (\mu\text{g/mL})$$

**Tabel L.12.1** Absorbansi dan Konsentrasi MDA pada Jantung

Tikus	Absorbansi rata-rata	Kadar Malondialdehid ( $\mu\text{g/mL}$ )
Kontrol Negatif	0.03257	0.109
	0.04024	0.188
	0.0382	0.167
	0.03286	0.112
rata		0.144
Kontrol Positif	0.08379	0.637
	0.07845	0.582
	0.07428	0.539
	0.0769	0.566
rata		0.581
Terapi 300	0.0630	0.421
	0.0570	0.357
	0.0560	0.352
	0.0550	0.341
Rata		0.368
Terapi 600	0.0470	0.257
	0.0420	0.202
	0.0440	0.229
	0.0450	0.232
Rata		0.230
Terapi 900	0.0390	0.176
	0.0364	0.148
	0.0332	0.115
	0.0386	0.171
Rata		0.153

Perhitungan presentase peningkatan dan penurunan kadar MDA

- Peningkatan kadar MDA kelompok tikus hiperkolesterolemia terhadap tikus kontrol negatif

Rumus 
$$\frac{\text{kontrol positif} - \text{kontrol negatif (sehat)} \times 100\%}{\text{Kontrol negatif(sehat)}}$$

$$\frac{0,581-0,144}{0,144} \times 100\% = 303,47\%$$

- Penurunan kadar MDA kelompok tikus terapi 300mg/kgBB, 600mg/kgBB, dan 900mg/kgBB terhadap tikus kontrol positif (hiperkolesterolemia).

Rumus 
$$\frac{\text{kontrol positif} - \text{Terapi} \times 100\%}{\text{Kontrol positif}}$$

Dosis 300mg/kgBB

$$\frac{0,581-0,368}{0,581} \times 100\% = 36,66\%$$

Dosis 600mg/kgBB

$$\frac{0,581-0,230}{0,581} \times 100\% = 60,4\%$$

Dosis 900mg/kgBB

$$\frac{0,581-0,152}{0,581} \times 100\% = 73,8\%$$





## Lampiran 13. Uji Statistika

### 13.1 Kadar MDA

#### 13.1.1 Uji Normalitas

##### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MDA
N		20
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	.2951
	Std. Deviation	.17095
Most Extreme Differences	Absolute	.194
	Positive	.194
	Negative	-.138
Kolmogorov-Smirnov Z		.867
Asymp. Sig. (2-tailed)		.440

a. Test distribution is Normal.

Hasil pengujian normalitas menggunakan *One-Sample kolmogorov-Smirnov Test* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,439 atau  $p > 0,05$  yang artinya data terdistribusi normal.

#### 13.1.2 Uji Homogenitas

##### Test of Homogeneity of Variances

MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.724	4	15	.589

Hasil pengujian Homogenitas tabel diatas menunjukkan nilai 0,724 dengan nilai signifikan sebesar 0,589 dimana nilai tersebut lebih dari  $\alpha=0,05$ , sehingga diperoleh kesimpulan data mempunyai ragam yang homogen.

### 13.1.3 Uji ANOVA

ANOVA					
MDA	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.538	4	.134	114.604	.000
Within Groups	.018	15	.001		
Total	.555	19			

Tabel ANOVA diatas menunjukkan F hitung sebesar 114.604 dan nilai signifikansi sebesar  $(p)=0.000$ , maka **Ho ditolak**, dan H1 diterima, atau dengan kata lain terdapat perbedaan signifikan akibat perlakuan terhadap kadar MDA dengan tingkat kepercayaan 0,05.

### 13.1.4 Uji Tukey

MDA						
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Tukey HSD <sup>a</sup>						
Kontrol	4	.1440				
Negatif	4			.3677		
Terapi 300	4					
Terapi 600	4		.2300			
Terapi 900	4	.1525				
Kontrol Positif	4				.5810	
Sig.		.996	1.000	1.000	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

MDA

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Tukey HSD <sup>a</sup>					
Kontrol Negatif	4	.1440			
Terapi 300	4			.3677	
Terapi 600	4		.2300		
Terapi 900	4	.1525			
Kontrol Positif	4				.5810
Sig.		.996	1.000	1.000	1.000

Hasil Uji lanjutan Tukey menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata dari setiap perlakuan (terapi 300, terapi 600, terapi 900). Sedangkan kontrol negatif dan terapi 900 tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata.



### 13.2 Ekpresi TNF- $\alpha$

#### 13.2.1 Uji Normalitas

##### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		TNF
N		20
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	1.79700
	Std. Deviation	.907127
Most Extreme Differences	Absolute	.137
	Positive	.137
	Negative	-.123
Kolmogorov-Smirnov Z		.611
Asymp. Sig. (2-tailed)		.850

a. Test distribution is Normal.

Hasil pengujian normalitas menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,850 ( $p > 0,05$ ) atau  $H_0$  diterima yang artinya data memiliki sebaran yang normal.

#### 13.2.2 Uji Homogenitas

##### Test of Homogeneity of Variances

TNF

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.304	4	15	.313

Hasil Uji homogenitas diatas menunjukkan bahwa nilai 1,304 dengan nilai signifikansi sebesar 0,313 ( $\alpha=0,05$ ), sehingga  $H_0$  diterima dan dapat diperoleh kesimpulan bahwa data tersebut mempunyai homogenitas yang sama.

### 13.2.3 Uji ANOVA

#### ANOVA

TNF	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.506	4	3.876	450.839	<b>.000</b>
Within Groups	.129	15	.009		
Total	15.635	19			

Tabel ANOVA diatas menunjukkan F hitung sebesar 450,839 dan nilai signifikansi sebesar  $(p)=0.000$ , maka  **$H_0$  ditolak**, dan  $H_1$  diterima, atau dengan kata lain terdapat perbedaan signifikan akibat perlakuan dengan tingkat kepercayaan 0,05.



### 13.2.4 Uji Tukey

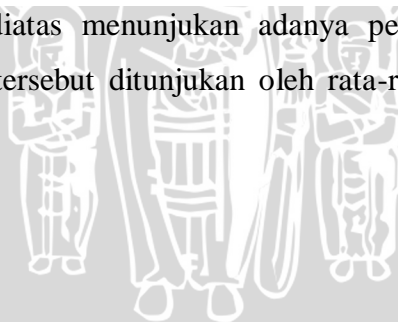
TNF

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
kontrol negatif	4	.35500				
Terapi 300	4				2.27000	
Terapi 600	4			1.93500		
Terapi 900	4		1.43500			
kontrol positif	4					2.99000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Tabel tes Tukey diatas menunjukkan adanya perbedaan nilai rata-rata kelompok perlakuan. Hal tersebut ditunjukkan oleh rata-rata yang terdapat pada kolom yang berbeda.



Perhitungan presentase peningkatan dan penurunan Ekspresi TNF- $\alpha$

- Peningkatan Ekspresi TNF- $\alpha$  kelompok tikus hiperkolesterolemia terhadap tikus kontrol negatif

Rumus 
$$\frac{\text{kontrol positif} - \text{kontrol negatif (sehat)} \times 100\%}{\text{Kontrol negatif(sehat)}}$$

$$\frac{2,99 - 0,355}{0,355} \times 100\% = 752,8\%$$

- Penurunan Ekspresi TNF- $\alpha$  kelompok tikus terapi 300mg/kgBB, 600mg/kgBB, dan 900mg/kgBB terhadap tikus kontrol positif (hiperkolesterolemia).

Rumus 
$$\frac{\text{kontrol positif} - \text{Terapi} \times 100\%}{\text{Kontrol positif}}$$

Dosis 300mg/kgBB

$$\frac{2,99 - 2,27}{2,99} \times 100\% = 24,08\%$$

Dosis 600mg/kgBB

$$\frac{2,99 - 1,930}{2,99} \times 100\% = 35,45\%$$

Dosis 900mg/kgBB

$$\frac{2,99 - 1,44}{2,99} \times 100\% = 51,83\%$$

