

**TERAPI *WATER SOLUBLE EXTRACT* (WSE) YOGURT
SUSU KAMBING TERHADAP *THYROID STIMULATING
HORMONE* (TSH) DALAM SERUM DAN EKSPRESI
INTERLEUKIN 1 (IL-1) PADA KELENJAR TIROID
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL
AUTOIMMUNE THYROIDITIS (AITD)
HASIL INDUKSI TIROGLOBULIN
ANJING**

SKRIPSI

Oleh:

**RIDHO WINDARSYAH
125130107111029**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2017

**TERAPI WATER SOLUBLE EXTRACT (WSE) YOGURT SUSU KAMBING
TERHADAP THYROID STIMULATING HORMONE (TSH) DALAM SERUM
DAN EKSPRESI INTERLEUKIN 1 (IL-1) PADA KELENJAR TIROID PADA
TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL AUTOIMMUNE THYROIDITIS (AITD)
HASIL INDUKSI TIROGLOBULIN ANJING**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

RIDHO WINDARSYAH
125130107111029



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017**



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

TERAPI WATER SOLUBLE EXTRACT (WSE) YOGURT SUSU KAMBING TERHADAP THYROID STIMULATING HORMONE (TSH) DALAM SERUM DAN EKSPRESI INTERLEUKIN 1 (IL-1) PADA KELENJAR TIROID PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL AUTOIMMUNE THYROIDITIS (AITD) HASIL INDUKSI TIROGLOBULIN ANJING

Oleh:

RIDHO WINDARSYAH
125130107111029

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal.....
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Fajar Shodiq P, M.Biotech

NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

NAMA : Ridho Windarsyah

NIM : 125130107111029

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi Berjudul:

Terapi *Water Soluble Extract* (WSE) Yogurt Susu Kambing Terhadap *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) dalam Serum dan Ekspresi Interleukin 1 (IL-1) pada Kelenjar Tiroid pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Autoimmune Thyroiditis* (AITD) Hasil Induksi Tiroglobulin Anjing

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 7 Februari 2017

Yang menyatakan,

(Ridho Windarsyah)

NIM. 125130107111029

Terapi *Water Soluble Extract* (WSE) Yogurt Susu Kambing Terhadap *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) dalam Serum dan Ekspresi Interleukin 1 (IL-1) pada Kelenjar Tiroid pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Autoimmune Thyroiditis* (AITD) Hasil Induksi Tiroglobulin anjing

ABSTRAK

Autoimmune Thyroiditis (AITD) adalah penyakit autoimun pada organ spesifik tiroid. Penyakit ini ditandai dengan peningkatan kadar *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) dan Ekspresi Interleukin 1 (IL-1). *Water Soluble Extract* (WSE) Yogurt Susu Kambing memiliki kandungan laktoferin dan *Conjugated Linoleic Acid* (CLA) sebagai antiinflamasi. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh WSE yogurt susu kambing terhadap kadar TSH serum dan ekspresi IL-1 jaringan tiroid pada hewan model AITD induksi tiroglobulin anjing. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar betina umur 6-8 minggu dengan berat badan 100-150 gram. Induksi menggunakan tiroglobulin anjing yang diemulsikan menggunakan CFA atau IFA (perbandingan 1:1) pada hari ke-0, 14 dan 28 secara subcutan. Tikus dibagi menjadi 5 perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kelompok terapi dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB. Kadar TSH diukur menggunakan ELISA dan ekspresi IL-1 dengan *immunoratio* yang selanjutnya dianalisis menggunakan *one way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* ($\alpha = 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi WSE yogurt susu kambing secara signifikan ($p < 0,05$) menurunkan kadar TSH dan ekspresi IL-1 pada tikus AITD yang diinduksi tiroglobulin anjing dan dosis 900 mg/kg BB adalah dosis terbaik. Kesimpulan dari penelitian ini terapi WSE yogurt susu kambing dapat digunakan sebagai terapi alternatif kondisi AITD.

Kata Kunci : *Autoimmune thyroiditis*, tiroglobulin anjing, yogurt susu kambing, TSH, IL-1

Water Soluble Extract (WSE) Therapy Derived from Goat Milk Yoghurt against Serum Thyroid Stimulating Hormone (TSH) and Interleukin 1 (IL-1) Expression on Rats (*Rattus norvegicus*) Thyroids Glands Modeled after Autoimmune Thyroiditis (AITD) Induced by Dog Thyroglobulin

ABSTRACT

Autoimmune Thyroiditis (AITD) is an autoimmune disease specific on thyroid. This disease were marked by the increased of Thyroid Stimulating Hormone (TSH) and Interleukin 1 (IL-1) expression. Water Soluble Extract (WSE) derived from goat milk yoghurt has lactoferrin and Conjugated Linoleic Acid (CLA) as anti-inflammatory. The purpose of this research is to study the effect of WSE derived from goat milk yoghurt at serum TSH and IL-1 expression from thyroid tissue on AITD model animal induced with dog thyroglobulin. The animal model used in this study were 6-8 weeks female wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighed 100-150 gram. Induction were done subcutaneously using emulsified dog thyroglobulin using CFA or IFA (1:1 ratio) at day 0, 14th and 28th. The rats were divided into 5 group, which was negative group, positive control, therapy group with the dosage of 300 mg/kg BW, 600 mg/kg BW and 900 mg/kg BW. TSH level was measured using ELISA and IL-1 expression using Immunoratio then analyzed with one way ANOVA and submitted through Tukey test ($\alpha = 0,05$). The results of this research is WSE derived from goat milk yoghurt could significantly ($p < 0,05$) decrease the TSH level and IL-1 expression on AITD rats induced by dog thyroglobulin and 900 mg/kg BW is the best dose. In conclusion, therapy using WSE derived from goat milk yoghurt can be used as an alternative therapy on AITD condition.

Keywords : Autoimmune thyroiditis, Dog thyroglobulin, Goat milk yoghurt, TSH, IL-1

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, atas berkat limpahan rahmat dan hidayahnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Terapi *Water Soluble Extract* (WSE) Yogurt Susu Kambing Terhadap *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) dalam Serum dan Ekspresi Interleukin 1 (IL-1) pada Kelenjar Tiroid pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Autoimmune Thyroiditis* (AITD)” dengan semangat dan tepat waktu. Penelitian ini merupakan bagian dari payung penelitian yang diketuai oleh drh. Aldila Noviatri.

Selama penulisan proposal ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku dosen pembimbing 1 atas bimbingan, saran, kesabaran, fasilitas serta waktu yang telah diberikan selama ini.
2. drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech selaku dosen pembimbing 2 atas bimbingan, saran, kesabaran, fasilitas serta waktu yang telah diberikan selama ini.
3. drh. Aulia Firmawati, M. Vet sebagai dosen penguji 1 dan drh Ajeng Erika PH, M.Si sebagai dosen penguji 2 yang telah memberikan saran kepada penulis.
4. drh. Aldila Noviatri yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk ikut serta dalam penelitian ini.
5. Seluruh jajaran Dekanat, Dosen dan Staf Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas dorongan semangat dan fasilitas yang diberikan.

6. Ayahanda Erwin Rosian, ibunda Alida dan kakak-kakak Herlinda Anggraini dan Rico Alwinsyah yang saya sayangi untuk doa, kasih sayang, dukungan serta pengorbanan baik moril maupun materi selama ini.
7. Teman – teman CEROLAS, serta keluarga besar angkatan 2012 FKH UB atas cinta, persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan dan mimpi – mimpi yang luar biasa.
8. Annisa Nur Attina dan Lia Aulia selaku rekan dalam penelitian ini.
9. Teman – teman kontrakan “PARLENTE” yaitu Nirwan Maulana, David Prasetyo Jati dan Hio Primatakwa yang telah menjadi keluarga bagi penulis yang selalu mendukung dan menyemangati penulis.
10. Serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan proposal ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa proposal ini masih jauh dari kata sempurna, maka saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya.

Akhir kata penulis berharap semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca. Amin.

Malang, 7 Februari 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kelenjar Tiroid	5
2.2 Patomekanisme <i>Autoimmune Thyroiditis</i> (AITD)	6
2.3 Hewan Model AITD Dengan Induksi Tiroglobulin Anjing	7
2.4 <i>Thyroid Stimulating Hormone</i> (TSH)	9
2.5 Interleukin 1 (IL – 1)	10
2.6 <i>Water Soluble Extract</i> (WSE) Yogurt Susu Kambing	11
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	13
3.1 Kerangka Konsep	13
3.2 Hipotesis Penelitian	15
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	16
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	16
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	16
4.3 Tahapan Penelitian	16
4.4 Rancangan Penelitian	18
4.5 Batasan Penelitian	18
4.6 Persiapan Hewan Coba	19
4.7 Isolasi Tiroglobulin Anjing	19
4.8 Persiapan Hewan Model AITD	20
4.9 Pembuatan Terapi WSE Yogurt Susu Kambing	21
4.10 Koleksi Serum	22
4.11 Pengukuran Kadar TSH	22
4.12 Pengambilan Organ Tiroid Tikus	22
4.13 Pembuatan Preparat Histologi	23

4.14 Pewarnaan Imunohistokimia IL-1 24

4.15 Pengamatan Ekspresi IL-1 25

4.16 Analisa Data..... 25

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN 25

5.1 Kadar *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) dalam Serum 25

5.2 Ekspresi Interleukin 1 (IL – 1) pada Kelenjar Tiroid..... 29

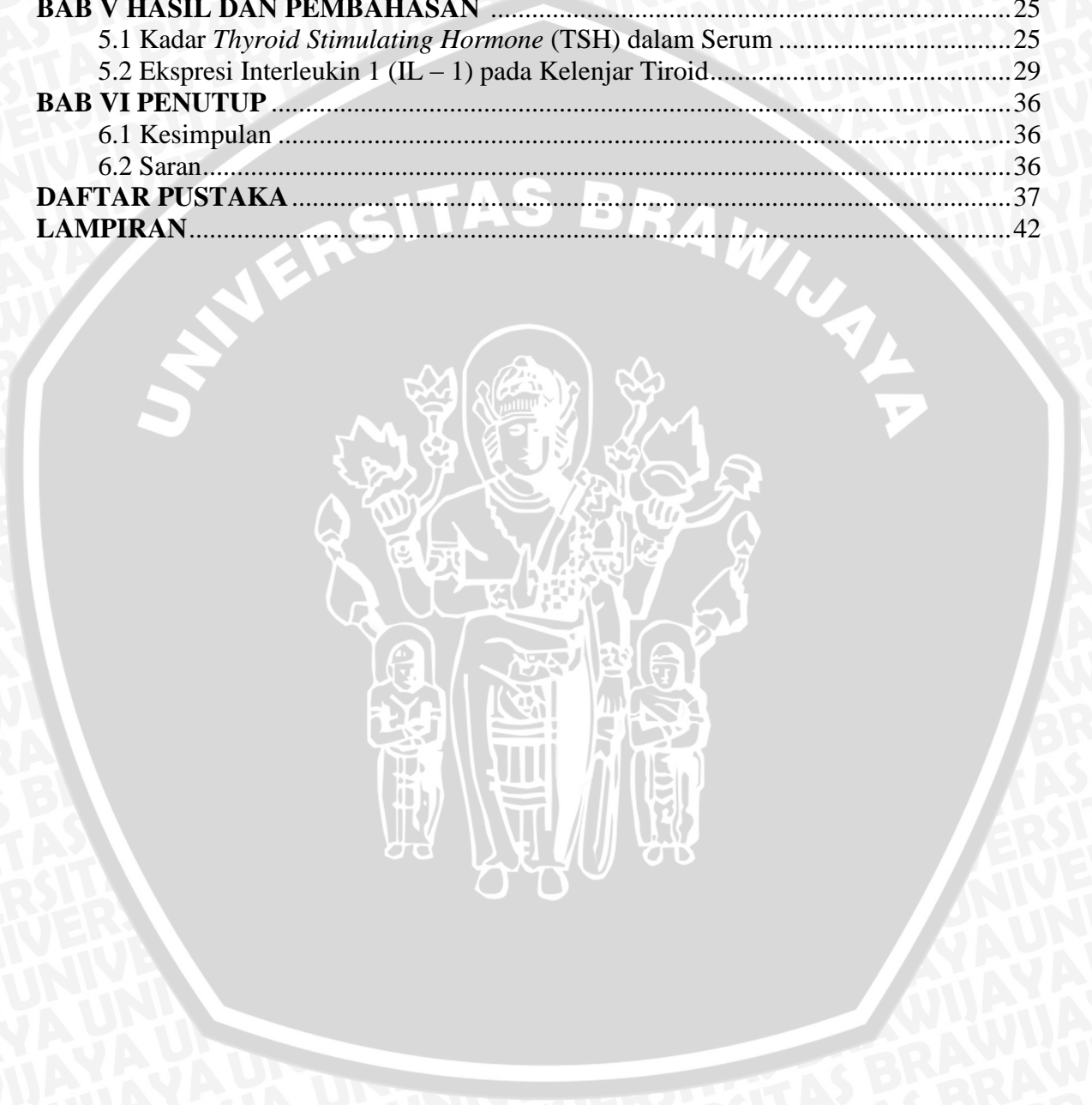
BAB VI PENUTUP 36

6.1 Kesimpulan 36

6.2 Saran..... 36

DAFTAR PUSTAKA 37

LAMPIRAN..... 42

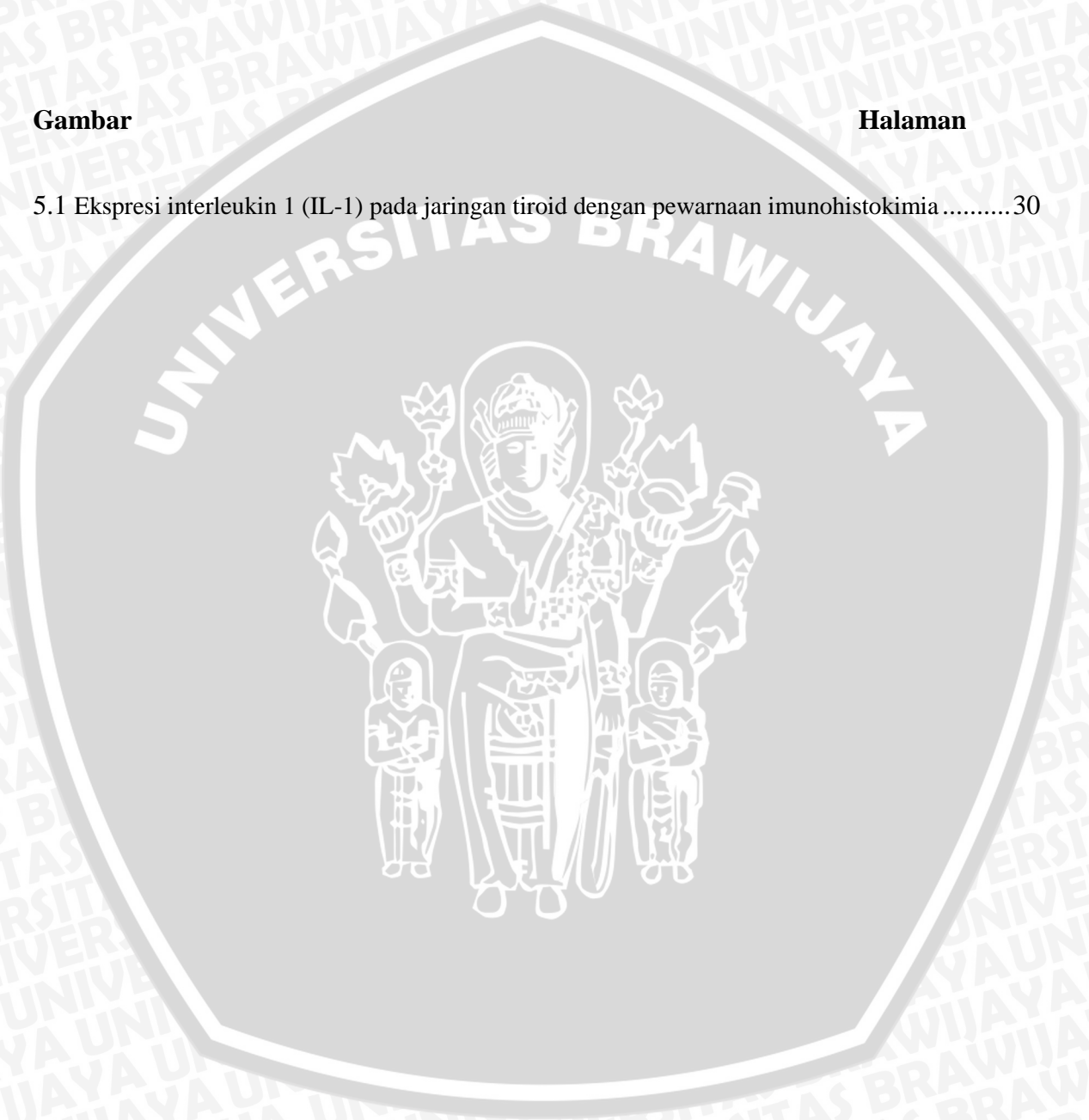


DAFTAR GAMBAR

Gambar

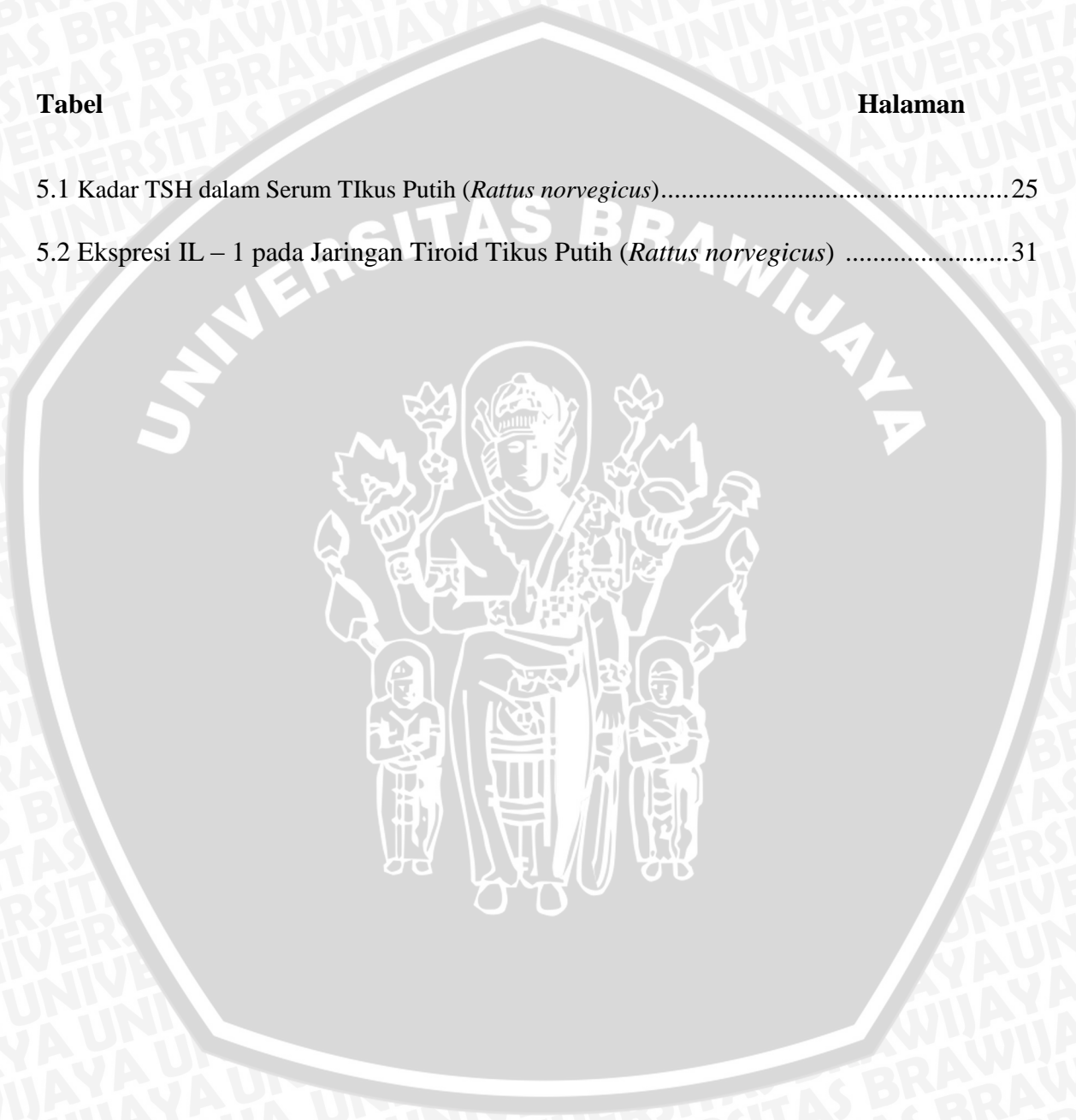
Halaman

5.1 Ekspresi interleukin 1 (IL-1) pada jaringan tiroid dengan pewarnaan imunohistokimia30



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Kadar TSH dalam Serum Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	25
5.2 Ekspresi IL – 1 pada Jaringan Tiroid Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	31



LAMPIRAN

Lampiran

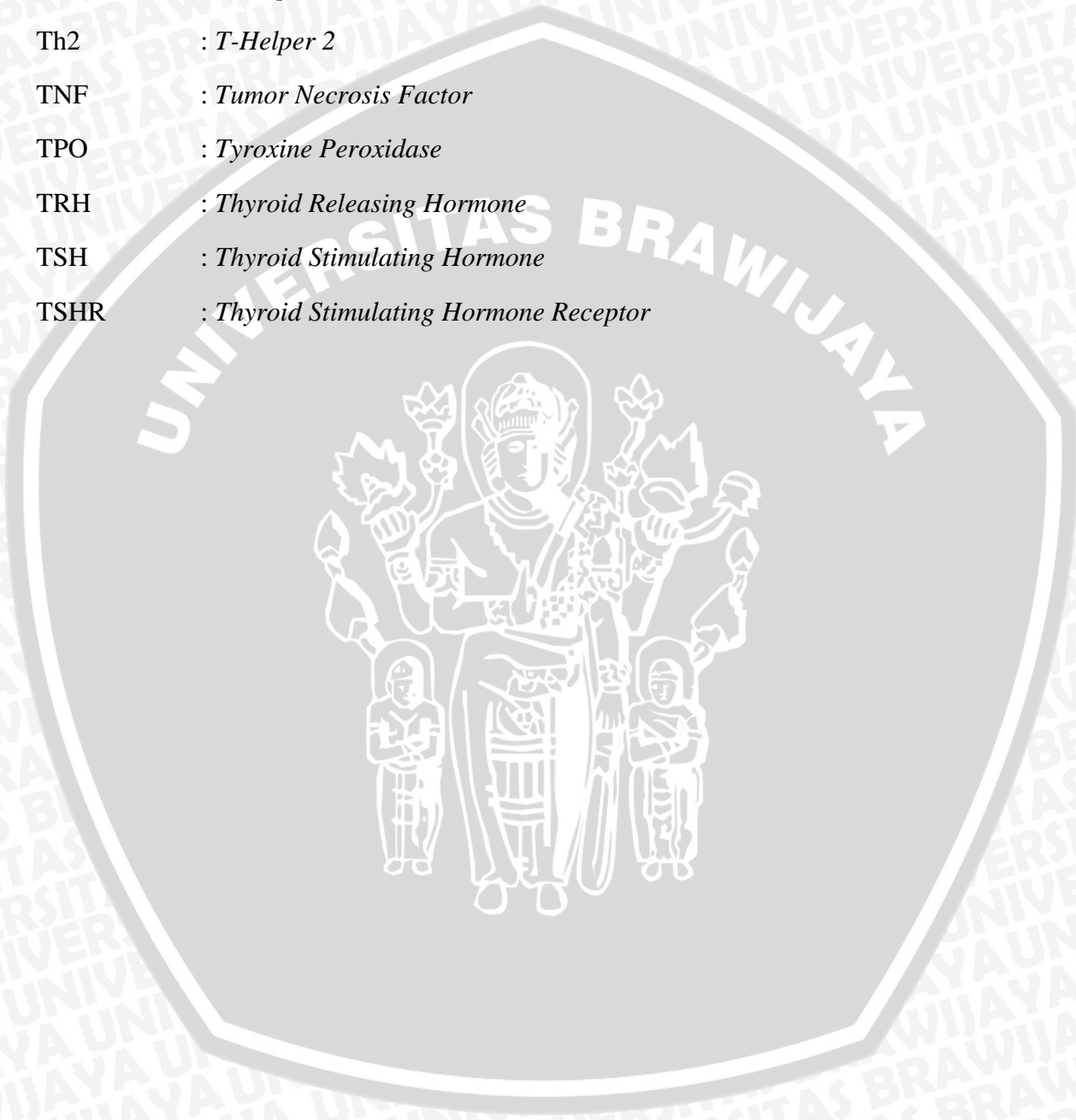
Halaman

1. Laik Etik Penelitian	42
2. Rancangan Alir Penelitian.....	43
3. Tahapan Pembuatan WSE.....	44
4. Perhitungan Dosis CFA, IFA dan Tg.....	45
5. Perhitungan Dosis WSE.....	46
6. Prosedur ELISA	48
7. Hasil dan Analisa Data Kadar <i>Thyroid Stimulating Hormone</i> (TSH).....	50
8. Analisis Statistik Uji TSH.....	52
9. Pembuatan Preparat Organ.....	56
10. Pewarnaan Preparat dengan Metode Imunohistokimia.....	57
11. Imunoratio Ekspresi Interleukin 1 (IL – 1).....	59
12. Analisis Statistik Uji IL – 1.....	60
13. Dokumentasi Penelitian	60

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

AITD	: <i>Autoimmune Thyroiditis</i>
AOAC	: <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
CTL	: <i>Canine Lymphocytic Thyroiditis</i>
CFA	: <i>Complete Freud's Adjuvant</i>
DAB	: <i>Diaminobenzidine</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
IFA	: <i>Incomplete Freud's Adjuvant</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$: <i>Mikrogram per mikroliter</i>
μl	: <i>Mikroliter</i>
mL	: <i>mililiter</i>
PBS	: <i>Phospat Buffer Saline</i>
PBST-PMSF	: <i>PBSTween – Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride</i>
PFA	: <i>Parafolmaldehide</i>
SAHRP	: <i>Strep-Avidin Horseraglodish Peroxidase</i>
T3	: <i>Triiodothyronine</i>
T4	: <i>Tyroxine</i>
TCR	: <i>T-cell-receptor</i>
Tg	: <i>Tiroglobulin</i>

- Th : *T-Helper*
- Th1 : *T-Helper 1*
- Th2 : *T-Helper 2*
- TNF : *Tumor Necrosis Factor*
- TPO : *Tyroxine Peroxidase*
- TRH : *Thyroid Releasing Hormone*
- TSH : *Thyroid Stimulating Hormone*
- TSHR : *Thyroid Stimulating Hormone Receptor*



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Autoimmune thyroiditis (AITD) merupakan penyakit autoimun pada organ spesifik tiroid. Penyakit ini memiliki bentuk paling umum yaitu hipotiroidisme (*Hashimoto's thyroiditis*) dan hipertiroidisme (*Grave disease*). Kedua penyakit ini mempengaruhi imunologi dan penyakit ini dapat berubah seiring proses perubahan autoimun (Manorama *et al.*, 2005).

Penyakit AITD bisa menyerang manusia dan hewan. Pada manusia lebih banyak menyerang wanita terutama wanita berumur 30 – 50 tahun daripada laki – laki. Pada wanita menyerang sekitar 4 – 5% populasi dan pada laki – laki lebih dari 1% populasi di dunia (Manorama *et al.*, 2005). Penyakit ini secara klinis mirip dengan penyakit *Canine Lymphocytic Thyroiditis* (CLT) pada anjing. Berdasarkan penelitian di Swedia prevalensi CLT pada ras *Giant Schnauzer* sebesar 16% dan pada ras *Hovawart* sebesar 13% tetapi terdapat beberapa ras anjing yang memiliki prevalensi tinggi terhadap penyakit ini adalah *Golden retriever*, *Doberman pincher*, *American Cocker Spaniel*, *Boxer* dan *Rhodesian Rigerback* (Egenvall *et al.*, 2000).

Hormon tiroid adalah hormon yang disintesis dan dilepaskan dari kelenjar tiroid. Stimulus untuk sekresi hormon tiroid adalah *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH). Stimulus untuk pelepasan TSH adalah *Thyroid Releasing Hormone* (TRH) yang disekresi dari hipotalamus ke dalam aliran darah portal. Hormon tiroid bekerja dengan cara umpan balik negatif pada hipotalamus, untuk menurunkan pelepasan

TRH lebih lanjut, dan pada hipofisis, untuk menurunkan pelepasan TSH. *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) juga bekerja pada hipotalamus untuk menurunkan pelepasan TRH lebih lanjut (Corwin, 2008).

Interleukin 1 merupakan sitokin proinflamasi. Ekspresi IL-1 pada AITD mengalami peningkatan akibat makrofag teraktivasi oleh sel *T-helper* yang tersensitisasi oleh antigen. Ekspresi IL-1 memicu proliferasi dan diferensiasi dari limfosit T dan limfosit B sehingga terbentuk autoantibodi yang merupakan reaksi autoimun. Reaksi autoimun berakibat memicu kerusakan jaringan kelenjar tiroid. Kerusakan pada tiroid akan memicu mekanisme timbal balik sehingga terjadi infiltrasi mononuklear dan limfosit pada tiroid sehingga memperparah reaksi autoimun (Weetman, 2003).

Whey dan kasein protein susu kambing sebagai peptida bioaktif dan termasuk imunoglobulin, *lactoperoksidase*, *folate binding protein*, α -*lactalbumin* dan β -*lactoglobulin* (Diaz *et al.*, 2010; Antanasova and Ivanova, 2010). β -*lactoglobulin* bertindak sebagai emulgator efektif imunomodulator melalui vitamin A, vitamin D, kalsium dan *fatty acid* dengan menunjukkan adanya aktifitas *radical scavenging* (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2007). Laktoferin pada susu kambing sebagai antiinflamasi ditunjukkan dengan penghambatan sitokin *Tumor Necrosis Factor* (TNF), interleukin 1 (IL-1) dan interferon γ (IFN- γ) (Hayashida *et al.*, 2004; Ebringer *et al.*, 2008). CLA memiliki fungsi sebagai antiinflamasi dengan mengurangi produksi sitokin proinflamasi (Park, 2009). Bagian *whey* pada yogurt merupakan bagian yang tidak terpakai dalam industri pembuatan keju (Legowo dkk,

2003) sehingga dengan terapi WSE yogurt susu kambing ini merupakan upaya untuk memanfaatkan bagian whey dari yogurt diharapkan dapat menurunkan kadar TSH dan menurunkan ekspresi IL-1 pada hewan model AITD.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut:

1. Apakah terapi *Water Soluble Extract* (WSE) yogurt susu kambing dapat menurunkan kadar TSH di serum pada tikus model AITD?
2. Apakah terapi *Water Soluble Extract* (WSE) yogurt susu kambing dapat menurunkan ekspresi IL-1 di kelenjar tiroid pada tikus model AITD?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang sudah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar dengan umur 6-8 minggu dan berat badan antara 100-150 gram yang diperoleh dari Biosains UB
2. Hewan model AITD dibuat dengan cara diinjeksi menggunakan 0,2 mL tiroglobulin anjing dalam *Complete Freud's Adjuvant* (CFA) serta *Incomplete Freud's Adjuvant* (IFA) secara subkutan pada *cervical*
3. Parameter yang diamati adalah perubahan kadar *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) dengan ELISA dan ekspresi Interleukin 1 (IL-1) dengan imunohistokimia

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui potensi antiinflamasi WSE yogurt susu kambing terhadap penurunan kadar TSH di serum pada tikus model AITD
2. Mengetahui potensi antiinflamasi WSE yogurt susu kambing terhadap penurunan ekspresi IL-1 di kelenjar tiroid pada tikus model AITD

1.5 Manfaat Penelitian

Dengan adanya penelitian ini dapat diketahui potensi WSE yogurt susu kambing pada tikus model AITD yang diamati dari kadar TSH dan ekspresi IL-1. Penelitian yang bersifat *true experimental with post test design only* ini diharapkan dapat memberikan informasi WSE yogurt susu kambing sebagai antiinflamasi untuk dikembangkan dan menjadi pengobatan alternatif terlebih pada penyakit AITD

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kelenjar Tiroid

Kelenjar tiroid menghasilkan hormon tiroid yang berpengaruh dalam tiga hal pokok fisiologi yaitu diferensiasi seluler, pertumbuhan dan metabolisme. Selain itu, hormon tiroid juga berperan dalam mengatur sejumlah fungsi homeostasis termasuk produksi energi dan panas (Greenspan F.S. MD and Baxter J.D. MD, 1994). Kelenjar tiroid juga menghasilkan hormon selain hormon tiroid yang disebut dengan kalsitonin. Hormon paratiroid dan kalsitonin ikut berpartisipasi dalam mengontrol homeostasis kalsium dan fosfor serta mempunyai pengaruh yang sangat signifikan terhadap fisiologi tulang (Astuti, 2015).

Kelenjar tiroid berdasarkan anatomi terletak disekitar leher, tepatnya pada bagian pertama trakea. Pada manusia kelenjar tiroid berbentuk seperti kupu – kupu, dengan dua lobus lateralis yang dihubungkan dengan isthmus. Sedangkan pada hewan tidak terdapat penghubung antarlobus. Pada sebagian besar hewan kedua glandula tiroid masing – masing dipisahkan oleh trakea dan berwarna merah – kecoklatan. Berdekatan dengan kelenjar tiroid, terdapat nodulus/nodul yang berwarna lebih terang pada permukaan yang disebut dengan kelenjar paratiroid (Peterson, 2012).

Sel – sel kelenjar tiroid terdiri atas sel epitel beraturan yang membentuk sebuah folikel tiroid yang di dalamnya terisi dengan koloid (Bowen, 1999). Sel – sel folikel ini menjadi kolumnar jika dirangsang oleh TSH dan gepeng saat istirahat

(Geneeskunde The Medicine Journal, 2000; Greenspan F.S. MD and Baxter J.D. MD, 1994). Folikel tiroid bertindak sebagai pabrik untuk memproduksi hormon. Tahapan sintesis hormon tiroid terdiri dari produksi dan akumulasi materi yang masih mentah, yakni tirosin, pada proses selanjutnya akan membentuk glikoprotein yang besar disebut tiroglobulin yang disintesis oleh sel – sel epitel tiroid dan disekresikan ke dalam lumen folikel koloid sebagai pool tiroglobulin. Satu molekul tiroglobulin mengandung 134 tirosin yang hanya sebagian digunakan untuk mensintesis T3 dan T4 (Bowen, 1999).

Iodida secara aktif diambil dari darah oleh sel epitel melalui *simport sodium-iodide* atau “*iodine trap*”. Iodida diangkut ke dalam lumen folikel dengan tiroglobulin. Pembentukan hormon tiroid membutuhkan enzim tiroid peroksidase (TPO) yang mengatalisis 2 reaksi berurutan yaitu iodinasi tirosin pada tiroglobulin dan sintesis tiroksin atau triiodotironin dari dua iodotirosin. Hormon tiroid akan terakumulasi di dalam koloid pada permukaan sel epitel tiroid dengan adanya aksi TPO. Hormon yang bebas dapat disekresikan ke dalam darah. Pelepasan hormon tiroid dari tiroglobulin melalui digesti lisosom di sel epitel tiroid (Bowen,1999). Sebagian besar ($\pm 85\%$) hormon yang disekresikan dalam peredaran darah oleh kelenjar tiroid adalah T4, selebihnya ($\pm 15\%$) adalah T3 (Klein I and Danzi S, 2007).

2.2 Patomekanisme Autoimmune Thyroiditis (AITD)

Penyakit AITD terjadi karena adanya inflamasi yang disebabkan oleh respon autoimun yaitu terbentuknya autoantibodi akibat pengenalan *self-antigen* sebagai non self-antigen (Weetman, 2004). Penyakit ini ditandai dengan infiltrasi limfosit dan

autoreaktif terhadap tiroid sebagai mekanisme respon imun (Quarantino, 2004). Infiltrasi sel limfosit memediasi kerusakan sel – sel pada tiroid sehingga gambaran histopatologi tiroid yang mengalami AITD ditemukan adanya infiltrasi sel mononuklear, perubahan struktur dan bentuk jaringan tiroid (Chistiakov dan Turakulov, 2003; Quarantino, 2004). kerusakan jaringan tiroid ini mempengaruhi kadar hormon tertentu seperti TSH, T3 dan T4 serta peningkatan antibodi terhadap tyroxine peroxidase dan tiroglobulin (Chistiakov, 2005; Song *et al.*, 2011).

Self-antigen-specific akan mengaktifkan *T-cell-receptor* (TCR) untuk mengaktifasi sel T CD4⁺. Sel T CD4⁺ berdiferensiasi menjadi sel T-helper (Th). T-helper 1 (Th1) menghasilkan interferon gamma (IFN- γ), interleukin 2 (IL-2) dan tumor necrosis factor (TNF- α). Sitokin ini mengaktifkan makrofag, untuk membentuk sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 dan IL-6 dan menginduksi mekanisme imun efektor sitotoksik dari makrofag. Sebaliknya, sel T helper 2 (Th2) menghasilkan IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13, sitokin ini menginduksi pembentukan antibodi tetapi juga menghambat fungsi makrofag disebut sitokin antiinflamasi (Irawati, 2014).

2.3 Hewan Model AITD dengan Induksi Tiroglobulin Anjing

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan salah satu hewan yang banyak digunakan dalam penelitian. Tikus memiliki kemiripan dengan manusia maupun hewan mamalia dari segi bentuk organ, fungsi serta biokimia. Kemiripan ini menjadi dasar untuk menjadikan tikus putih menjadi hewan coba (Hedrich, 2000). Tikus memiliki mata merah, rambut berwarna putih, panjang tubuh 440 mm, panjang ekor 205 mm, bobot dewasa jantan berkisar 450-520 gram dan betina 250-300 gram. Tikus

memiliki masa sapih hingga usia 21 hari dan masa dewasa pada usia 40-60 hari. Konsumsi air minum tikus berkisar 8-11 mL/100gram BB dan dengan kebutuhan pakan 5 gram/Kg BB (Sharp and La Regina, 1988; Myers and Armitage, 2004).

Hewan model autoimun dapat dibagi menjadi tiga jenis yaitu *induced*, *spontaneous* dan *Genetically-Engineered Model*. Hewan model AITD dengan jenis *Induced* dapat didapatkan dengan menginduksi self-antigen berupa *Thyroid Peroxidase* (TPO), tiroglobulin (Tg) dan *Thyroid Stimulating Hormone Receptor* (TSHR). Tiroglobulin lebih banyak dipilih karena merupakan glikoprotein spesifik yang dapat menginduksi AITD secara signifikan dan paling banyak terdapat di kelenjar tiroid yaitu 75% (Ng *et al.*, 2004; Kong, 1996). Tiroglobulin dari berbagai spesies memiliki kesamaan fisik, biokimia dan struktur molekul sehingga tidak menutup kemungkinan bahwa tiroglobulin anjing juga dapat menginduksi terjadinya AITD (Zhou dan Gill, 2005). Tiroglobulin akan diemulsikan dengan *Adjuvant* saat akan diinjeksikan ke hewan coba. *Adjuvant* merupakan suspensi minyak yang berfungsi untuk memaksimalkan respon imun. *Adjuvant* yang digunakan adalah *Complete Freud's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freud's Adjuvant* (IFA). *Complete Freud's Adjuvant* (CFA) merupakan emulsi air dalam minyak yang mengandung *killed Mycobacterium butyricum* yang berfungsi untuk meningkatkan antigenitas dan menstimulasi respon imun yang lebih besar dari antigen saja (IACUC Guideline, 2015). *Incomplete Freud's Adjuvant* (IFA) adalah adjuvant suspensi tanpa *heat-killed mycobacterium* yang dapat merangsang produksi antibodi secara

cepat (Billiau dan Matthys, 2001). CFA dan IFA digunakan untuk merangsang dan sebagai *booster* terjadinya proses autoimun.

2.4 *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH)

Hormon tiroid terdiri dari *Triiodothyronine* (T3) dan *Tyroxine* (T4). Stimulus untuk sekresi hormon tiroid adalah *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH), yang dilepaskan kedalam aliran darah dari hipofisis anterior. Stimulus untuk pelepasan TSH adalah *Thyroid Releasing Hormone* (TRH), yang disekresi dari hipotalamus ke dalam aliran darah portal. Hormon tiroid bekerja dengan cara umpan balik negatif pada hipotalamus untuk menurunkan pelepasan TRH lebih lanjut dan pada hipofisis untuk menurunkan pelepasan TSH. TSH juga dapat bekerja pada hipotalamus untuk menurunkan pelepasan TRH lebih lanjut (Corwin, 2008).

Thyroid Stimulating Hormone (TSH) diproduksi di *pituitary thyrotroph* dan mengaktifkan sel – sel folikel tiroid dengan mengikat pada TSH receptor (Magner, 1990). Hormon ini meningkatkan proliferasi sel tiroid dan sintesis hormon tiroid dengan menginduksi ekspresi tiroglobulin, thyroid peroxidase, sodium iodide symporter dan type I iodothyronine deodinase (D1) (Tang *et al.*, 1995). Sintesis TSH sebagian besar tergantung pada kadar hormon tiroid. Kadar TSH pada pasien dengan hipertiroidisme atau hipotiroidisme secara konsisten ditekan atau ditingkatkan (Ladenson *et al.*, 2000). Secara klinis konsentrasi TSH pada serum berfungsi sebagai indikator yang sensitif pada pasien dengan kelainan fungsi tiroid karena kadar TSH pada serum telah diubah bahkan juga pada tahap subklinis (Fatourech, 2009).

2.5 Interleukin 1 (IL-1)

Interleukin 1 merupakan sitokin proinflamasi multifungsi yang awalnya dideskripsikan sebagai *endogenous pyrogen* pertama. Hal ini dapat memberi efek biologis kompleks dengan memodulasi ekspresi gen dalam berbagai jenis sel dan kondisi inflamasi (Dinarello, 2000). Interleukin-1 terdiri dari 2 ligan yang berbeda (IL-1 α dan IL-1 β) dengan *highsequence homology*. Hanya IL-1 β yang bisa dilepaskan dari sitosol ke ruang *exocellular* setelah aktivasi (Martinon *et al.*, 2002; Thornberry *et al.*, 1992). IL-1 secara konsisten diinduksi dan diaktifkan setelah cedera jaringan dan memediasi respon reparatif (Dinarello, 2000; Bujak and Frangogiannis, 2009).

Hipotalamus bertindak sebagai thermostat untuk tubuh manusia dan IL-1 menetapkan thermostat pada tingkat yang lebih tinggi. Suhu tubuh tinggi dapat berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan patogenik bakteri dan virus dan juga meningkatkan aktifitas limfosit. IL-1 menginduksi produksi molekul sel adhesi vascular seperti kemokin dan IL-6. Kemokin dan sel adhesi menarik dan membantu leukosit untuk memasuki daerah inflamasi. Proses ini disebut diapedesis.

Ekspresi IL-1 pada AITD mengalami peningkatan akibat makrofag teraktifasi oleh sel T-helper yang tersensitisasi oleh antigen. Ekpresi IL-1 memicu proliferasi dan diferensiasi dari limfosit T dan limfosit B sehingga terbentuk autoantibodi yang merupakan reaksi autoimun. Reaksi autoimun berakibat memicu kerusakan jaringan kelenjar tiroid. Kerusakan pada tiroid akan memicu mekanisme timbal balik sehingga terjadi infiltrasi mononuklear dan limfosit pada tiroid sehingga memperparah reaksi autoimun (Weetman, 2003).

2.6 Water Soluble Extract (WSE) Yogurt Susu Kambing

Menurut Padaga dkk, (2009) terdapat manfaat dari kasein dan *whey* dari susu kambing. Susu kambing memiliki protein spesifik pada berat molekul 36-55 kDa yang berbeda dari susu lain. Protein spesifik ini memiliki fungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi dan imunomodulator dalam perbaikan jaringan. Menurut Karitas dan Fatchiyah (2013) protein susu tidak selalu aktif dalam bentuk aslinya. Susu akan aktif dan bermanfaat jika ada aktifitas proteolitik yang mengubah protein menjadi molekul yang lebih kecil dan aktif yaitu dengan cara fermentasi. Fermentasi susu yang disukai salah satunya adalah yogurt. Metabolisme dari bakteri asam laktat mampu menghidrolisis kasein yang ada pada yogurt menjadi molekul protein yang lebih kecil (peptida) dan diduga mengaktifkan fungsi dari protein. Menurut Park (2006) susu kambing lebih mudah dicerna daripada susu sapi karena memiliki butiran lemak yang ukurannya lebih kecil dengan kandungan asam lemak yang lebih tinggi.

Susu kambing memiliki kandungan asam amino yang lebih tinggi dari pada susu sapi seperti Isoleucine, lysine, cystine, tyrosine, valine, alanine, proline dan serine yang berpotensi sebagai biopeptida aktif dari susu kambing (Haenlein, 2004). Hidrolisis protein susu dengan enzimatis atau fermentasi dapat menghasilkan biopeptida dengan aktifitas imunomodulator (Korhonen dan Pihlanto, 2006). Kandungan *whey* dan kasein protein pada susu kambing berfungsi sebagai peptida bioaktif yaitu imunoglobulin, laktoperoksidase, *folate binding protein*, α -lactalbumin dan β -lactoglobulin (Diaz *et al.*, 2010; Antanasova and Ivanova, 2010). β -lactoglobulin bertindak sebagai emulgator efektif imunomodulator melalui vitamin A,

vitamin D, kalsium dan *fatty acid* dengan menunjukkan adanya aktifitas *radical scavenging* (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2007). Laktoferin merupakan pengikat besi yang fungsinya untuk transportasi besi. Hal ini terlibat dalam banyak fungsi fisiologis termasuk regulasi penyerapan besi dan respon imun (Garcia-Montoya *et al.*, 2011). Laktoferin bertindak sebagai antiinflamasi yang ditunjukkan dengan penghambatan sitokin *tumor necrosis factor* (TNF), interleukin 1 (IL-1) dan interferon γ (IFN- γ). Aktifitas stimulan ditunjukkan dengan produksi IL-10 yang menyebabkan penekanan aktifitas limfosit dan makrofag (Hayashida *et al.*, 2004; Ebringer *et al.*, 2008).

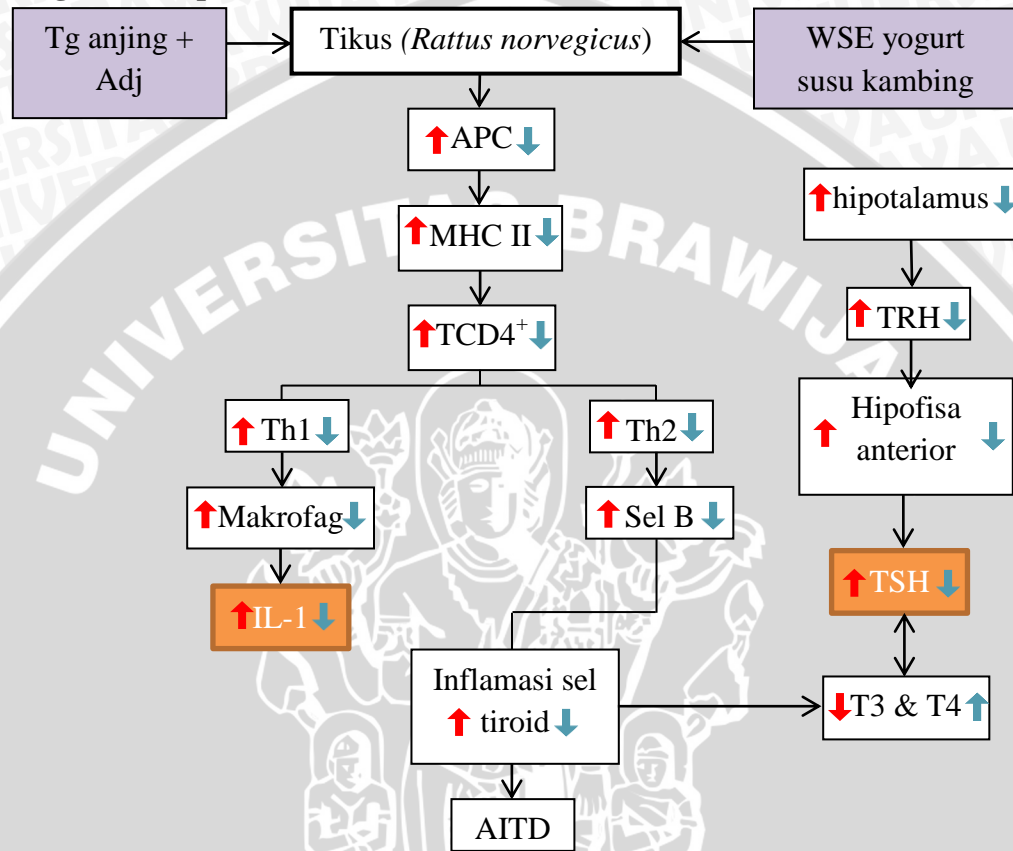
Susu kambing juga memiliki kandungan *polyunsaturated fat acid* (PUFA) dan *conjugated linoleic acid* (CLA) yang tinggi (Lopes-Aliaga *et al.*, 2010; Ceballos *et al.*, 2009). CLA memiliki banyak manfaat dan fungsi bioaktif pada kesehatan manusia. CLA telah terbukti dapat memodifikasi mediator imunitas seperti sitokin, eicosanoid, prostaglandin dan imunoglobulin. CLA juga telah diketahui memiliki fungsi sebagai antiinflamasi dengan mengurangi produksi sitokin proinflamasi yang berhubungan dengan penyakit usus, aterosklerosis, kanker dan imunopatologi lainnya didalam tubuh (Park, 2009). Peptida pada yogurt memiliki efek terhadap sistem imun yaitu dapat menginduksi aktifitas sistem imun seluler dan menghambat aktifitas inflammasi serta menghambat respon imun yang berlebihan (Grajek *et al.*, 2005). Yogurt akan menginduksi sistem imun seluler dengan melepaskan mediator inflammasi yang berfungsi sebagai penghambat proses inflammasi berupa sitokin TGF- β dan IL-10 yang disekresikan sel T-regulator (Chiba *et al.*, 2009). Pada industri pembuatan keju, *whey* merupakan bagian yang tidak terpakai karena

pembuatan keju hanya mengambil kasein yang nantinya menjadi *curd*. *Whey* tidak terpakai karena berbentuk cairan dan tidak dapat menggumpal (Legowo dkk, 2003).

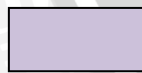


BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 kerangka konsep



: Variabel bebas



: Variabel tergantung



: Efek Tg anjing + adj



: Efek WSE yogurt susu kambing

↔ : Mekanisme umpan balik

Tiroglobulin (Tg) anjing yang ditambahkan dengan CFA dan IFA berfungsi sebagai *inducer* penyakit AITD. Pembentukan antibodi Tg dikenal sebagai antigen oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) yang kemudian APC mempresentasikan MHC II lalu dikenali oleh sel T CD4⁺ (Th). Sel T CD4⁺ berdiferensiasi menjadi T helper 1 (Th1) dan T helper 2 (Th2). Sel Th1 menghasilkan sitokin IFN- γ , IL-2 dan TNF- α sedangkan sel Th2 menghasilkan sitokin IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-13. Sel Th1 menginisiasi makrofag untuk menghasilkan sitokin proinflamasi (TNF- α , IL-1 dan IL-6) sehingga tiroid mengalami infiltrasi sel-sel mononuklear. Sel Th2 menginisiasi sel B membentuk sel B plasma dan sel B memori.

Sel B plasma memproduksi antibodi-Tg anjing dan antibodi-mycobacterium. Antibodi Tg anjing akan berikatan dengan Tg anjing dan Tg pada tiroid tikus. Pengenalan Tg pada tiroid tikus sebagai antigen karena kesamaan dengan Tg anjing menyebabkan terjadinya reaksi autoimun. Sel-sel mononuklear yang terinfiltrasi pada jaringan tiroid tikus akan mengfagosit dan menghancurkan Tg sehingga terjadi kerusakan struktur dan bentk folikel. Infiltrasi sel-sel mononuklear ke jaringan tiroid diikuti dengan peningkatan ekspresi IL-1. Tiroid yang telah mengalami inflamasi akan mengganggu metabolisme dari jaringan tiroid yang didalamnya terjadi proses pembentukan hormon T3 dan T4. Konsentrasi T3 dan T4 dalam plasma dikendalikan melalui mekanisme umpan balik negatif melalui poros hipotalamus – hipofisa anterior – tiroid. Aktifitas kelenjar tiroid dirangsang oleh TSH yang dibentuk oleh hipofisa anterior. TSH dipengaruhi oleh *Thyroid Releasing Hormon* (TRH) dari hipotalamus. Pengaturan secara umpan balik negatif, jika T3 dan T4 rendah maka

akan menaikkan sekresi TSH dan TRH, sehingga rangsangan kelenjar tiroid untuk memproduksi hormon akan berkurang, begitu juga sebaliknya.

Water soluble extract yogurt susu kambing berfungsi untuk memperbaiki inflamasi pada kelenjar tiroid yang mengalami AITD. Hal ini dikarenakan kandungannya antara lain laktoferin dan *Conjugated Linoleic Acid* (CLA) yang berfungsi sebagai antiinflamasi. Terapi ini diharapkan dapat memperbaiki inflamasi yang dialami kelenjar tiroid sehingga dapat menurunkan sitokin proinflamasi seperti IL-1 dan menurunkan konsentrasi TSH.

3.2 Hipotesis Penelitian

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

1. WSE yogurt susu kambing mampu menurunkan kadar TSH pada hewan model AITD
2. WSE yogurt susu kambing dapat menurunkan ekspresi IL-1 pada hewan model AITD

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – Mei 2016 di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tikus strain wistar kelamin betina, kandang tikus, scalpel, mortar, sentrifus (Hettich EBA III), sentrifus dingin, sonikator (Branson 200), Vortex (GUO HUQ), tabung eppendorf, mikropipet, yellow tip, blue tip, PBS, mortar, larutan PBST-PMSF, pasir kuarsa, pastel, *microtube*, vortex, sonikator, sentrifus, sentrifus dingin, etanol absolut, buffer Tris-HCl, spektrofotometer, CFA, IFA, susu kambing, starter 3%, air minum *reverse osmosis* (RO), *vacumtainer*, *freezer*, Rodent TSH ELISA test kit, *well*, TSH HRP-conjugate reagent, *microplate*, *washing buffer*, TMB reagent, aluminium foil, *stop solution* (2N HCl), ELISA reader.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian
2. Persiapan hewan coba
3. Isolasi tiroglobulin anjing
4. Persiapan hewan model AITD

5. Persiapan terapi WSE yogurt susu kambing
6. Koleksi serum
7. Pengukuran kadar hormon TSH
8. Pengukuran ekspresi Pengukuran ekspresi IL-1
9. Analisis data

4.4 Rancangan penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 kelompok perlakuan yang ditentukan dengan menggunakan rumus (Montgomery and Kowalsky, 2011):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$N \geq 4$$

Keterangan :

P = jumlah kelompok (terdiri dari 5 kelompok)

n = ulangan yang diperlukan

4.5 Batasan Penelitian

Adapun variabel dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Pemberian tiroglobulin anjing dari tiroid anjing lokal umur dewasa dan terapi WSE Yogurt Susu Kambing dengan perbedaan dosis yaitu 300 mg/kgBB, 600 mg/kgBB dan 900 mg/kgBB

Variabel terikat : kadar TSH dalam serum dan ekspresi IL-1 pada jaringan tiroid

Variabel terkontrol : jenis kelamin, umur dan berat badan tikus

Sampel penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus putih strain Wistar betina yang diberi pakan pelet dan minum *ad libitum* umur 6 – 8 minggu yang sudah mengalami dewasa kelamin dengan berat badan 100 – 150 gram penelitian dirancang dengan membagi tikus ke dalam 5 kelompok perlakuan.

4.6 Persiapan Hewan Coba

Persiapan hewan coba dimulai dengan diaklimasi selama 7 hari di laboratorium. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok dan setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Tikus diberikan pakan yang sesuai dengan standar penyusunan ransum untuk hewan coba *Association of Analytical Communities* (AOAC, 2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin dan air 12%. Tikus dipelihara di dalam kandang yang terbuat dari bak plastik yang dilengkapi penutup kawat dengan ukuran 35 x 30 x 20 cm dengan lantai kandang yang mudah dibersihkan dan disanitasi. Lokasi pemeliharaan berada pada tempat yang tenang dan bebas dari polusi kendaraan maupun industri.

4.7 Isolasi Tiroglobulin Anjing

Tiroid anjing yang sudah diseparasi dari trakea dicuci menggunakan PBS sebanyak 3 kali untuk membersihkan darah lalu ditimbang sebanyak 1 gram. Organ diletakan di mortar steril dingin dan dipotong kecil – kecil. Ditambahkan 1 mL larutan PBST-PMSF. Ditambahkan sedikit pasir kuarsa lalu digerus dengan pastel

dan diratakan. Homogenat ditambahkan 4 mL PBST-PMST kemudian dipindahkan ke dalam *microtube* dan divortex selama 10 menit. Homogenat disonifikasi selama 10 menit lalu disentrifus pada kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit. Supernatan kemudian dipindahkan ke dalam *microtube* baru. Supernatan ditambahkan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1 : 1 dan dibiarkan selama 24 jam hingga terbentuk endapan dalam *freezer*. Supernatan setelah 24 jam disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Etanol dibuang dan sisa endapan dikeringkan pada udara bebas hingga bau etanol hilang. Endapan protein kemudian ditambahkan buffer Tris-HCl dingin 20 mM dengan perbandingan 1:1. Ekstrak protein tiroglobulin anjing kemudian divortex selama 5 menit dan disimpan pada *freezer*. Kadar tiroglobulin anjing diukur menggunakan metode uji biuret dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm (Amin, dkk, 2009). Pengukuran ini untuk mengetahui konsentrasi dari tiroglobulin anjing sebagai *inducer*.

4.8 Persiapan Hewan Model AITD

Penentuan dosis tiroglobulin anjing untuk induksi merupakan modifikasi yang didasarkan pada penelitian Zhou dan Gill (2005) dan Xiao-hong, *et al.* (2011). Dosis yang digunakan adalah 200 µg/µL tiroglobulin anjing dalam Tris HCl diemulsikan (perbandingan 1 : 1) dengan CFA atau IFA. Volume injeksi tiap tikus sebanyak 0,2 mL/ekor.

4.9 Pembuatan Terapi WSE yogurt susu kambing

4.9.1 Pembuatan yogurt susu kambing

Susu kambing sebanyak 500 ml di pasteurisasi pada suhu 72°C selama 5 menit kemudian didinginkan sampai suhu mencapai 45°C. Inokulasi starter 3% pada 500 ml susu kambing yang telah dipasteurisasi, kemudian dihomogenasi dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 4 – 8 jam sehingga diperoleh yogurt dengan pH 4,52 (Papadimitriou, 2007).

4.9.2 Pembuatan WSE

Water Soluble extract (WSE) dibuat dengan cara sentrifugasi dingin yogurt pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 5°C, kemudian kasein dipisahkan dan diambil bagian *whey*. *Water Soluble extract* (WSE) yang dihasilkan dikering bekukan (*freeze dry*) dan selanjutnya disimpan ke dalam refrigerator pada suhu 4-5°C (Modifikasi Ledesma *et al.*, 2005 & Aloglu *et al.*, 2011). Tujuan dari proses *freeze dry* untuk mempertahankan struktur dari *whey* dan untuk mempertahankan pH.

4.9.3 Perlakuan Terapi dengan WSE

Dosis pemberian terapi WSE yogurt susu kambing adalah 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB. *Water Soluble extract* (WSE) dilarutkan dalam air minum *reverse osmosis* (RO) karena air RO lebih bersih dan bebas kontaminasi mikroorganisme. Pemberian terapi WSE dilakukan melalui sonde lambung 1 kali sehari selama 4 minggu (Contreras *et al.*, 2011).

4.10 Koleksi Serum

Metode koleksi darah dilakukan eutanasi dengan cara dislokasi leher terlebih dahulu lalu darah diambil melalui intrakardial tikus. Sampel darah dimasukan ke dalam *vacutainer* dan dimiringkan pada sudut 45° selama kurang lebih tiga jam untuk memisahkan serum dengan plasma. Setelah itu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk dipisahkan dan dilakukan sentrifugasi lagi pada supernatan selama 15 menit dengan kecepatan yang sama yaitu 3000 rpm. Setelah supernatan kedua, serum diambil dan dipindahkan ke tabung *ependorf* yang baru lalu disimpan di dalam *freezer*.

4.11 Pengukuran Kadar TSH

Kadar TSH dapat diukur dengan menggunakan Rat TSH ELISA kit merupakan modifikasi dari metode yang telah dilakukan oleh Wuragil *et al.* (2015). Microplate yang dipakai telah dilapisi oleh antibodi spesifik terhadap TSH. Standard atau sampel ditambahkan ke dalam *well* yang sesuai dan dikombinasikan dengan antibodi spesifik. Kemudian *biotinylated detection* antibodi spesifik untuk TSH dan *Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) conjugate* ditambahkan ke tiap *well* dan diinkubasikan. Komponen yang bebas dicuci. Substrat ditambahkan ke tiap *well*. Hanya *well* yang mengandung TSH, antibodi pendeteksi berlabel biotin dan konjugat *Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP)* yang akan menampilkan berwarna biru. Reaksi enzim substrat diakhiri dengan ditambahkan sulphuric acid dan akan menampilkan warna kuning. Densitas optik (OD) diukur dengan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm \pm 2 nm.

4.12 Pengambilan Organ Tiroid Tikus

Tikus dieutanasi dengan cara dislokasi leher. Tikus dibedah dengan posisi ventro dorsal diatas papan bedah. Tiroid terdiri dari dua lobus yang terletak pada medial laring pada bagian dexter dan sinister. Pembedahan dilakukan pada bagian cervical dimulai dengan menginsisi bagian kulit dan menguak subkutan dilanjut dengan memotong *Musculus sternohyoid*, *Musculus omohyoid* dan *Musculus sternothyroid*. Tiroid *dexter* dan *sinister* diambil dan dipreparasi dengan melakukan insisi pada kedua sisi laring. Tiroid dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% dua kali untuk menghilangkan darah yang masih menempel. Kemudian dimasukkan ke larutan paraformaldehide (PFA) 4% untuk pembuatan preparat.

4.13 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, infiltrasi, penjernihan, *embedding*, *sectioning*, penempelan di gelas objek dan pewarnaan. Fiksasi dilakukan dengan cara organ tiroid direndam pada larutan formalin 10%. Dehidrasi dilakukan dengan menggunakan etanol bertingkat dari konsentrasi 30%, 50%, 70%, 80, 95%, sampai konsentrasi absolut. Lama jaringan di dalam etanol berkisar 10 menit hingga 30 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 40°C. tahap berikutnya adalah penjernihan yaitu jaringan dipindahkan dari absolut III ke larutan penjernih yaitu xylol I (1 jam), xylol II (1 jam) dan xylol III (30 menit) pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator. Proses infiltrasi dalam parafin cair ditempatkan dalam incubator bersuhu 58-60°C. Jaringan dimasukkan pada parafin I, paraffin II dan parafin III masing – masing selama 1 jam di dalam oven.

Embedding dilakukan dengan cetakan yang didalamnya berisi parafin cair. Setelah membeku, hasilnya dipotong – potong dan ditempelkan pada blok kayu. Blok dipasang pada mikrotom dan diatur supaya posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 5 μm . pada awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Jaringan diletakkan diatas gelas objek. Sediaan tersebut disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama semalam (Ramos-Vara, 2005).

4.14 Pewarnaan Imunohistokimia IL-1

Preparat jaringan tiroid sebelum diwarnai terlebih dahulu harus dilakukan deparafinasi dan rehidrasi. Deparafinasi dilakukan dengan xylol selama 5 menit. Proses rehidrasi dilakukan menggunakan alkohol absolut 3 menit, alkohol 100%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan dengan waktu masing – masing 3 menit. Jaringan kemudian dicuci menggunakan aquades dan PBS pH 7,4 sebanyak 3x5 menit. Jaringan lalu direndam dalam H₂O₂ selama 45 menit dan kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Jaringan diblok menggunakan BSA 1% dalam PBS pH 7,4 selama 30 menit dengan suhu ruang kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Jaringan ditetesi antibodi primer mouse anti IL-1 dan diinkubasi selama semalam pada suhu 4°C. jaringan yang sudah diinkubasi kemudian dicuci menggunakan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Jaringan kemudian ditetesi antibodi sekunder rabbit anti-mouse berlabel biotin dan dinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Jaringan selanjutnya dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Jaringan kemudian ditetesi *strep-avidin conjugated horseradish peroxidase* (SAHRP) selama

45 menit pada suhu ruang. Jaringan kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Jaringan setelah itu ditetesi *cromagen diaminobenzidine* (DAB) selama 7 menit pada suhu ruang. Preparat lalu dicuci dengan aquades selama 3x5 menit. Preparat kemudian dicounterstaining dengan *Mayer's Hematoxylin* selama 5 menit pada suhu ruang lalu dicuci dengan *stilled water* 3x5 menit. Preparat kemudian dikeringkan lalu proses dilanjutkan dengan *mounting* menggunakan *entellan* kemudian ditutup dengan *cover glass* (Ramos-Vara, 2005).

4.15 Pengamatan Ekspresi IL-1

Preparat histopatologi dengan pewarnaan imunohistokimia diamati pada bagian yang berwarna coklat dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus BX51* dengan perbesaran 400x sebanyak 5 lapang pandang untuk melihat ekspresi IL-1. Perhitungan presentasi area ekspresi IL-1 menggunakan gambaran imunohistokimia tiroid dengan perbesaran 400x dianalisa menggunakan *software immunoratio*.

4.16 Analisis Data

Data kuantitatif yang diperoleh dari hasil pengukuran kadar TSH dan ekspresi IL-1 ditabulasi dengan menggunakan *microsoft office excel* dan dianalisis menggunakan SPSS 16,0 for Windows dengan analisis *one way ANOVA*. Apabila terdapat perbedaan nyata uji dilanjutkan dengan perbandingan berganda uji tukey atau Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan $\alpha = 0.05$.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Kadar *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) dalam Serum

Kadar hormon TSH dalam serum merupakan indikator untuk penyakit AITD selain hormon T3 dan T4. Kadar TSH akan menjelaskan keadaan kelenjar tiroid apakah normal atau mengalami gangguan. Kadar hormon TSH pada tikus model AITD diukur menggunakan metode ELISA yang kemudian hasilnya dianalisis secara statistik.

Hasil penelitian WSE yogurt susu kambing terhadap ekspresi *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) pada kelenjar tiroid tikus model AITD hasil induksi Tg anjing pada 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, terapi 300 mg/kg BB, kelompok 600 mg/kg BB, 900 mg/kg BB, dianalisis secara statistika menggunakan uji ANOVA dan BNJ ditunjukkan pada Tabel 5.1

Tabel 5.1 Kadar TSH dalam serum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar TSH (ng/ml)	Kadar TSH (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kelompok A (kontrol negatif)	1,62±0,67 ^a	-	-
Kelompok B (kontrol positif)	4,68±0,94 ^b	188,18	-
Kelompok C (300 mg/kgBB)	4,24±0,87 ^b	-	9,34
Kelompok D (600 mg/kgBB)	2,05±0,52 ^a	-	56,05
Kelompok E (900 mg/kgBB)	1,82±0,52 ^a	-	60,95

Keterangan : angka dengan notasi berbeda menunjukkan perbedaan $p < 0,05$. Kontrol negatif: tanpa perlakuan, kontrol positif: induksi tiroglobulin anjing, kelompok C: 300 mg/kg BB, kelompok D: 600 mg/kg BB dan kelompok E 900 mg/kg BB. Peningkatan dibandingkan dengan kontrol negatif dan penurunan dibandingkan dengan kontrol positif.

Hasil uji *One-Way ANOVA* menggunakan *software* SPSS menunjukkan bahwa kelompok B (kontrol positif) berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok A (kontrol negatif), sedangkan pada kelompok C (terapi 300 mg/kg BB) tidak terlihat berbeda signifikan terhadap kelompok positif. Kelompok D (600 mg/kg BB) dan kelompok E (900 mg/kg BB) menunjukkan hasil yang berbeda signifikan terhadap kontrol positif ($p < 0,05$). Kelompok dengan terapi dosis 900 mg/kg BB merupakan kelompok dengan penurunan kadar TSH dalam serum tertinggi jika dibandingkan dengan kelompok lain. Berdasarkan tabel 5.1 pada kelompok kontrol positif menunjukkan rata – rata kadar TSH sejumlah $4,68 \pm 0,94$ ng/ml. *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) merupakan hormon yang berfungsi sebagai hormon stimulus dalam pembentukan hormon tiroid, sehingga pada hewan yang sehat atau yang mengalami AITD akan terdeteksi adanya TSH. *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) yang tinggi menunjukkan bahwa kadar hormon tiroid yaitu hormon T3 dan T4 telah menurun. Hormon tiroid yang rendah menunjukkan bahwa terjadi gangguan pada kelenjar tiroid yang mengarah pada penyakit hipotiroidisme.

Kadar TSH dalam serum pada kelompok kontrol positif yang tinggi disebabkan karena adanya inflamasi pada kelenjar tiroid. Tiroglobulin anjing sebagai *inducer* yang masuk ke dalam tubuh hewan coba dikenali sebagai antigen yang merespon terjadinya autoimun dan inflamasi pada kelenjar tiroid. Tiroglobulin anjing yang telah diemulsikan dengan *adjuvant* masuk ke dalam tubuh hewan coba dan dikenal sebagai antigen oleh MHC II dengan bantuan APC. Sel T CD4⁺ akan terinisiasi untuk berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2. Sel Th1 menginduksi

makrofag untuk menghasilkan sitokin proinflamasi sedangkan Th2 akan menginisiasi sel B untuk menghasilkan antibodi. Antibodi yang dihasilkan oleh sel B akan berikatan dengan tiroglobulin anjing dan tiroglobulin pada tiroid tikus. Pengenalan tiroglobulin tikus sebagai autoantigen merupakan reaksi autoimun karena memiliki kesamaan dengan tiroglobulin anjing. Hal ini terjadi karena kesamaan fisik, biokimia dan struktur molekul dari tiroglobulin anjing dan tikus. Kelenjar tiroid mengandung tiroglobulin dalam jumlah besar sehingga penyerangan antibodi terhadap tiroglobulin yang dianggap sebagai autoantigen akan menyebabkan inflamasi pada sel tiroid (Zhou dan Gill, 2005). Kelenjar tiroid yang inflamasi akan mempengaruhi produksi hormon tiroid yaitu T3 dan T4. Produksi hormon tiroid akan menurun dan penurunan ini membuat produksi hormon TSH di hipofisa anterior akan naik karena adanya mekanisme umpan balik negatif (Corwin, 2008). TSH berfungsi untuk merangsang sintesis hormon dari kelenjar tiroid sampai terjadi sekresi. Konsentrasi serum hormon tiroid yang tinggi akan menghambat sekresi TRH dan TSH dalam umpan balik negatif (Astuti, 2015). Mekanisme umpan balik negatif adalah keadaan kadar hormon yang berlawanan jumlahnya.

Kelompok C (terapi dosis 300 mg/kg BB) tidak menunjukkan penurunan kadar TSH yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol positif. Persentase penurunan kadar TSH pada kelompok C (terapi dosis 300 mg/kg BB) terhadap kontrol positif sebesar 9,34%. Hal berbeda ditunjukkan pada kelompok D (terapi dosis 600 mg/kg BB) dan kelompok E (terapi dosis 900 mg/kg BB) yang menunjukkan penurunan kadar TSH yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan

dengan kontrol positif. Pada kelompok D (terapi dosis 600 mg/kg BB) ditunjukkan penurunan kadar TSH sebesar 56,05% dibandingkan dengan kelompok kontrol positif serta berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Kelompok E (terapi dosis 900 mg/kg BB) menunjukkan penurunan kadar TSH tertinggi yang dibandingkan dengan kelompok positif ditunjukkan dengan persentase penurunan sebesar 60,95%. Pada rata – rata konsentrasi kadar TSH kelompok E juga menunjukkan kadar yang paling mendekati dengan kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok terapi dengan dosis 900 mg/kg BB merupakan kelompok terbaik dalam menurunkan kadar TSH.

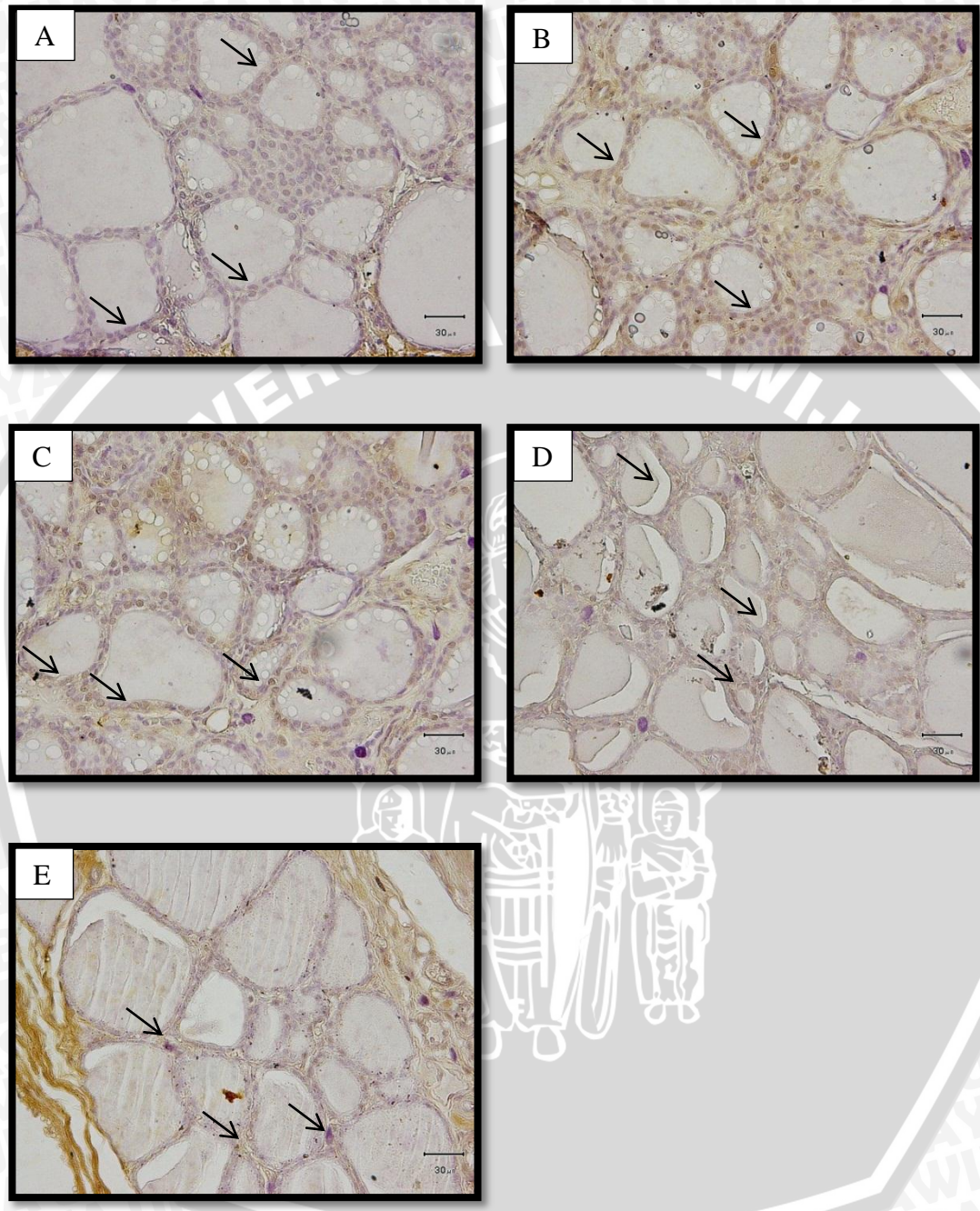
Pada kelompok yang diterapi dengan WSE yogurt susu kambing hormon TSH mengalami penurunan. Penurunan kadar TSH disebabkan karena kandungan antiinflamasi pada yogurt susu kambing yang dapat memperbaiki inflamasi pada kelenjar tiroid. Kandungan laktoferin dan *Conjugated Linoleic Acid* (CLA) yang bertindak sebagai antiinflamasi dapat memperbaiki kerusakan dari kelenjar tiroid dengan cara menginduksi aktifitas sistem imun seluler dengan aktifitas antiinflamasi (Grajek *et al.*, 2005) serta menghambat respon imun yang berlebihan seperti reaksi alergi dan autoimun. Perbaikan inflamasi ini dapat memperbaiki struktur dari jaringan tiroid yang rusak karena inflamasi. Jaringan tiroid yang diperbaiki oleh WSE yogurt susu kambing akan menyebabkan produksi hormon tiroid dari kadar yang rendah menjadi meningkat. Peningkatan kadar hormon tiroid ini menyebabkan produksi hormon TSH, sebagai hormon stimulus untuk produksi hormon tiroid, yang diproduksi di hipofisa anterior menurun karena adanya mekanisme umpan balik negatif. Ketika

kadar hormon tiroid naik maka kadar TSH akan turun (Corwin, 2008). Sehingga kadar TSH pada kelompok yang diterapi dengan WSE yogurt susu kambing ini akan menurun karena produksi hormon tiroid yang naik.

Kelompok terapi C, D dan E memberikan hasil yang bervariasi karena dosis terapi yang bertahap. Hal ini disebabkan karena perbedaan dosis juga mempengaruhi dari jumlah kandungan antiinflamasi yang diterima oleh tubuh dan dosis 900 mg/kg BB menunjukkan hasil tertinggi dalam menurunkan kadar TSH.

5.2 Ekspresi Interleukin 1 (IL – 1) pada Kelenjar Tiroid

Ekspresi IL-1 pada kelenjar tiroid tikus model AITD yang diinduksi Tg anjing dan diterapi dengan WSE yogurt susu kambing yang diamati dengan metode imunohistokimia ditunjukkan dengan gambaran jaringan berwarna kecoklatan. Warna kecoklatan terjadi akibat ikatan antigen antibodi, antibodi sekunder berlabel biotin dan pewarnaan kromagen DAB, ekspresi IL-1 yang diamati dengan metode imunohistokimia di hitung jumlah ekspresinya dengan *software immunoratio*.



Gambar 5.1 Ekspresi interleukin 1 (IL-1) pada jaringan tiroid dengan pewarnaan imunohistokimia
 Keterangan: perbesaran 400x. anak panah warna hitam menunjukan ekspresi IL-1 yang ditunjukan dengan warna kecoklatan hasil visualisasi kromagen. kelompok A (kontrol negatif), kelompok B (kontrol positif), kelompok C (terapi dosis 300 mg/kg BB), kelompok D (terapi dosis 600 mg/kg BB), kelompok E (terapi dosis 900 mg/kg BB)

Hasil penelitian WSE yogurt susu kambing terhadap ekspresi Interleukin-1 (IL-1) pada kelenjar tiroid tikus model AITD hasil induksi Tg anjing pada 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, terapi 300 mg/kg BB, kelompok 600 mg/kg BB, 900 mg/kg BB, dianalisis secara statistika menggunakan uji ANOVA dan BNJ ditunjukkan pada Tabel 5.2

Tabel 5.2 Ekspresi IL-1 pada jaringan tiroid Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi IL-1±SD	Ekspresi IL-1 (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kelompok A (kontrol negatif)	38,06±0,007 ^a	-	-
Kelompok B (kontrol positif)	95,08±2,12 ^c	149,81	-
Kelompok C (300 mg/kgBB)	86,20±7,47 ^c	-	9,33
Kelompok D (600 mg/kgBB)	65,58±7,62 ^b	-	32,07
Kelompok E (900 mg/kgBB)	47,48±5,11 ^a	-	50,06

Keterangan : angka dengan notasi berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan $p < 0,05$. Kontrol negatif: tanpa perlakuan, kontrol positif: induksi tiroglobulin anjing, kelompok C: 300 mg/kg BB, kelompok D: 600 mg/kg BB dan kelompok E 900 mg/kg BB. Peningkatan dibandingkan dengan kontrol negatif dan penurunan dibandingkan dengan kontrol positif.

Hasil analisa *One-Way ANOVA* menggunakan software SPSS menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif, sedangkan dengan kelompok terapi C (300 mg/kgBB) tidak berbeda signifikan terhadap kelompok positif. Kelompok terapi D (600 mg/kg BB) dan kelompok terapi E (900 mg/kg BB) menunjukkan hasil yang berbeda signifikan. Kelompok terapi E dengan dosis terapi 900 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi IL-1. Interleukin 1 (IL-1) merupakan mediator yang penting pada respon imun spesifik dengan proses inflamasi akut maupun kronis. Produsen

utama dari IL-1 adalah monosit dan terkadang makrofag, sel dendritik dan sel – sel lain (Limei, *et al.*, 2008).

Ekspresi IL-1 pada kelompok B yang merupakan kelompok kontrol positif menunjukkan pengaruh yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap tikus kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan. Interleukin 1 (IL-1) diproduksi selain sebagai sinyal adanya inflammasi juga berfungsi untuk merangsang hipotalamus untuk memproduksi panas. Panas yang ditimbulkan atas pengaruh prostaglandin yang diproduksi sel hipotalamus yang dirangsang TNF dan IL-1 (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Hal ini menyebabkan pada kelompok negatif juga terdapat IL-1.

Ekspresi IL-1 yang tinggi pada kelompok positif terjadi karena sel Th1 yang menginisiasi makrofag untuk menghasilkan sitokin proinflamasi salah satunya IL-1. Tiroglobulin yang diinduksikan akan menyebabkan pembentukan antibodi Tg yang dikenal sebagai antigen oleh APC. *Antigen Presenting Cell* akan mempresentasikan MHC II kemudian dikenali oleh sel T CD4⁺. Sel T CD4⁺ berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan sel Th2. Sel Th1 yang dapat menyebabkan pembentukan IL-1. Ekspresi IL-1 memicu proliferasi dan diferensiasi dari limfosit T dan limfosit B sehingga terbentuk autoantibodi yang merupakan reaksi autoimun. Reaksi ini akan merusak kelenjar tiroid dan memicu terjadinya infiltrasi mononuclear dan limfosi pada tiroid sehingga memperparah reaksi autoimun (Weetman, 2003).

Kelompok C (terapi 300 mg/kg BB) tidak menunjukkan penurunan ekspresi IL-1 yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok positif. Persentase penurunan ekspresi IL-1 pada kelompok C (terapi 300 mg/kg BB)

terhadap kelompok B (kontrol positif) sebesar 9,33%. Berbeda dengan kelompok D dan kelompok E (terapi 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB) menunjukkan ekspresi IL-1 yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok B (kontrol positif). Pada kelompok D (terapi 600 mg/kg BB) terjadi penurunan ekspresi IL-1 sebesar 32,07% dibandingkan dengan kelompok B (kontrol positif) serta dinyatakan berbeda signifikan dengan kelompok A (kontrol negatif). Kelompok E (terapi 600 mg/kg BB) merupakan kelompok dengan penurunan ekspresi IL-1 tertinggi yang ditunjukkan dengan persentase sebesar 50,06%.

Pada tabel 5.2 menunjukkan bahwa kelompok E (terapi 600 mg/kg BB) menunjukkan hasil yang mendekati kelompok A (kontrol negatif) dibandingkan dengan kelompok yang lain sehingga hal tersebut menunjukkan bahwa dosis terapi 900 mg/kg BB dalam penelitian ini merupakan dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi IL-1. Yogurt susu kambing diketahui memiliki kandungan yang dapat menurunkan inflamasi. Kandungan tersebut antara lain adalah β - lactoglobulin, laktoferin dan *conjugated linoleic acid* (CLA). Cara untuk mengaktifkan dan mengoptimalkan kandungan biopeptida dari susu adalah dengan fermentasi. Fermentasi juga dapat menambah cita rasa dan memperpanjang masa simpan susu.

β -lactoglobulin bertindak sebagai emulgator efektif imunomodulator melalui vitamin A, vitamin D, kalsium dan *fatty acid* dengan menunjukkan adanya aktifitas *radical scavenging* (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2007). Laktoferin merupakan pengikat besi yang fungsinya untuk transportasi besi yang penting dalam regulasi penyerapan besi dan respon imun (Garcia-Montoya *et al.*, 2011). Laktoferin bertindak

sebagai antiinflamasi yang ditunjukkan dengan penghambatan sitokin *tumor necrosis factor* (TNF), interleukin 1 (IL-1) dan interferon γ (IFN- γ) (Hayashida *et al.*, 2004; Ebringer *et al.*, 2008). CLA memiliki fungsi sebagai anti inflamasi dengan mengurangi produksi sitokin proinflamasi yang berhubungan dengan penyakit usus, aterosklerosis, kanker dan imunopatologi lainnya didalam tubuh (Park, 2009). Pengurangan sitokin proinflamasi oleh CLA dengan cara menekan makrofag untuk memproduksi sitokin proinflamasi.

Terapi yogurt susu kambing dengan kandungan biopeptida dapat memperbaiki jaringan tiroid yang rusak dan mengurangi infiltrasi sel mononuklear. Akibat dari berkurangnya infiltrasi sel – sel mononuklear akan mengakibatkan penurunan aktifitas fagositosis sehingga penghancuran Tg yang dapat menyebabkan kerusakan struktur tiroid menjadi berkurang. Berkurangnya infiltrasi sel – sel mononuklear akan menyebabkan berkurangnya produksi sitokin proinflamasi salah satunya adalah IL-1.

Interleukin 1 (IL-1) ditunjukkan dengan adanya warna kecoklatan pada jaringan. Ekspresi IL-1 tertinggi pada kelompok kontrol positif terjadi karena adanya inflamasi pada kelenjar tiroid yang diinduksi dengan Tg anjing. Tirogloluin anjing sebagai *inducer* yang menyebabkan terjadinya reaksi autoimun. Pada kelompok terapi dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB dan 90 mg/kg BB menunjukkan hasil yang bervariasi. Dosis yang bervariasi mempengaruhi jumlah kandungan antiinflamasi pada yogurt susu kambing. Kelompok terapi yang menunjukkan hasil tertinggi dalam menurunkan ekspresi IL-1 adalah kelompok E dengan dosis 900 mg/kg BB.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. *Water soluble Extract* (WSE) yogurt susu kambing dapat menurunkan kadar TSH dalam serum hewan coba yang mengalami AITD hasil induksi tiroglobulin anjing. Terapi WSE yogurt susu kambing dengan dosis 900 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam menurunkan kadar TSH.
2. *Water soluble Extract* (WSE) yogurt susu kambing dapat menurunkan ekspresi IL-1 pada kelenjar tiroid hewan coba yang mengalami AITD hasil induksi tiroglobulin anjing. Terapi WSE yogurt susu kambing dengan dosis 900 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi IL-1.

6.2 Saran

Disarankan penelitian berikutnya untuk meneliti tentang dosis optimal dari WSE yogurt susu kambing pada penyembuhan penyakit AITD terutama hipotiroidisme.

DAFTAR PUSTAKA

- Alichanidis, 2007. *Identification Of Peptides In Traditional And Probiotic Sheep Milk*
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 2005. *Official Methods of Analysis*. Washington DC.
- Amin, M.H.F, A.P.W. Marhendra dan Aulanni'am. 2009. *Pengaruh Paparan Lipopolisakarida pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) terhadap Kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas Pada Tikus Asma*, Paper Presentasi pada Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki, Malang, 24-25 Juli.
- Astuti, Pudji. 2015. *Endokrinologi Veteriner*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Atanasova, J. and I. Ivanova, 2010. *Antibacterial peptides from goat and sheep milk proteins*. *Biotechnology and Biotechnol. Eq.*, 24: 1799-1803.
- Billiau, A. and P. Matthys. 2001. *Modes of Action of Freund's Adjuvants in Experimental Models of Autoimmune Diseases*. *J. Leukoc. Biol.* 70: 849- 860
- Ceballos, L.S., E.R. Morales, T. Dela, G. OrreAdarve, J.D. Castro, L.P. Martinez and M.R.S. Sampelayo, 2009. *Composition of Goat and Cow Milk Produced Under Similar Condition and Analyzed by Identical Methodology*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 322-329.
- Chiba Y., S, Kun., N, Saturo., W, Mariko. 2009. *Well-controlled Proinflammatory Cytokines Responses of Peyer Patch Cells to Probiotic Lactobacillus casei*. *Immunology*, 130 : 352-362
- Chistiakov, D.A. and R.I. Turakulov. 2003. *CTLA-4 and its Role in Autoimmune Thyroid Disease*. *J. Mol Endocrinol* Vol 31 pp.21-36
- Chistiakov, D.A. 2005. *Immunogenetics of Hashimoto's thyroiditis*. *J. Autoimmune Diseases* Vol.2 No.1
- Contreras, M.M., M.A. Sevilla, J.M. Ruiz, L. Amigo, B.G. Sala, E. Molina, M. Ramos, and I. Recio. 2011. *Food-Grade Production Of An Antihypertensive Casein Hydrolysate And Resistance Of Active Peptides To Drying And Storage*. *International Dairy Journal*, 21 (7) : 470-476

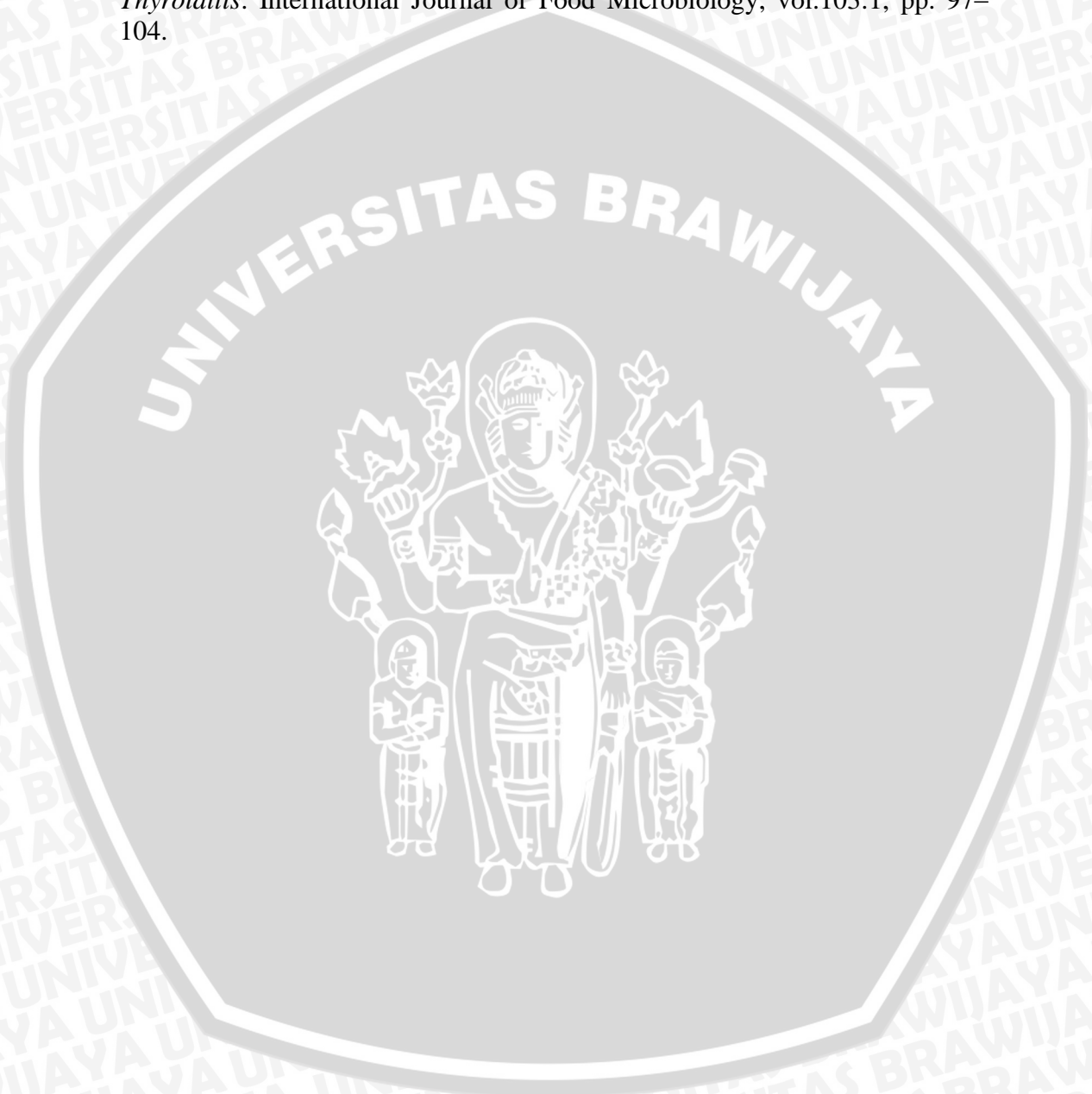
- Corwin, Elizabeth J, 2008. Handbook of Pathophysiology, 3rd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA. 279-280
- Díaz-Castro, J., S. Hijano, M.J.M. Alférez, I. López-Aliaga and T. Nestares, 2010. *Goat milk consumption protects DNA against damage induced by chronic iron overload in anaemic rats*. Int Dairy, J.20: 495-499.
- Dinarello CA. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu Rev Immunol;27:519
- Dinarello CA. 2000. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. N Engl J Med. 343(10):732-4.
- Djokomueljanto.R, 1996. *Kelenjar Tiroid Embriologi, Anatomi dan Faalnya*. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, ed 3, jilid 1, Jakarta, FKUI.
- D.K. Wuragil, N.M. Dliyaul Haq, Aulanni'am and A.P. Warih Marhendra. 2015. *Thyroid Stimulating Hormone (TSH) and Thyroxine Hormone (T4) Role in Thyroid Detriment on Hypothyroidism Animal Models*. International Journal of ChemTech Research. Vol. 8. Hal. 2
- Ebringer, L., Ferencik., and J. Krajcovic. 2008. *Beneficial Health Effect of Milk and Fermented Dairy Products*. Food Microbiol. 53 (5) 378-394
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Olson, P. & Hedhammar, A. 2000. *Gender, age, breed and distribution of morbidity and mortality in insured dogs in Sweden during 1995 and 1996*. Vet Rec 146(18), 519-25.
- Erkadius, 1997. *Fisiologi Hormon*. Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang
- Fatourechi, V. 2009. Subclinical hypothyroidism: an update for primary care physicians. *Mayo Clinic proceedings*. Mayo Clinic, Vol.84, No1, pp. 65-71, ISSN 1942-5546
- Garcia-Montoya, I.A., T.S. Cendon, S. Arevalo-Gallegos and Q. Rascon-Cruz, 2011. *Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview*
- Geneeskunde The Medicine Journal. 2000. *Thyroid Gland: An Overview*. November/Desember
- Grajek W.A., Olejnik., and A, Sip. 2005. *Probiotics, Prebiotic and Antioxidant as Functional Food*. Biotechnology 52 (3) : 665-671

- Greenspan F.S. MD and Baxter J.D. MD. 1994. *Basic and Clinical Endocrinology* 4th. 206 - 289
- Haenlein, G.F.W. 2004. *Goat Milk Human Nutrition*. Animal and food Science Vol 51 : 155-163
- Hayashida, K., T. Kaneko, T. Takeuchi, H. Shimizu, K. Ando dan E. Harada. 2004. *Oral Administration of Lactoferrin Inhibits Inflammation and Nociception in Rat Adjuvant-Induced Arthritis*. J.Vet.Med.Sci 66 : 149-154
- Hedrich, H.J. 2000. *History, Strains, and Models*. Di dalam: Krinke GJ. *The Laboratory Rats*. California: Academic Press.
- IACUC Guideline, 2015. *Use of Complete Freund's Adjuvant in Laboratory Animals*. University of Pennsylvania.
- Irawati, Lila. 2014. *Hubungan Tumor Necrosis Factor – Alfa (TNF- α) dengan Kadar Hemoglobulin dan Parasitemia pada Infeksi Malaria Falciparum*. Jurnal Kesehatan Andalas. 2014; 3(2) hal. 99
- Karitas MU dan Fatchiyah. 2013. *Profil Protein 30-60 kDa pada Yogurt hasil Fermentasi Susu Kambing Peranakan Etawa dengan Kultur Tunggal* . Jurnal Biotropika Edisi 1 No. 2. Hal. 66
- K.G. Baratawidjaja dan Iris Rengganis. 2010. *Imunologi Dasar Edisi ke-10*. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2012.
- Klein I and Danzi S. 2007. *Thyroid Disease and The Heart Circulation*. 116:1725-35
- Korhonen, H., dan A. Pihlanto. 2006. *Bioactive peptides: Production and Functionality*. Dairy journal 16 : 945 - 960
- Papadimitriou, C.G., A.V. Mastrojiannaki, S.V. Silva, A.M. Gomes, F.X. Malcata, and E. Alichanidis, 2007. *Identification Of Peptides In Traditional And Probiotic Sheep Milk Yoghurt With Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Activity*. Food Chemistry, 105 (2) : 647-656.
- Padaga, MC, M.E Sawitri dan S. Murwani. 2009. *Potensi Protein Spesifik Susu Kambing sebagai Immunomodulator Dan Immunogen: Upaya Pengembangan Pangan Nutrasetika: Laporan Penelitian*.

- Park Y.W., Goat milk – chemistry and nutrition, in: Park Y.W., Haenlein G.F.W. (Eds.), 2006. *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*, Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 34–58.
- Park, Y., 2009. *Bioactive components in goat milk*. In *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*, pp: 4381.
- Hernandez-Ledesma, B., L. Amigo, I. Recio, dan B. Bartolome. 2007. Ace-Inhibitory and Radical Scavenging Activity of Peptides Derived from β -Lactoglobulin F (19-25). Interactions With Ascorbic Acid. *J.Agric.Food Chem.* 55 : 3392-3397
- Ladenson, P. W., Singer, P. A., Ain, K. B., Bagchi, N., Bigos, S. T., Levy, E. G., Smith, S. A., Daniels, G. H., & Cohen, H. D. 2000. *American Thyroid Association guidelines for detection of thyroid dysfunction*. *Archives of internal medicine*, Vol.160, No.11, pp. 1573-1575, ISSN 0003-9926
- Lopez-Aliaga, I., J. DiazCastro, M.J.M. Alferez, M. Barrionuevo and M.S. Campos, 2010. *A review of the nutritional and health aspects of goat milk in cases of intestinal resection*. *Dairy Science and Technology*, 90: 611-622.
- Legowo, M.A., Nurwantoro., Albaarri, A.N., Chairani, Reni., dan Purbasari Connida. 2003. Kadar Protein, Lemak, Nilai pH Dan Mutu Hedonik Keju *Cottage* Dengan Bahan Dasar Susu Kambing Dan Susu Sapi Krim. *Prosiding Seminar Nasional. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Bogor.* Hal : 272-277
- Limei L., Zhaoliang F., Jianke P., Ruilin S., Zhihui., Zhejin S., Long W., Xia S., Jun Y., Zhugang W. and Jian F. 2008. *Functional Imaging of Interleukin 1 Beta Expression in Inflammatory Process Using Bioluminescence Imaging in Transgenic Mice*. *BMC Immunology* 2008, 9:49
- Magner, J. A. 1990. *Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology, and bioactivity*. *Endocrine reviews*, Vol.11, No.2, pp. 354-385, ISSN 0163-769X
- Martinon F, Burns K, Tschopp J. 2002. *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. *Mol Cell*;10(2):417-26.
- M. Bujak and NG. Frangogiannis. 2009. *The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*;57(3):165-76.

- Montgomery, D., and S. Kowalsky. 2011. *Design and Analysis of Experiment*. John Wiley and Sains Inc. ISBN 978-0-470-16990-2.
- Quarantino, S. 2004. Drug Discovery Today: Disease Models | *Autoimmune Diseases and Inflammation* Vol. 1, No. 4
- Ramos-Vara, J.A. 2005. *Technical Aspects of Immunohistochemistry*. Veterinary Pathology, vol.42, no.4, pp. 405–426.
- S. Manorama, S. Truptirekha and B.K Mohanty, 2005. *Autoimmune Thyroid Disorders – An Update*. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 20 (1) 9-17
- Song, XH, R. Z. Zan, C. H. Yu and F. Wang. 2011. *Effects of Modified Haizao Yuhu Decoction in Experimental Autoimmune Thyroiditis Rats*. Journal of Ethnopharmacology, vol.135:2, pp. 321-324.
- Sharp, P.E. and M.C La Regina. 1998. *The Laboratory Rat*. Boca Raton. CRC Press
- Stills, H. F., and M. Q. Bailey. 1991. *The use of Freund's Complete Adjuvant*. Lab Animal Sci 20(4): 25-31.
- Tang, K. T., Braverman, L. E., & DeVito, W. J. (1995). *Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma modulate gene expression of type I 5'-deiodinase, thyroid peroxidase, and thyroglobulin in FRTL-5 rat thyroid cells*. Endocrinology, Vol.136, No.3, pp. 881-888, ISSN 0013-7227
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD and Kostura MJ. 1992. *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes*. Nature 1992;356(6372):768-74.
- Weetman, A.P. 2003. *Autoimmune Thyroid Disease: Propagation and Progression*. European Journal of Endocrinology vol.148 pp.1–9
- Weetman, A.P. 2004. *Autoimmune Thyroid Disease*. Autoimmunity, vol.37, no.4, pp. 337.
- Xiao-hong S., Z. Ri-zeng., Y. Chen-huan and W. Fang. 2011. *Effects of Modified Haizao Yuhu Decoction in Experimental Autoimmune Thyroiditis Rats*. J.Ethnopharmacol, vol.135, no.2, pp. 321-324. Yoghurt With Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Activity. *Food Chemistry*, 105 (2) : 647-656.

Zhou, J. S. and H.S. Gill. 2005. *Immunostimulatory Probiotic Lactobacillus rhamnosus HN001 and Bifidobacterium lactis HN019 Do Not Induce Pathological Inflammation in Mouse Model of Experimental Autoimmune Thyroiditis*. International Journal of Food Microbiology, vol.103:1, pp. 97–104.



1. Laik Etik Penelitian



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARANCE"

No: 552-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (*ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE*)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : SUPLEMENTASI *WATER SOLUBLE EXTRACT* (WSE)
YOGURT SUSU KAMBING TERHADAP KADAR
TIROKSIN (T4), JUMLAH MAKROFAG DAN IL-10 PADA
TIROID TIKUS INDUKSI dTg

PENELITI : ALDILA NOVIANTRI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 30 Mei 2016

Ketua Komisi Etik Penelitian

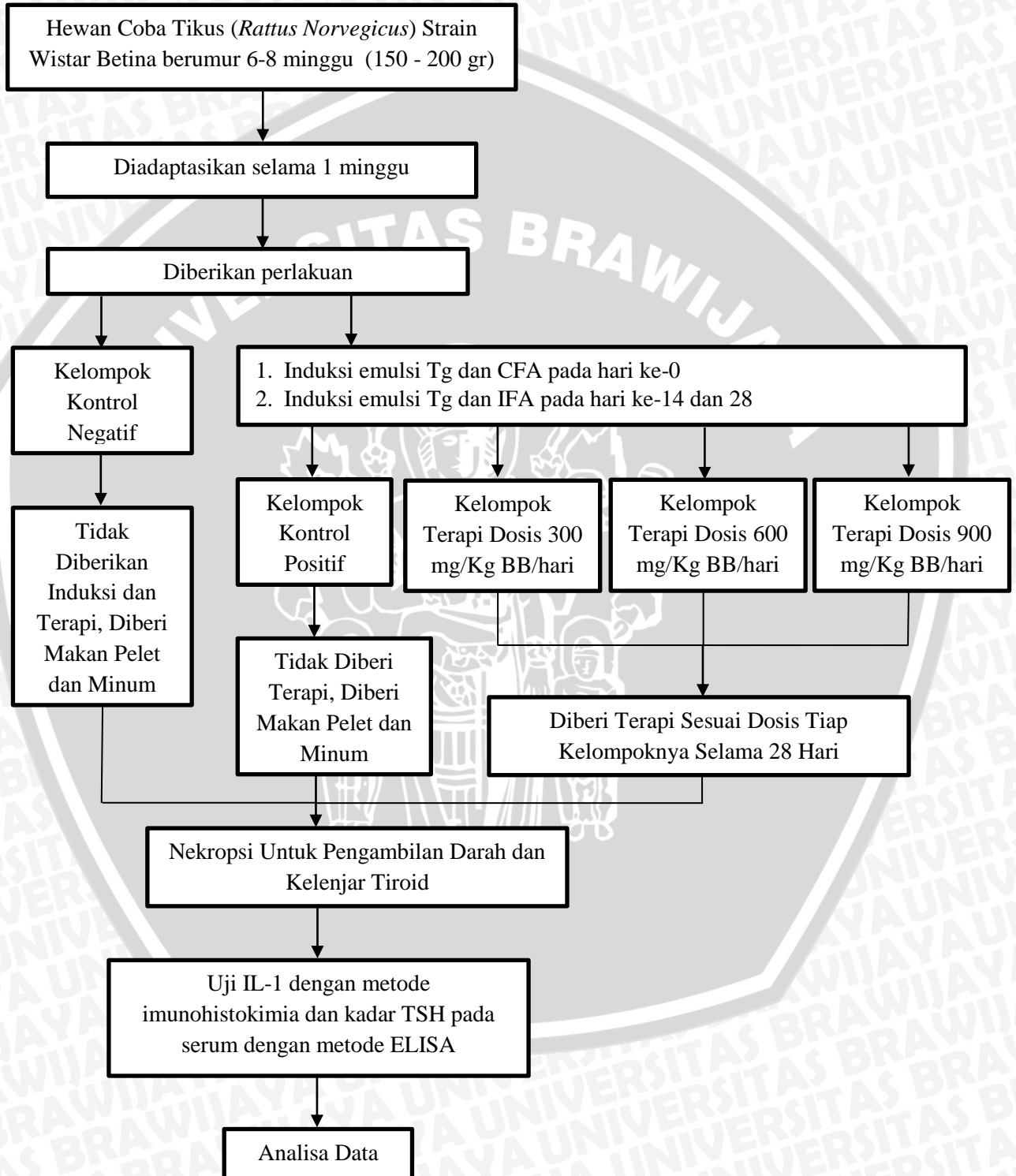
Universitas Brawijaya



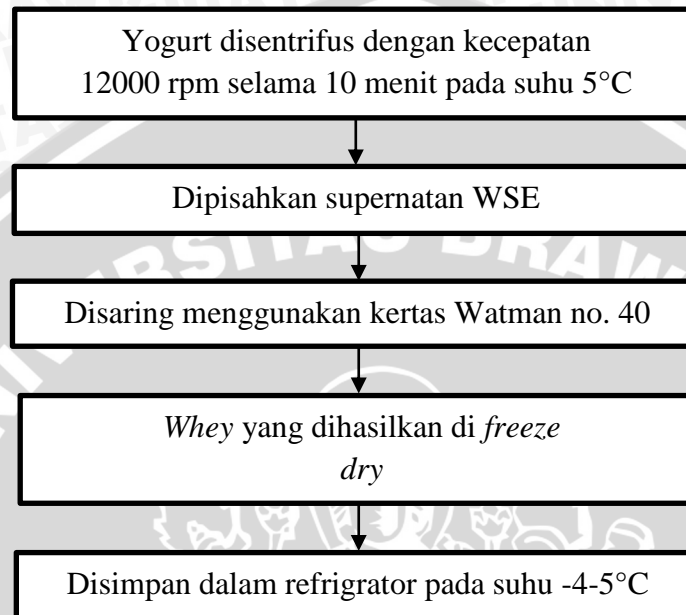
Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.

NIP. 19600903 198802 2 001

2. Rancangan Alir Penelitian



3. Tahapan Pembuatan WSE



4. Perhitungan Dosis CFA, IFA, dan Tg

Hasil nanodrop menunjukkan konsentrasi protein Tg sebesar 11.800 µg/µL. Jumlah konsentrasi protein untuk mencapai dosis optimal adalah 200 µg/mL

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

$$11.800 \text{ µg/µL} \times V_1 = 200 \text{ µg/µL} \times 100 \text{ µL}$$

$$V_1 = \frac{200 \text{ µg/µL} \times 100 \text{ µL}}{11.800 \text{ µg/µL}} = 1.7 \text{ µL}$$

Berdasarkan perhitungan volume diatas didapatkan volume crude protein sebesar 1.69 µL yang kemudian ditambahkan 98.3 µL Tris HCl, sehingga volumenya menjadi 100 µL.

Crude protein Tg tersebut lalu diemulsikan dengan CFA atau IFA dengan perbandingan 1:1.

$$\text{Emulsi Tg} + \text{CFA} = 100 \text{ µL} + 100 \text{ µL} = 200 \text{ µL} = 0,2 \text{ mL}$$

$$\text{Emulsi Tg} + \text{IFA} = 100 \text{ µL} + 100 \text{ µL} = 200 \text{ µL} = 0,2 \text{ mL}$$

5. Perhitungan Dosis WSE

$$\text{Volume WSE} = \text{Dosis (mg/kg bb)} \times \text{BB (kg)} : \text{Konsentrasi Sediaan}$$

Kelompok C (Terapi dengan dosis 300 mg/kg BB)

$$\text{Tikus 1} : 0,134 \text{ kg} \times 300 \text{ mg/kg bb} = 40,2 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 2} : 0,111 \text{ kg} \times 300 \text{ mg/kg bb} = 33,3 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 3} : 0,141 \text{ kg} \times 300 \text{ mg/kg bb} = 42,3 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 4} : 0,138 \text{ kg} \times 300 \text{ mg/kg bb} = \underline{41,4 \text{ mg}} +$$

$$157,2 \text{ mg}$$

Air R.O yang diberikan per tikus 1,5 mL, jadi untuk 4 tikus air R.O yang diberikan 6 mL.

$$\text{Konsentrasi} : 157,2 \text{ mg} : 6 \text{ mL} = 26,2 \text{ mg/mL}$$

Jadi, volume WSE yang diberikan yakni :

$$\text{Tikus 1} : 40,2 \text{ mg} : 26,2 \text{ mg/mL} = 1,5 \text{ mL}$$

$$\text{Tikus 2} : 33,3 \text{ mg} : 26,2 \text{ mg/mL} = 1,2 \text{ mL}$$

$$\text{Tikus 3} : 42,3 \text{ mg} : 26,2 \text{ mg/mL} = 1,6 \text{ mL}$$

$$\text{Tikus 4} : 41,4 \text{ mg} : 26,2 \text{ mg/mL} = 1,5 \text{ mL}$$

Kelompok D (Terapi dengan dosis 600 mg/kg BB)

$$\text{Tikus 1} : 0,131 \text{ kg} \times 600 \text{ mg/kg bb} = 78,6 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 2} : 0,139 \text{ kg} \times 600 \text{ mg/kg bb} = 83,4 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 3} : 0,127 \text{ kg} \times 600 \text{ mg/kg bb} = 76,2 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 4} : 0,147 \text{ kg} \times 600 \text{ mg/kg bb} = \underline{88,2 \text{ mg}} +$$

$$326,4 \text{ mg}$$

Air R.O yang diberikan per tikus 1,5 mL, jadi untuk 4 tikus air R.O yang diberikan 6 mL.

Konsentrasi : $326,4 \text{ mg} : 6 \text{ ml} = 54,4 \text{ mg/ml}$

Jadi, volume WSE yang diberikan yakni :

Tikus 1 : $78,6 \text{ mg} : 54,4 \text{ mg/mL} = 1,4 \text{ mL}$

Tikus 2 : $83,4 \text{ mg} : 54,4 \text{ mg/mL} = 1,5 \text{ mL}$

Tikus 3 : $76,2 \text{ mg} : 54,4 \text{ mg/mL} = 1,4 \text{ mL}$

Tikus 4 : $88,2 \text{ mg} : 54,4 \text{ mg/mL} = 1,6 \text{ mL}$

Kelompok E (Terapi dengan dosis 900 mg/kg BB)

Tikus 1 : $0,147 \text{ kg} \times 900 \text{ mg/kg bb} = 132,3 \text{ mg}$

Tikus 2 : $0,123 \text{ kg} \times 900 \text{ mg/kg bb} = 110,7 \text{ mg}$

Tikus 3 : $0,142 \text{ kg} \times 900 \text{ mg/kg bb} = 127,8 \text{ mg}$

Tikus 4 : $0,148 \text{ kg} \times 900 \text{ mg/kg bb} = 133,2 \text{ mg} +$
 540 mg

Air R.O yang diberikan per tikus 1,5 mL, jadi untuk 4 tikus air R.O yang diberikan 6 mL.

Konsentrasi : $540 \text{ mg} : 6 \text{ mL} = 90 \text{ mg/mL}$

Jadi, volume WSE yang diberikan yakni :

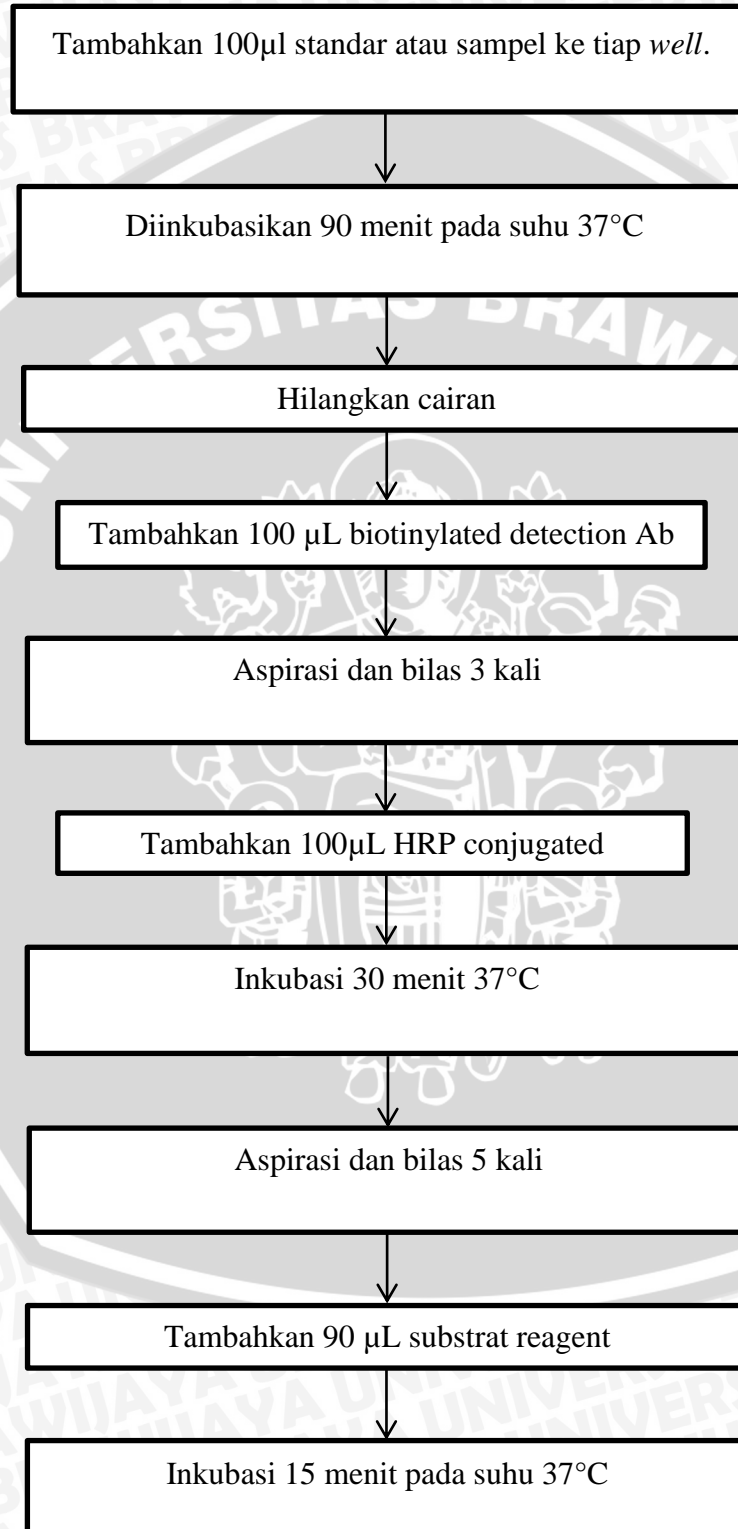
Tikus 1 : $132,3 \text{ mg} : 90 \text{ mg/mL} = 1,4 \text{ mL}$

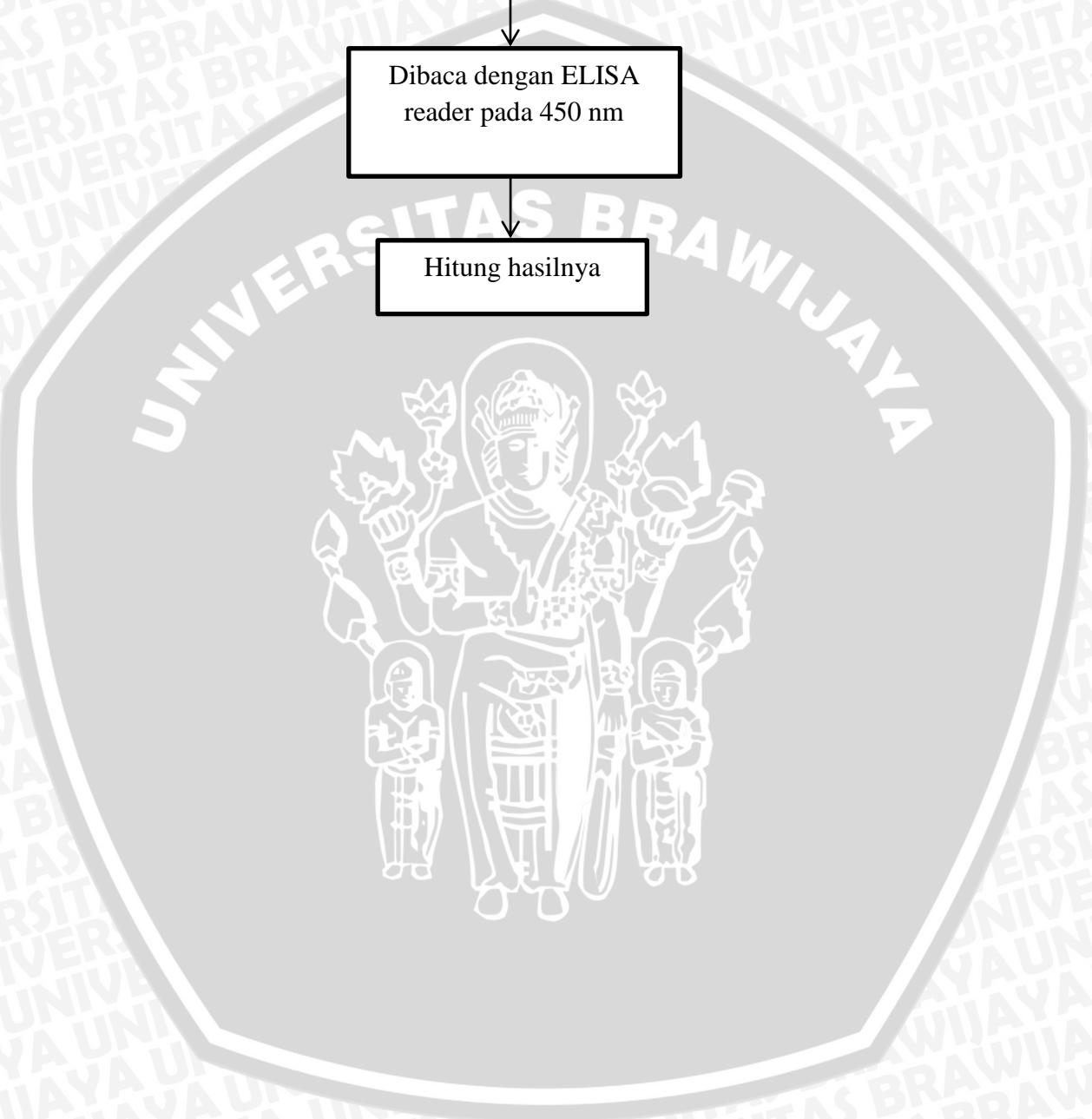
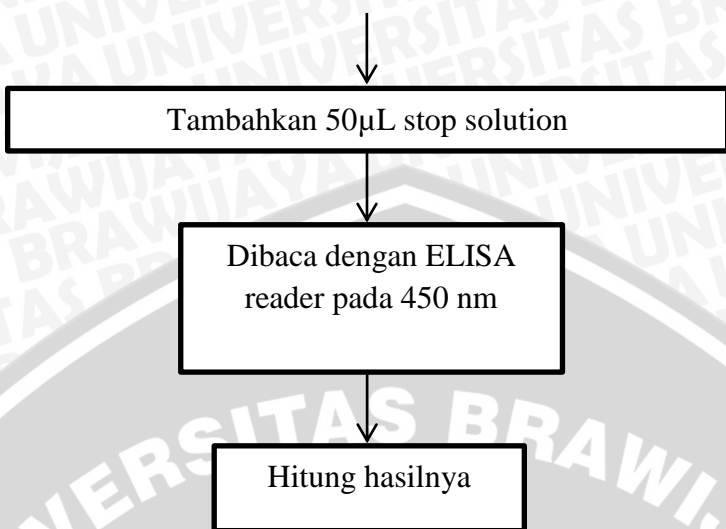
Tikus 2 : $110,7 \text{ mg} : 90 \text{ mg/mL} = 1,2 \text{ mL}$

Tikus 3 : $127,8 \text{ mg} : 90 \text{ mg/mL} = 1,4 \text{ mL}$

Tikus 4 : $133,2 \text{ mg} : 90 \text{ mg/mL} = 1,5 \text{ mL}$

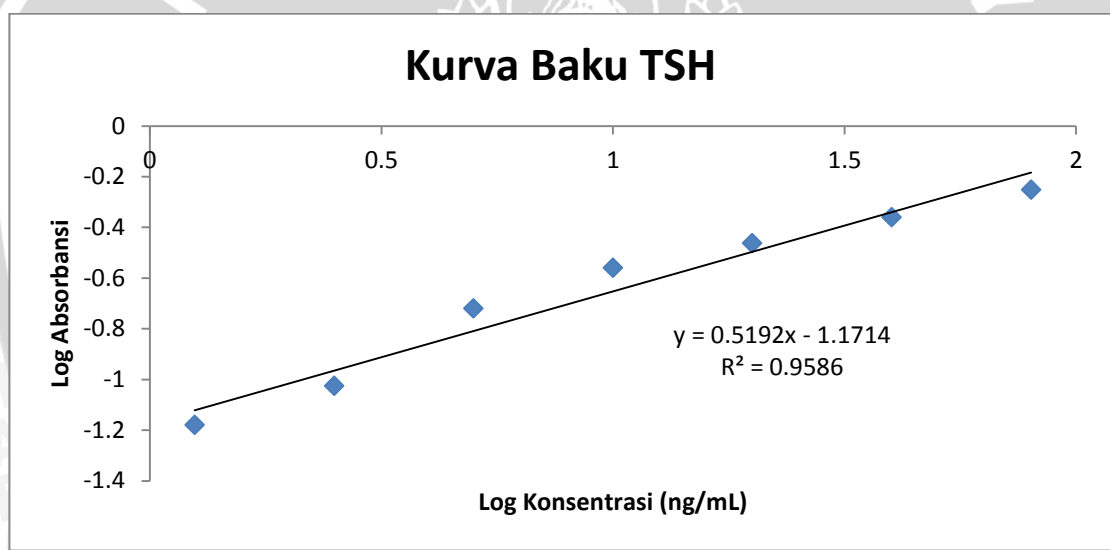
6. Prosedur ELISA





7. Hasil dan Analisa Data Kadar *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH)

Konsentrasi TSH (ng/mL)	Absorbansi	Absorbansi Riil	Log Konsentrasi	Log Absorbansi
80	0.701	0.56	1.903089987	-0.251811973
40	0.577	0.436	1.602059991	-0.360513511
20	0.485	0.344	1.301029996	-0.463441557
10	0.416	0.275	1	-0.560667306
5	0.331	0.19	0.698970004	-0.721246399
2.5	0.235	0.094	0.397940009	-1.026872146
1.25	0.207	0.066	0.096910013	-1/180456064
0	0.141	0		



Sampel	Ulangan	Absorbansi	Absorbansi Riil	Log absorbansi	Log konsentrasi	Konsentrasi TSH (ng/mL)	Rata - rata	ST DEV
Kontrol negatif	1	0.203	0.062	-1.208	-0.071	0.850	1.624	0.672
	2	0.218	0.077	-1.114	0.111	1.290		
	3	0.239	0.098	-1.009	0.313	2.054		
	4	0.245	0.104	-0.983	0.362	2.303		
Kontrol positif	1	0.290	0.149	-0.827	0.663	4.604	4.682	0.941
	2	0.285	0.144	-0.842	0.635	4.311		
	3	0.276	0.135	-0.870	0.581	3.807		
	4	0.312	0.171	-0.767	0.778	6.004		
Terapi A	1	0.295	0.154	-0.812	0.691	4.907	4.244	0.870
	2	0.276	0.135	-0.870	0.581	3.807		
	3	0.265	0.124	-0.907	0.509	3.232		
	4	0.297	0.156	-0.807	0.702	5.030		
Terapi B	1	0.244	0.103	-0.987	0.354	2.261	2.057	0.523
	2	0.254	0.113	-0.947	0.432	2.702		
	3	0.227	0.086	-1.066	0.203	1.597		
	4	0.229	0.088	-1.056	0.223	1.669		
Terapi C	1	0.247	0.106	-0.975	0.378	2.389	1.828	0.530
	2	0.241	0.100	-1.000	0.329	2.135		
	3	0.216	0.075	-1.125	0.089	1.227		
	4	0.226	0.085	-1.071	0.193	1.561		

8. Analisis Statistik Uji TSH

Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		<u>kadar TSH</u>
N		20
Normal <u>Parameters^{a,b}</u>	Mean	2.8858
	Std. Deviation	1.65920
Most Extreme Differences	Absolute	.097
	Positive	.097
	Negative	-.083
Test Statistic		.097
<u>Asymp. Sig. (2-tailed)</u>		.200 ^{c,d}

Berdasarkan uji normalitas, maka disimpulkan distribusi data bersifat normal, dimana hasil sig = 0.200 > 0.05

Uji homogenitas Kadar TSH

<u>Levene Statistic</u>	df1	df2	Sig.
1.599	4	15	.226

p > 0,05

Data homogen

Uji statistik ANOVA

kadar TSH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	33.921	4	8.480	6.919	.002
Within Groups	18.385	15	1.226		
Total	52.306	19			

$p < 0,05$



Uji lanjutan (Post Hoc test) dengan menggunakan uji Tukey

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-3.05925*	.78283	.010	-5.4766	-.6419
	3	-2.62175*	.78283	.031	-5.0391	-.2044
	4	-.43500	.78283	.980	-2.8523	1.9823
	5	-.20150	.78283	.999	-2.6188	2.2158
2	1	3.05925*	.78283	.010	.6419	5.4766
	3	.43750	.78283	.979	-1.9798	2.8548
	4	2.62425*	.78283	.030	.2069	5.0416
	5	2.85775*	.78283	.017	.4404	5.2751
3	1	2.62175*	.78283	.031	.2044	5.0391
	2	-.43750	.78283	.979	-2.8548	1.9798
	4	2.18675	.78283	.086	-.2306	4.6041
	5	2.42025*	.78283	.050	.0029	4.8376
4	1	.43500	.78283	.980	-1.9823	2.8523
	2	-2.62425*	.78283	.030	-5.0416	-.2069
	3	-2.18675	.78283	.086	-4.6041	.2306
	5	.23350	.78283	.998	-2.1838	2.6508
5	1	.20150	.78283	.999	-2.2158	2.6188
	2	-2.85775*	.78283	.017	-5.2751	-.4404
	3	-2.42025*	.78283	.050	-4.8376	-.0029
	4	-.23350	.78283	.998	-2.6508	2.1838

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

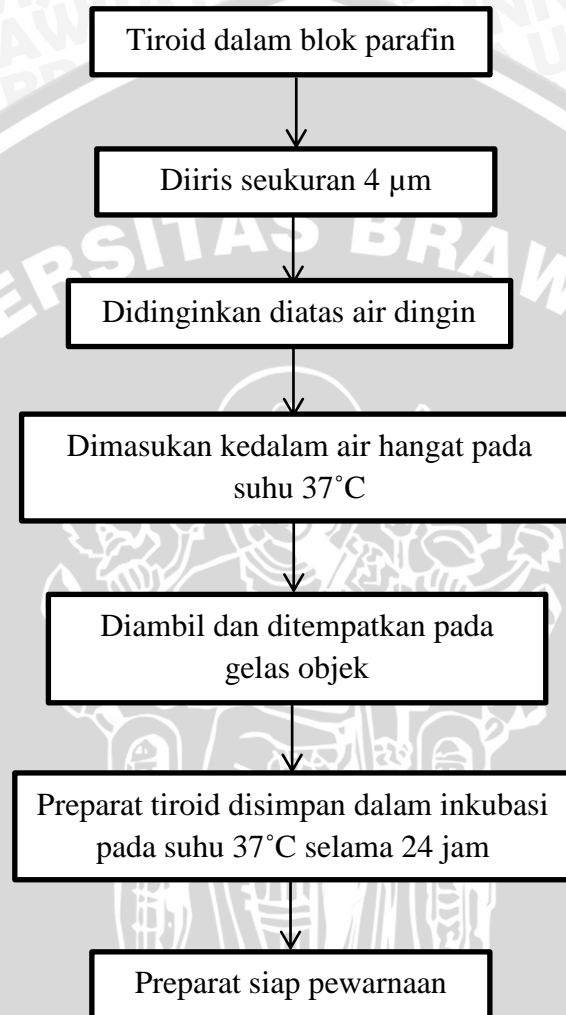
Homogenous subsets

Tukey HSD^a

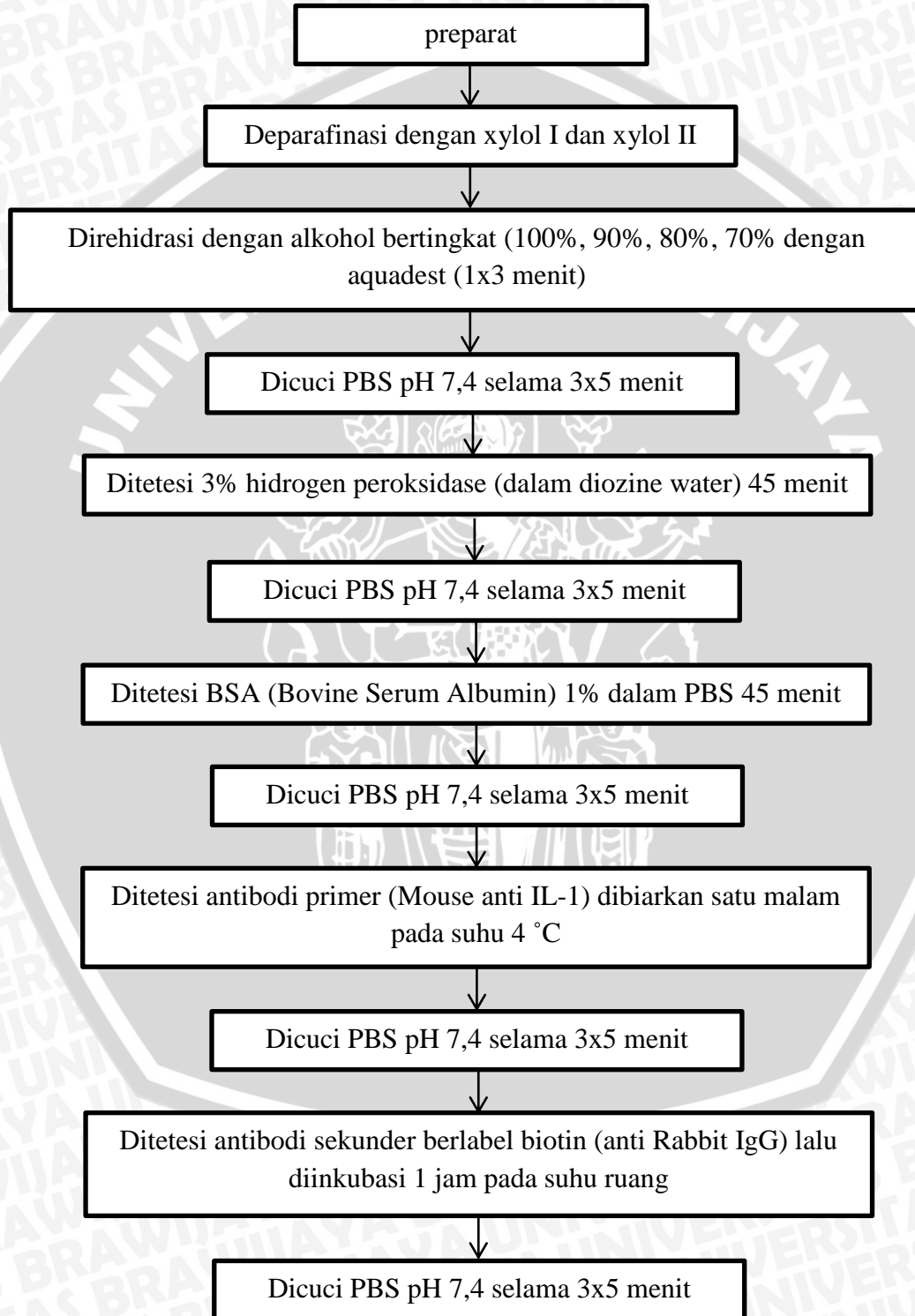
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	4	1.6223		
5	4	1.8238		
4	4	2.0573	2.0573	
3	4		4.2440	4.2440
2	4			4.6815
Sig.		.980	.086	.979

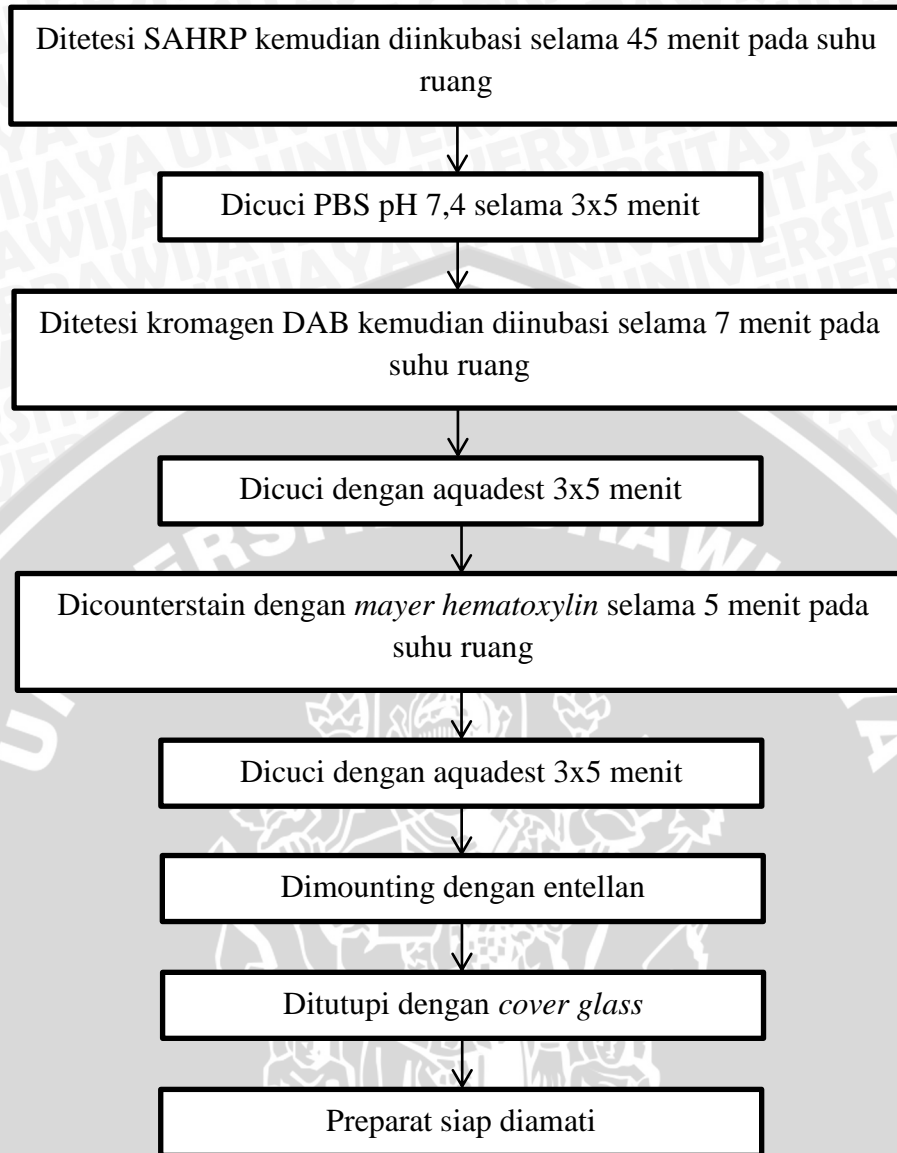


9. Pembuatan Preparat Organ

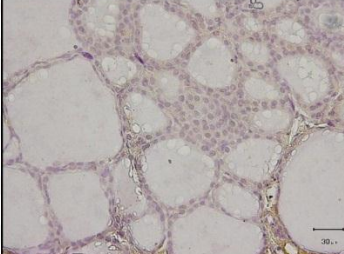
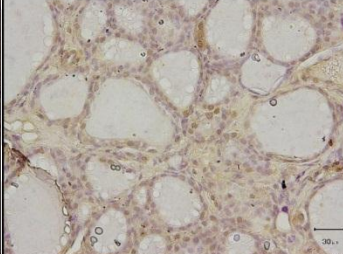
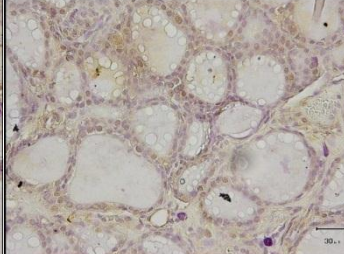
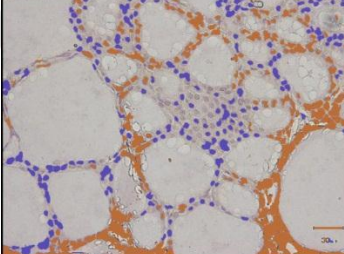
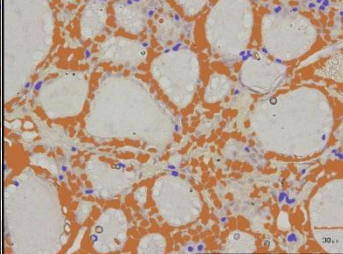
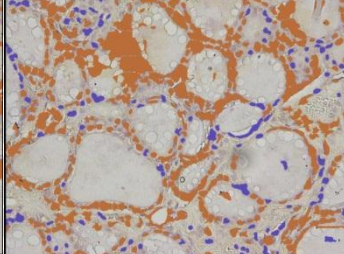
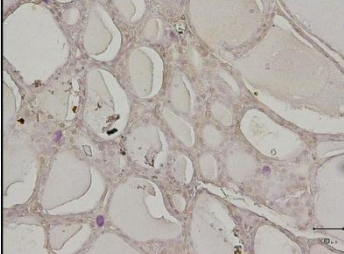
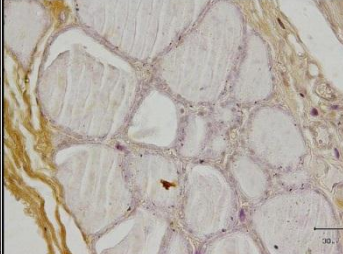
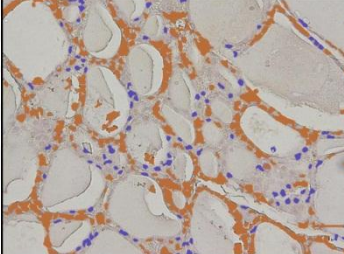
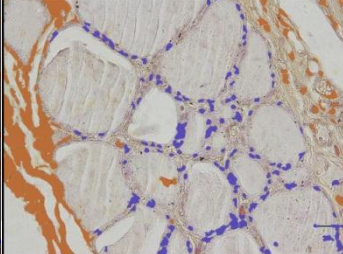


10. Pewarnaan Preparat dengan Metode Imunohistokimia





11. Immunoratio Ekspresi Interleukin 1 (IL - 1)

ImmunoRatio Sample ID: PB078841 Date: 24.11.2016 21:21 DAB / nuclear area: 52.6%	Negatif	ImmunoRatio Sample ID: PB148807 Date: 24.11.2016 21:25 DAB / nuclear area: 96.9%	Positif	ImmunoRatio Sample ID: PB148825 Date: 24.11.2016 21:27 DAB / nuclear area: 77.6%	Terapi A
					
					
ImmunoRatio Sample ID: PB078829 Date: 24.11.2016 21:29 DAB / nuclear area: 76.6%	Terapi B	ImmunoRatio Sample ID: PB148800 Date: 24.11.2016 21:31 DAB / nuclear area: 54.4%	Terapi C		
					
					



12. Analisis Statistik Uji IL – 1
Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		25
Normal Parameters ^a	Mean	.0000000
	Std. Deviation	23.00154180
Most Extreme Differences	Absolute	.129
	Positive	.101
	Negative	-.129
Kolmogorov-Smirnov Z		.643
Asymp. Sig. (2-tailed)		.802

Berdasarkan uji normalitas, maka disimpulkan distribusi data besifat normal, dimana hasil sig = 0.802 > 0.05

Uji homogenitas

IL 1

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.892	4	20	.487

p > 0,05
 data homogen

Uji ANOVA

IL 1	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11894.724	4	2973.681	68.285	.000
Within Groups	870.956	20	43.548		
Total	12765.680	24			

p < 0,05

Uji lanjutan (Post Hoc test) dengan menggunakan uji Tukey

Tukey HSD

(I) Perakua α	(J) Perakua α	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-57.02000*	4.17362	.000	-69.5090	-44.5310
	3	-48.14000*	4.17362	.000	-60.6290	-35.6510
	4	-26.52000*	4.17362	.000	-39.0090	-14.0310
	5	-9.42000	4.17362	.200	-21.9090	3.0690
2	1	57.02000*	4.17362	.000	44.5310	69.5090
	3	8.88000	4.17362	.247	-3.6090	21.3690
	4	30.50000*	4.17362	.000	18.0110	42.9890
	5	47.60000*	4.17362	.000	35.1110	60.0890
3	1	48.14000*	4.17362	.000	35.6510	60.6290
	2	-8.88000	4.17362	.247	-21.3690	3.6090
	4	21.62000*	4.17362	.000	9.1310	34.1090
	5	38.72000*	4.17362	.000	26.2310	51.2090
4	1	26.52000*	4.17362	.000	14.0310	39.0090
	2	-30.50000*	4.17362	.000	-42.9890	-18.0110
	3	-21.62000*	4.17362	.000	-34.1090	-9.1310
	5	17.10000*	4.17362	.005	4.6110	29.5890
5	1	9.42000	4.17362	.200	-3.0690	21.9090
	2	-47.60000*	4.17362	.000	-60.0890	-35.1110
	3	-38.72000*	4.17362	.000	-51.2090	-26.2310
	4	-17.10000*	4.17362	.005	-29.5890	-4.6110

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

Homogenous subsets

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	5	38.0600		
5	5	47.4800		
4	5		64.5800	
3	5			86.2000
2	5			95.0800
Sig.		.200	1.000	.247

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



13. Dokumentasi penelitian



Protein tiroglobulin anjing



Tiroid tikus



Kasein dan whey



WSE yogurt susu kambing