

**EFEK PREVENTIF KASEIN YOGHURT SUSU KAMBING  
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA)  
DAN HISTOPATOLOGI TESTIS TIKUS PUTIH  
(*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR 2,3,7,8-  
*tetrachloro-dibenzo-p-dioxin* (TCDD)**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MALINDA IRAWAN**  
145130100111036



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**EFEK PREVENTIF KASEIN YOGHURT SUSU KAMBING  
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA)  
DAN HISTOPATOLOGI TESTIS TIKUS PUTIH  
(*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR 2,3,7,8-  
*tetrachloro-dibenzo-p-dioxin* (TCDD)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:  
**MALINDA IRAWAN**  
**145130100111036**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**



**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**Efek Preventif Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar 2,3,7,8-Tetrachlorinedibenzo-P-Dioksin (TCDD)**

**Oleh :  
MALINDA IRAWAN  
145130100111036**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 6 Juli 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

**Pembimbing I**



**Pembimbing II**

**Dr. drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc**  
NIP. 19560210198403 2 001

**drh. Ajeng Erika P. H., M.Si**  
NIP. 19890516201504 2 001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001



**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Malinda Irawan

NIM : 125130100111059

Program Studi : Kedokteran Hewan.

Penulis Skripsi berjudul:

Efek Preventif Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar 2,3,7,8-Tetrachlorinedibenzo-*P*-Dioksin (TCDD)

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 risiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Juli 2018

Yang menyatakan,

Malinda Irawan

NIM.145130100111036



**Efek Preventif Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar 2,3,7,8-Tetrachlorinedibenzo-P-Dioksin (TCDD)**

**ABSTRAK**

Dioksin merupakan senyawa kimia paling toksik yang dihasilkan oleh kegiatan manusia dan memiliki salah satu efek sebagai reprotoksik. Jenis dioksin yang memiliki toksik paling tinggi adalah 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD). Kasein yoghurt susu kambing memiliki potensi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan potensi antioksidan yoghurt susu kambing pada paparan dioksin yang diamati melalui kadar *malondyaldehide* (MDA) dan gambaran histopatologi testis. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental menggunakan RAL. Hewan coba dibagi menjadi 6 kelompok yang terdiri dari kelompok normal, kelompok kontrol kasein (kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kg BB), kelompok positif (TCDD 100 ng/kg BB), kelompok perlakuan 1 (kasein yoghurt susu kambing 300 mg/kg BB dan TCDD 100 ng/kg BB), kelompok perlakuan 2 (kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kg BB dan TCDD 100 ng/kg BB) dan kelompok perlakuan 3 (kasein yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB dan TCDD 100 ng/kg BB). Kadar MDA diukur dengan metode *Thiobarbituric Acid (TBA)* menggunakan spektrofotometri UV-Vis panjang gelombang 530 nm secara kuantitatif dengan uji statistik *one way Analysis of Variance* (ANOVA) dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ). Gambaran histopatologi testis menggunakan metode pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) diamati secara deskriptif sel sperma dalam tubulus seminiferus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kasein yoghurt susu kambing dapat mencegah kenaikan kadar MDA dan pengurangan kepadatan sel spermatozoa akibat paparan TCDD secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Dosis 900 mg/kg BB adalah dosis terbaik dalam mencegah kenaikan kadar MDA dan pengurangan kepadatan sel spermatozoa. Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian kasein yoghurt susu kambing dapat mencegah kenaikan kadar MDA dan pengurangan kepadatan spermatozoa akibat paparan TCDD.

**Kata kunci** : Dioksin, kasein yoghurt susu kambing, MDA, sel spermatozoa.

repository.ub.ac.id

**Preventive Effect Of Casein Goat Milk Yoghurt on Malondyaldehyde (MDA) Levels And Histopatology Picture Of Testes In (*Rattus norvegicus*) Exposed To 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD)**

**ABSTRACT**

Dioxin is the most toxic chemistry compound produced by human activity and has one of the effects as the reprotoxic. The type of dioxin that has the highest toxicity is 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD). Goat milk yoghurt casein has a potential as antioxidant. The purpose of this study was to prove the antioxidant potential of goat milk yoghurt on dioxin exposure observed by *malondyaldehyde* (MDA) levels and histopathological image of testicle. This study was occurred experimentally using RAL. Model animals were divided into 6 groups consisted of normal group, casein control group (goat milk yoghurt casein 600 mg/kg BW), positive group (TCDD 100 ng/kg BW), treatment group 1 (goat milk yoghurt casein 300 mg/kg BW and TCDD 100 ng/kg BW), treatment group 2 (goat milk yoghurt casein 600 mg/kg BW and TCDD 100 ng/kg BW) and treatment group 3 (goat milk yoghurt casein 900 mg/kg BW and TCDD 100 ng/kg BW). MDA level was measured by *Thiobarbituric Acid (TBA)* method using spectrophotometry UV-Vis with wavelength of 530 nm quantitatively with one way Analysis of Variance (ANOVA) statistic test method, continued by Honest Significant Difference test. The histopathological image of testicle was stained by Hematoxylin-eosin staining method, and sperm cells in seminiferous tubules were observed descriptively. The result of this study showed that goat milk yoghurt casein could prevent the increase level of MDA and decrease the density of spermatozoa cells as the effect of TCDD exposure significantly ( $p < 0,05$ ). The dose of 900 mg/kg BW was the most best dose to prevent MDA level to increase and the density of spermatozoa cells to decrease. The conclusion of this study was the administration of goat milk yoghurt casein could prevent the increase level of MDA and decrease the density of spermatozoa cells as the effect of TCDD exposure.

**Key word :** dioxin, goat milk yoghurt casein, MDA, spermatozoa cell.

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkat dan anugrah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Efek Preventif Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar *Malondyaldehyde* (MDA) dan Gambaran Histopatologi Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar 2,3,7,8- *tetrachloro-dibenzo-p-dioxin* (TCDD)” ini dapat terselesaikan.

Selama menyusun skripsi, penulis banyak mendapatkan arahan, bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc., selaku dosen pembimbing I yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, waktu yang telah diberikan, dan dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
2. Drh. Ajeng Erika P.H., M.Si., selaku dosen pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan, dan dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
3. Drh. Ahmad Fauzi, M.Sc., dan Drh. Mira Fatmawati, M.Si., selaku dosen penguji yang telah memberikan saran, kritik, masukan serta dukungan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES., selaku Dekan FKH UB.
5. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, M.S., yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk ikut serta dalam penelitian ini.
6. Orang tua, Bapak Suwarno Irawan, dan Ibu Agustinah atas doa, materi, dan juga moril semua diberikan kepada saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Jasa orang tua yang tiada tara.
7. Kepada “Skripsi Squad” tercinta, Melinda dan Robbie yang selalu mendukung dan memberi keceriaan pada saat penelitian berlangsung, dan mendukung menyelesaikan skripsi.

8. Kepada keluarga besar KEPETA serta keluarga besar IMPROVE yang selalu mendukung dan mengerti segala kesibukan saya.
9. Kepada “DEER class” yang selalu memberikan keceriaan, terutama sahabat saya Gabriella, Gavi, Iva, Dena, dan Imit yang selalu mendukung segala usaha saya untuk menyelesaikan skripsi.
10. Seluruh kolega di FKH UB yang selalu memberikan semangat, inspirasi, dan mimpi-mimpi luar biasa.

Penulis sadar bahwa skripsi ini jauh dari sempurna. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat terutama bagi penulis dan bagi pembaca, untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan. Akhir kata, penulis berharap semoga ALLAH S.W.T. membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan hasil dari penelitian ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, Oktober 2017

Penulis

## DAFTAR ISI

Halaman

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Batasan Masalah .....	4
1.4 Tujuan Penelitian .....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	7
2.1 2,3,7,8-Tetrachlorinedibenzo-P-Dioxin (TCDD) .....	7
2.2 Patomekanisme keracunan 2,3,7,8-Tetrachlorinedibenzo-P-Dioxin (TCDD) .....	9
2.3 Pengaruh 2,3,7,8-Tetrachlorinedibenzo-P-Dioxin (TCDD) terhadap Testis .....	11
2.4 Kasein Yoghurt Susu Kambing sebagai Antioksidan .....	13
2.5 Hewan Model Keracunan 2,3,7,8-Tetrachlorinedibenzo-P-Dioxin (TCDD) .....	17
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	20
3.1 Kerangka Konseptual .....	20
3.2 Hipotesis Penelitian .....	23
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	24
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	24
4.2 Materi Penelitian .....	24
4.2.1 Alat .....	24
4.2.2 Bahan .....	25
4.3 Tahapan Penelitian .....	25



4.3.1 Rancangan Penelitian .....	25
4.3.2 Variabel Penelitian .....	27
4.4 Prosedur Kerja .....	28
4.4.1 Pembuatan Kasein .....	28
4.4.1.1 Pembuatan <i>Starter Cair (Mother Culture)</i> .....	28
4.4.1.2 Pembuatan Yoghurt .....	28
4.4.1.3 Pemisahan Kasein Yoghurt Susu Kambing.....	29
4.4.2 Persiapan Hewan Coba Dipapar 2,3,7,8- <i>Tetrachlorinedibenzo-P-Dioxin (TCDD)</i> .....	29
4.4.2.1 Persiapan Hewan Coba .....	29
4.4.2.2 Pemberian Kasein Yoghurt Susu Kambing .....	30
4.4.2.3 Hewan Coba Dipapar dengan 2,3,7,8- <i>Tetrachlorinedibenzo-P-Dioxin (TCDD)</i> .....	30
4.4.3 Histopatologi Testis .....	30
4.4.4 Pengukuran Kadar <i>Malondyaldehyde (MDA)</i> Testis.....	31
4.5. Analisis Statistik.....	32
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	33
5.1 Pengaruh Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar <i>Malondyaldehyde (MDA)</i> Testis Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang Dipapar 2,3,7,8- <i>tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)</i> .....	33
5.2 Efek Preventif Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Histopatologi Testis Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang Dipapar 2,3,7,8- <i>tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)</i> .....	38
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	44
6.1 Kesimpulan .....	44
6.2 Saran.....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	45
<b>LAMPIRAN</b> .....	51





## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
4.1. Rancangan Penelitian .....	26
5.1. Nilai Kadar MDA Organ Testis Berbagai Kelompok Perlakuan.....	33





## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Molekul 2,3,7,8-Tetrachlorinedibenzo-P-Dioxin (TCDD) .....	7
2.2 Histologi Testis Dipapar 2,3,7,8-Tetrachlorinedibenzo-P-Dioxin (TCDD)..	13
2.3 Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	17
2.4 Mikroskopis Organ Testis Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	18
2.5 Histologi Testis Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	19
3.1 Skema Kerangka Konseptual .....	20
5.1 Perubahan Gambaran Histopatologi Testis Setiap Perlakuan Perbesaran 400x.....	40



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik .....	51
2. Surat Pernyataan Payung Penelitian .....	52
3. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian.....	53
4. Pembuatan Kasein Yoghurt Susu Kambing .....	54
5. Perhitungan Dosis Kasein Yoghurt Susu Kambing.....	56
6. Perhitungan Dosis 2,3,7,8- <i>Tetrachlorinedibenzo-P-Dioxin</i> (TCDD).....	60
7. Prosedur Pengukuran Kadar <i>Malondyaldehyde</i> (MDA) Testis.....	62
8. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi Testis dengan Hematoksin- Eosin (HE) .....	63
9. Data Absorbansi dan Perhitungan Kadar <i>Malondyaldehyde</i> (MDA) Organ Testis.....	64
10. Analisa Statistika Kadar <i>Malondyaldehyde</i> (MDA) Organ Testis.....	65
11. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan.....	67



## DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
$\alpha$	Alfa
ABP	<i>Androgen Binding Protein</i>
AhR	<i>Aryl Hidrocarbon Receptor</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AR	<i>Androgen Receptor</i>
Arnt	<i>Aryl Hidrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>
BAL	Bakteri Asam Laktat
BB	Berat Badan
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
°	Derajat
DPPH	<i>Diphenylpicrylhydrazyl</i>
DRE	<i>Dioxin-Responsive Enhancer Elements</i>
DRE	<i>Dioxin-Responsive Enhancer Elements</i>
FSH	<i>Folikel Stimulating Hormon</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
HE	Hematoksilin-Eosin
kDa	kilo Dalton
kg	kilogram
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
MDA	<i>Malondyaldehyde</i>
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
mg	milligram
ml	milliliter
ng	nanogram
%	Persen
PCDD	<i>Polychlorinated Dibenzodioksins</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SNI	Standar Nasional Indonesia
TBA	<i>Thiobarbituric Acid</i>
TCDD	<i>2,3,7,8-Tetrachlorinedibenzo-p-dioksin</i>
TEF	<i>Toxic Equivalency Factor</i>



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-*p*-dioksin (TCDD) merupakan salah satu jenis senyawa organoklorin yang dapat menimbulkan efek racun dan bersifat karsinogenik. TCDD berasal dari senyawa kimia yang resisten terhadap degradasi secara fisik dan metabolik. Sumber TCDD berasal dari industri maupun insenerator, melalui pembakaran yang mengandung klor, contoh limbah organik produk kertas dan plastik. Selain itu klorin dapat ditemukan sebagai sisa pembakaran sampah seperti plastik maupun kayu, sisa pembakaran tersebut berupa debu dan butiran-butiran halus menyebar secara efisien melalui udara. Dioxin yang ada diudara tersebut kembali ke tanah mencakup area yang jauh lebih luas dari lokasi pembakaran dimana banyak binatang seperti sapi yang memakan rumput yang telah terkontam inasi dari dioxin (Wakiefield, 2008 dan Warlina *et al.*, 2008).

Sumber-sumber kontaminasi dioksin pada produk ternak umumnya berasal dari pakan ternak, rumput, tanah dan air (Kijlstra, 2004). Pakan dianggap sebagai sumber utama kontaminasi dioksin pada pangan asal hewan dan produk hewan, meskipun hewan tersebut juga dapat terpapar secara langsung melalui tanah, udara dan air yang tercemar. Susu sebagai sumber nutrisi kaya gizi dapat membawa senyawa beracun menjadi faktor risiko tertinggi dalam kesehatan masyarakat (Licata *et al.*, 2004). Dioksin dapat masuk ke dalam susu sapi perah melalui pakan ternak yang tercemar (Durand *et al.*, 2000). Kandungan dioksin di dalam susu bergantung pada konsentrasinya di dalam hijauan pakan ternak atau

konsentrat yang dikonsumsi oleh sapi laktasi (van Larebeke *et al.*, 2001; Schmid *et al.*, 2003).

TCDD juga merupakan bahan toksik terhadap sistem reproduksi dan dapat mengurangi fertilitas, menekan pertumbuhan dan maturasi spermatozoa, serta menurunkan kadar testosteron, GnRH, FSH, dan LH. Efek toksik TCDD dalam sistem reproduksi laki-laki menyebabkan ukuran testis, kelenjar prostat, vesikula seminalis, dan jumlah sperma berkurang, serta peningkatan jumlah sperma abnormal (Latchoumycandane *et al.*, 2003). Menurut Kim *et al.* (1999), TCDD menyebabkan atrofi dan kerusakan testis. Beberapa studi menyatakan bahwa sel-sel Sertoli mungkin target TCDD di testis marmut, yang menyebabkan perubahan dalam sel germinal.

TCDD masuk ke dalam tubuh melalui ingesti, inhalasi, maupun kontak kulit. Pada saat terjadinya paparan TCDD di dalam tubuh akan terbentuk kompleks senyawa TCDD-AhR-Arnt yang akan berinteraksi dengan DRE (*Dioxin Responsive Enhancer Elements*). Ikatan tersebut akan meningkatkan ekspresi sitokrom P450 yang mengakibatkan stres oksidatif dan peningkatan aktivitas sitokrom P450 akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Doi *et al.*, 2003). Ikatan CYP450 dengan AR (*Androgen Receptor*), yang berakibat pada penurunan peran AR pada sel Leydig dan peningkatan ROS dalam sel sehingga terjadilah kematian pada sel Leydig (Wati, 2013).

Stres oksidatif yang diakibatkan TCDD dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameter berupa *malondyaldehyde* (MDA) sel (Brunner *et al.*, 2004). *Malondyaldehyde* (MDA) merupakan senyawa toksik yang dapat merusak sel-sel

pada tubuh. *Malondyaldehyde* (MDA) dihasilkan karena adanya peningkatan ROS yang menyebabkan peroksidasi lipid, akibat dari reaksi tersebut adalah terputusnya rantai asam lemak dan menghasilkan senyawa toksik bagi sel (Brunner *et al.*, 2004).

Kasein adalah 80% dari protein total yang terkandung dalam susu, merupakan sumber bioaktif peptida dan memiliki pengaruh kesehatan yaitu sebagai antioksidan jika dikelola dengan tepat, salah satunya dengan fermentasi (Aliaga *et al.*, 2003). Bakteri Asam Laktat (BAL) memiliki enzim proteolitik yang mampu menghidrolisa bioaktif peptida yang terikat dalam protein prekursor, sehingga lepas dan menghasilkan produk olahan susu dengan kandungan bioaktif peptida yang cukup tinggi (Awemu *et al.*, 2009; Exposito *et al.*, 2007). Biopeptida hasil fermentasi yoghurt mampu menginduksi sistem imun seluler dan berperan sebagai antioksidan (Levings *et al.*, 2002). Derivat bioaktif antioksidan peptida memiliki kemampuan mencegah pembentukan radikal dan memiliki efek *scavenging radicals* (Mohanty *et al.*, 2015).

Penggunaan kasein yoghurt susu kambing diharapkan mampu menjadi alternatif untuk mencegah peningkatan stres oksidatif dan kerusakan sel testis akibat induksi TCDD. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah kasein yoghurt susu kambing dapat memiliki efek antioksidan terhadap induksi TCDD yang ditinjau dari kadar MDA testis dan gambaran histologi berupa kepadatan sperma dalam tubulus seminiferus.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disampaikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut:

- 1) Bagaimanakah pengaruh preventif kasein yoghurt susu kambing dalam mencegah kenaikan kadar MDA testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar TCDD?
- 2) Bagaimanakah pengaruh preventif kasein yoghurt susu kambing dalam mencegah peningkatan kerusakan histologi testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar TCDD?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini dibatasi pada:

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar*, jantan, berumur 8-12 minggu, dengan berat 150-250 gram sebanyak 24 ekor yang didapat dari Penyedia Hewan Laboratorium D'wistar, Jalan Deme Nomor 66 Gatot Subroto Bandung dan telah mendapat keterangan kelaikan etik dengan nomor: 710-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian (*Animal Care and Use Commite*) Universitas Brawijaya, Malang (**Lampiran 1**).
- 2) Induksi TCDD Sebagai induktor toksik organ reproduksi digunakan 2,3,7,8-TCDD *Sigma 48599* per-oral dengan sonde lambung selama 21 hari. Penelitian ini menggunakan dosis tunggal TCDD, yaitu 100 ng/kgBB/hari. Dosis TCDD ditentukan berdasarkan penelitian yang telah



dilakukan oleh Fujimaki *et al.*, (2002) dan Yin *et al.*, (2012). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksin (TCDD) dilarutkan dengan minyak jagung setiap 100 ng/ml TCDD dalam 100 ml minyak jagung.

- 3) Kasein yoghurt susu kambing dibuat dari susu kambing Peranakan Etawa (PE) segar dari Surabaya Valenta Goat Milk dan starter yogurt (*Yógourmet Yoghurt Starter, LYO-SAN. INC 500 Aéroparc, C. P. 598, Lachute, QC. Canada, J8H 4G4*) yang mengandung bakteri *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus acidophilus*.
- 4) Kadar MDA testis yang diukur dengan menggunakan metode TBA dengan pengukuran kadar menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 530 nm (Aulanni'am *et al.*, 2013), dan gambaran histopatologi testis menggunakan metode pewarnaan HE dan diamati sel spermatozoa dalam tubulus seminiferus dengan mikroskop cahaya perbesaran 100x dan 400x.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang, adapun tujuan penelitian ini adalah:

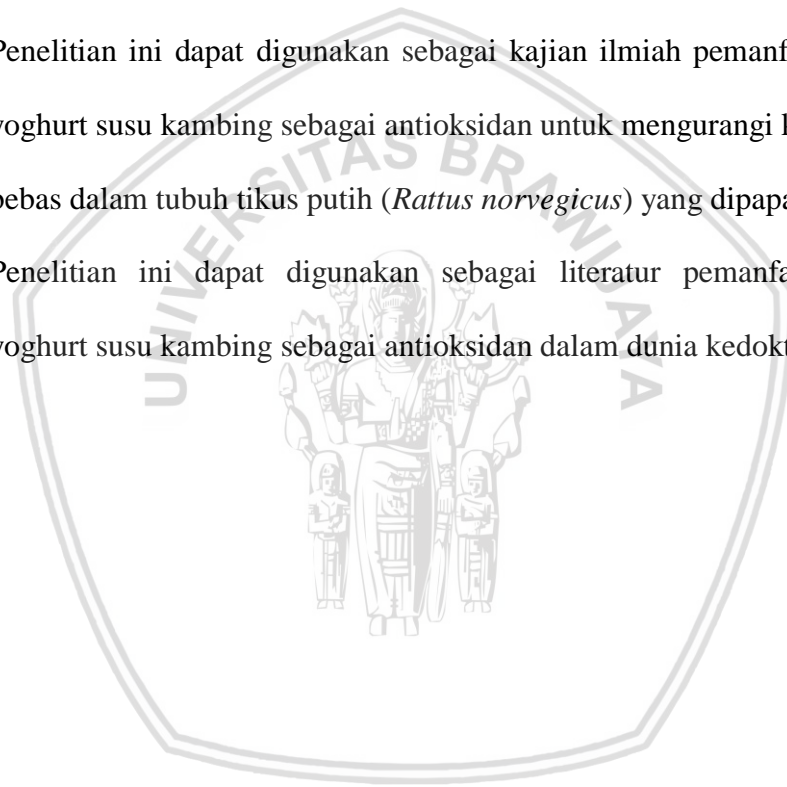
- 1) Untuk mengetahui pengaruh pemberian kasein yoghurt susu kambing dalam mencegah kenaikan kadar MDA testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar TCDD.
- 2) Untuk mengetahui pengaruh pemberian kasein yoghurt susu kambing dalam mencegah peningkatan kerusakan histologi testis tikus putih

(*Rattus norvegicus*) berupa kepadatan sperma dalam tubulus seminiferus yang dipapar TCDD.

### 1.5 Manfaat

Adapun manfaat yang diharapkan oleh penulis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan kasein yoghurt susu kambing sebagai antioksidan untuk mengurangi kadar radikal bebas dalam tubuh tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dioksin.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai literatur pemanfaatan kasein yoghurt susu kambing sebagai antioksidan dalam dunia kedokteran hewan.

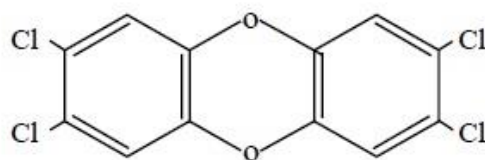


## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)

TCDD merupakan salah satu jenis senyawa organoklorin yang tiap molekul memiliki empat atom klor, dua oksigen dan dua cincin benzena. Klor adalah unsur halogen yang sangat reaktif, sehingga mudah bereaksi dengan senyawa organik atau senyawa lain. Sebagian besar senyawa organoklorin, seperti dioksin menimbulkan efek racun. Senyawa kimia mematikan ini ditemukan dalam konsentrasi tinggi pesisir yang memiliki pabrik kertas (European Commission, 2000; Rini, 2002). Menurut Isa (2011), dioksin adalah nama umum untuk grup *Polychlorinated Dibenzodioksins* (PCDD). Dioksin adalah kelompok senyawa yang bersifat racun (toksik) dan diketahui secara nyata merupakan faktor pemicu kanker.

Dioksin merupakan padatan kristal tidak berwarna pada suhu ruang dan memiliki kestabilan termal yang tinggi. Zat ini larut dalam pelarut polar maupun pelarut non polar, tetapi tingkat kelarutan pada pelarut non polar lebih besar dibandingkan pelarut polar. Selain itu dioksin juga cenderung akan terakumulasi dalam jaringan lemak atau mempunyai sifat lipofilik (Connel dan Miller, 1995).



2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

**Gambar 2.1** Struktur Molekul 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD) (Fiedler, 2001).

Menurut Rier (2002) yang dimaksud dengan dioksin adalah 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p* dioxin (TCDD), merupakan senyawa paling toksik yang pernah dihasilkan oleh kegiatan manusia (Birnbaum, 1995). Kebakaran lahan pertanian maupun hutan yang tidak terkendali dapat menaikkan tingkat pencemaran dioksin pada lingkungan. Begitupula dengan proses pengapian pada kendaraan bermotor dapat pula menghasilkan dioksin dan dioxinslike (Fielder, 2007). Cakupan ketoksikan sangat luas, meliputi reprotoksik, neurotoksik, hepatotoksik, dan imunotoksik. Dioksin juga bersifat karsinogenik dan teratogenik (Birnbaum, 1995). Jenis dioksin yang paling tinggi aktivitas ketoksikannya adalah TCDD. Oleh karena itu, TCDD digunakan sebagai senyawa prototipe dioksin dan paling banyak diteliti dibandingkan dengan jenis senyawa-senyawa dioksin lain (Kimbrough, 1998; Safe, 1998).

Sehubungan dengan sifat lipofilik dan persistensinya, dioksin dan dioxinslike dapat terakumulasi di dalam jaringan lemak hewan dan manusia. Pangan hewani seperti susu, daging dan telur merupakan sumber utama paparan dioksin pada manusia. Sementara itu, pakan ternak seperti rumput dan konsentrat merupakan sumber utama pencemaran dioksin pada hewan dan produknya (Adekunte *et al.*, 2010; De Vries *et al.*, 2006; Kijlstra, 2004). Keracunan dioksin dapat menimbulkan gangguan kesehatan seperti gangguan reproduksi, pertumbuhan, neurologis, tingkah laku, kerusakan kulit (dermal), dan imunomodulator (Bencko, 2003). Dioksin juga dilaporkan bersifat karsinogenik (Tsutsumi *et al.*, 2001; Parzefall, 2002; Wang *et al.*, 2009) yang dapat

menimbulkan pertumbuhan tumor, teratogen, atrofi thymus, disfungsi kelenjar endokrin dan imunotoksisitas (Schwarz & Appel, 2005; EU-SCF, 2001)

TCDD adalah senyawa yang mampu memicu terbentuknya radikal bebas, karena merupakan suatu molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan dalam orbital terluarnya sehingga sangat reaktif. Radikal ini cenderung mengadakan reaksi berantai yang apabila terjadi di dalam tubuh akan dapat menimbulkan kerusakan-kerusakan yang berlanjut dan terus menerus (Wahdaningsih, 2011). Untuk mendapatkan stabilitas kimia, radikal bebas tidak dapat mempertahankan bentuk asli dalam waktu lama dan segera berikatan dengan bahan sekitarnya. Radikal bebas akan menyerang molekul stabil yang terdekat dan mengambil elektron, zat yang terambil elektronnya akan menjadi radikal bebas juga sehingga akan memulai suatu reaksi berantai, yang akhirnya terjadi kerusakan sel tersebut (Droge W, 2002).

## **2.2 Patomekanisme Keracunan 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)**

Menurut Aritinang (1999), mekanisme masuk dioksin kedalam tubuh melalui beberapa cara, seperti tertelan bersama makanan atau minuman (*ingestion*) dan juga melalui penghirupan (*inhalation*) udara yang tercemar dioksin, atau melalui kontak kulit (*dermal contact*). Sebelum berada di tanah, kemungkinan penyebaran dioksin melalui udara, seperti terhirup manusia atau hewan besar terlebih dahulu. Dioksin yang masuk ke tanah berpotensi terserap akar tanaman dan melalui rantai makanan sampai ke makhluk hidup lain.

Liem *et al.* (2000), melaporkan bahwa 90% paparan senyawa dioxin-like pada manusia disebabkan karena intake makanan yang tercemar. *Intake* makanan merupakan rute utama kejadian intoksikasi senyawa dioksin pada makhluk hidup seperti melalui konsumsi daging, telur, susu dan ikan tercemar (De Vries *et al.*, 2006). Oleh karena itu semakin tinggi konsentrasi kontaminasi dioxin pada mata rantai pangan semakin besar jumlah yang terakumulasi di dalam tubuh (EC, 2001) yang pada suatu saat menimbulkan residu pada produk pangan dan gangguan kesehatan. Intake dioksin melalui makanan sangat bergantung pada tingkat relatif intake pangan yang terkontaminasi maupun jumlah pangan yang dikonsumsi. Dioxin dapat tersimpan pada lemak sapi dan lemak susu yang tidak akan termetabolisir oleh sapi. Dioxin berada pada lemak ikan karena air laut yang tercemar melalui udara dan juga limbah industri. Begitu seterusnya melalui rantai makanan, akhirnya dioxin terdeposit dalam tubuh manusia (Birbaum and Cummings, 2002).

TCDD dapat menimbulkan respon toksik pada tubuh karena memiliki reseptor spesifik, yaitu Ahr. TCDD mengikat AhR dalam sitoplasma. Kompleks ikatan AhR dan dioksin mengalami konformasi perubahan dan tertranslokasi ke nukleus. Selanjutnya, ikatan ini akan melakukan heterodimer dengan faktor transkripsi lain, yaitu Arnt. Heterodimer ini akan berinteraksi dengan *Dioxin-Responsive Enhancer Elements* (DRE) yang terletak pada permukaan gen target dan mengaktifkan berbagai faktor transkripsi pada inti sel. Heterodimer AhR-Arnt menghasilkan stimulasi gen sitokrom P450 dan menyebabkan peningkatan produksi sitokrom. Sitokrom p450 yang terpapar TCDD diduga mengakibatkan

stres oksidatif dan peningkatan aktivitas sitokrom P450 akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Dobrzyński *et al.*, 2009; Yoshida and Ogawa, 2000). Stres oksidatif yang ditimbulkan dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameter berupa *malondyaldehyde* (MDA) sel (Brunner *et al.*, 2004).

*Malondyaldehyde* (MDA) merupakan senyawa toksik yang dapat merusak sel-sel pada tubuh. *Malondyaldehyde* (MDA) dihasilkan karena adanya peningkatan ROS yang menyebabkan peroksidasi lipid, akibat dari reaksi tersebut adalah terputusnya rantai asam lemak dan menghasilkan senyawa toksik bagi sel (Brunner *et al.*, 2004). Bila kadar MDA tinggi dalam plasma, maka dapat dipastikan sel mengalami stres oksidatif (Valko, 2006).

### 2.3 Pengaruh TCDD Terhadap Testis

Testis merupakan bagian penting dalam sistem reproduksi makhluk hidup, apabila testis mengalami kerusakan akibat suatu senyawa toksik maka akan mempengaruhi fertilitas sistem reproduksi testis. Beberapa agen dapat menginduksi toksisitas pada organ testis dengan menghambat sintesis protein yang merusak pembelahan sel secara cepat dan pergantian proses spermatogenesis yang terjadi (Creazy *et al.*, 2012).

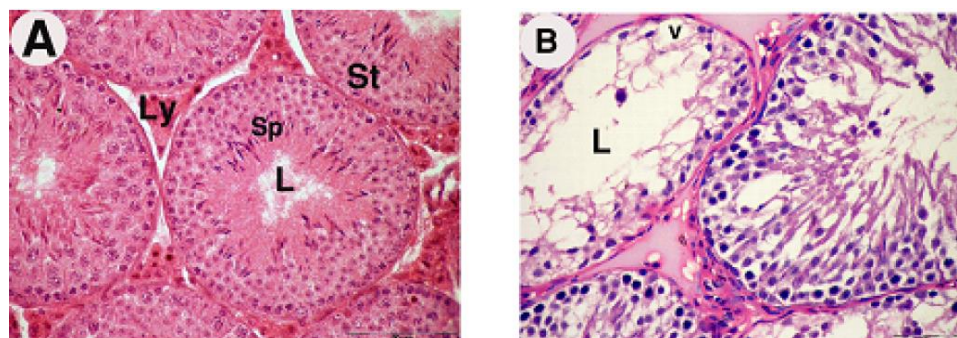
Menurut Latchoumycandane *et al.* (2002), TCDD merupakan bahan toksik terhadap sistem reproduksi dan dapat mengurangi fertilitas, menekan pertumbuhan dan maturasi spermatozoa serta menurunkan kadar testosteron, GnRH, FSH, dan LH. Selain itu, TCDD dapat menghancurkan pertahanan



antioksidan pada sistem *chondrosomes* dan *cytomicrosomes* testis, menyebabkan stres oksidatif sehingga dapat menurunkan kemampuan reproduksi.

ROS yang terbentuk akibat terekspresinya CYP450 mengakibatkan gangguan pada proses steroidogenesis dimana steroidogenesis merupakan salah satu sumber ROS secara fisiologis dalam sel Leydig. Di dalam sel Leydig terdapat mediator reseptor yang disebut AR (*Androgen Receptor*), AR berperan untuk memediasi pematangan jalur steroidogenesis (Chang *et al.*, 2004). CYP450 akan berikatan dengan AR yang berakibat pada penurunan peran AR pada sel Leydig dan peningkatan ROS dalam sel sehingga terjadilah kematian pada sel Leydig (Wati, 2013). Penurunan jumlah sel Leydig mengakibatkan penurunan produksi hormon testosteron, sehingga proses spermatogenesis menurun. Menurut Dobrzyński *et al.* (2009), Selain berinteraksi dengan AR dioxin juga dapat mengikat ABP (*Androgen Binding Protein*) yang bertugas membawa hormon testosterone ke dalam lumen tubulus seminiferus.

Efek toksik TCDD dalam sistem reproduksi laki-laki menyebabkan ukuran testis berkurang, kelenjar prostat dan vesikula seminalis berkurang, mengurangi jumlah sperma, serta peningkatan jumlah sperma abnormal (Latchoumycandane *et al.*, 2003). Juga telah dilaporkan bahwa TCDD penyebab atrofi dan menyebabkan kerusakan testis. Beberapa studi menyatakan bahwa sel-sel Sertoli mungkin target TCDD di testis marmut, yang menyebabkan perubahan dalam sel germinal (Kim *et al.*, 1999).



**Gambar 2.2** Histologi Testis Dipapar 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-*p*-dioksin (TCDD) (El-Gerbed *et al.*, 2015).

Keterangan: A: histologi testis normal. B: histologi testis dipapar Dioksin (TCDD), tubulus Seminiferus memiliki lamina basal yang tidak teratur dan terpisah satu sama lain. Terdapat pelebaran jarak antara sel-sel dan pembesaran ruang inter selular antar sel. Jaringan interstisial menunjukkan edema, perdarahan dan vakuolasi. Banyak tubulus seminiferus yang edema dengan lapisan germinal utuh dan mengalami degenerasi bersama dengan hilangnya spermatogenesis. St: tubulus seminiferus, Sp: spermatid, Ly: sel ledig, L: Lumen, V: vakuola

Pada testis, MDA dapat terbentuk apabila radikal bebas hidroksil seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) bereaksi dengan komponen asam lemak dari membran sel testis sehingga terjadi reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lemak. Peroksidasi lemak tersebut akan menyebabkan terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa toksik dan menyebabkan kerusakan pada membran sel testis (Yunus, 2001).

#### 2.4 Kasein Yoghurt Susu Kambing sebagai Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam (Zubia *et al.*, 2007). Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat digunakan untuk mengatasi kerusakan oksidatif akibat radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*) (Wulansari,

2011). Secara signifikan antioksidan dapat mencegah atau menghambat oksidasi substrat, sehingga kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas terhadap sel, jaringan maupun organ dapat dicegah.

Susu kambing merupakan salah satu sumber protein hewani yang memiliki nilai gizi tinggi, dan relatif mudah dicerna. Susu kambing memiliki kandungan protein relatif lebih tinggi yaitu mencapai 3,4% dibandingkan susu sapi yang hanya 3,2% (Park *et al.*, 2007). Susu kambing memiliki beberapa perbedaan karakteristik dari susu sapi, yaitu warna lebih putih, globula lemak susu lebih kecil, sehingga lemak susu kambing lebih mudah dicerna, dapat menghindari alergi terhadap susu sapi, intoleransi laktosa, dan penderita gangguan pencernaan (Blakely and Blade, 1991).

Kasein merupakan 80% dari protein total yang terkandung dalam susu. Sama dengan susu sapi dan susu domba, kasein susu kambing terdiri dari alpha, beta, gamma, dan kappa kasein (Lestari, 2015). Saat ini, pengetahuan tentang protein pada susu kambing semakin berkembang, seperti manfaat dari beberapa kasein dan *whey* yang telah diketahui. Penelitian Padaga dkk. (2009) tentang pangan nutrasetika dengan bahan susu menunjukkan bahwa terdapat protein spesifik pada berat molekul 36-55 kDa yang berbeda dengan susu sapi. Protein spesifik ini memiliki potensi menurunkan proses peradangan dan terbukti berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan imunomodulator (Padaga dkk., 2009).

Hasil penelitian Hidayat *et al.* (2015) menunjukkan bahwa jenis protein yang terkandung di dalam kefir susu kambing adalah laktoferin (80kDa), laktoferoksidase (70kDa),  $\alpha$ -kasein (65kDa), dan  $\beta$ -Kasein (45kDa). Laktoferin,

like-laktoferin dan peptida lainnya yang mempunyai aktivitas antimikroba dan antioksidan. Senyawa bioaktif tersebut dipengaruhi oleh panas yang dapat mendenaturasi protein, namun dengan fermentasi lebih lanjut pembentukan peptida novel akan diproduksi (Abubakar, 2014). Penelitian telah menunjukkan bahwa kasein, terutama  $\beta$ -casein,  $\alpha$ 2-casein, dan juga protein *whey* memiliki sifat antioksidan yang baik, mungkin berdasarkan kemampuan mereka untuk mengikat logam transisi dan radikal bebas (Rahmawati *and* Sunrornsuk, 2016).

Menurut Karitas dan Fatchiyah (2013) protein susu tidak selalu aktif dalam bentuk asli. Susu akan aktif dan bermanfaat jika ada aktifitas proteolitik yang mengubah protein menjadi molekul yang lebih kecil dan aktif, yaitu dengan cara fermentasi menjadi yoghurt. Metabolisme dari BAL mampu menghidrolisis kasein yang ada pada yogurt menjadi molekul protein yang lebih kecil (peptida) dan diduga mengaktifkan fungsi dari protein. Pemisahan kasein dapat dilakukan dengan menurunkan pH susu hingga mencapai 4,6 baik dengan penambahan asam maupun dengan cara fermentasi menggunakan *starter* bakteri (Lestari, 2015). Selain itu, dalam Bakteri Asam Laktat (BAL) terdapat enzim proteolitik memiliki kemampuan menghidrolisa bioaktif peptida yang terikat dalam protein prekursor, sehingga lepas dan akhirnya menghasilkan produk olahan susu dengan kandungan bioaktif peptida yang cukup tinggi. Salah satu fungsi biologis peptida bioaktif yang sudah diketahui yaitu sebagai antioksidan (Awemu *et. al.*, 2009; Exposito *et al.*, 2007).

Peptida merupakan kumpulan dari asam amino yang terikat satu sama lain melalui ikatan peptida. Peptida dengan komposisi dan urutan asam amino tertentu

yang mempunyai manfaat positif bagi kesehatan tubuh disebut sebagai peptida bioaktif. Peptida bioaktif umumnya terdiri dari 2-20 asam amino dan mempunyai sifat fungsional lebih dari satu (Miesel dan FitzGerald, 2003). Sifat fungsional dari peptida bioaktif ditentukan oleh susunan asam amino dari peptida bioaktif tersebut, contoh peptida dengan komposisi dan susunan asam amino Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys mempunyai fungsi sebagai antioksidan (Herna'ndez-Ledesma *et al.*, 2004).

Peptida dapat diproduksi dari protein, yaitu dengan cara memutus ikatan peptida dari protein tersebut, sehingga dihasilkan struktur yang lebih pendek dengan komposisi dan urutan asam amino tertentu. Terdapat dua cara yang dapat dilakukan untuk memutus ikatan peptida, yaitu hidrolisis enzim dan fermentasi. Banyak produk fermentasi terutama yang berbasis susu menggunakan kultur starter yang mempunyai daya proteolitik tinggi. Mikroba tersebut dapat memecah protein sehingga dihasilkan peptida dengan komposisi dan urutan asam amino tertentu. Pada penelitian yang dilakukan oleh Kusumaningtyas dkk. (2012) kandungan asam amino aromatik pada susu kambing cukup tinggi yaitu (dalam mg asam amino/g total asam amino) tirosin (38,2), histidine (31,1), dan fenilalanin (62). Keberadaan asam amino dengan aktivitas antioksidan tinggi seperti metionin (5,5), sistein (20,5), lisin (26,3) dan leusin (146,2) juga ikut berperan dalam peningkatan aktivitas antioksidan peptida dalam hidrolisat (Sabahelkheir *et al.*, 2012).

Susu yang difermentasi terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan susu murni (Zhang, 2011). Hasil penelitian di China



membuktikan bahwa bakteri *Lactobacillus* sp., dalam yoghurt memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, sehingga dapat memberikan manfaat dengan menyediakan antioksidan alami yang aman dan efektif bagi konsumen (Liu, 2005). Kasein yoghurt susu kambing sebagai antioksidan peptida bioaktif diduga menangkal radikal bebas dengan mekanisme menangkap atau mengikat radikal bebas tersebut, atau dapat disebut sebagai *radical scavenging* (Ahmed *et al.*, 2015). Pada penelitian yang dilakukan oleh Aprillidya dkk. (2013), Pemberian terapi kasein yogurt susu kambing dapat menurunkan kadar MDA pada hewan model hipertensi yang diinduksi DOCA-salt.

### **2.5 Hewan Model Keracunan 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)**

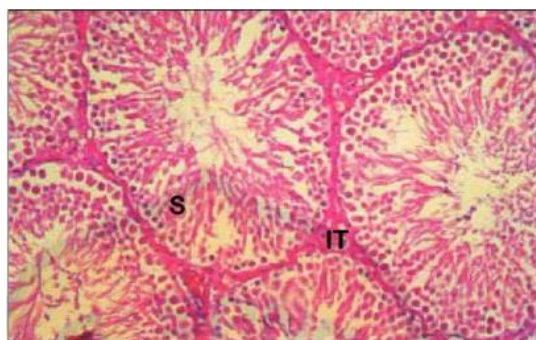
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan untuk percobaan laboratorium yang dikenal ada tiga macam strain yaitu *Sprague Dawley*, *Long Evans*, dan *Wistar*. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) digunakan dalam setiap penelitian karena memiliki keunggulan berupa asam amino, sistem metabolisme, dan organ hampir sama dengan manusia sehingga memudahkan dalam penelitian, perkembangan cepat, dan mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak (Akbar, 2010).



**Gambar 2.3** Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Suckow *et al.*, 2006)

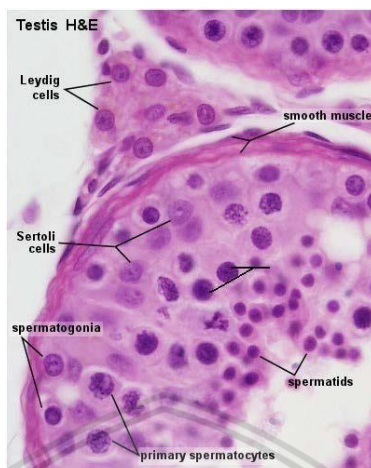
Sistem reproduksi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan terdiri atas sepasang testis yang berada didalam skrotum, sepasang kelenjar asesori dan organ kopulasi (Akbar, 2010). Testis adalah dua kelenjar seks primer yang dimiliki laki-laki. Menurut Heffner dan Schust (2006), testis memiliki dua fungsi, yaitu sebagai tempat spermatogenesis dan produksi androgen. Testis normal terdapat dalam skrotum, yang memiliki fungsi sebagai pembungkus, pelindung testis, serta mempertahankan suhu testis sekitar 1,5 sampai 2<sup>0</sup>C di bawah suhu abdomen (McPhee and Ganong, 2002).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dan mencit adalah salah satu hewan penelitian yang paling banyak digunakan dalam fisiologi reproduksi. Testis dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan terdapat pada dua kantung skrotum yang dipisahkan oleh membran tipis yang terletak antara anus dan preputium. Testis tersebut kemudian turun antara hari ke 30 sampai 40 masa hidup, dari rongga perut ke kantung skrotum melalui kanalis inguinal terbuka. Jarak dubur kelamin pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan lebih jauh daripada betina (Suckow, 2006).



**Gambar 2.4** Mikroskopis Organ Testis Tikus ( Tuncer dkk., 2011)  
Keterangan: S= Tubulus Seminiferus; IT= Jaringan Interstisial



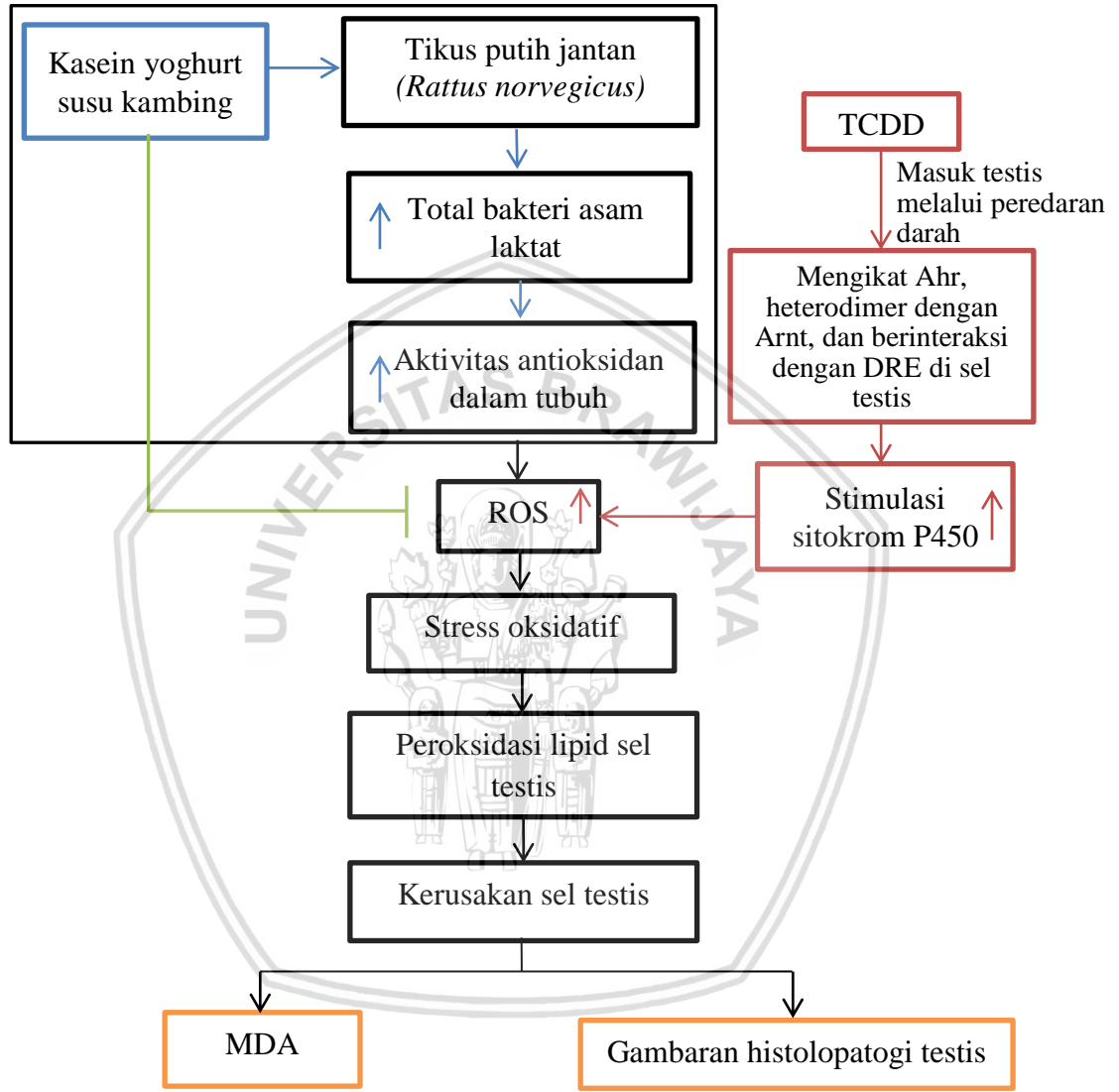


**Gambar 2.5** Histologi Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Hill, 2010)  
Keterangan: Histologi sel-sel spermatogenik mencit pada organ testis dengan pewarnaan HE

Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Ramania dkk. (2014), kelompok perlakuan mencit yang diberi vitamin E sebagai antioksidan mengalami pemulihan jumlah sel Leydig yang berkurang akibat paparan TCDD. Hal ini menunjukkan terdapat pengaruh positif dari vitamin E terhadap paparan TCDD. Pemberian Vitamin E dapat memproteksi kerusakan struktur testis karena fungsi vitamin E ( *$\alpha$ -tocopherol*) sebagai antioksidan yang dapat menghentikan reaksi berantai radikal bebas. Kemampuan vitamin E ini juga menyebabkan proses spermatogenesis di dalam tubulus seminiferus berjalan secara normal tanpa pengaruh negatif dari TCDD (Yin *et al.*, 2012). Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Wati dkk. (2014), kerusakan sel spermatogenik yang diakibatkan oleh TCDD pada mencit, dapat diperbaiki dengan menggunakan vitamin E sebagai antioksidan. Hal tersebut membuktikan bahwa antioksidan dapat mencegah kerusakan histopatologi testis hewan coba akibat dari paparan TCDD.

### BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Skema kerangka konsep

- Keterangan:
- : Pemberian kasein yoghurt susu kambing
  - : Pemberian Dioksin
  - ↓ : menyebabkan
  - ▭ : parameter yang diamati
  - ↓ : efek paparan Dioksin
  - ↓ : efek preventif yoghurt susu kambing
  - ⊥ : menghambat

Kasein yoghurt susu kambing memiliki fungsi sebagai antioksidan. Ketika kasein yoghurt susu kambing masuk ke dalam tubuh dan diserap oleh tubuh, akan mengakibatkan peningkatan total bakteri asam laktat, yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi sehingga dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dalam tubuh. Hal tersebut akan menyebabkan keseimbangan ROS di dalam tubuh.

2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD) masuk ke dalam sel dan mengikat AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) dalam sitoplasma. Kompleks ikatan AhR dan dioksin mengalami konformasi perubahan dan tertranslokasi ke nukleus. Selanjutnya, ikatan ini akan melakukan heterodimer dengan faktor transkripsi lain, yaitu Arnt. Heterodimer ini akan berinteraksi dengan *Dioxin-Responsive Enhancer Elements* (DRE) yang terletak pada permukaan gen target dan mengaktifkan berbagai faktor transkripsi pada inti sel. AhR dan Arnt dalam saluran reproduksi jantan dewasa terdeteksi di semua organ serta diekspresikan pada spermatosit. Heterodimer AhR-Arnt menghasilkan stimulasi gen sitokrom P450 dan menyebabkan peningkatan produksi sitokrom. Sitokrom P450 menghasilkan ROS yang merupakan enzim khusus hasil dari aktivitas biokimia agen toksik.

Pada kondisi tubuh sehat, ROS dan antioksidan berada dalam keseimbangan. Apabila keseimbangan ini terganggu dan bergeser dengan peningkatan ROS maka terjadi stres oksidatif. *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menyebabkan kerusakan lipid membran sel dan menginduksi peroksidasi lipid dalam sel tersebut. Peroksidasi lipid merupakan perusakan oksidatif terhadap asam lemak tak jenuh berantai panjang dan menghasilkan *malondialdehyde* (MDA) yang merupakan senyawa toksik terhadap sel dan dapat merusak membran sel testis.

Kerusakan membran sel di testis dapat mempengaruhi jumlah serta kinerja hormon LH, testosteron, dan FSH. Hal ini dapat menghambat ikatan antara LH dengan reseptor LH yang terdapat pada bagian membran sel sehingga sekresi hormon testosteron dari sel leydig tidak maksimal serta efek sinergis antara hormon testosteron dengan FSH untuk memacu perkembangan sel sertoli yang menghasilkan *androgen binding protein* (ABP) sebagai *carrier* dari hormon testosteron akan terganggu. Hal tersebut dapat mengakibatkan terhambatnya spermatid untuk berdiferensiasi menjadi spermatozoa sehingga terjadi kegagalan proses spermiogenesis dan sperma mengalami penurunan.

Peptida bioaktif susu kambing yang telah difermentasi akan menstabilkan superoksida dengan mendonorkan atom hidrogen sehingga mencegah pembentukan radikal lipid yang bersifat tidak stabil dan menghambat transfer elektron. Antioksidan mengubah radikal bebas menjadi senyawa yang tidak merusak dan memperbaiki kerusakan sel. TCDD sebagai senyawa yang reaktif tidak berikatan dengan reseptor AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*), sehingga reaksi tidak terjadi. Kasein yoghurt susu kambing yang diberikan sebelum pemberian TCDD diharapkan mampu mencegah pembentukan radikal bebas, sehingga mencegah terjadinya stress oksidatif dalam tubuh. Pencegahan stress oksidatif dalam tubuh menyebabkan ROS menurun, sehingga kerusakan sel dapat dicegah. Antioksidan akan mencegah terjadinya peroksidasi lipid dan kenaikan kadar MDA pada sel testis, sehingga mengurangi terjadinya kerusakan sel tubulus seminiferus pada testis. Hal tersebut menyebabkan kinerja hormon seimbang dan

jumlah sel spermatogenik normal, sehingga mencegah kerusakan pada gambaran histopatologi berupa kepadatan sperma dalam tubulus seminiferus.

### 3.2 Hipotesis penelitian

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

1. Pemberian kasein yoghurt susu kambing dapat mencegah kenaikan kadar *Malondialdehyde* (MDA) testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar 2,3,7,8-*tetrachlorinedibenzo-p-dioksin* (TCDD).
2. Pemberian kasein yoghurt susu kambing dapat mencegah peningkatan kerusakan histologi testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) berupa kepadatan spermatozoa dalam tubulus seminiferus yang dipapar 2,3,7,8-*tetrachlorinedibenzo-p-dioksin* (TCDD).

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei sampai dengan September 2017 di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya, Malang, untuk pembuatan yoghurt dan mendapatkan kasein; Laboratorium Biosains, Universitas Brawijaya, Malang, untuk pemeliharaan tikus serta sentrifugasi yoghurt susu kambing; Laboratorium Ilmu FAAL, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, untuk analisis kadar MDA; dan Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, untuk pembuatan histopatologi organ testis.

### 4.2 Materi Penelitian

#### 4.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *autoclave*, *Beaker glass* 100 ml, tabung *Erlenmeyer* 250 ml, tabung *Erlenmeyer* 500 ml, tabung erlenmeyer 1000 ml, gelas ukur 500ml, pipet 1 ml, pipet 5 ml, pipet 10 ml, *aluminium foil*, *waterbath*, spatula, pH meter, inkubator, karet bulb, tisu, kompor gas, botol *Schott* 1000 ml, timbangan digital, corong kaca, kertas saring, sentrifus, tabung sentrifus 50 ml, kandang plastik ukuran 41 cm x 31 cm x 27 cm, penutup kandang kawat, serbuk kayu, tempat minum hewan coba, boks pakan, hewan coba, *disposable syringe* (1 ml dan 3 ml), alat sonde, pot organ, lemari es, spektrofotometer, mikroskop cahaya *Nikon H600L* dilengkapi dengan



digital camera DS Fi2 300 megapixel, mikrotube, *vortex*, *object glass*, *cover glass*, tempat untuk *staining* dan *paraffin cassette*.

#### 4.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tikus putih (*Ratus norvegicus*) strain *Wistar*, jantan, berumur 8-12 minggu, dengan berat 150-250 gram sebanyak 24 ekor yang didapat dari Penyedia Hewan Laboratorium D'wistar, Jalan Deme Nomor 66 Gatot Subroto, Bandung, susu kambing Peranakan Etawa (PE) segar dari Surabaya Valenta Goat Milk, *starter* yoghurt (*Yógourmet Yoghurt Starter, LYO-SAN. INC 500 Aéroparc, C. P. 598, Lachute, QC. Canada, J8H 4G4*) yang mengandung bakteri *L. Bulgaricus*, *S. Thermophilus* dan *L. Acidophilus*, TCDD (2,3,7,8-TCDD Sigma 48599), air *Reverse Osmosis* (RO), pakan komersial (KSP 2, Comfeed Indonesia), *aquades*, TCA 1 %, TBA, HCL, nitrogen cair, NaCl fisiologis, minyak jagung, formaldehid 10 %, etanol 70 %, etanol 80 %, etanol 90 %, pewarna HE, dan parafin.

### 4.3 Tahapan Penelitian

#### 4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 6 kelompok yang terdiri dari kelompok normal, kelompok kontrol kasein (kasein yoghurt susu kambing dosis 600 mg/kg BB), kelompok positif (TCDD dosis 100 ng/kg BB),



kelompok perlakuan 1 (kasein yoghurt susu kambing 300 mg/kg BB dan TCDD 100 ng/kg BB), kelompok perlakuan 2 (kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kg BB dan TCDD 100 ng/kg BB) dan kelompok perlakuan 3 (kasein yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB dan TCDD 100 ng/kg BB).

**Tabel 4.1** Rancangan Penelitian

Kelompok Tikus	Perlakuan
Normal	Kelompok tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) sehat tanpa perlakuan apapun, hanya diberi pakan komersial dan air minum <i>ad libitum</i>
Kontrol Kasein	Kelompok tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang diberi kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 600 mg/kg BB per-oral selama 21 hari
Positif	Kelompok tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang dipapar TCDD dengan dosis 100 ng/kg BB per-oral selama 21 hari.
Perlakuan 1	Kelompok tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang diberi kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 300 mg/kg BB selama 21 hari dan dipapar TCDD dengan dosis 100 ng/kg BB selama 21 hari.
Perlakuan 2	Kelompok tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang diberi kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 600 mg/kg BB selama 21 hari dan dipapar TCDD dengan dosis 100 ng/kg BB selama 21 hari.
Perlakuan 3	Kelompok tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang diberi kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 900 mg/kg BB selama 21 hari dan dipapar TCDD dengan dosis 100 ng/kg BB selama 21 hari.

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus menurut Soehono (2016).

$P(n-1) \geq 20$	$P$ = jumlah kelompok (terdiri dari 6 macam perlakuan)
$6(n-1) \geq 20$	$n$ = jumlah ulangan yang dibutuhkan
$6n-6 \geq 20$	
$6n \geq 26$	
$n \geq 4$	

Berdasarkan perhitungan diatas, jumlah ulangan yang dibutuhkan adalah 4 kali ulangan, sehingga untuk 6 perlakuan dengan 4 kali ulangan dalam setiap kelompok, dibutuhkan 24 ekor hewan coba.

#### 4.3.2 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam melaksanakan penelitian ini adalah:

Variabel bebas : TCDD (dosis 100 ng/kg BB) dan kasein yoghurt susu kambing (dosis 300mg/kg BB, 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB)

Variabel tergantung : kadar MDA dan gambaran histopatologi testis

Variabel kendali : umur, jenis kelamin, berat badan, pakan, air minum, dan kondisi kandang tikus

## 4.4 Prosedur Kerja

### 4.4.1 Pembuata Kasein

#### 4.4.1.1 Pembuatan *Starter Cair (Mother Culture)*

Prosedur pembuatan *strarter cair (mother culture)* menggunakan metode Posecion *et. al.*, (2005) yang dimodifikasi. Sebanyak 70 ml susu kambing PE dipasteurisasi pada suhu 72<sup>0</sup>C selama 5 menit dengan cara 70 ml susu kambing dituang kedalam tabung Erlenmayer 250 ml, dipanaskan dalam air mendidih hingga mencapai suhu 72<sup>0</sup>C, kemudian dipindahkan dalam *waterbath* dengan suhu 72<sup>0</sup>C selama 5 menit. Susu kambing PE yang telah dipasteurisasi kemudian didinginkan hingga mencapai suhu 45<sup>0</sup>C. Tahap selanjutnya, susu kambing PE diinokulasi dengan *starter yoghurt* sebanyak 0,35 gram dan dihomogenisasi. Setelah itu, di inkubasi pada suhu 45<sup>0</sup>C selama 4 jam hingga mencapai pH 4,4 sampai 4,5. *Strarter cair (mother culture)* kemudian ditutup dengan alimunium foil untuk menghindari kontaminasi dan disimpan dalam lemari es < 4<sup>0</sup>C.

#### 4.4.1.2 Pembuatan Yoghurt

Proses pembuatan yoghurt menggunakan metode Posecion *et al.*, (2005) yang dimodifikasi. Sebanyak 480 ml susu kambing dimasukkan kedalam tabung Erlenmeyer 500 ml kemudian di pasteurisasi selama 5 menit dengan cara yang sama dengan pembuatan *strarter cair (mother culture)*. Susu kambing PE yang telah dipasteurisasi kemudian didinginkan hingga mencapai suhu 45<sup>0</sup>C. Diinokulasikan *strarter cair mother culture*)

dengan konsentrasi 3% kedalam susu kambing PE 480 ml yang telah dipasteurisasi, dan dihomogenkan. Diinkubasi pada suhu 45<sup>0</sup>C selama 2 sampai 3 jam sampai pH mencapai 4,5 sampai 5.

#### 4.4.1.3 Pemisahan Kasein Yoghurt Susu Kambing

Yoghurt susu kambing disentrifus pada kecepatan 1200 rpm selama 10 menit pada suhu 5<sup>0</sup>C dan disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan kasein dengan *water soluble extract*. Kasein yang didapat dari hasil penyaringan kemudian dilakukan *Freeze Drying* untuk menjaga kestabilan pH (Padaga, 2016).

#### 4.4.2 Persiapan Hewan Coba Dipapar 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)

##### 4.4.2.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dibagi dalam 6 kelompok perlakuan. Sebelum mendapat perlakuan, semua tikus putih (*Rattus norvegicus*) diadaptasikan dengan kondisi kandang selama 7 hari dan diberi pakan *ad-libitum* komersial berupa KSP 2 dengan komposisi: kadar air maksimal 12%; protein kasar minimal 16%; lemak kasar 3-7%; serat kasar maksimal 8%; abu maksimal 10%; kalsium 0,8-1%; fosfor 0,6-0,8%. Air minum diberikan *ad-libitum*. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dipelihara dalam kandang plastik ukuran 41x31x27 cm. dengan populasi 2 ekor/kandang dalam suatu bersuhu 25-26<sup>0</sup>C.

#### 4.4.2.2 Pemberian Kasein Yoghurt Susu Kambing

Dosis pemberian kasein yoghurt susu kambing berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Irawan dkk. (2014), yaitu sebanyak 300-900 mg/kg BB. Dosis kasein yoghurt susu kambing yang digunakan pada penelitian ini, yaitu 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB yang dilarutkan dengan air RO sebanyak 1 ml. Pemberian kasein yoghurt susu kambing dilakukan selama 21 hari per-oral setiap hari satu kali dengan sonde lambung setiap pukul 10.00 WIB. Perhitungan dosis kasein yoghurt susu kambing dapat dilihat di **Lampiran 5**.

#### 4.4.2.3 Hewan Coba Dipapar dengan 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)

Paparan TCDD menggunakan metode Wati dkk. (2014) yang dimodifikasi. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberikan TCDD dengan dosis 100ng/kg BB yang telah dilarutkan dalam minyak jagung 1 ml per-oral dengan sonde lambung setiap hari pada pukul 14.00 WIB selama 21 hari. Dosis TCDD ditentukan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Fujimaki *et al.*, (2002) dan Yin *et al.*, (2012). Perhitungan dosis TCDD dapat dilihat di **Lampiran 4**.

#### 4.4.3 Histopatologi Testis

Sebelum dilakukan pengambilan organ testis, terlebih dahulu tikus putih (*Rattus norvegicus*) dieutanasia dengan cara dislokasi leher, dibedah dengan

membuat sayatan pada bagian abdomen, testis dipotong, dan diisolasi (Sulanda dkk., 2012). Testis sebelah kiri dibungkus dengan aluminium foil, dan dicelupkan kedalam nitrogen cair selama 10 detik, kemudian disimpan dalam lemari es dengan suhu 2<sup>0</sup>C sebagai bahan untuk pengukuran kadar MDA. Testis sebelah kanan dimasukkan dalam larutan formaldehid 10% untuk pembuatan preparat histopatologi pewarnaan HE.

Pembuatan preparat histopatologi testis tikus Tikus putih (*Rattus norvegicus*) menggunakan metode dari Amin dkk. (2009) dengan menggunakan pewarnaan HE. Testis hasil pembedahan direndam dalam larutan formaldehid 10%. Pembuatan preparat histopatologi testis dilakukan secara berurutan dimulai dari fiksasi, dehidrasi, infiltrasi, *embedding*, pemotongan, penempelan pada *object glass* dan pewarnaan HE. Prosedur lebih lengkap dapat dilihat di **Lampiran 7**.

Pembacaan preparat histopatologi testis dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya *Nikon H600L* dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel. Pengambilan gambar histopatologi menggunakan kamera setelah mendapatkan gambar yang diinginkan. Pengamatan histopatologi yang diamati berupa kepadatan sel sperma pada tubulus seminiferus.

#### **4.4.4 Pengukuran Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Testis**

Prosedur pengukuran kadar MDA testis menggunakan metode Aulanni'am *et al.* (2013) yang dimodifikasi. Pengukuran kadar MDA dengan

metode TBA menggunakan organ testis yang di potong dan ditimbang sebanyak 0,1 gram, digerus, kemudian dilakukan homogenisasi dengan mensentrifus pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada  $\lambda=532$  nm. Prosedur lebih lengkap dapat dilihat di **Lampiran 6**.

#### 4.5 Analisis Statistik

Analisis data untuk kadar MDA dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan uji statistik *one way Analysis of Variance* (ANOVA) menggunakan *software* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Jika antar perlakuan berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) untuk mengetahui pengaruh terapi yoghurt susu kambing terhadap kadar MDA dengan  $\alpha= 0,05$  %. Analisis data histopatologi testis dilakukan secara deskriptif berupa kepadatan sel sperma dalam tubulus seminiferus.



## BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar *Malondyaldehyde* (MDA) Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)

Hasil penelitian pengaruh preventif kasein yoghurt susu kambing terhadap kadar MDA organ testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar TCDD menunjukkan perbedaan dari masing-masing kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ). Hasil pengujian kadar MDA dengan menggunakan analisa statistika uji *one way* ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur, tingkat kepercayaan 95% (**Lampiran 10**). Rata-rata nilai kadar MDA organ testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) masing-masing perlakuan disajikan dalam **Tabel 5.1**.

**Tabel 5.1** Nilai Kadar MDA Organ Testis Berbagai Kelompok Perlakuan

Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA (ng/mL)
Normal (A)	1680,75±40,55 <sup>a</sup>
Kontrol kasein (B)	1658,00±51,56 <sup>a</sup>
Positif TCDD 100 ng/kg BB (C)	2044,62±72,32 <sup>c</sup>
Kasein yoghurt susu kambing 300 mg/kg BB + TCDD 100 ng/kg BB (D)	1962,12±89,75 <sup>c</sup>
Kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kg BB + TCDD 100 ng/kg BB (E)	1890,87±56,39 <sup>bc</sup>
Kasein yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB + TCDD 100 ng/kg BB (F)	1772,12±94,03 <sup>ab</sup>

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

Berdasarkan **Tabel 5.1** diketahui nilai kadar MDA organ testis pada kelompok normal (A) adalah 1680,75±40,551 ng/mL. Pada tikus normal terdapat MDA disebabkan proses biokimia dalam tubuh yang menghasilkan radikal bebas. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Valko (2006), pada tubuh normal, radikal bebas terbentuk sebagai respon normal dari rantai peristiwa biokimia dalam tubuh dan MDA merupakan senyawa yang terbentuk karena ada radikal bebas.

Metabolisme aerobik pada organisme selalu diikuti dengan pembentukan radikal bebas, proses metabolisme terjadi karena zat-zat makanan yang teroksidasi dikonversi menjadi senyawa pengikat energi dengan bantuan oksigen (Khaira, 2010).

Kadar MDA organ testis kelompok kontrol kasein (B) menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ( $p>0,05$ ) terhadap tikus normal (A). Perlakuan pada kelompok kontrol kasein bertujuan untuk melihat efek kasein yoghurt susu kambing terhadap tubuh normal. Berdasarkan hasil statistik menunjukkan bahwa kasein yoghurt susu kambing pada tubuh normal tidak memberikan dampak nyata pada kadar MDA. Hal tersebut menunjukkan bahwa sebagai preventif kasein yoghurt susu kambing tidak memberikan dampak negatif pada sel normal.

Pada kelompok perlakuan positif, yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar TCDD dengan dosis 100 ng/kg BB (C), kadar MDA testis menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p<0,05$ ) dibandingkan kelompok normal (A) dan kelompok kontrol kasein (B). Hal tersebut menunjukkan bahwa paparan TCDD mengakibatkan stres oksidatif pada testis dan menyebabkan kadar MDA meningkat secara signifikan. Menurut Doi *et al.* (2013), paparan TCDD akan memicu terbentuk ROS. *Reactive Oxygen Species* (ROS) menyebabkan peroksidasi lipid, akibat dari reaksi tersebut adalah terputus rantai asam lemak dan menghasilkan senyawa toksik bagi sel, yaitu MDA (Brunner *et al.*, 2004).

Berdasarkan hasil statistik kelompok preventif kasein yoghurt susu kambing terhadap TCDD dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB menunjukkan pencegahan kenaikan kadar MDA testis dibandingkan

dengan kelompok positif TCDD (C). Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian kasein yoghurt susu kambing sebagai preventif mampu mencegah kenaikan kadar MDA testis yang disebabkan peningkatan produksi ROS akibat paparan TCDD. Peptida dari susu kambing menunjukkan aktivitas *free radical-scavenging* (menangkap radikal bebas) dan mampu menghambat peroksidasi lipid secara enzimatik maupun non enzimatik (Young 2009; Korhoen and Pihlanto, 2006). Hal tersebut sesuai dengan penelitian Rival *et al.*, (2001) yang menyatakan bahwa peptida dalam kasein mampu menangkap radikal bebas dan menghambat terjadi peroksidasi lipid.

Kadar MDA testis kelompok preventif kasein yoghurt susu kambing 300 mg/kg BB + TCDD 100ng/kg BB (D) menunjukkan perbedaan tidak nyata ( $p>0,05$ ) dibandingkan dengan rata-rata kelompok positif TCDD 100 ng/kg BB (C). Hal ini menunjukkan bahwa rata-rata kadar MDA kelompok preventif kasein yoghurt susu kambing 300 mg/kg BB (D) sama dengan rata-rata kadar MDA kelompok positif TCDD (C). Sedangkan, perbandingan rata-rata kadar MDA kelompok preventif kasein yoghurt susu kambing 300 mg/kg (D) dengan kelompok normal (A) dan kontrol kasein (B) menunjukkan perbedaan nyata ( $p<0,05$ ). Sebagai antioksidan, preventif kasein yoghurt susu kambing 300 mg/kg BB mampu mencegah kenaikan kadar MDA testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) paparan TCDD, namun belum mendekati rata-rata kadar MDA kontrol normal. Hal tersebut menunjukkan bahwa kasein yoghurt susu kambing dengan dosis 300 mg/kg BB, belum mampu menyeimbangkan kadar antioksidan dan ROS yang terbentuk dalam tubuh. Sesuai dengan pernyataan Alonso (2004),

Ketidakseimbangan antara radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS) dengan aktivitas antioksidan seperti *free radical-scavenging activity*, dapat menyebabkan stres oksidatif dan peroksidasi lipid sehingga menghasilkan senyawa MDA.

Kadar MDA kelompok preventif kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kg BB + TCDD 100 ng/kg BB (E) menunjukkan perbedaan tidak nyata ( $p>0.05$ ) dibandingkan dengan kelompok positif TCDD 100 ng/kg BB (C) dan kelompok kelompok preventif kasein yoghurt susu kambing 300 mg/kg BB + TCDD 100ng/kg BB (D). Sedangkan, perbandingan rata-rata kadar MDA antara kelompok preventif kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kg BB + TCDD 100 ng/kg BB (E) dengan kelompok normal (A) dan kelompok kontrol kasein (B) menunjukkan perbedaan nyata ( $p<0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa preventif kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kg BB mampu mencegah kenaikan rata-rata kadar MDA testis paparan TCDD, namun berdasarkan hasil statistika kemampuan preventif kasein yoghurt susu kambing dosis 600 mg/kg BB memiliki efek preventif yang sama dengan pemberian dosis 300 mg/kg BB dan belum mendekati kadar normal MDA testis.

Kadar MDA kelompok preventif yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB+TCDD 100 ng/kg BB (F) menunjukkan perbedaan nyata ( $p<0.05$ ) dibandingkan dengan kelompok positif TCDD (C) namun menunjukkan perbedaan tidak nyata ( $p>0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok preventif kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kg BB (E). Hal tersebut menunjukkan bahwa kelompok kelompok preventif yoghurt susu kambing 600 mg/kg BB (E) dan

kelompok kelompok preventif yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB (F) memiliki efek preventif yang sama, namun pada kelompok perlakuan kelompok preventif yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB (F) memiliki perbedaan tidak nyata ( $p>0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok normal (A) dan kelompok kontrol kasein (B). Hal ini menunjukkan bahwa preventif kasein yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB mampu mencegah kenaikan rata-rata kadar MDA testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) paparan TCDD dan nilai rata-rata MDA tidak berbeda nyata dengan kontrol normal (A).

Pada kelompok perlakuan preventif kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kg BB (E) dan kelompok perlakuan preventif kasein yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB (F), kedua perlakuan memiliki efek sama terhadap paparan TCDD (D), namun kelompok perlakuan preventif kasein yoghurt susu kambing dosis 900 mg/kg BB (F) memiliki perbedaan tidak nyata dengan kelompok normal (A) dan kelompok kontrol kasein (B), sehingga dosis 900 mg/kg BB merupakan kelompok dengan dosis terapi yang terbaik dalam mencegah kenaikan kadar MDA testis terhadap paparan TCDD. Menurut El Samh (2013), terdapat hubungan linear antara aktivitas antioksidan *free radical-scavenging activity* dengan kandungan antioksidan. Semakin tinggi kadar antioksidannya, semakin meningkat aktivitas antioksidannya.

Mekanisme penghambatan radikal bebas kasein yoghurt susu kambing adalah dengan menghambat proses oksidasi radikal bebas. Peptida bioaktif yang terdapat dalam kasein yoghurt susu kambing mampu menstabilkan radikal superoksida. Peptida bioaktif susu kambing yang telah difermentasi akan

menstabilkan superoksida dengan mendonorkan atom H. Radikal superoksida yang telah ditangkap oleh peptida bioaktif kasein yoghurt susu kambing akan mencegah pembentukan radikal lipid yang bersifat tidak stabil dan menghambat transfer elektron molekul oksigen pada radikal peroksil serta mencegah radikal bebas bereaksi dengan oksigen dan menghasilkan MDA (Kullisaar *et al.*, 2003 dan Liu *et al.*, 2005).

## **5.2 Efek Preventif Kasein Yoghurt Susu Kambing Terhadap Histopatologi Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-*p*-dioksin (TCDD)**

Hasil penelitian preventif kasein yoghurt susu kambing terhadap gambaran histopatologi organ testis dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) disajikan pada **Gambar 5.1.** gambaran histopatologi organ testis pada masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan kepadatan sel spermatozoa pada bagian tubulus seminiferus testis kanan.

Hasil penelitian pada kelompok normal (**Gambar 5.1 A**) menunjukkan sel spermatozoa pada tubulus seminiferus dengan kepadatan tinggi. Sesuai dengan pernyataan Sukmaningsih (2009), histologis tubulus seminiferus yang normal akan menunjukkan sel spermatogenik tersusun berlapis sesuai dengan tingkat perkembangan lamina basalis menuju ke arah lumen tubulus seminiferus yaitu spermatogonium, spermatosit, spermatid, serta lumen terisi penuh dengan spermatozoa.

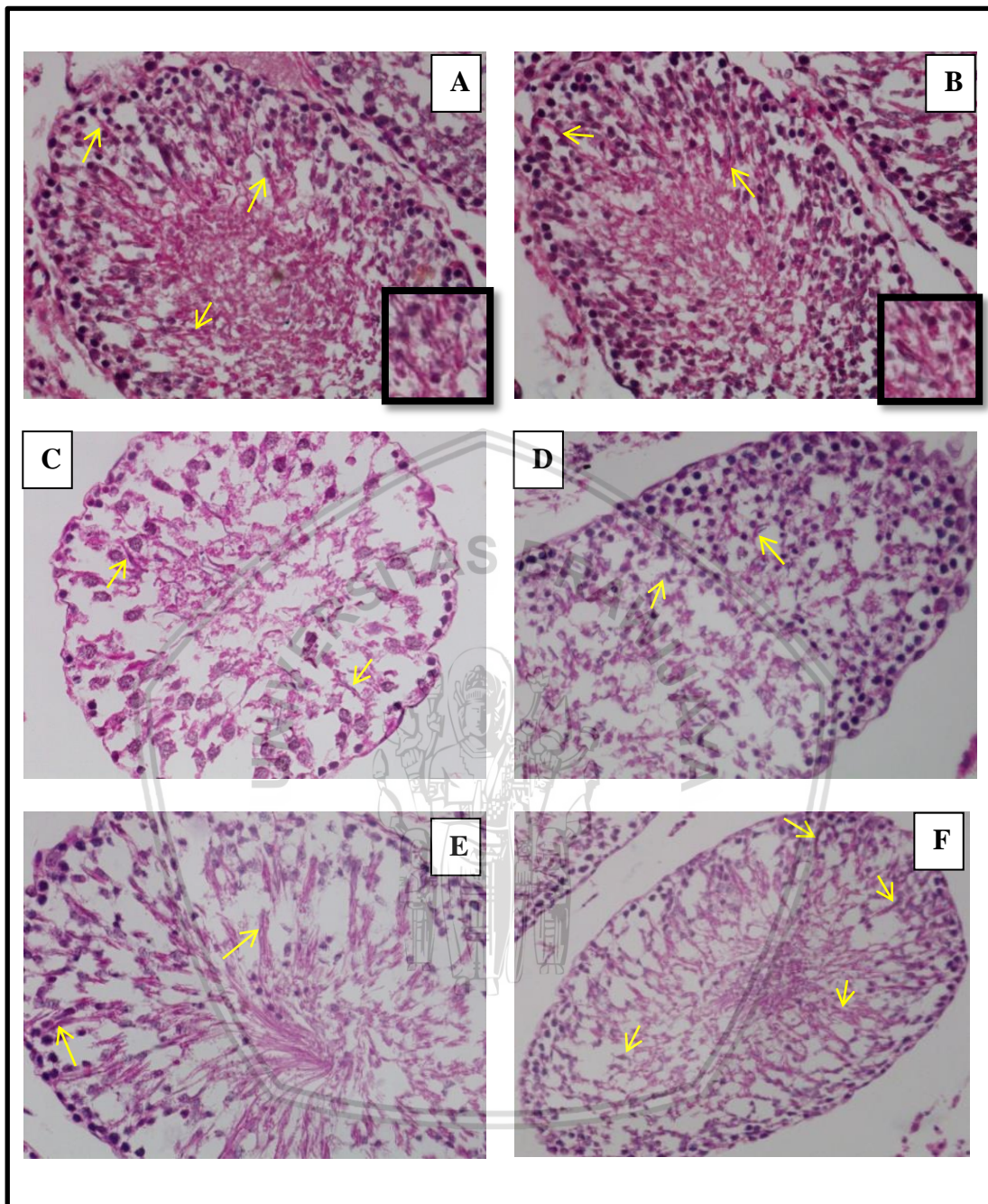
Pada kelompok kontrol kasein (**Gambar 5.1 B**), lumen terisi penuh dengan spermatozoa dan gambaran histopatologi terlihat menyerupai kelompok normal. Pada kelompok positif TCDD (**Gambar 5.1 C**), tidak dijumpai spermatozoa pada



lumen tubulus, hanya terdapat sedikit spermatosit pada bagian basal. Hal ini sesuai pendapat Dirican dan Kalender (2012) yang berhasil membuktikan TCDD mampu meningkatkan abnormalitas pada proses spermatositogenesis dan spermiogenesis. Perbedaan penampang melintang tubulus seminiferus dapat dilihat dari jumlah sel spermatogenik serta kepadatan sel yang menyusun tubulus seminiferus. Pada kontrol negatif (**Gambar 5.1 A**), sel spermatogenik tersusun rapi dengan kepadatan sel yang tinggi, sedangkan pada kontrol positif letak sel spermatogenik tidak beraturan dengan kepadatan sel yang rendah. Menurut Sukmaningsih (2009), susunan sel spermatogenik tubulus seminiferus testis yang renggang dapat disebabkan oleh kerusakan sel-sel spermatogenik yang selanjutnya akan berdegenerasi dan difagositosis oleh sel-sel sertoli. Kurang penuh spermatozoa dalam lumen tubulus seminiferus disebabkan gangguan spermiogenesis, sehingga spermatid terhambat untuk berdiferensiasi menjadi spermatozoa.

Menurut Wati dkk. (2014), abnormalitas spermatogenesis dapat dilihat dari jumlah spermatogenik penyusun tubulus seminiferus yang berubah, berkurang atau mengalami perkembangan yang terhenti pada salah satu tahapan dan ada kemungkinan untuk terjadi pelepasan perlekatan sel germinalis. Pemberian TCDD diduga menyebabkan efek samping berupa infertilitas, karena menyebabkan gangguan proses spermatogenesis yang selanjutnya akan berdampak pada penurunan jumlah sel spermatogenik.





**Gambar 5.1** Perubahan Gambaran Histopatologi Testis Setiap Perlakuan Perbesaran 400x.

Keterangan: (A) kontrol normal, (B) kontrol kasein, (C) positif TCDD, (D) preventif kasein yoghurt susu kambing dosis 300 mg/kg BB, (E) preventif kasein yoghurt susu kambing dosis 600 mg/kg BB, (F) preventif kasein yoghurt susu kambing dosis 900 mg/kg BB. (↑) tanda panah menunjukkan sel spermatozoa pada perifer maupun lumen tubulus seminiferus.

Kelompok TCDD dengan preventif kasein yoghurt susu kambing 300 mg/kg BB (**Gambar 5.1 D**) menunjukkan perbaikan dengan sel spermatozoa yang mulai terdapat pada lumen tubulus, namun tidak terlalu banyak dan tidak padat memenuhi lumen. Spermatisit dan spermatid tampak menyusun bagian lumen. Kelompok preventif kasein yoghurt susu kambing 600 mg/kg BB mengalami perbaikan yang ditunjukkan dengan kepadatan sel spermatozoa yang terdapat pada lumen dan mulai memadati kembali lumen tubulus. Pada kelompok preventif kasein yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB, lumen tubulus dipadati dengan sel spermatozoa dan mendekati normal. Dosis kasein yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB memberikan gambaran histopatologi yang lebih baik dibandingkan dengan dosis 300 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB, serta paling mendekati gambaran histopatologi pada kelompok normal.

Kerusakan sel spermatozoa pada testis di setiap perlakuan berbanding terbalik dengan kadar MDA. Kadar MDA tinggi menunjukkan kepadatan spermatozoa yang rendah, kadar MDA rendah menunjukkan kepadatan sperma yang tinggi. Malondialdehid (MDA) adalah salah satu marker radikal bebas dalam tubuh. Malondialdehid (MDA) terbentuk dari peroksidasi lipid (*lipid peroxidation*) pada membran sel, yaitu reaksi antara radikal bebas (radikal hidroksi) dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA). Peroksidasi lipid didalam tubuh terjadi sebagai respon dari peningkatan stres oksidatif. Akibat dari radikal bebas dalam jumlah besar tersebut antara lain gangguan produksi DNA, lapisan lipid pada dinding sel, pembuluh darah, kerusakan sel dan mengurangi kemampuan sel untuk beradaptasi terhadap lingkungannya (Arief, 2012). Menurut

Sharma *et al.*, (2003) MDA dapat merusak sel karena produk tersebut mampu menaikkan permeabilitas vaskular, kemotaksis leukosit, dan mengubah sintesis prostaglandin serta pelepasan histamin.

Susu kambing dan produk olahannya mengandung berbagai senyawa bioaktif yang konsentrasi dapat ditingkatkan melalui fermentasi. Beberapa senyawa bioaktif dapat mengurangi kerusakan DNA, terutama disebabkan oleh adanya radikal bebas (Abubakar, 2014). Laktoferin yang terdapat pada susu kambing juga berperan dalam mencegah kerusakan sel. Mekanisme laktoferin sebagai antioksidan adalah dengan menangkal ion besi. Laktoferin memiliki kemampuan mengikat membran sel, meningkatkan kemampuannya mencegah peroksidasi lipid (Konishi *et al.*, 2006; Larkins, 2005).

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode hitungan cawan DPPH (*Diphenylpicrylhydrazyl*). Hasil yang diperoleh menunjukkan aktivitas antioksidan kasein yoghurt susu kambing adalah sebesar 4,52 µg/ml. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC<sub>50</sub> < 50 µg/ml; kuat jika nilai IC<sub>50</sub> 50-100 µg/ml; sedang jika IC<sub>50</sub> 250-500 µg/ml; lemah jika nilai IC<sub>50</sub> > 500 µg/ml; (Dewi, 2016). Sehingga, hasil aktivitas antioksidan 4,52 µg/ml dapat dikatakan kasein yoghurt susu kambing memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat.

Pada testis TCDD mengganggu aktivitas endokrin dimediasi oleh reseptor *Aryl Hydrocarbon Receptor* (AhR). Sistem AhR memiliki beberapa karakter yang menarik salah satunya dapat mengikat *androgen receptor* (AR) dan *androgen binding protein* (ABP) (Kakeyama and Tohyama, 2003). Pengikatan terhadap AR

dan ABP akan mengganggu mekanisme transportasi testosteron ke dalam tubulus seminiferus. Gangguan terhadap transportasi testosteron ke dalam tubulus seminiferus akan mengganggu proses spermatogenesis dengan berkurangnya jumlah sel spermatogenik (Wati dkk., 2014). Efek toksik TCDD dalam sistem reproduksi laki-laki menyebabkan ukuran testis berkurang, kelenjar prostat dan vesikula seminalis berkurang, mengurangi jumlah sperma, serta peningkatan jumlah sperma abnormal (Latchoumycandane *et al.*, 2003).





## BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

1. Pemberian preventif kasein yoghurt susu kambing dapat mencegah kenaikan kadar MDA organ testis yang dipapar TCDD. Dosis 900 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam mencegah kenaikan kadar MDA dibandingkan dosis 300 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB.
2. Pemberian preventif kasein yoghurt susu kambing dapat mencegah pengurangan kepadatan spermatozoa pada tubulus seminiferus organ testis. Dosis 900 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam mencegah pengurangan kepadatan spermatozoa organ testis dibandingkan dosis 300mg/kg BB dan 600 mg/kg BB.

### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas antioksidan kasein yoghurt susu kambing terhadap kualitas dan kuantitas spermatozoa, serta efek preventif kasein yoghurt susu kambing terhadap TCDD pada testis dengan dosis yang lebih tinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, Amhar. 2014. Kandungan Komponen Bioaktif Dalam Protein Susu, Hubungannya Dengan Kesehatan. Pidato Pengukuhan Dalam Jabatan Guru Besar Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala Darussalam Banda Aceh
- Adekunte A.O., Tiwari B.K., O'Donnell C.P. 2010. Exposure Assessment of Dioxins and Dioxin-Like PCBs in Pasteurised Bovine Milk Using Probabilistic Modeling. *Chemosphere*. 81:509-516.
- Akbar, B. 2010. Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Anti Fertilitas. Adabia Press., Jakarta. 4-5
- Aliaga, I.L., M. J. M. Alferes., M. Barrionuevo., T. Nestares., M.R.S. Sampelayo and M.S. Campos. 2003. Study of Nutritive Utilization of Protein and Magnesium in Rats with Resection FF the Distal Small Intestine. Beneficial Effect Of Goat Milk. *J. Dairy Science*, 86: 2968-2966
- Alonso, Gracia. 2004. Evaluation of the Antioxidant Properties of Fruits. *Food Chem* 84: 13-18.
- Aprillidya, Baend S. 2013. Pengaruh Terapi Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipertensi Induksi *Deoxycorticosterone Acetate* (DOCA)-Salt [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya
- Arief S. 2012. Radikal Bebas. *J Pediatr Unair*, 1:1-9.
- Aulanni'am, Vivi S., dan Chanif M. 2013. Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum prismaticum*) Terhadap Kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan Gambaran Histologi Jaringan Ginjal Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1. *Kimia Student Journal*, vol 1, no. 1, pp. 119-125
- Awemu, E. M. I., J. R. Liu, and X. Zhao. 2009. Bioactive Components in Yoghurt Products. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products Text Book*. 235-250.
- Bencko V. 2003. Risk Assessment and Human Exposure to Endocrine Disrupters. In: Jedrychowski WA, Petera FP, Maugeri U (Editors.), *Molecular Epidemiology in Preventive Medicine*. International Center for Studies and Research in Biomedicine in Luxemburg. p. 315-327.
- Birnbaum LS, Cummings AM. 2002. Dioxins and Endometriosis: A Plausible Hypothesis. *Environ Health Perspect* 110(1):15-21.
- Birnbaum, L. S. 1995. Developmental Effects of Dioxins. *Environ Health Perspect* Volume 103 (Suppl 7): 89-94.
- Blakely J, Bade DH. 1991. Ilmu Peternakan. Terjemahan: B. Srigandono.
- Brunner, H., J.R Cockcroft, J. Deanfield, A. Donald, E. Ferrannini, J. Halcox, W. Kiowski, T.F Luscher, G. Mancina and A. Natali. 2004. Endothelial Function and Dysfunction. Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*, 23, 233-246.





- Chang, H.J., J.S. Park, E.K. Lee, M.H. Kim, M.K. Baek, H.R. Kim, H.G. Jeong, S.Y. Choi and Y.D. Jung. 2009. Ascorbic Acid Suppresses the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced CYP1A1 Expression in Human HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* 23: 622–626
- Connel dan Miller. 1995. *Kimia dan Etoksikologi Pencemaran*, diterjemahkan oleh Koestoer. Indonesia University Press, Jakarta. hal. 419
- Creasy, D., Bube, A., Rijk, E. D., Kandori, H., Kuwahara, M. and Masson. 2012. Proliferative and Nonproliferative of the Rat and Mouse Male Reproductive System. *Toxicologic Pathology* 40 (40S-1218), 438-478
- De Vries JM, Kwakkel RP, Kijlstra A. 2006. Dioxins in Organic Eggs: A Review. *NJAS*. 54:207-221.
- Doi, H., T. Baba, C. Tohyama and K. Nohara. 2003. Functional Activation of Arylhydrocarbon receptor (Ahr) in Primary T-cell by 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin.
- Dobrzyński, M., I. Całkosiński, I. Przywitowska, J.K. Brzoza, A.C. Waszkiewicz, E. Sołtan and O. Parulska. 2009. Effects of Dioxins in Environmental Pollution on Development
- Dirican, E.K., Y. Kalender. 2012. Dichlorvos-Induced Testicular Toxicity in Male Rats and the Protective Role of Vitamins C and E. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64: 821–830
- Droge, W. 2002, Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiologi Review* 82.: 47-95.
- Durand B, Dufour B, Vindel E, Fraisse D. 2000. A Survey of PCDD and PCDF in French Long-life Half-skimmed Drinking Milk. *Chemosphere* 41:865-869
- El Samh, M. Mehriz Abou. 2013. Properties and Antioxidant Activity of Probiotic Yoghurt Flavored with Black Carrot, Pumpkin and Strawberry. *International Journal of Dairy Science*, 8 (2): 48-57.
- EPA, 1997. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment
- EPA, 2000a. Information Sheet 1: Dioxin: Summary of the Dioxin Reassessment Science.
- [EU SCF] EU Scientific Committee on Food. 2001. European Commission, Scientific Committee on Food, Brussels, Belgium. Opinion on the Risk Assessment of Dioxins and Dioxin-like PCBs in food. [http://www.europa.eu.int/comm/food /fs/sc/scf/out78.en.pdf](http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out78.en.pdf) [22 November 2017].
- Exposito, I. L., A. Quiros, L. Amigo, and I. Recio. 2007. Casein Hydrolysates as a Source of Antimicrobial, Antioxidant and Antihypertensive Peptides. *INRA, EDP Science*. 87 : 241-249.
- Fielder H. 2007. National PCDD/PCDF Release Inventories Under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. *Chemosphere* 67:S96-S108.

- Fujimaki, H.K. Nohara and T. Kobayashi. 2002. Effect of a Single Oral Dose of 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin on Immune Function In Male NC/Nga Mice. *Toxicology Science* 66(1) : 117-124
- Heffner. L. J., and Schust, D. J. 2006. *At a Glance Sistem Reproduksi*. Erlangga, Jakarta pp. 26,28,30,38
- Herna'ndez-Ledesma, Amigo B., Ramos L.M., and Recio I. 2004. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity in Commercial Fermented Products. Formation of Peptides Under Simulated Gastrointestinal Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1504-1510
- Hill M. 2010. Spermatogenesis. *Acknowledgements*. [http://embryology.med.unsw.edu.au/Notes/week1\\_3b.htm](http://embryology.med.unsw.edu.au/Notes/week1_3b.htm) [8 sept 2017].
- Johnsen SG, 1970. Testicular Biopsy Score Count--A Method For Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Hormones* 1(1):2-25
- Takeyama, M. and C. Tohyama. 2003. Developmental Neurotoxicity of Dioxin and its Related Compounds. *Industrial Health* 41 : 215–230
- Khaira, Kuntum. 2010. Menangkal Radikal Bebas dengan Antioksidan. *Jurnal Sainstek*, Vol. II No.2: 183-187
- Kijlstra A. 2004. The Role of Organic and Free Poultry Production Systems on the Dioxin Levels in Eggs. *Proceedings of the 3rd SAFO Workshop, Falenty*. Reading (UK): University of Reading. p. 83-90.
- Kim, W., Hwang, S., Lee, H., Song, H., Kim, S. 1999. Panax Ginseng Protects The Testis Against 2, 3, 7; 8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin Induced Testicular Damage in Guinea Pigs. *BJU Int.* 83: 842–849.
- Kimbrough, R.D. 1998. Selected Other Effects and TEF. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen* 17: 265-273.
- Konishi M, Iwasa M. Yamauchi K. Sugimoto R, Fujita N, Kobayashi Y, Watanabe S, Teragouchi S, Adachi Y, Kaito M. 2006. Lactoferrin Inhibits Lipid Peroxidation in Patient With Chronic Hepatitis C. *Hepatology Res* 36: 27-32
- Korhonen, H and A. Pihlanto. 2006. Bioactive Peptides: Production and Functionality. *International Dairy Journal*, 16: 945–960.
- Kusumaningtyas, Eni, Raphaella W., Dewantari H., dan Suhartono M. T. 2015. Aktivitas Antibakteri Dan Antioksidan Hasil Hidrolisis Protein Susu Kambing Dengan Ekstrak Kasar Bromelin. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* Vol. 26: 179-188
- Larkin N. 2005. Potensial Implications of Lactoferrin As Therapeutic Agent. *Am J Vet Res.* 66: 739-742.
- Lestari, Diana. 2015. Protein dan Peptida Susu Kambing Serta Potensinya Sebagai Antibakteri [Skripsi]. Sekolah Pascasarjana Program Studi Ilmu Pangan. Institut Pertanian Bogor

- Licata PD, Trombetta, Cristani M, Giofrè F, Martino D, Calò M, Naccari F. 2004. Levels of Toxic and Essential Metals in Samples of Bovine Milk From Various Dairy Farms in Calabria, Italy. *Environ Int* 30:1-6.
- Liem AK, Furst P, Rappe C. 2000. Exposure of Populations to Dioxins and Related Compounds. *Food Addit Contam* 17:241-259.
- Liu, Je-Ruei, *et al.* 2005. Antioxidative Activities of Kefir. *Asian-Aust J Anim Sci*. Vol 18, No 4: 567-573.
- Latchoumycandane, C., Chitra, K.C., Mathur, P.P. 2003. 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-Pdioxin (TCDD) Induces Oxidative Stress in the Epididymis and Epididymal Sperm of Adult Rats. *Arch Topical*. 77: 280–284.
- Matsuzaki S., Szweda P.A., Szweda L.I., Humphries K.M. 2009. Regulated Production of Free Radicals by the Mitochondrial Electron Transport Chain: Cardiac Ischemic Preconditioning. *Adv Drug Deliv Rev*. 61(14):1324–31.
- McPhee, S. J., and Ganong W. F. 2002. Pathophysiology of Disease: An Introduction To Clinical Medicine, 5th ed, diterjemahkan oleh Brahm U. P., Jakarta: penerbit buku kedokteran EGC. hal 680-695
- Miesel H. dan FitzGerald R. J. 2003. Biofunctional Peptides From Milk Proteins: Mineral Binding and Cytomodulatory Effects. *Current Pharmaceutical Design* 9: 1289-1295
- Mohanty, D. P., S. Mohapatra, S. Misra, and P. S. Sahu. 2015. Milk Derived Bioactive Peptides and Their Impact on Human Health—A Review. *Studi Journal of Biological Sciences*, 1-7.
- Padaga, M.C., Sawitri M.E., dan Muwarni S. 2009. Potensi Protein Spesifik Susu Kambing Sebagai Immunomodulator dan Immunogen: Upaya Pengembangan Pangan Nutrasetika: Laporan Penelitian.
- Parzefall W. 2002. Risk Assessment of Dioxins Contamination in Human Food. *Food Chem Toxicol* 40:1185-1189.
- Rahmawati, I. S., and Sunroksuk, W. 2016. Effects of Fermentation and Storage on Bioactive Activities in Milk and Yoghurts. *Procedia Chemistry* 18 : 53-62.
- Ramania, Nuril L., Ajik A., Wurlina. 2014. Pengaruh Pemberian Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) terhadap Jumlah Hitung Sel Leydig pada Mencit yang dipapar 2,3,7,8 – tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya
- Rier SE. 2002. The Potential Role of Exposure to Environmental Toxicants in the Pathophysiology of Endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 955:201-12; discussion 30-2, 396-406.
- Rini, D. S. 2002. Minimasi Limbah dalam Industri Pulp & Paper. Gresik: Ecological Observation And Welland Conservation
- Sabahelkheir M.K., Fat en M.M., and Hassan A.A. 2012. Amino Acid Composition of Human and Animal's Milk (Camel, Cow Sheep and Goat). *ARPN J Sci Technol*, 2: 32-34

- Safe, S. 1998. Limitation of the Total Equivalency Factor Approach for Risk Assessment of the TCDD and Related Compound. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* 17: 285-304.
- Schmid P, Gujer, Zennegg M, Studer C. 2003. Temporal and Local Trends of PCDD/F Concentrations in Cows Milk in Switzerland. *Chemosphere* 53:129-136.
- Schwarz M, Appel KE. 2005. Carcinogenic Risks of Dioxin: Mechanistic Considerations. *Regul Toxicol Pharmacol* 43:19-34.
- Shah, N., Caballero, B., Trugo, L C., and Finlas, P.M. 2003. Yogurt: The Product and its Manufacture. *In Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition Academic Press: New York, U.S.A.* pp 6252-6259.
- Sharma, A., S. Bansal, and R.K. Nagpal. 2003. Lipid Peroksidation in Bronchial Asthma. *Indian Journal of Pediatrics* 70(9): 715-717.
- Suckow, M. A., Steven H. W., Craig L. F. 2006. The Laboratory Rat Second Edition. USA: American College of Laboratory Animal Medicine Series
- Sukmaningsih AA. 2009. Penurunan Jumlah Spermatisit Pakiten dan Spermatisid Tubulus Seminiferus Testis pada Mencit (*Mus musculus*) Yang Dipaparkan Asap Rokok. *Jurnal Biologi.* XIII. (2):31-35.
- Tsutsumi TT, Yanagi, Nakamura M, Kono Y, Uchibe H, Iida T, Hori T, Nakagawa R, Tobiishi K, Matsuda R, K. Sasaki K, Toyoda MM. 2001. Update Of Daily Intake of PCDDs, PCDFs, and Dioxins-Like Pcb's From Food in Japan. *Chemosphere* 45:1129-1137.
- Tuncer, I., Sunar, F., Toy, H., Baltaci, A. K., Mogulkoc, R. 2011. Histological Effect of Zinc and Melantonin on Rat Testes. *Bratisl lek listi*, 112(8): 425-427
- Valko, M. 2006. Free Radical, Metal and Antioxidant in Oxidative Stress Induced Cancer. *J. Chem-Biol, Rusia*, edisi 160, p.1-40
- Van Larebeke N, Hens L, Schepens P, Covaci A, Bayens J, Everaert K, Bernheim, JL, Vlietinck R, De Poorter G. 2001. The Belgian PCB and Dioxin Incident of January– June 1999: Exposure Data And Potential Impact On Health. *Environ Health Perspect* 109:265-273.
- Wakiefield, 2008. Public Policy and Retirement Saving Incentives in the United Kingdom. MIT Press (with Woojin Chung, Richard Disney and Carl Emmerson)
- Wang IC, Wu YL, Lin LF, Chang-Chien GP. 2009. Human Dietary Exposure to Polychlorinated Dibenzo-P-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans in Taiwan. *J Hazard Mater*, 164:621-626.
- Warlina, Lina, Erliza Noor, Akhmad Fauzi, Rudy C. Tarumingkeng dan Surjono H. Sutjahjo. 2008. Kebijakan Manajemen Lingkungan untuk Emisi Dioksi/Furan yang Bersumber dari Industri Logam. Bogor: *Jurnal Organisasi dan Manajemen*, Volume 4, Nomor 2
- Wati, Waode Karmila, Wurlina, Sarmanu. 2014. Potensi Vitamin E Terhadap Jumlah Sel Spermatogenik pada Mencit yang Terpapar 2,3,7,8-



- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Surabaya: *Jurnal Veterinaria Medika*, vol 7 no 3
- Wahdaningsih, Sri, E. P. Setyowati, S. Wahyuno. 2011. Aktivitas Penangkap Radikal Bebas dari Batang Pakis (*Alsophila glauca* J. Sm). Pontianak: *Majalah Obat Tradisional*, 16(3), 156-160
- Wulansari D, Chairul. 2011. Penapisan Aktivitas Antioksidan dan Beberapa Tumbuhan Obat Indonesia Menggunakan Radikal 2, 2-Diphenyl-1 Picrylhydrazyl ( Dpph ) Antioxidant Screening Activity of Several Indonesian Medicinal. *Majalah Obat Tradisional* 16(1):22–5.
- Yin, H.P., J.P. Xu, X.Q Zhou, and Y. Wang. 2012. Effects of Vitamin E on Reproductive Hormones and Testis Structure in Chronic Dioxin-Treated Mice. *Toxicology and Industrial*
- Yoshida, R., and Y. Ogawa. 2000. Oxidative Stress Induced by 2,3,7,8-TCDD: An Application of Oxidative Stress Markers to Cancer Risk Assessment of Dioxins. *Indust. Health. Journal*. 38: 5-14.
- Young, W.P. 2009. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Wiley-Blackwel. Iowa.
- Yunus, Moch. 2001. Pengaruh Antioksidan Vitamin C Terhadap MDA Eritrosit Tikus Wistar Akibat Latihan Anaerobik. *Jurnal Pendidikan Jasmani*, (1): 9-16.
- Zhang, S, *et al.* 2011. Antioxidative Activity Of Lactic Acid Bacteria In Yogurt. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5(29): 5194-5201.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 710-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 : PEMANFAATAN NUTRASETIKA ALAMI BERBASIS  
BIOAKTIF ANTIOKSIDAN PEPTIDE KASEIN YOGHURT  
SUSU KAMBING UNTUK PENANGANAN KERACUNAN  
DIOKSIDIN PADA TIKUS JANTAN (*Rattus norvegicus*)**

**PENELITI : AJENG ERIKA PRIHASTUTI HASKITO  
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**DINYATAKAN : LAIK ETIK**

Malang, 8 Maret 2017  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



**Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.**  
NIP. 19600903 198802 2 001



**Lampiran 2.** Surat Pernyataan Penelitian Payung

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Malinda Irawan

NIM :145130100111036

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Fakultas : Kedokteran Hewan

Universitas : Brawijaya

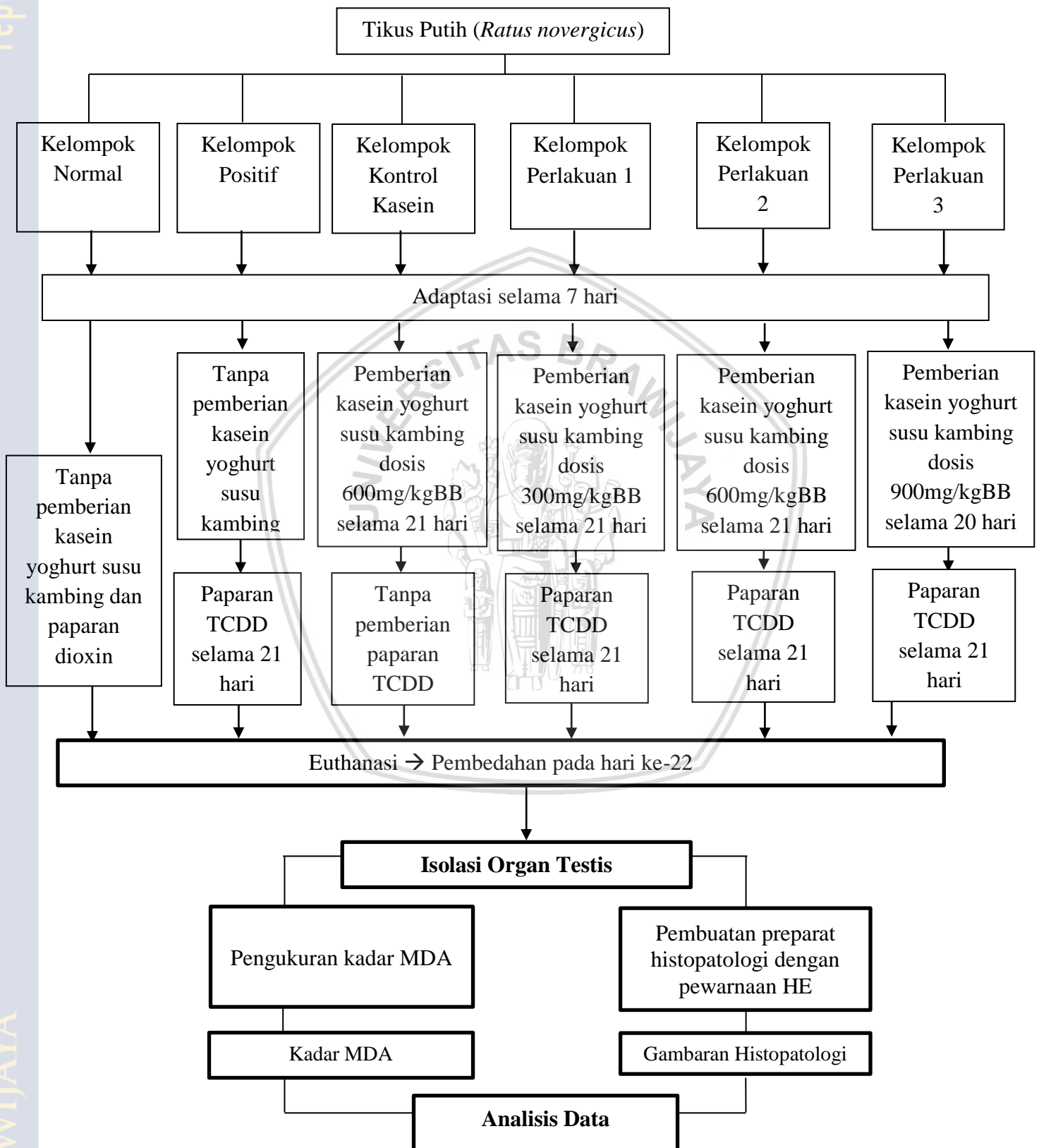
Menyatakan bahwa penelitian saya yang berjudul “Efek Preventif Kasein Yoghurt Susu Kambing terhadap Kadar *Malondyaldehyde* (MDA) dan Gambaran Histopatologi Testis Tikus putih (*Ratus norvegicus*) yang Dipapar 2,3,7,8-*tetrachlorinedibenzo-p-dioksin* (TCDD)” merupakan bagian dari penelitian yang berjudul “Pemanfaatan Nurasetika Alami berbasis Bioaktif Antioksidan Peptida Kasein Yoghurt Susu Kambing Untuk Penanganan Keracunan Dioksin”. Untuk itu kepemilikan dan hak publikasi menjadi hak milik dri peneliti utama Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS.

Malang, 18 Oktober 2017

Yang membuat pernyataan

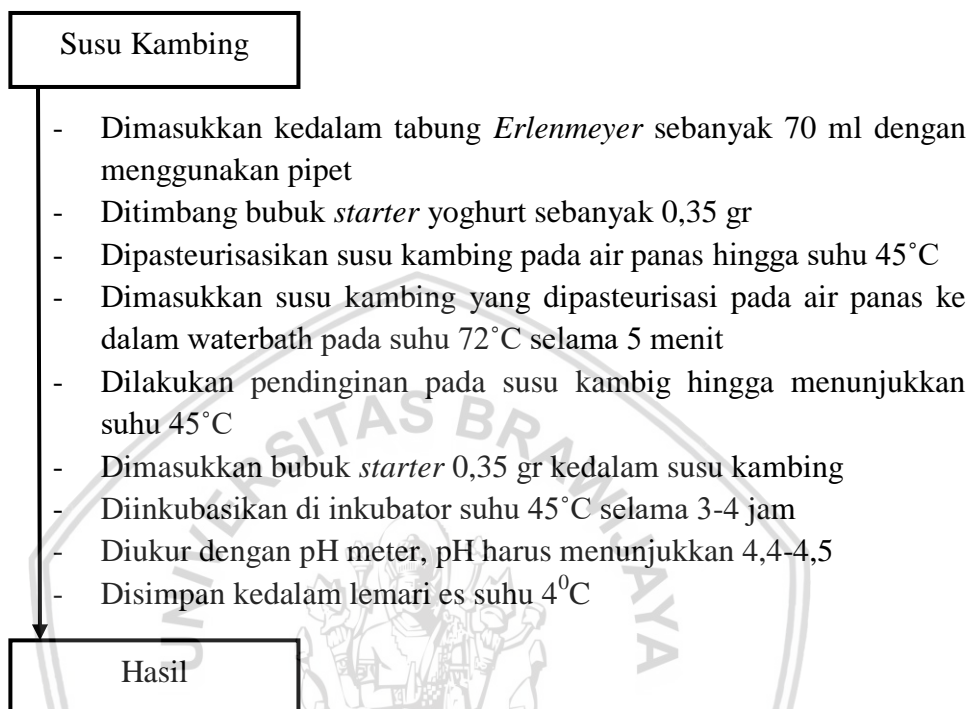
**Malinda Irawan**  
NIM. 145130100111036

### Lampiran 3. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian

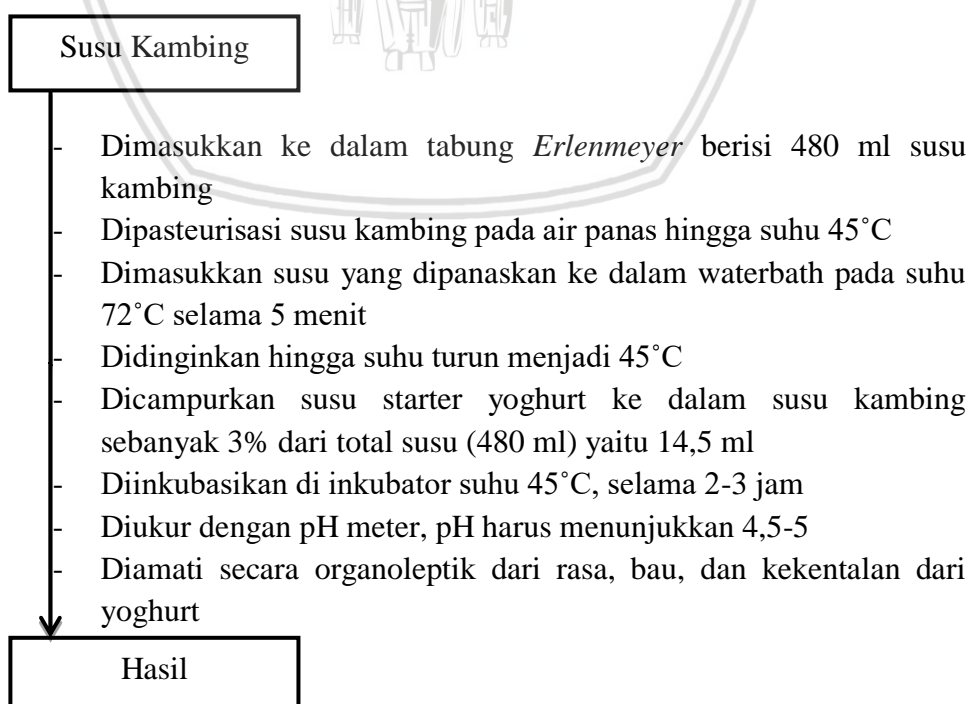


## Lampiran 4. Pembuatan Yoghurt Susu Kambing

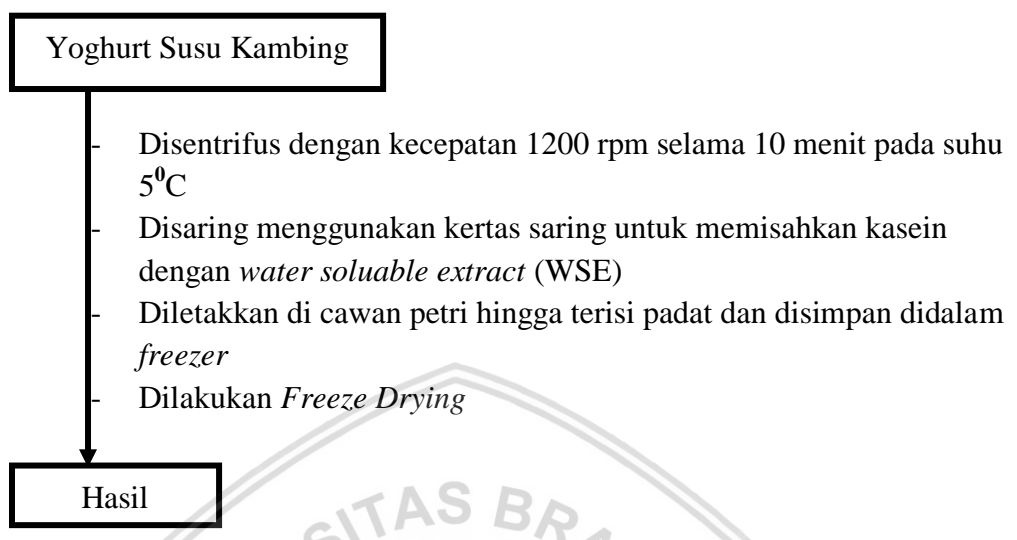
### A. Pembuatan *Starter*



### B. Pembuatan Yoghurt



### C. Isolasi Kasein Yoghurt Susu Kambing



### Lampiran 5. Perhitungan Dosis Kasein Yoghurt Susu Kambing

Pemberian dosis kasein yoghurt susu kambing dibagi menjadi 3, yaitu dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB.

**Tabel 4.1** Perhitungan Dosis Pemberian kasein

Hari ke-	N	Kelompok 1 (terapi kasein 300 mg/kg BB)		Kelompok 2 dan kontrol kasein (terapi kasein 600 mg/kg BB)		Kelompok 3 (terapi kasein 900 mg/kg BB)	
		BB (kg)	Hasil (mg)	BB (kg)	Hasil (mg)	BB (kg)	Hasil (mg)
1	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
2	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
3	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
4	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
5	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
6	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
7	4	178,2	53,46	164,4	98,64	169,6	152,64
8	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
9	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
10	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
11	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
12	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
13	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
14	4	189,9	56,97	181,4	108,84	185,5	166,95
15	4	205	61,5	200	120	206	185,4
16	4	205	61,5	200	120	206	185,4
17	4	205	61,5	200	120	206	185,4
18	4	205	61,5	200	120	206	185,4
19	4	205	61,5	200	120	206	185,4
20	4	205	61,5	200	120	206	185,4
21	4	205	61,5	200	120	206	185,4

Contoh perhitungan dosis pemberian kasein dengan dosis 300 mg/kg BB :

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 1

(rata-rata berat badan = 116 gram)  $\rightarrow \frac{116 \text{ gr}}{1000} \times 300 \text{ mg} = 34,8 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 2

(rata-rata berat badan = 130 gram)  $\rightarrow \frac{130 \text{ gr}}{1000} \times 300 \text{ mg} = 39 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 3

(rata-rata berat badan = 133 gram) →  $\frac{133 \text{ gr}}{1000} \times 300 \text{ mg} = 39,9 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 4

(rata-rata berat badan = 139 gram) →  $\frac{139 \text{ gr}}{1000} \times 300 \text{ mg} = 41,7 \text{ mg}$

---

<b>Total</b>	<b>= 518 gram</b>	<b>= 155,4 mg</b>
<b>Rata-rata</b>	<b>= 129,5 gram</b>	<b>= 38,85 mg</b>

Kasein dilarutkan dengan air RO sebanyak 1 ml

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 1

(rata-rata berat badan = 116 gram) →  $\frac{34,8 \text{ mg}}{38,85 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,895 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 2

(rata-rata berat badan = 130 gram) →  $\frac{39 \text{ mg}}{38,85 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 3

(rata-rata berat badan = 133 gram) →  $\frac{39,9 \text{ mg}}{38,85 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,03 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 4

(rata-rata berat badan = 139 gram) →  $\frac{41,7 \text{ mg}}{38,85 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,073 \text{ ml}$

---

<b>Total</b>	<b>= 3,998 ml</b>
--------------	-------------------

- Dalam 3,998 ml air RO terdapat 155,4 mg kasein
- Dalam prosedur penelitian disiapkan setiap kelompok 4,5 ml larutan kasein yoghurt susu kambing
- Untuk 4,5 ml larutan, maka kasein yang dibutuhkan :

$$\frac{4,5 \text{ ml}}{3,998 \text{ ml}} \times 155,4 \text{ mg} = 174,9 \text{ mg} = 1,08 \text{ gr kasein}$$

Contoh perhitungan dosis pemberian kasein dengan dosis 600 mg/kg BB :

Tikus Putih (*Ratus novergicus*) 1

(rata-rata berat badan = 145 gram) →  $\frac{145 \text{ mg}}{1000} \times 600 \text{ mg} = 87 \text{ mg}$



Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 2

(rata-rata berat badan = 138 gram) →  $\frac{138 \text{ gr}}{1000} \times 600 \text{ mg} = 78 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 3

(rata-rata berat badan = 146 gram) →  $\frac{146 \text{ gr}}{1000} \times 600 \text{ mg} = 79,8 \text{ mg}$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 4

(rata-rata berat badan = 150 gram) →  $\frac{150 \text{ gr}}{1000} \times 600 \text{ mg} = 90 \text{ mg}$

---

<b>Total</b>	<b>= 579 gram</b>	<b>= 334,8 mg</b>
<b>Rata-rata</b>	<b>= 144,75 gram</b>	<b>= 83,7 mg</b>

Kasein dilarutkan dengan air RO sebanyak 1 ml

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 1

(rata-rata berat badan = 145 gram) →  $\frac{87 \text{ mg}}{83,7 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,04 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 2

(rata-rata berat badan = 138 gram) →  $\frac{78 \text{ mg}}{83,7 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,93 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 3

(rata-rata berat badan = 146 gram) →  $\frac{79,8 \text{ mg}}{83,7 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,95 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 4

(rata-rata berat badan = 150 gram) →  $\frac{90 \text{ mg}}{83,7 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,08 \text{ ml}$

---

**Total** **= 4 ml**

- Dalam 4 ml air RO terdapat 334,8 mg kasein
- Dalam prosedur penelitian disiapkan setiap kelompok 4,5 ml larutan kasein yoghurt susu kambing
- Untuk 4,5 ml larutan, maka kasein yang dibutuhkan :

$$\frac{4,5 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 334,8 \text{ mg} = 376,8 \text{ mg} = 0,3768 \text{ gr kasein}$$

Contoh perhitungan dosis pemberian kasein dengan dosis 900 mg/kg BB :

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 1

$$\text{(rata-rata berat badan = 188 gram)} \rightarrow \frac{188 \text{ gr}}{1000} \times 900 \text{ mg} = 169,2 \text{ mg}$$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 2

$$\text{(rata-rata berat badan = 174 gram)} \rightarrow \frac{174 \text{ gr}}{1000} \times 900 \text{ mg} = 156,6 \text{ mg}$$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 3

$$\text{(rata-rata berat badan = 158 gram)} \rightarrow \frac{158 \text{ gr}}{1000} \times 900 \text{ mg} = 142,2 \text{ mg}$$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 4

$$\text{(rata-rata berat badan = 162 gram)} \rightarrow \frac{162 \text{ gr}}{1000} \times 900 \text{ mg} = 145,8 \text{ mg}$$

---

<b>Total</b>	<b>= 682 gram</b>	<b>= 613,8 mg</b>
<b>Rata-rata</b>	<b>= 170,5 gram</b>	<b>= 153,45 mg</b>

Kasein dilarutkan dengan air RO sebanyak 1 ml

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 1

$$\text{(rata-rata berat badan = 188 gram)} \rightarrow \frac{169,2 \text{ gr}}{153,45 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,1 \text{ ml}$$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 2

$$\text{(rata-rata berat badan = 174 gram)} \rightarrow \frac{156,6 \text{ gr}}{153,45 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,02 \text{ ml}$$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 3

$$\text{(rata-rata berat badan = 158 gram)} \rightarrow \frac{142,2 \text{ gr}}{153,45 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,93 \text{ ml}$$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 4

$$\text{(rata-rata berat badan = 162 gram)} \rightarrow \frac{145,8 \text{ gr}}{153,45 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,95 \text{ ml}$$

---

<b>Total</b>	<b>= 4 ml</b>
--------------	---------------

- Dalam 4 ml air RO terdapat 613,8 mg kasein
- Dalam prosedur penelitian disiapkan setiap kelompok 4,5 ml larutan kasein yoghurt susu kambing
- Untuk 4,5 ml larutan, maka kasein yang dibutuhkan :

$$\frac{4,5 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 613,8 \text{ mg} = 690,5 \text{ mg} = 0,6905 \text{ gr kasein}$$

### Lampiran 6. Perhitungan Dosis 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioksin (TCDD)

Pemberian dosis dioksin 100 ng/kg BB

Hari ke-	N	Kelompok 1 (dioksin 100 ng/kg BB)		Kelompok 2 dan kontrol kasein (terapi kasein 100 ng/kg BB)		Kelompok 3 (dioksin 100 ng/kg BB)	
		BB (kg)	Hasil (ng)	BB (kg)	Hasil (ng)	BB (kg)	Hasil (ng)
1	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
2	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
3	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
4	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
5	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
6	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
7	4	178,2	0,01782	164,4	0,01644	169,6	0,01696
8	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
9	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
10	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
11	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
12	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
13	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
14	4	189,9	0,01899	181,4	0,01814	185,5	0,01855
15	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206
16	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206
17	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206
18	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206
19	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206
20	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206
21	4	205	0,0205	200	0,02	206	0,0206

#### Perhitungan Dosis TCDD

Contoh perhitungan dosis pemberian TCDD dengan dosis 100 ng/kg BB :

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 1

(rata-rata berat badan = 116 gram)  $\rightarrow \frac{116 \text{ gr}}{1000} \times 100 \text{ ng} = 11,6\text{ng}$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 2

(rata-rata berat badan = 130 gram)  $\rightarrow \frac{130 \text{ gr}}{1000} \times 100 \text{ ng} = 13\text{ng}$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 3  
 (rata-rata berat badan = 133 gram) →  $\frac{133 \text{ gr}}{1000} \times 100 \text{ ng} = 13,3\text{ng}$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 4  
 (rata-rata berat badan = 139 gram) →  $\frac{139 \text{ gr}}{1000} \times 100 \text{ ng} = 13,9 \text{ ng}$

---

**Total** = 518 gram = 51,8ng  
**Rata-rata** = 129,5 gram = 12,95 ng

TCDD dilarutkan dengan corn oil sebanyak 1 ml

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 1  
 (rata-rata berat badan = 116 gram) →  $\frac{11,6 \text{ ng}}{12,95 \text{ ng}} \times 1 \text{ ml} = 0,9 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 2  
 (rata-rata berat badan = 130 gram) →  $\frac{13 \text{ ng}}{12,95 \text{ ng}} \times 1 \text{ ml} = 1 \text{ ml}$

Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 3  
 (rata-rata berat badan = 133 gram) →  $\frac{13,3 \text{ ng}}{12,95 \text{ ng}} \times 1 \text{ ml} = 1,02 \text{ ml}$

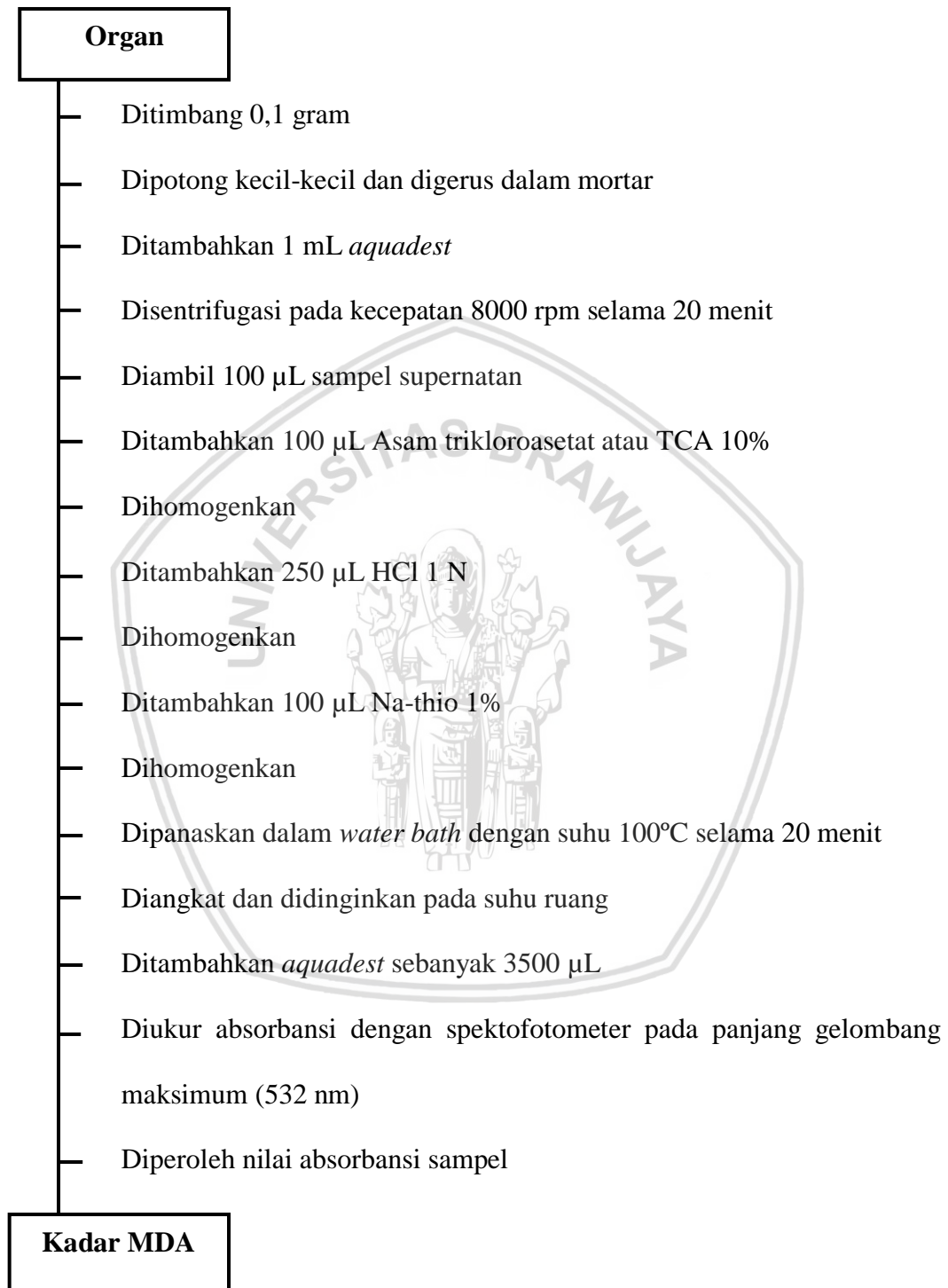
Tikus Putih (*Ratus norvegicus*) 4  
 (rata-rata berat badan = 139 gram) →  $\frac{13,9 \text{ ng}}{12,95 \text{ ng}} \times 1 \text{ ml} = 1,07 \text{ ml}$

---

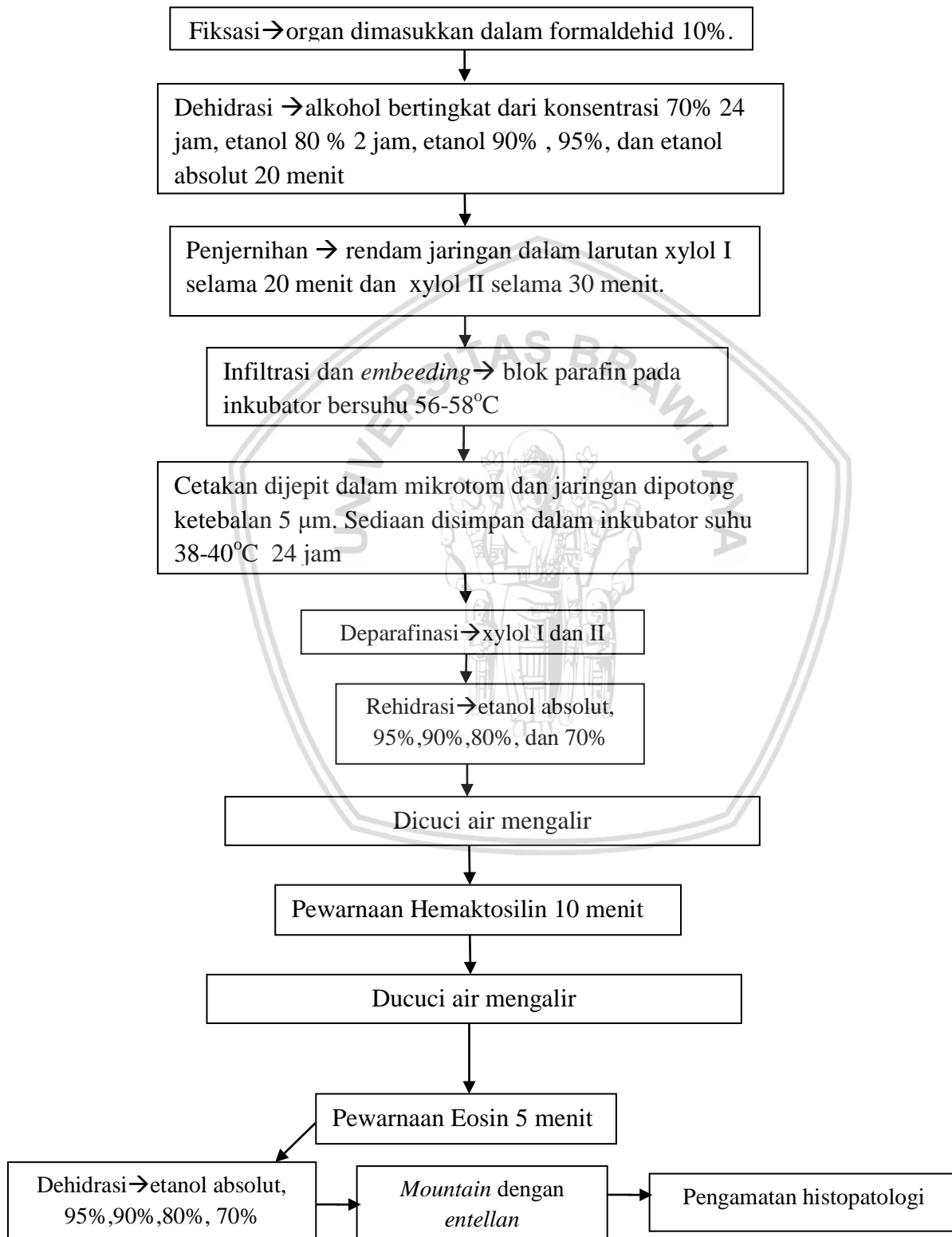
**Total** = 3,99 ml

- Dalam 3,99 ml corn oil terdapat 51,8 ng Dioxin
- Dalam prosedur penelitian yang kami siapkan setiap kelompok larutan Dioxin dalam seminggu  $3,99 \times 7 = 27,93 \text{ ml}$
- Untuk 27,93 ml larutan, maka Dioxin yang dibutuhkan :

$$\frac{27,93 \text{ ml}}{3,99 \text{ ml}} \times 51,8 \text{ ng} = 362,6 \text{ ng Dioxin}$$

**Lampiran 7.** Prosedur Pengukuran Kadar *Malondyaldehyde* (MDA)

**Lampiran 8.** Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi Testis dengan Pewarnaan Hemaktosilin-Eosin (HE)





**Lampiran 9.** Data Absorbansi dan Perhitungan Kadar MDA Organ Testis

Perlakuan	Ulangan	Absorbansi	Kadar (ng/ml)	Rata- rata	SD
Kontrol normal	1	0,636	1622	1680,75	40,55
	2	0,6708	1708,5		
	3	0,661	1685,5		
	4	0,6702	1707		
Kontrol kasein	1	0,6418	1636	1658	51,56
	2	0,6416	1635,5		
	3	0,637	1625,5		
	4	0,681	1735		
Kontrol positif	1	0,810	2056,5	2044,62	72,323
	2	0,788	2001,5		
	3	0,844	2141,5		
	4	0,779	1979		
Perlakuan 1	1	0,824	2091,5	1962,12	89,753
	2	0,761	1934		
	3	0,763	1939		
	4	0,741	1884		
Perlakuan 2	1	0,733	1964	1890,87	56,39
	2	0,743	1889		
	3	0,718	1826,5		
	4	0,741	1884		
Perlakuan 3	1	0,718	1826,5	1772,12	94,038
	2	0,738	1876,5		
	3	0,667	1699		
	4	0,662	1686,5		

Keterangan: hasil nilai absorbansi dikonversi menjadi kadar MDA dengan rumus  
 $y=0,0004x-0,0126$

Contoh perhitungan kadar MDA

$$Y = 0,0004x - 0,0126$$

$$0,662 = 0,0004x - 0,0126$$

$$x = (0,662 + 0,0126) / 0,0004$$

$$x = 1686,5$$

### Lampiran 10. Analisa Statistika Kadar MDA organ Testis

#### a. Uji Normalitas

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

		Kadar
N		24
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	1834.7500
	Std. Deviation	158.53151
Most Extreme Differences	Absolute	.162
	Positive	.162
	Negative	-.104
Test Statistic		.162
Asymp. Sig. (2-tailed)		.103 <sup>c</sup>

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

#### b. Uji Homogenitas

##### Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.298	5	18	.308

#### c. Descriptive

##### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	4	1680.7500	40.55141	20.27570	1616.2237	1745.2763	1622.00	1708.50
P1	4	1962.1250	89.75371	44.87686	1819.3068	2104.9432	1884.00	2091.50
P2	4	1890.8750	56.39795	28.19898	1801.1333	1980.6167	1826.50	1964.00
P3	4	1772.1250	94.03845	47.01922	1622.4888	1921.7612	1686.50	1876.50
KK	4	1658.0000	51.56064	25.78032	1575.9555	1740.0445	1625.50	1735.00
K+	4	2044.6250	72.32378	36.16189	1929.5417	2159.7083	1979.00	2141.50
Total	24	1834.7500	158.53151	32.36011	1767.8080	1901.6920	1622.00	2141.50

#### d. Uji ANOVA

##### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	489201.500	5	97840.300	19.824	.000
Within Groups	88840.000	18	4935.556		
Total	578041.500	23			

e. Uji Lanjutan (*Post Hoc*) menggunakan *Tukey Test*

## Multiple Comparisons

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	P1	-281.37500	49.67673	.000	-439.2494	-123.5006
	P2	-210.12500	49.67673	.006	-367.9994	-52.2506
	P3	-91.37500	49.67673	.467	-249.2494	66.4994
	KK	22.75000	49.67673	.997	-135.1244	180.6244
	K+	-363.87500	49.67673	.000	-521.7494	-206.0006
P1	K-	281.37500	49.67673	.000	123.5006	439.2494
	P2	71.25000	49.67673	.707	-86.6244	229.1244
	P3	190.00000	49.67673	.013	32.1256	347.8744
	KK	304.12500	49.67673	.000	146.2506	461.9994
	K+	-82.50000	49.67673	.572	-240.3744	75.3744
P2	K-	210.12500	49.67673	.006	52.2506	367.9994
	P1	-71.25000	49.67673	.707	-229.1244	86.6244
	P3	118.75000	49.67673	.211	-39.1244	276.6244
	KK	232.87500	49.67673	.002	75.0006	390.7494
	K+	-153.75000	49.67673	.059	-311.6244	4.1244
P3	K-	91.37500	49.67673	.467	-66.4994	249.2494
	P1	-190.00000	49.67673	.013	-347.8744	-32.1256
	P2	-118.75000	49.67673	.211	-276.6244	39.1244
	KK	114.12500	49.67673	.245	-43.7494	271.9994
	K+	-272.50000	49.67673	.000	-430.3744	-114.6256
KK	K-	-22.75000	49.67673	.997	-180.6244	135.1244
	P1	-304.12500	49.67673	.000	-461.9994	-146.2506
	P2	-232.87500	49.67673	.002	-390.7494	-75.0006
	P3	-114.12500	49.67673	.245	-271.9994	43.7494
	K+	-386.62500	49.67673	.000	-544.4994	-228.7506
K+	K-	363.87500	49.67673	.000	206.0006	521.7494
	P1	82.50000	49.67673	.572	-75.3744	240.3744
	P2	153.75000	49.67673	.059	-4.1244	311.6244
	P3	272.50000	49.67673	.000	114.6256	430.3744
	KK	386.62500	49.67673	.000	228.7506	544.4994

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

## f. Uji Homogeneous Subjects

## Kadar

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		a	b	c
KK	4	1658.0000		
K-	4	1680.7500		
P3	4	1772.1250	1772.1250	
P2	4		1890.8750	1890.8750
P1	4			1962.1250
K+	4			2044.6250
Sig.		.245	.211	.059

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Lampiran 11. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

**LABORATORIUM PENGUJIAN MUTU DAN KEAMANAN PANGAN**  
**(TESTING LABORATORY OF FOOD QUALITY AND FOOD SAFETY)**  
 JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
 FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
 Jl. Veteran, Malang 65145, Telp. (0341) 573358  
 E-mail : labujipangan\_thpub@yahoo.com

**KEPADA : drh. Ajeng Erika P.H.,M.Si**  
**FKH - UB**  
**MALANG**


**LAPORAN HASIL UJI**  
**REPORT OF ANALYSIS**

Nomor / Number : 0633/THP/LAB/2017  
 Nomor Analisis / Analysis Number : 0633  
 Tanggal penerbitan / Date of issue : 30 Agustus 2017  
 Yang bertandatangan di bawah ini menerangkan, bahwa hasil pengujian  
 The undersigned ratifies that examination  
 Dari contoh / of the sample (s) of : Freeze Dry Kasein Yoghurt -  
 : Susu Kambing

Untuk analisis / For analysis  
 Keterangan contoh / Description of sample  
 Diambil dan / Taken from  
 Oleh / By  
 Tanggal penerimaan contoh / Received : 02 Agustus 2017  
 Tanggal pelaksanaan analisis / Date of analysis : 02 Agustus 2017  
 Hasil adalah sebagai berikut / Resulted as follows :

PARAMETER	HASIL
PROTEIN (%)	31,59
LEMAK (%)	31,87
AIR (%)	4,98
ABU (%)	2,99
KARBOHIDRAT (%)	28,57
ANTIOKSIDAN IC50(mg/ml)	452,00
TOTAL BAL (CFU/g)	$2,2 \times 10^5$

HASIL PENGUJIAN INI HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH TERSEBUT DI ATAS. PENGAMBIL CONTOH BERTANGGUNG JAWAB ATAS KEBENARAN TANDING BARANG

Ketua,  
  
 Dr. Widya Dwi Rukmi P., STP, MP  
 NIP. 19700504 199903 2 002

