

**Pengaruh Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap  
Kadar Malondialdehida (MDA) dan Aktivitas Protease  
Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi  
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)**

**SKRIPSI**

oleh:

**RIHMA FATHIN FATATY**

**145090200111007**



**JURUSAN KIMIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

**Pengaruh Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar  
Malondialdehida (MDA) dan Aktivitas Protease Jejunum  
Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi 2,3,7,8-  
*Tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana  
Sains dalam bidang Kimia



**JURUSAN KIMIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

## LEMBAR PERNYATAAN

**Pengaruh Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Aktivitas Protease Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)**

**Oleh:**  
**Rihma Fathin Fataty**  
**145090200111007**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal.....  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang kimia

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS  
NIP. 195204121980021001

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS  
NIP. 196304041987011001

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D  
NIP. 197310202002121001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rihma Fathin Fataty

NIM : 145090200111007

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

“Pengaruh Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Aktivitas Protease Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)”

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini hanya digunakans sebagai referensi.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil plagiasi, maka saya bersedia menanggung segala resiko dari keadaan tersebut.

demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang  
Yang menyatakan,

Rihma Fathin Fataty  
145090200111007

# Pengaruh Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Aktivitas Protease Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

## ABSTRAK

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) merupakan golongan senyawa hidrokarbon aromatik terhalogenasi yang berbahaya dan mampu terakumulasi dalam jangka panjang di dalam tubuh. Akumulasi TCDD di dalam tubuh dapat meningkatkan stres oksidatif akibat peroksidasi lipid. Kasein yogurt susu kambing peranakan etawa diketahui memiliki kandungan biopeptida aktif yang berpotensi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kasein yogurt susu kambing dalam menangani keracunan TCDD yang dapat diamati melalui biomarker kadar Malondialdehida (MDA) dan aktivitas protease. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus *Rattus norvegicus* jantan usia 8-12 minggu dengan berat 150-250 gram sebanyak 20 ekor yang dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yaitu kelompok negatif, kelompok positif, kelompok terapi dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB. Induksi TCDD diberikan sebanyak 100 ng/kg BB/hari melalui sonde lambung selama 21 hari. Terapi yogurt susu kambing dalam bentuk freeze dry melalui sonde lambung selama 21 hari. Pengukuran kadar Malondialdehida (MDA) dilakukan menggunakan metode TBA (*Thiobarbituric Acid*) sedangkan pengukuran aktivitas protease menggunakan metode Walter. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi yogurt susu kambing secara signifikan ( $p < 0.01$ ) dapat menurunkan kadar Malondialdehida (MDA) dan aktivitas protease. Ketiga dosis memiliki potensi yang sama dalam menurunkan kadar Malondialdehida (MDA) dan aktivitas protease. Kesimpulan dari penelitian ini adalah kasein yogurt susu kambing dapat digunakan sebagai nutrasetika alami untuk penanganan keracunan TCDD.

**Kata Kunci:** TCDD, kasein, yogurt susu kambing, malondialdehida, aktivitas protease

# The Effect of Goat Milk Yogurt Casein to Malondialdehyde (MDA) Level and Protease Activity of *Rattus norvegicus* Jejunum Induced With 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

## ABSTRACT

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is a class of harmful, halogenated, aromatic hydrocarbon compound which can accumulate inside the body from time to time. The accumulation of TCDD inside the body can increase oxidative stress due to lipid peroxidation. Goat milk yogurt casein contains active biopeptides which can be considered as potential antioxidant. This research aimed to know the influence of goat milk yogurt casein in reducing the effect of TCDD, i.e. poisoning that can be observed through biomarker level of Malondialdehyde (MDA) and protease activity. This research involved 20 males of *Rattus norvegicus* as a guinea pig, ranged in age from 8 to 12 weeks and weights from 150 to 250 grams. They were divided into five groups of treatment: negative group, positive group, therapy group with doses of 300 mg/kg BW, 600 mg/kg BW, and 900 mg/kg BW. TCDD induction was administered as much as 100 ng/kg BW/day through gastrostomy feeding tube for 21 days. Goat milk yogurt therapy was introduced using freeze dry yogurt through gastrostomy feeding tube for 21 days. The measurement of Malondialdehyde level (MDA) was carried out using TBA (Thiobarbituric Acid) method, while the protease activity was measured using Walter method. The result showed that goat milk yogurt therapy significantly decreased the level of Malondialdehyde (MDA) ( $p < 0.01$ ) and the protease activity. All the three doses had the same potential in decreasing the level of Malondialdehyde (MDA) and the protease activity. It can be concluded that goat milk yogurt casein can be used as natural nutraceutical in reducing the effect of TCDD, i.e. poisoning.

**Keywords:** TCDD, casein, goat milk yogurt, malondialdehyde, protease activity

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT. yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “**Pengaruh Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Aktivitas Protease Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Induksi 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)**” sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bimbingan dan dukungan berbagai pihak. Oleh sebab itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS selaku dosen pembimbing I dan pembimbing akademik.
2. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS selaku dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, ilmu pengetahuan, dan motivasi kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.
4. Ayah Achmad Kirom, Ama Munifah, Kakak Arbita Wafdatul Ilmia, dan Adik Reihan Fahrely Muhammad yang selalu mendoakan, memberikan kasih sayang, nasihat, dan dukungan baik secara moriil maupun materiil selama masa studi.
5. Rekan kelompok penelitian Malinda Irawan, Melinda Puspitasari, dan Muhammad Habibie Robbie.
6. Seluruh staf dan karyawan Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Biosains Universitas Brawijaya yang telah membantu selama penelitian.
7. Teman-teman kimia angkatan 2014 dan semua pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan kepada penulis.

Malang, Juli 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN ABSTRAK</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN KATA PENGANTAR</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN DAFTAR ISI</b>	<b>vii</b>
<b>HALAMAN DAFTAR TABEL</b>	<b>ix</b>
<b>HALAMAN DAFTAR GAMBAR</b>	<b>x</b>
<b>HALAMAN DAFTAR LAMPIRAN</b>	<b>xi</b>
<b>HALAMAN DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG</b>	<b>xii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	<b>1</b>
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	<b>4</b>
2.1 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	4
2.2 Kasein Yogurt Susu Kambing	5
2.3 Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> )	6
2.4 Jejunum	7
2.5 Malondialdehida	7
2.6 Aktivitas Protease	8
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b>	<b>9</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	9
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	9
3.2.1 Alat	9
3.2.2 Bahan	9
3.3 Tahapan Penelitian	10
3.4 Prosedur Penelitian	10
3.4.1 Kerangka Penelitian dan Persiapan Hewan Coba	10
3.4.2 Pembuatan Kasein Yogurt Susu Kambing	11
3.4.2.1 Pembuatan <i>Starter</i>	11
3.4.2.2 Pembuatan Yogurt Susu Kambing	12
3.4.2.3 Isolasi Kasein Yogurt Susu Kambing	12
3.4.3 Pemberian Kasein Yogurt Susu Kambing	13



3.4.4	Induksi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	13
3.4.5	Pembedahan Hewan Coba dan Isolasi Organ Jejunum	13
3.4.6	Pengukuran Kadar Malondialdehida (MDA)	13
3.4.6.1	Pembuatan Kurva Baku Malondialdehida	13
3.4.6.2	Pengukuran Kadar Malondialdehida	14
3.4.7	Pengukuran Aktivitas Protease	15
3.4.7.1	Isolasi Protease	15
3.4.7.2	Pembuatan Kurva Baku Tirosin	15
3.4.7.3	Pengukuran Aktivitas Protease	15
3.4.8	Analisis Data	16
<b>BAB IV</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	<b>17</b>
4.1	Pengaruh Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Jejunum Tikus Hasil Induksi 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	17
4.2	Pengaruh Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Aktivitas Enzim Protease Jejunum Tikus Hasil Induksi 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	19
<b>BAB V</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>22</b>
5.1	Kesimpulan	22
5.2	Saran	22
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>		<b>23</b>
<b>LAMPIRAN</b>		<b>29</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1: Kelompok perlakuan tikus	10
Tabel 4.1: Profil MDA jejunum tikus hasil induksi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD) dan pasca terapi	17
Tabel 4.2: Profil aktivitas protease jejunum tikus hasil induksi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD) dan pasca terapi	19



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1:	Struktur 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	4
Gambar 2.2:	Struktur kasein	6
Gambar 2.3:	Reaksi pembentukan MDA	7
Gambar 2.4:	Reaksi antara MDA dan TBA	8



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran A.</b>	Sertifikat Laik Etik	29
<b>Lampiran B.</b>	Kerangka Operasional Penelitian	30
<b>Lampiran C.</b>	Kerangka Teori	31
<b>Lampiran D.</b>	Perhitungan Dosis	32
<b>Lampiran E.</b>	Diagram Alir	38
<b>Lampiran F.</b>	Preparasi Larutan	43
<b>Lampiran G.</b>	Penentuan Kadar Malondialdehida	46
<b>Lampiran H.</b>	Penentuan Aktivitas Protease	51



## DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<b>Singkatan/symbol</b>	<b>Keterangan</b>
AhR	<i>Aryl Hidrocarbon Receptor</i>
BAL	Bakteri Asam Laktat
BB	Berat Badan
BNJ	Beda Nyata Jujur
BPAH	Bahan Pangan Asal Hewan
CDD	<i>Chlorodibenzo-p-dioxin</i>
CDF	<i>Chlorodibenzofuran</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
IL-1	Interleukin 1
MDA	Malondialdehida
NF-κB	<i>Nuclear Factor-kappaB</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCB	<i>Polychlorobiphenyl</i>
pH	Potensial Hidrogen
PMSF	<i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>
PE	Peranakan Etawa
TBA	<i>Thiobarbituric Acid</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
RO	<i>Reverse Osmosis</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i>
TCDD	<i>Tetrachlorodibenzo,p-dioxin</i>
UV-Vis	<i>Ultraviolet-Visible</i>
PVC	<i>Polivinyll Chloride</i>
WSE	<i>Water Soluble Extract</i>
α	alfa
β	Beta
μ	mikro
λ	Lamda



# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) merupakan salah satu polutan bahan kimia paling berbahaya dalam kelompok dioksin. Senyawa ini bersifat stabil dan mudah diserap oleh jaringan lemak. Sebanyak 90% dioksin dapat terakumulasi di dalam tubuh melalui makanan. Dioksin berasal dari pembakaran sampah terutama sampah plastik *Polivinyl Chloride* (PVC), limbah industri herbisida, dan limbah industri kertas yang menggunakan klor sebagai pemutih. TCDD merupakan zat xenobiotik yang dapat meningkatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Peningkatan jumlah ROS menyebabkan ketidakseimbangan jumlah antioksidan dan oksidan atau stres oksidatif. Beberapa akibat keracunan TCDD adalah kehilangan nafsu makan, penurunan imunitas, kelainan pertumbuhan tubuh, ruam pada kulit (*chloracne*), gangguan sistem saraf, dan kanker [1,2].

Seiring dengan berkembangnya waktu, pengobatan dengan menggunakan bahan-bahan alami semakin berkembang dan tingginya minat masyarakat yang cenderung lebih memilih produk pengobatan dalam bentuk pangan (pangan fungsional), salah satunya adalah susu kambing sebagai sumber bioaktif peptida yang berpotensi sebagai pangan fungsional melalui fermentasi [3]. Proses fermentasi melibatkan Bakteri Asam Laktat (BAL) yang mengandung enzim proteolitik dan berperan dalam hidrolisa bioaktif peptida yang terikat pada prekursor sehingga menghasilkan produk olahan susu yaitu yogurt. Yogurt sebagai salah satu nutrasetika alami memiliki kandungan bioaktif peptida yang tinggi. Bioaktif peptida bermanfaat sebagai antioksidan, antimikrobal, antihipertensi, dan antikolesterolemia [4,5]. Antioksidan berfungsi untuk mengatasi kerusakan oksidatif akibat ROS (*Reactive Oxygen Species*) [6].

Kerusakan pada organ dapat diamati dari kadar Malondialdehida (MDA). Malondialdehida merupakan senyawa aldehyd produk akhir dari peroksidasi lipid. Malondialdehida menunjukkan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh ROS. Peningkatan ROS akan menyebabkan stres oksidatif yang ditunjukkan dengan meningkatnya kadar malondialdehida yang dihasilkan [7].

Kerusakan organ akibat radikal bebas juga dapat diamati dengan mengukur aktivitas protease. Protease merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolitik dengan memutus ikatan peptida pada

protein. Protease dapat menghidrolisis protein pada jaringan akibat kerusakan atau inflamasi. Adanya kerusakan atau inflamasi pada jejunum dapat diamati dengan meningkatnya aktivitas protease [8].

Berdasarkan latar belakang tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi kasein yogurt susu kambing dalam penanganan keracunan dioksin.

## 1.2 Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana pengaruh kasein yogurt susu kambing terhadap kadar Malondialdehida (MDA) pada jejunum tikus hasil induksi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)?
2. Bagaimana pengaruh kasein yogurt susu kambing terhadap aktivitas protease pada jejunum tikus hasil induksi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)?

## 1.3 Batasan Masalah

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

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* usia 8-12 minggu dengan berat 150-250 gram yang diperoleh dari penyedia hewan laboratorium D' *Wistar*, Jalan Deme Nomor 66 Gatot Subroto, Bandung. Penggunaan hewan coba telah menyertakan sertifikat laik etik No. 710-KEP UB dari komisi etik penelitian Universitas Brawijaya (**lampiran A**).
2. Dosis 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (Sigma 48599) sebagai induktor toksik organ jejunum adalah 100 ng/kg BB/hari dalam pelarut minyak jagung 100 mL [9].
3. Kasein yogurt susu kambing diperoleh dari fermentasi susu kambing Valenta Goat Milk dari Peranakan Etawa (PE) Surabaya dengan *starter* yang mengandung bakteri *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, dan *Streptococcus thermophilus* (yogourmet, Lyo San Inc. 500 Aéroport, C.P 598, Lachute, Qc, Canada, J8H.4G4). Perlakuan dilakukan selama 21 hari dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB yang dilarutkan dengan air *Reverse Osmosis* (RO) sebanyak 1 mL untuk

setiap tikus dan diberikan secara peroral dengan sonde lambung [10].

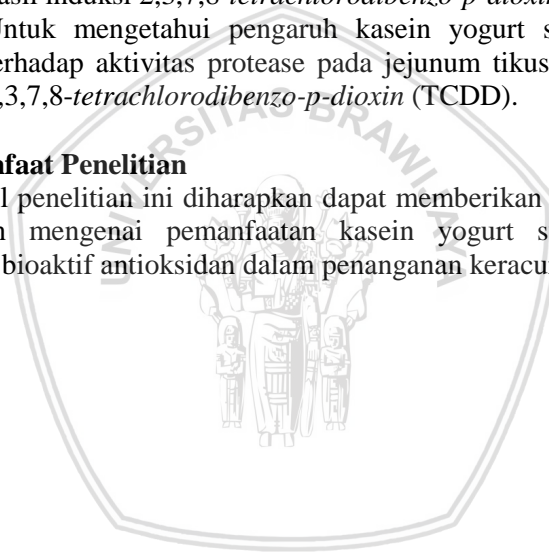
4. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah kadar Malondialdehida (MDA) jejunum tikus yang diuji menggunakan metode *Thiobarbituric Acid* (TBA) dan aktivitas protease yang diukur dengan metode Walter serta dianalisis menggunakan *software IBM SPSS statistics 23*.

#### **1.4 Tujuan penelitian**

1. Untuk mengetahui pengaruh kasein yogurt susu kambing terhadap kadar Malondialdehida (MDA) pada jejunum tikus hasil induksi 2,3,7,8-*tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).
2. Untuk mengetahui pengaruh kasein yogurt susu kambing terhadap aktivitas protease pada jejunum tikus hasil induksi 2,3,7,8-*tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD).

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan wawasan mengenai pemanfaatan kasein yogurt susu kambing berbasis bioaktif antioksidan dalam penanganan keracunan dioksin.

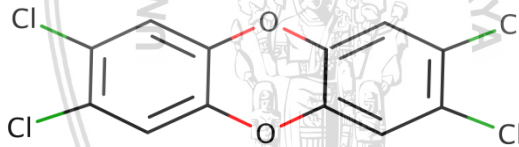




## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)

Dioksin merupakan golongan senyawa hidrokarbon aromatik terhalogenasi yang berbahaya. Golongan ini terdiri dari *Chlorodibenzo-*p*-dioxins* (CDDs), *Chlorodibenzofurans* (CDFs), dan *Polychlorobiphenyls* (PCBs). Senyawa dioksin yang paling beracun adalah 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Menurut *Environmental Protection Agency* (EPA) tahun 1994 ada beberapa sumber utama TCDD yaitu hasil pembakaran sampah, limbah industri pestisida, hasil pembakaran produksi baja, dan limbah industri kertas yang menggunakan klor sebagai pemutih. Selain itu, sumber dioksin juga dapat berasal dari alam yaitu kebakaran hutan atau aktivitas gunung berapi [11]. Tingkat toksisitas senyawa TCDD berkaitan dengan strukturnya yang memiliki atom halogen pada posisi lateral yaitu 2,3,7,8 dan satu cincin yang tidak terhalogenasi [12]. Berikut ini adalah struktur TCDD [13]:



**Gambar 2.1:** Struktur 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

Jalur utama dioksin masuk ke dalam tubuh adalah melalui rantai makanan (gastrointestinal) karena bersifat mudah larut dalam lemak (lipofilik). Dioksin mampu terakumulasi di bahan pangan dan jaringan makhluk hidup selama 7 hingga 8 tahun. Bahan makanan yang berasal dari hewan lebih beresiko terkontaminasi TCDD dibandingkan tumbuhan karena jaringan lemak lebih banyak [14].

Mekanisme TCDD sebagai sumber ROS (*Reactive Oxygen Species*) yaitu melalui pengikatan dengan reseptor spesifik *Aryl Hydrocarbon Receptor* (AhR). Pengikatan ini akan menstimulasi sitokrom P450 di mitokondria. Sitokrom P450 berfungsi untuk metabolisme zat xenobiotik seperti TCDD melalui reaksi fungsionalisasi (reaksi tahap 1) yang melibatkan reaksi oksidasi, reduksi, dan hidrolisis. TCDD bersifat non polar sehingga tidak dapat dieksresi secara langsung oleh tubuh. Pada reaksi

fungsionalisasi terjadi fosforilasi oksidatif di mitokondria sehingga menyebabkan tereduksinya oksigen ( $O_2$ ) yang dikatalis oleh enzim sitokrom oksidase dalam rantai transpor elektron. Reduksi oksigen menghasilkan radikal ion superoksida ( $O_2^{\cdot-}$ ) melalui reaksi  $O_2 + e \rightarrow O_2^{\cdot-}$ . Radikal ion superoksida akan mengalami dismutasi ion yang enzim superoksida dismutase (SOD) menghasilkan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan  $O_2$ . Hidrogen peroksida akan bereaksi dengan radikal ion superoksida menghasilkan radikal hidroksil ( $OH\cdot$ ) melalui reaksi Haber Weiss  $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH\cdot + H_2O$ . Radikal hidroksil juga dapat dihasilkan dengan melibatkan  $Fe^{2+}$  sebagai pendonor elektron melalui reaksi fenton  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$ . Radikal hidroksil lebih berbahaya dibandingkan dengan radikal ion superoksida karena mampu berdifusi ke membran sel makromolekul seperti lipid, karbohidrat, asam amino, dan asam nukleat [15–17].

Efek toksik TCDD yaitu penurunan berat badan (*wasting syndrome*). Hal ini disebabkan karena menurunnya nafsu makan dan berkurangnya kemampuan usus halus untuk mengabsorpsi glukosa serta dapat menyebabkan penyakit kulit parah (*chloracne*) dan kanker [18,19].

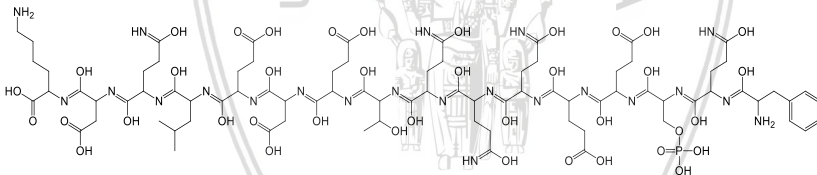
## 2.2 Kasein Yogurt Susu Kambing

Susu merupakan salah satu Bahan Pangan Asal Hewan (BPAH) yang diperoleh dari ternak perah seperti kambing dan sapi. Susu kambing dihasilkan oleh ternak kambing Peranakan Etawa (PE). Kelebihan susu kambing dibanding susu sapi yaitu globula lemak lebih kecil sehingga mudah larut dan mudah dicerna oleh tubuh, kadar laktosa lebih sedikit sehingga aman dikonsumsi penderita alergi laktosa, immunoglobulin susu kambing lebih, dan mengandung laktalbumin yang berbeda dengan sapi sehingga tidak menyebabkan alergi pada bayi dan anak-anak yang intoleran terhadap laktalbumin pada sapi [20]. Selain itu, kandungan protein susu kambing relatif lebih tinggi yaitu mencapai 3,4% dibandingkan susu sapi yang hanya 3,2% [21].

Yogurt merupakan salah satu hasil olahan susu yang diperoleh dari fermentasi menggunakan bantuan Bakteri Asam Laktat (BAL) seperti *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, dan *Lactobacillus casei*. Fermentasi susu merupakan proses perombakan gula susu (laktosa) menjadi asam laktat sehingga tekstur seperti gel dan memiliki rasa asam. Kelebihan susu dalam bentuk yogurt adalah

mengandung gizi yang lebih banyak karena meningkatnya total padatan [21].

Kasein merupakan protein yang mendominasi sebanyak 80% dari total keseluruhan protein susu, sedangkan *Water Soluble Extract* (WSE) hanya 20%. Kasein susu kambing terdiri dari  $\lambda$ ,  $\beta$ , dan  $\kappa$ . Kasein terdiri dari 94% protein dan 6% koloid kalsium fosfat [22]. Kandungan protein yang tinggi berpotensi untuk menghasilkan peptida yang bersifat bioaktif. Peptida bioaktif merupakan fragmen protein spesifik yang memberikan efek positif bagi tubuh dan dapat mempengaruhi kesehatan. Peptida bioaktif bersifat inaktif sehingga membutuhkan beberapa proses agar dapat bersifat aktif seperti proses hidrolisis dengan enzim pencernaan, hidrolisis protein oleh mikroorganisme proteolitik, dan hidrolisis oleh enzim proteolitik yang dihasilkan oleh mikroorganisme atau tumbuhan [3]. Peptida bioaktif berfungsi sebagai antioksidan, antimikrobal, antihipertensi, *immunomodulator*, *cytomodulator* dan antikolesterolemia [5]. Pada proses pembuatan yogurt kasein diperlukan pengaturan pH agar mudah larut, Berikut ini adalah struktur kasein ( $C_{81}H_{125}N_{22}O_{39}P$ ) [23]:



**Gambar 2.2:** Struktur kasein

### 2.3 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan coba merupakan hewan yang sengaja dipelihara dan ditanakkan untuk dipakai sebagai hewan model digunakan untuk mempelajari dan memahami keadaan patologis yang kompleks [24]. Hewan coba yang digunakan pada penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* yang memiliki kepala besar dan ekor pendek dengan berat saat usia dewasa sekitar 150-300 gram. Hewan coba ini memiliki beberapa keunggulan, yaitu pola makan, saluran pencernaan tipe monogastrik seperti manusia, kebutuhan nutrisi seperti manusia, dan mudah dicekok tanpa mengalami muntah karena tidak memiliki kantung empedu [25]. Berikut ini adalah aksonomi *Rattus norvegicus* [26]:

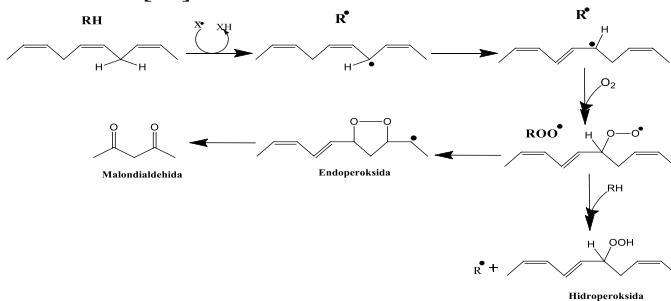
Kingdom : Animalia  
 Filum : Chordata  
 Kelas : Mammalia  
 Ordo : Rodentia  
 Subordo : Myomorpha  
 Famili : Muridae  
 Genus : *Rattus*  
 Spesies : *Rattus norvegicus*  
 Galur : *Wistar*

### 2.4 Jejunum

Jejunum merupakan bagian tengah usus halus diantara duodenum dan ileum. Organ ini berfungsi untuk pemecahan nutrisi, penyerapan nutrisi lipofilik (protein, lemak, kolesterol dan vitamin yang larut dalam lemak A, D, E dan K), dan penyerapan air. Organ jejunum memiliki luas permukaan tetap besar walaupun terjadi penurunan diameter usus halus karena adanya vili serta mikrovili sehingga fungsi penyerapan maksimal [27]. Pada jejunum, nutrisi yang diserap jaringan epitel akan dialirkan ke seluruh tubuh melalui transport aktif dan pasif.

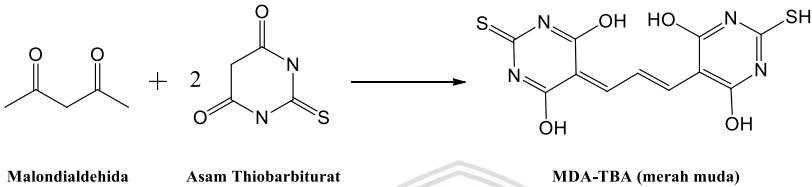
### 2.5 Malondialdehida (MDA)

Malondialdehida ( $C_3H_4O_2$ ) merupakan senyawa aldehyd yang sangat reaktif. Radikal bebas bereaksi dengan membran sel melalui proses peroksidasi lipid menghasilkan malondialdehida. Peningkatan radikal bebas menyebabkan kelebihan produksi malondialdehida. Hasil peroksidasi lipid ini sering digunakan sebagai indikator stres oksidatif. Stres oksidatif adalah keadaan tidak seimbang antara oksidan dan antioksidan [28]. Berikut ini adalah reaksi pembentukan malondialdehida [29]:



Gambar 2.3: Reaksi pembentukan MDA

Penentuan kadar malondialdehida (dapat ditentukan dengan metode *Thiobarbituric Acid* (TBA) dan menggunakan instrumen spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 530 nm. *Thiobarbituric Acid* (TBA) yang bereaksi dengan gugus karboksilat malondialdehida dalam suasana asam menghasilkan kompleks TBA-MDA yang berwarna merah muda. Berikut ini adalah reaksi antara MDA dengan TBA [29]:



**Gambar 2.4:** Reaksi antara MDA dan TBA

## 2.6 Aktivitas Protease

Protease merupakan kelompok enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada protein dan mengubahnya menjadi substansi yang lebih kecil yaitu asam amino agar mudah diserap oleh sel [30]. Protease berperan dalam kerusakan usus karena stres dan induksi bahan-bahan berbahaya seperti dioksin. Adanya rangsangan yang mampu mengaktifasi makrofag menjadi tahap awal pelepasan protease, sehingga terbentuk sitokin IL-1 dan TNF- $\alpha$  sebagai respon inflamasi yang menyebabkan aktivasi neutrofil dan pelepasan enzim proteolitik sehingga menyebabkan kerusakan jaringan, semakin tinggi kerusakan maka semakin tinggi juga aktivitas protease [31].

Tingkat aktivitas protease dapat diamati dari keaktifan enzim dalam menghidrolisis protein. Aktivitas ini diukur menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 275 nm. Panjang gelombang ini dapat ditangkap dan dipantulkan kembali oleh asam amino. Aktivitas protease dinyatakan dalam unit aktivitas, satu unit dinyatakan dengan banyaknya jumlah mikro mol tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida protein oleh 1 mL protease per menit [32].

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juli-November 2017.

### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah seperangkat bak pemeliharaan hewan coba, spuit 3 mL dan 5 mL, jarum sonde, seperangkat alat gelas (labu takar 10 mL dan 100 mL, erlenmeyer 250 mL dan 500 mL gelas kimia 50 mL, 250 mL, dan 500 mL, gelas ukur 10 mL, cawan petri, gelas arloji, corong gelas dan batang pengaduk), *cooler box*, *autoclave*, mortar, botol sampel, botol semprot, tabung polipropilen, mikrotip kuning dan biru, tabung *microtube eppendorf*, mikropipet, vortex, pH meter, neraca analitik, penangas air, inkubator, seperangkat alat sentrifugasi, *magnetic stirrer*, kuvet, spektrofotometer UV-Vis, *refrigerator*, masker, sarung tangan, dan *aluminium foil*.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* usia 8-12 minggu dengan berat 150-250 gram, susu kambing segar Valenta Goat Milk yang berasal dari Peranakan Etawa (PE) Surabaya, *starter yóourmet* (katalog: Lyo San Inc. 500 Aéroparc, C.P. 598, Lachute, Qc, Canada, J8H.4G4), TCDD, akuades, NaCl fisiologis 0,9%, etanol 70%, 80%, 90%, dan 95%, larutan *phosphat Buffer Saline* (PBS), larutan *phosphat Buffer Saline* azida (PBS-azida) 1%, larutan asam trikloroasetat (TCA) 10%, dan 4%, larutan HCl 1 N, larutan Na-thio 1%, larutan NaOH 1 M, larutan baku tirosin 20 ppm, larutan kasein 500 ppm, larutan *buffer* fosfat pH 7, padatan asam sitrat dihidrat, padatan natrium sitrat dihidrat, padatan NaCl, padatan KCl, padatan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , padatan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , dan pasir kuarsa.

### 3.3 Tahapan Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini mencakup beberapa tahapan, yaitu:

1. Kerangka penelitian dan persiapan hewan coba
2. Pembuatan kasein yogurt susu kambing
3. Induksi 2,3,7,8- *tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD)
4. Pemberian kasein yogurt susu kambing
5. Pembedahan hewan coba dan isolasi organ jejunum
6. Pengukuran kadar malondialdehida
7. Pengukuran aktivitas protease
8. Analisis data

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Kerangka Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan memberikan perlakuan kepada subjek dan menganalisis pengaruhnya [33]. Jenis penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena bersifat homogen [34]. Berikut ini adalah lima kelompok perlakuan hewan coba:

**Tabel 3.1:** Kelompok perlakuan tikus

<b>Kelompok</b>	<b>Perlakuan</b>
A (Normal)	Kelompok tikus tanpa perlakuan
B (TCDD)	Kelompok tikus yang diinduksi 2,3,7,8- <i>tetrachlorodibenzo-p-dioxin</i> (TCDD) 100 ng/kg BB sebanyak 1 mL
C (Terapi dosis 300 mg/kg BB)	Kelompok tikus yang diberi kasein yogurt susu kambing dengan dosis 300 mg/kgBB dan diinduksi 2,3,7,8- <i>tetrachlorodibenzo-p-dioxin</i> (TCDD) 100 ng/kg BB, masing-masing sebanyak 1 mL
D (Terapi dosis 600 mg/kg BB)	Kelompok tikus yang diberi kasein yogurt susu kambing dengan dosis 600 mg/kg BB dan diinduksi 2,3,7,8- <i>tetrachlorodibenzo-p-dioxin</i> (TCDD), masing-masing sebanyak 1 mL
E (Terapi dosis 900 mg/kg BB)	Kelompok tikus yang diberi kasein yogurt susu kambing dengan dosis 900 mg/kgBB dan diinduksi 2,3,7,8- <i>tetrachlorodibenzo-p-dioxin</i> (TCDD) 100 ng/kg BB, masing-masing sebanyak 1 mL



- Berikut ini adalah variabel yang diamati:
- Variabel bebas : Dosis yogurt susu kambing  
 Variabel tergantung : Kadar malondialdehida (MDA) dan aktivitas protease  
 Variabel kontrol : Jenis kelamin, umur, dan berat badan tikus (*Rattus norvegicus*).

Sampel penelitian menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* berumur 8-12 minggu dengan berat 150-250 gram. Aklimatisasi (adaptasi) hewan coba dilakukan selama tujuh hari yang bertujuan untuk adaptasi dengan kondisi laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus Federer [35]:

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

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$N \geq 3.5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

n = jumlah replikasi

Berdasarkan perhitungan diperlukan paling sedikit empat kali ulangan untuk pembagian menjadi lima kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 20 ekor tikus. Kerangka operasional penelitian dapat dilihat pada **Lampiran B**.

### 3.4.2 Pembuatan Kasein Yogurt Susu Kambing

#### 3.4.2.1 Pembuatan *Starter*

Langkah awal pembuatan kasein yogurt susu kambing adalah pembuatan *starter* dengan tahapan sebagai berikut [36]:

1. Susu kambing sebanyak 70 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, ditutup menggunakan *aluminium foil* dan dilakukan pasteurisasi dengan cara dipanaskan pada suhu 72 °C menggunakan penangas air selama lima menit.
2. Susu kambing didinginkan hingga suhu 45 °C.
3. Susu kambing hasil pasteurisasi sebanyak 100 mL diinokulasi dengan *starter yóourmet* sebanyak 0,35 gram dan dikocok hingga homogen.



4. Susu kambing yang telah homogen ditutup menggunakan *aluminium foil* dan diinkubasi dengan menggunakan inkubator pada suhu 45 °C hingga pH mencapai 4,0-4,5. Diagram alir pembuatan *starter* dapat dilihat pada **Lampiran E.1**.

#### 3.4.2.2 Pembuatan Yogurt Susu Kambing

Langkah kedua pembuatan kasein yogurt susu kambing adalah pembuatan yogurt dengan tahapan sebagai berikut [36]:

1. Susu kambing sebanyak 500 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL, ditutup menggunakan *aluminium foil* dan dilakukan pasteurisasi pada suhu 72 °C selama lima menit.
2. Susu kambing didinginkan hingga suhu 45 °C.
3. Susu kambing hasil pasteurisasi sebanyak 480 mL diinokulasi dengan *starter yógourmet* sebanyak 3% dan dikocok hingga homogen.
5. Susu kambing yang telah homogen ditutup menggunakan *aluminium foil* dan diinkubasi dengan menggunakan inkubator pada suhu 45 °C hingga pH mencapai 4,5-5,0. Diagram alir pembuatan yogurt susu kambing dapat dilihat pada **Lampiran E.2**.

#### 3.4.2.3 Isolasi Kasein Yogurt Susu Kambing

Langkah ketiga pembuatan kasein yogurt susu kambing adalah isolasi kasein dengan tahapan sebagai berikut [37]:

1. Yogurt susu kambing disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm pada suhu 5 °C selama 10 menit.
2. Yogurt susu kambing hasil sentrifugasi disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan endapan (kasein) dengan supernatan (WSE). Diagram alir isolasi kasein yogurt susu kambing dapat dilihat pada **Lampiran E.3**.

Kasein yang diperoleh diubah menjadi bubuk dengan menggunakan metode *freeze drying* agar lebih tahan lama dan disimpan pada suhu 4-5 °C.

### 3.4.3 Pemberian Kasein Yogurt Susu Kambing

Pemberian kasein yogurt susu kambing dilakukan secara peroral melalui sonde lambung berdasarkan penghitungan dosis yang dapat dilihat pada **Lampiran D.1**. Setiap tikus diberi kasein yogurt susu kambing yang dilarutkan dengan air *Reverse Osmosis* (RO) sebanyak 1 mL selama 21 hari pada pukul 09.00 WIB.

### 3.4.4 Induksi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

Induksi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) dilakukan secara peroral melalui sonde lambung berdasarkan penghitungan dosis yang dapat dilihat pada **Lampiran D.2**. Setiap tikus diinduksi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) yang dilarutkan dengan minyak jagung sebanyak 1 mL selama 21 hari pada pukul 13.00 WIB.

### 3.4.5 Pembedahan Hewan Coba dan Isolasi Organ Jejunum

Isolasi organ jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-22. Proses pembedahan dilakukan dengan cara dislokasi pada leher, kemudian tikus ditelentangkan pada papan pembedahan untuk dilakukan pembedahan pada bagian perut. Selanjutnya organ jejunum diisolasi dan dibilas menggunakan NaCl-fisiologis 0,9% lalu disimpan dalam larutan *Phosphate Buffer Saline* azida (PBS-azida) pH 7,4 agar protein di dalam organ tidak rusak kemudian disimpan di *refrigerator*. Diagram alir pembedahan hewan coba dan isolasi organ jejunum dapat dilihat pada **Lampiran E.4**.

### 3.4.6 Pengukuran Kadar Malondialdehida (MDA)

#### 3.4.6.1 Pembuatan Kurva Baku Malondialdehida

Langkah awal pembuatan kurva baku malondialdehida adalah masing-masing larutan baku malondialdehida variasi konsentrasi 0,1,2,3,4,5,6,7, dan 8 µg/mL diambil sebanyak 100 µL dan dimasukkan ke dalam tabung *microtube eppendorf* yang berbeda, selanjutnya ditambahkan 550 µL akuades. Setiap larutan baku ditambahkan larutan TCA 4% sebanyak 100 µL, larutan HCl 1 N sebanyak 250 µL dan Na-Thio 1% sebanyak 100 µL, selanjutnya dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Tabung *microtube eppendorf*

dibungkus dengan *aluminium foil* agar terhindar dari fluoresensi. Kemudian diinkubasi di penangas air dengan posisi terapung pada suhu 100 °C selama 30 menit, selanjutnya didinginkan pada suhu ruang. Dilakukan pengukuran absorbansi larutan baku MDA konsentrasi 4 µg/mL pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 510-580 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{max}$ ). Nilai  $\lambda_{max}$  digunakan untuk membuat kurva baku MDA dan menentukan nilai absorbansi larutan baku MDA variasi konsentrasi 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7, dan 8 µg/mL [38]. Diagram alir pembuatan kurva baku Malondialdehida (MDA) dapat dilihat pada **Lampiran E.5**.

#### 3.4.6.2 Pengukuran Kadar Malondialdehida

Kadar Malondialdehida (MDA) dapat ditentukan dengan metode *Thiobarbituric Acid* (TBA), karena TBA memiliki nilai kepekaan yang cukup tinggi terhadap radikal bebas dan efektif untuk sampel dalam berbagai tahapan [39]. Tahap pertama yang dilakukan adalah organ jejunum sebanyak 0,5 gram dihaluskan menggunakan mortar dingin yang diletakkan di atas balok es dengan ditambahkan sedikit pasir kuarsa. Kemudian ditambahkan NaCl-fisiologis 0.9% sebanyak 100 µL. Selanjutnya homogenat dimasukkan ke dalam tabung *microtube eppendorf* lalu disonikasi selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm pada suhu 25 °C selama 20 menit. Setelah itu, supernatan diambil sebanyak 100 µL dan ditambah akuades sebanyak 550 µL, larutan TCA 10% sebanyak 100 µL, larutan HCl 1 N sebanyak 250 µL, dan Na-Thio 1% sebanyak 100 µL. Setiap tabung *microtube eppendorf* dibungkus menggunakan *aluminium foil* dan setiap penambahan reagen dilakukan homogenisasi menggunakan vortex. Kemudian dilakukan inkubasi menggunakan penangas air dengan posisi terapung pada suhu 100 °C selama 30 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 25 °C selama 10 menit dan didinginkan pada suhu ruang. Setelah itu, dilakukan pengukuran absorbansi sampel pada panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{max}$ ) menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk uji TBA dan diplotkan

pada kurva baku malonialdehida yang telah dibuat untuk mengetahui konsentrasi sampel. Diagram alir pengukuran kadar malondialdehida dapat dilihat pada **Lampiran E.6**.

### 3.4.7 Pengukuran Aktivitas Protease

#### 3.4.7.1 Isolasi Protease

Langkah awal isolasi protease adalah organ jejunum sebanyak 0,3 gram dihaluskan menggunakan mortar dingin yang diletakkan di atas balok es dengan ditambahkan sedikit pasir kuarsa. Kemudian ditambahkan larutan PBS-*Tween*:PMSF (9:1) sebanyak lima kali volume sampel dan dihaluskan. Selanjutnya dimasukkan ke tabung *microtube eppendorf* dan disonikasi selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 25 menit. Setelah itu, supernatan dimasukkan ke tabung *microtube eppendorf* lain dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan volume 1:1 dan didiamkan 24 jam hingga terbentuk endapan. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 25 menit. Endapan yang terbentuk dikeringkan hingga bau etanol hilang dan ditambahkan larutan *buffer Tris-HCl* dingin pH 6,5 dingin dengan perbandingan volume 1:1 [40]. Diagram alir isolasi protease dapat dilihat pada **Lampiran E.7**.

#### 3.4.7.2 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Langkah awal pembuatan kurva baku tirosin adalah masing-masing larutan baku tirosin konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 16, 18, dan 20 ppm diambil sebanyak 1 mL dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{max}$ ) 275 nm [41]. Diagram alir pembuatan kurva baku tirosin dapat dilihat pada **Lampiran E.8**.

#### 3.4.7.3 Pengukuran Aktivitas Protease

Prosedur untuk mengukur aktivitas protease menggunakan metode Walter (1984). Langkah awal yaitu kasein 500 ppm diambil sebanyak 100  $\mu$ L, lalu ditambahkan larutan *buffer* fosfat pH 7 sebanyak 150  $\mu$ L dan enzim protease 50  $\mu$ L. Kemudian diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 60 menit. Selanjutnya

ditambahkan larutan TCA 4% sebanyak 200  $\mu\text{L}$  dan didiamkan pada suhu ruang. Masing-masing tabung *microtube eppendorf* dibungkus menggunakan *aluminium foil*. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 200  $\mu\text{L}$  dan ditambah larutan *buffer* fosfat sebanyak lima kali volume supernatan, lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{max}}$ ) 275 nm. Diagram alir Pengukuran aktivitas protease dapat dilihat pada **Lampiran E.9**. Pengukuran aktivitas protease dihitung berdasarkan rumus [40]:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times \text{fp}$$

Keterangan:

- v = Volume total sampel
- p = Jumlah enzim
- q = Waktu inkubasi
- fp = Faktor pengenceran

### 3.4.8 Analisis Data

Analisis data kadar Malondialdehida (MDA) dan aktivitas protease menggunakan IBM SPSS *statistics* 23 dengan melakukan uji Analisis Ragam *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dan uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ)/*Tukey* dengan  $\alpha=0,05$  untuk membandingkan seluruh pasangan rata-rata perlakuan.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pengaruh Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Jejunum Tikus Hasil Induksi 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

Uji kadar malondialdehida (MDA) dilakukan menggunakan metode *Thiobarbituric Acid* (TBA) yang bertujuan untuk mengetahui potensi kasein yogurt susu kambing dalam mengurangi tingkat stres oksidatif pada jejunum tikus hasil induksi 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Hasil pengukuran kadar Malondialdehida jejunum tikus *Rattus norvegicus* secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran G**.

**Tabel 4.1:** Profil MDA jejunum tikus hasil induksi 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) dan pasca terapi

Kelompok	Rata-rata Kadar MDA (µg/mL)	Kadar MDA (%)	
		Peningkatan terhadap kelompok normal	Penurunan terhadap kelompok TCDD
Normal	4,091±0,089 <sup>a</sup>	-	-
TCDD	6,244±0,037 <sup>c</sup>	52,63	-
Terapi 300 mg/kg BB	5,024±0,048 <sup>b</sup>	-	19,38
Terapi 600 mg/kg BB	5,169±0,057 <sup>b</sup>	-	17,21
Terapi 900 mg/kg BB	5,378±0,085 <sup>b</sup>	-	13,87

Keterangan: Notasi huruf kecil menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antar kelompok perlakuan menggunakan uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ)/Tukey dengan  $\alpha=0,05$

Analisis data dilakukan menggunakan IBM SPSS *statistics* 23 dengan uji analisis ragam *One Way ANOVA* dan diperoleh perbedaan yang sangat nyata antar perlakuan kemudian dilakukan uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ)/Tukey dengan  $\alpha=0,05$  untuk membandingkan seluruh pasangan rata-rata perlakuan dan diperoleh hasil perbedaan yang sangat nyata antar perlakuan dengan nilai  $F_{hitung} > F_{tabel} 1\%$ .

Berdasarkan **Tabel 4.1** diketahui nilai kadar malondialdehida organ jejunum tikus kelompok normal (A) adalah  $4,091 \pm 0,089$   $\mu\text{g/mL}$  yang menunjukkan standar nilai kadar malondialdehida dalam keadaan normal. Apabila dibandingkan dengan kadar malondialdehida tikus kelompok TCDD (B) maka terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ). TCDD termasuk dalam golongan zat xenobiotik yang dapat masuk ke dalam tubuh 90% melalui bahan pangan karena bersifat lipofilik. TCDD akan berikatan dengan reseptor Ah dan masuk ke dalam sel lalu membentuk heterodimer dengan Arnt (*Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator*) yang menstimulasi sitokrom P450 sehingga meningkatkan jumlah isozim yang berperan dalam detoksifikasi dan aktivasi metabolik bahan kimia. Selama proses metabolisme TCDD pada fase I (reaksi fungsionalisasi) terjadi reaksi oksidasi, reduksi, dan hidrolisa yang menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS menyebabkan kerusakan pada makromolekul, yang paling rentan diserang adalah asam lemak tak jenuh seperti asam lemak tak jenuh panjang (*Poly Unsaturated Fatty Acid* atau PUFA). Target ROS adalah ikatan ganda karbon-karbon dari PUFA. Ikatan ganda ini akan melemahkan ikatan karbon hidrogen dan memudahkan pemindahan hidrogen oleh radikal bebas, kemudian ROS akan memisahkan atom hidrogen yang akan membentuk radikal lipid ( $L\cdot$ ) yang akan mengalami penggabungan dengan  $O_2$  menghasilkan  $OH\cdot$ . Radikal ini akan bereaksi dengan PUFA yang lainnya dengan memindahkan satu elektron yang menghasilkan lipid hidroperoksida. Senyawa yang dihasilkan dari peroksidasi lipid adalah malondialdehida semakin banyak ROS maka akan semakin banyak juga malondialdehida yang terbentuk [14]. Hal ini menunjukkan induksi TCDD dapat meningkatkan kadar malondialdehida yang dibuktikan dengan tingginya nilai kadar malondialdehida organ jejunum tikus kelompok TCDD (B) yaitu  $6,244 \pm 0,037$   $\mu\text{g/mL}$ .

Berdasarkan hasil analisis statistika, diketahui bahwa pemberian terapi kasein yogurt susu kambing (C, D, dan E) tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian terapi kasein yogurt susu kambing dosis 300 mg/kg BB ( $5,024 \pm 0,048$   $\mu\text{g/mL}$ ), 600 mg/kg BB ( $5,169 \pm 0,057$   $\mu\text{g/mL}$ ), dan dosis 900 mg/kg BB ( $5,378 \pm 0,085$   $\mu\text{g/mL}$ ) memiliki potensi yang sama untuk menurunkan kadar malondialdehida. Kasein berperan sebagai antioksidan non-enzimatik yaitu pengkelat logam transisi (*chelating agent*) karena mampu mengikat ion logam  $Fe^{2+}$ . Ion  $Fe^{2+}$  mudah



bereaksi dengan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang mudah larut dalam lemak dan menghasilkan radikal hidroksil ( $OH\bullet$ ) dalam reaksi fenton sebagai berikut :  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH\bullet$ . Dengan adanya kasein yogurt susu kambing maka jumlah  $Fe^{2+}$  akan berkurang dan jumlah radikal hidroksil ( $OH\bullet$ ) yang berperan sebagai inisiator dalam peroksidasi lipid juga berkurang sehingga kadar malondialdehida sebagai hasil akhir peroksidasi lipid juga berkurang.

#### 4.2 Pengaruh Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Aktivitas Protease Jejunum Tikus Hasil Induksi 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

Uji aktivitas enzim protease hasil isolasi organ jejunum dilakukan menggunakan metode Walter yang bertujuan untuk mengetahui potensi kasein yogurt susu kambing dalam memperbaiki kerusakan jaringan jejunum hasil induksi 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Hasil pengukuran aktivitas enzim protease jejunum tikus *Rattus norvegicus* secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran H**.

**Tabel 4.2:** Aktivitas protease jejunum tikus hasil induksi 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) dan pasca terapi

Kelompok	Rata-rata Aktivitas Protease ( $\mu\text{mol/mL.menit}$ )	Aktivitas Protease (%)	
		Peningkatan terhadap kelompok normal	Penurunan terhadap kelompok TCDD
Normal	0,028 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	-	-
TCDD	0,104 $\pm$ 0,002 <sup>c</sup>	271,43	-
Terapi 300 mg/kg BB	0,077 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup>	-	25,96
Terapi 600 mg/kg BB	0,069 $\pm$ 0,005 <sup>b</sup>	-	33,65
Terapi 900 mg/kg BB	0,077 $\pm$ 0,005 <sup>b</sup>	-	25,96

Keterangan: Notasi huruf kecil menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antar kelompok perlakuan menggunakan uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ)/Tukey dengan  $\alpha=0,05$

Analisis data dilakukan menggunakan IBM SPSS *statistics* 23 dengan uji analisis ragam *One Way ANOVA* diperoleh perbedaan yang sangat nyata antar perlakuan dan dilakukan uji lanjutan Beda





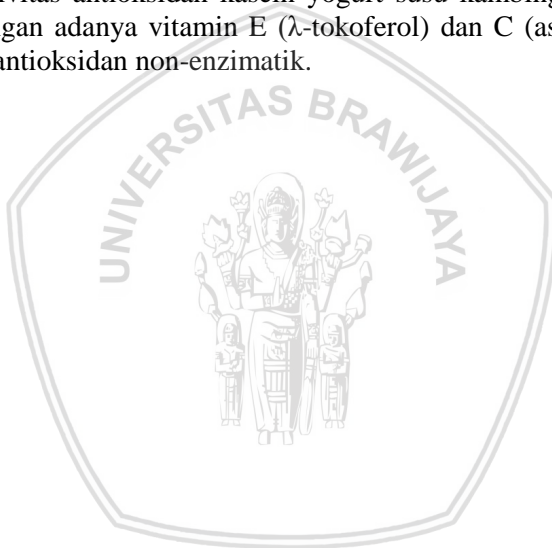
Nyata Jujur (BNJ)/Tukey dengan  $\alpha=0.05$  untuk membandingkan seluruh pasangan rata-rata perlakuan dan diperoleh hasil perbedaan yang sangat nyata antar perlakuan dengan nilai  $F_{hitung} > F_{tabel} 1\%$ .

Berdasarkan **Tabel 4.2** diketahui aktivitas protease organ jejunum tikus normal (A) adalah  $0,028 \pm 0,0034 \mu\text{mol/mL.menit}$  yang menunjukkan standar aktivitas protease dalam keadaan normal. Apabila dibandingkan dengan aktivitas protease tikus TCDD (B) maka terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ). Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai banyaknya mikro mol tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida pada protein oleh protease hasil isolasi organ jejunum. *Reactive Oxygen Species* (ROS) berlebih di dalam tubuh akibat induksi TCDD akan mengaktifkan NF- $\kappa$ B yang berfungsi untuk mengaktifkan makrofag. Makrofag berfungsi untuk mensintesis sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$  dan interleukin 1 (IL-1) yang menyebabkan pelepasan enzim protease sebagai respon terjadinya kerusakan sel. Enzim protease berlebih akan menyebabkan kematian sel yang diiringi dengan kebocoran akibat pecahnya membran (nekrosis), sehingga jumlah enzim ekstrasel akan lebih besar dibandingkan intrasel. Peroksidasi lipid menyebabkan kekuatan membran berkurang sehingga akan mempermudah terjadinya nekrosis [42]. Semakin tinggi jumlah enzim protease maka kerusakan sel juga semakin tinggi. Hal ini menunjukkan induksi TCDD dapat meningkatkan aktivitas protease yang dibuktikan dengan tingginya nilai aktivitas protease organ jejunum tikus kelompok TCDD (B) yaitu  $0,104 \pm 0,002 \mu\text{mol/mL.menit}$ .

Berdasarkan hasil analisis statistika, diketahui bahwa pemberian terapi kasein yogurt susu kambing (C, D dan E) tidak memiliki perbedaan yang nyata. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian terapi kasein yogurt susu kambing dosis 300 mg/kg BB ( $0,104 \pm 0,002 \mu\text{mol/mL.menit}$ ) dan kasein yogurt susu kambing dengan dosis 600 mg/kg BB ( $0,069 \pm 0,005 \mu\text{mol/mL.menit}$ ) dan dosis 900 mg/kg BB ( $0,077 \pm 0,005 \mu\text{mol/mL.menit}$ ) memiliki potensi yang sama untuk menurunkan aktivitas protease. Gugus fosfat pada kasein berperan sebagai antioksidan karena mampu mendonorkan atom  $H^+$  sehingga radikal menjadi senyawa yang tidak reaktif [43]. Aktivitas ini didukung dengan adanya peptida bioaktif yaitu fosfopeptida yang berperan untuk menghambat peroksidasi lipid secara enzimatik dan non-enzimatik dan sebagai *radical-scavenger* [44, 45]. Berkurangnya

ROS akan menyebabkan aktivitas protease berkurang karena kerusakan sel berkurang.

Potensi kasein yogurt susu kambing sebagai antioksidan diuji menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1- difenil-2-pikrihidazil) dan dinyatakan dalam nilai konsentrasi efektif ( $IC_{50}$ ). Ada 4 kategori aktivitas antioksidan, yaitu sangat kuat ( $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ), kuat ( $IC_{50} 50-100 \mu\text{g/mL}$ ), sedang ( $IC_{50} 100-150 \mu\text{g/mL}$ ), dan lemah ( $IC_{50} 151-200 \mu\text{g/mL}$ ) [46]. Hasil aktivitas antioksidan kasein yogurt susu kambing adalah  $4,52 \mu\text{g/mL}$  sehingga termasuk dalam kategori sangat kuat. Semakin kecil nilai aktivitas antioksidan maka semakin kuat kemampuannya sebagai antioksidan. Tingginya nilai aktivitas antioksidan kasein yogurt susu kambing dipengaruhi juga dengan adanya vitamin E ( $\lambda$ -tokoferol) dan C (asam askorbat) sebagai antioksidan non-enzimatis.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Terapi kasein yogurt susu kambing dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB mampu menurunkan kadar malondialdehida (MDA) tikus hasil induksi 2,3,7,8-*Tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) pada tikus dengan persentase yang tidak berbeda secara signifikan yaitu 19,38%, 17,21%, dan 13,87%.
2. Terapi kasein yogurt susu kambing dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB mampu menurunkan aktivitas protease tikus hasil induksi 2,3,7,8-*Tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) pada tikus dengan persentase yang tidak berbeda secara signifikan yaitu 25,96%, 33,65%, dan 25,96%.

#### 5.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis yang lebih efektif untuk menangani keracunan 2,3,7,8-*Tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD)

## DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. (2002). Polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls, In: Safety evaluations of certain food additives and contaminants. Retrieved from <http://www.inchem.org/document/jecfa/jecmono/y48je20.htm>, diakses pada 4 januari 2018.
2. Scheter, A., Birnbaum, J. J., R., & J. D., C. (2005). Dioxins: An Overview. *Review Environmental Research*, 1–10.
3. Kitts, D., & K., W. (2003). Bioactive Proteins and peptides from Food sources. Applications of Bioprocesses Used in Isolation and Recovery. *Pharmaceutica Design*, 9, 1309–1323.
4. Miesel, H. (2005). Biochemical Properties of Peptides Encrypted in Bovine Milk proteins. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1905–1919.
5. Awemu, E. M. I., J.R., L., & X., Z. (2009). Bioactive Components in Yogurt Products. *Bioactive Components in Milk and Diary*, 235–250.
6. Wulansari, D., & Chairul. (2011). Penapisan Aktivitas Antioksidan dan Beberapa Tumbuhan Obat Indonesia Menggunakan Radikal 2,2-diphenyl-1 picrylhydrazyl (DPPH). *Majalah Pbat Tradisional*, 16 (1), 22–25.
7. Jeyabalan, A., & Caritis, S. N. (n.d.). Antioxidant and The Prevention of Preklamsia-Unresolved Issues. *New England J Med*, 354 (17), 1841–3.
8. Akhtaruzzaman, M., Mozumder, N. R., Jamal, R., Rahman, A., & Rahman, T. (2012). Isolation and characterization protease enzyme from leguminous seeds. *Agric. Sci. Res. J*, 2, 434–440.
9. Wati, W. K., Wurlina, & Sarmanu. (2014). Potensi Vitamin E terhadap Jumlah Sel Spermatogenik pada Mencit yang Terpapar 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).

- Veterinaria Medika*, 7, No. 3. Retrieved from <http://journal.unair.ac.id/download-fullpapers-vetmed3d87839cd6full.pdf>
10. Baend Aprillidya S, Masdiana C. Padaga, & Dyah Ayu Oktavianie. (n.d.). Pengaruh Terapi Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) dan Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipertensi Induksi Deoxycorticosterone Acetate (DOCA)-Salt. *Program Studi Kedokteran Hewan, Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya*.
  11. Program (NTP) (NIH), N. T. (2011). *Report on Carcinogens (12th Ed.)*. DIANE Publishing.
  12. Kociba, R. J., & Schwetz, B. A. (1982). Toxicity of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Drug Metabolism Reviews*, 13(3), 387–406. doi:10.3109/03602538209029986
  13. Pohjanvirta, R. (2011). *The AH Receptor in Biology and Toxicology*. John Wiley & Sons.
  14. Rebourcet, D., Odet, F., Vérot, A., Combe, E., Meugnier, E., Pesenti, S., ... Le Magueresse-Battistoni, B. (2010). The effects of an in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo- p - dioxin on male reproductive function: identification of Ccl5 as a potential marker. *International Journal of Andrology*, 33(2), 413–424. doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01020.x
  15. Pubchem. (n.d.). TCDD. Retrieved February 14, 2018, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15625>
  16. Doi, H., T., B., C., T., & K., N. (2003). Functional Activation of Arylhydrocarbon Receptor (AhR) in Primary T Cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Chemosphere Journal*, 52, 655–662.
  17. Kulkarni, P. S., J.G., C., & C. A. M., A. (2008). Dioxins Sources and Current Remediation Technologies-A Review. *Environment International Journal*, 24, 139–153.

18. Ebtekar, M. (2004). Effects of Persistent Organic Polutants on the Immune System: the Case of Dioxin. *Iranian Journal Environmental Health Science Eng.*, 1 (2), 1–7.
19. Wisdom, S. G. O., & R.W., N. (2012). Dioxin Effects on Human Health-A Review. *Journal of Global Biosciences*, 1.
20. Park, Y. W. (2009). In *Bioactive Components In Goat Milk*. Singapore: Willey-Blackwell.
21. Park YW, Ju´arez M, M, R., & Haenlein GFW. (2007). Physico-chemical Characteristics of Goat and Sheep Milk. *Small Ruminant Res.*, 68, 88–113. doi::10.1016/j.smallrumres.2006.09.013
22. Arora Neha, Garg Tarun, & Bilandi Ajay. (2011). Review On Casein Production And casein Based Nano-formulation. *10 January 2012*, 3(1), 41–45.
23. Pubchem. (n.d.). Casein. Retrieved June 27, 2018, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73995022>
24. Widiartini, W., Siswati, E., Setiyawati, A., Rohmah, I. M., & Prastyo, E. (2013). Pengembangan usaha produksi tikus putih (*Rattus norvegicus*) tersertifikas dalam upaya memenuhi kebutuhan hewan laboratorium. *Program Kreativitas Mahasiswa-Kewirausahaan*.
25. Smith, J. B., & S., M. (1988). *Pemeliharaan, Pembiakan Dan Penggunaan Hewan Percobaan Di Daerah Tropis*. Jakarta: UI Press.
26. Norway rat (*Rattus norvegicus*) longevity, ageing, and life history. (n.d.). Retrieved February 19, 2018, from [http://genomics.senescence.info/species/entry.php?species=Rattus\\_norvegicus](http://genomics.senescence.info/species/entry.php?species=Rattus_norvegicus)

27. Durgin, J. M., & Hanan, Z. I. (2005). *Thomson Delmar Learning's Pharmacy Practice for Technicians*. Cengage Learning.
28. Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K., & Jouyban, A. (2015). Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts : BI*, 5(3), 123–127. doi:10.15171/bi.2015.20
29. Hwang, H.-S. (2017). *Advances in NMR Spectroscopy for Lipid Oxidation Assessment*. Springer.
30. Salleh, A. B., Rahman (Raja.), N. Z. R. A., & Basri, M. (2006). *New Lipases and Proteases*. Nova Publishers.
31. Khumar, V., Ramzi, & R.L., S. (n.d.). *Robins Buku Ajar Patologi* (7th ed., Vol. 1). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
32. Wirahadikusumah, M. (2001). *Biokimia Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*. Bandung: ITB.
33. Notoatmodjo, S. (2012). *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rinekepta.
34. Putri, W. S. (2017). Pengaruh Beban Latihan-renang Tunggal Dan Berulang Berlebihan Terhadap Kadar Malondialdehid (Mda) Plasma Pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Jantan Galur Wistar. *Jurnal Mahasiswa Fakultas Kedokteran Untan*, 5(1).
35. Wahyuningrum, M. R., & Probosari, E. (2012). *Pengaruh pemberian buah pepaya (*carica papaya l.*) terhadap kadar trigliserida pada tikus sprague dawley dengan hiperkolesterolemia* (PhD Thesis). Diponegoro University.
36. Posecion, N. C., Crowe, N. ., Robinson, A. R., & Asiedu, S. K. (2005). The Development Of A Goat's Milk Yogurt. *Journal of the science of Food and Agriculture*, (85(11)), 1909–1913.

37. Padaga, M., Aulanni'am, Sujuti, H., & Widodo. (2015). Blood Pressure Lowering Effect and Antioxidative Activity of Casein Derived from Goat Milk Yogurt in DOCA-salt Hypertensive Rats. *International Journal of PharmTech Research*, (8 (6)), 322–330.
38. Utami, N. B., Agustina, D., & Efendi, E. (2018). The Correlation between Administration of Alpha Lipoic Acid and Malondialdehyde Level on Traumatic Brain Injury Model Rat's Brain. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 4(1), 31–37.
39. Andriyani, M. M. (2014). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Bawang Mekah (Eleutherine Americana Merr.) Terhadap Kadar Malondialdehyde (Mda) Tikus (Rattus Norvegicus) Wistar Jantan Pasca Paparan Asap Rokok. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 1(1).
40. Aulanni'am. (2004). *Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul*. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press.
41. Yusriah, Y., & Kuswyasari, N. D. (2013). Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease Penicillium sp. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 2(1), E48–E50.
42. Manning Jr, R.D., Tian, N., & S. Meng. (2005). Oxidative Stress and Antioxidant Treatment in Hypertension and The Associated Renal Damage. *Am J Nephrol*, 25, 311–317.
43. Kitts, D. D. (2005). Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. *Trends in Food Science & Technology*, 16(12), 549–554. doi:10.1016/j.tifs.2005.08.009
44. Suetsuna, K., Ukeda, H., & Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(3), 128–131. doi:10.1016/S0955-2863(99)00083-2
45. Park, Y. W., & Nam, M. S. (2015). Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Korean Journal for Food*



*Science of Animal Resources*, 35(6), 831–840.  
doi:10.5851/kosfa.2015.35.6.831

46. Badarinath A, Rao K, Chetty CS, Ramkanth S, Rajan T, & Gnanaprakash K. (2010). A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations, and Considerations. *International Journal of PharmTech Research*  
*International Journal of PharmTech Research*, 1276–1285.

