

**PERANAN YOGHURT TERHADAP PERUBAHAN
KADAR HORMON TIROKSIN (T₄) dan PROFIL
PITA PROTEIN TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL *AUTOIMMUNE THYROIDITIS*
INDUKSI NATRIUM IODIDA (NaI)**

SKRIPSI

Oleh:
RIZKI ROSMALLASARI
0911310060



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

**PERANAN YOGHURT TERHADAP PERUBAHAN
KADAR HORMON TIROKSIN (T₄) dan PROFIL
PITA PROTEIN TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL *AUTOIMMUNE THYROIDITIS*
INDUKSI NATRIUM IODIDA (NaI)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
RIZKI ROSMALLASARI
0911310060



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Peranan Yoghurt Terhadap Perubahan Kadar Hormon Tiroksin (T4)
dan Profil Pita Protein Tikus (*Rattus norvegicus*) Model
Autoimmune Thyroiditis Induksi Natrium Iodida (NaI)

Oleh :
Rizki Rosmallasari
0911310060

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 28 Oktober 2013
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
RIZKI ROSMALLASARI
0911310060

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, MS
NIP. 19650616 199111 1 001

drh. Analis Wisnu Wardhana, M. Biomed
NIP. 19800904 200812 1 001

Mengetahui,
Ketua Program Program Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter
Hewan Program Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, MS
NIP. 19650616 199111 1 001

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Rizki Rosmallasari
NIM : 0911310060
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul : Peranan Yoghurt Terhadap Perubahan Kadar Hormon Tiroksin (T₄) dan Profil Pita Protein Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Autoimmune Thyroiditis* Induksi Natrium Iodida (NaI)

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, November 2013

Yang menyatakan,

Rizki Rosmallasari

0911310060

**Peranan Yoghurt Terhadap Perubahan Kadar Hormon Tiroksin (T₄) dan
Profil Pita Protein Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model *Autoimmune
Thyroiditis* Induksi Natrium Iodida (NaI)**

ABSTRAK

Autoimmune Thyroiditis (AITD) merupakan salah satu penyakit autoimun yang terjadi pada organ spesifik kelenjar tiroid dan ditandai oleh infiltrasi sel-sel limfositik karena mekanisme inflamasi yang diikuti abnormalitas hormon tiroid akibat kerusakan jaringan tiroid. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat keparahan penyakit AITD pada tikus (*Rattus norvegicus*) model AITD induksi Natrium Iodida (NaI) berdasarkan perubahan kadar hormon tiroksin (T₄) dan ekspresi protein pada gambaran profil pita protein serum. Hewan model AITD dibuat dengan induksi NaI 0,05% yang dilarutkan dalam aquades dan diberikan melalui air minum secara *ad libitum*. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus yang dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol (P₀), kelompok AITD induksi NaI 0,05% (P₁) dan kelompok AITD yang diberi terapi yoghurt dosis 10⁹ cfu/mL 1 mL/hari (P₂). Induksi NaI dilakukan selama 5 minggu dan terapi yoghurt selama 4 minggu. Data kualitatif disajikan dan dianalisis secara deskriptif sedangkan data kuantitatif disajikan secara skoring dan dianalisis dengan ANOVA. Hasil pengukuran kadar hormon tiroksin pada P₀ 1,3122 ± 0,1548 ng/mL, P₁ 4,4848 ± 0,32938 ng/mL dan P₂ 1,7028 ± 0,163653 ng/mL. Hasil tersebut menunjukkan pada P₁ terjadi peningkatan kadar hormon T₄ yang signifikan. Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa terdapat ekspresi protein spesifik penanda inflamasi serta autoimun yaitu *C- Reactive Protein* (CRP) pada kelompok P₁. Pada kelompok P₂ tidak menunjukkan ekspresi CRP. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian terapi yoghurt pada AITD mampu menurunkan kadar hormon T₄ sehingga mencapai kadar normal dan mampu mengekspresikan protein yang sama dengan kontrol setelah diberi terapi yoghurt selama 4 minggu.

Kata kunci : *Autoimmune Thyroiditis*, NaI, T₄, profil pita protein, SDS-PAGE, CRP

repository.ub.ac.id

The Role of Yogurt to Change Thyroxine (T₄) Hormone Levels and Protein Profiles on Rat (*Rattus norvegicus*) Autoimmune thyroiditis Models Induced by Supplementation of Sodium Iodide (NaI)

ABSTRACT

Autoimmune thyroiditis (AITD) is one of the autoimmune diseases that occur in specific organs. It is thyroid gland. It's characterized by lymphocytic infiltration of the cells due to inflammatory mechanisms of thyroid hormone abnormalities and followed by damaging of the thyroid tissue. The aim of this research was to determine the severity of AITD in rats (*Rattus norvegicus*) models induced by supplementation of sodium iodide (NaI) based on levels of the thyroxine (T₄) hormone and protein band profile in rat sera. Animal models of AITD were prepared by 0.05% NaI supplementation which dissolved in distilled water and administered by drinking water *ad libitum*. This study used a rat (*Rattus norvegicus*) grouped into 3 groups : control group (P₀), AITD group were induced NaI 0.05 % (P₁) and AITD group which given therapeutic with yogurt 10⁹ cfu/mL/day (P₂). NaI induction were carried out for 5 weeks, meanwhile the therapy were given for 4 weeks. Qualitative data presented and analyzed descriptively while quantitative data presented and analyzed with ANOVA. The measurement of thyroxine hormone levels in P₀ to be 1.3122 ± 0.1548 ng/mL, P₁ to be 4.4848 ± 0.32938 ng/mL and P₂ to be 1.7028 ± 0.163653 ng/mL. These results showed that there were significantly different. SDS - PAGE analysis showed that there was existed specific protein expression of autoimmune inflammatory markers as C-Reactive Protein (CRP) in P₁ samples. On P₂ treatments showed there were not expression of CRP. It can be concluded that the AITD with yogurt therapy could reduce the levels of T₄ hormone to reach normal levels and was able to express the same protein with the same condition to control.

Keywords : Autoimmune thyroiditis , NaI , T₄ , band profiles of proteins , SDS - PAGE , CRP

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberi rahmat dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Peranan Yoghurt Terhadap Perubahan Kadar Hormon Tiroksin (T₄) dan Profil Pita Protein Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model *Autoimmune Thyroiditis* Induksi Natrium Iodida (NaI)”** Penelitian ini merupakan payung penelitian yang diketuai oleh Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, MS sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Ucapan terimakasih terutama kepada :

1. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, MS dan drh. Analis Wisnu Wardhana, M. Biomed selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan petunjuk selama penelitian dan penyelesaian penulisan skripsi ini.
2. Ibu Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., M.P., M.Sc., drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc dan drh. Handayu Untari selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu dan banyak memberikan masukan, saran dan arahan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
3. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, MS selaku Ketua Program Kedokteran Hewan dan ketua tim payung penelitian yang telah membantu memberikan fasilitas dan kemudahan selama penelitian.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan yang telah membantu memberikan fasilitas dan kemudahan selama penelitian.
5. Ibu Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., M.P., M.Sc., selaku dosen pembimbing PKM yang selalu memberikan motivasi, masukan dan saran.

6. Ayahanda Suhartono, Ibunda Daruningsih, adik Sasa dan Tita serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa, kasih sayang, dan dukungan yang tak terhingga sehingga penulis mampu menyelesaikan studi.
7. Supervisor laboratorium Muh. Noer El-Haq bersama asisten lain dan seluruh staf Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian.
8. Tim peneliti AITD khususnya Fitri Amalia Riska, Wakhidatus Inrya, Prima Santi, Dyah Agustini, Adib Mustain, Hendra Legatawa, Bayu Noviaji, Ganendra Awang dan Arif Rahmatullah serta sahabat-sahabat perjuangan 2009 atas persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan, dan mimpi yang luar biasa.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Laporan Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

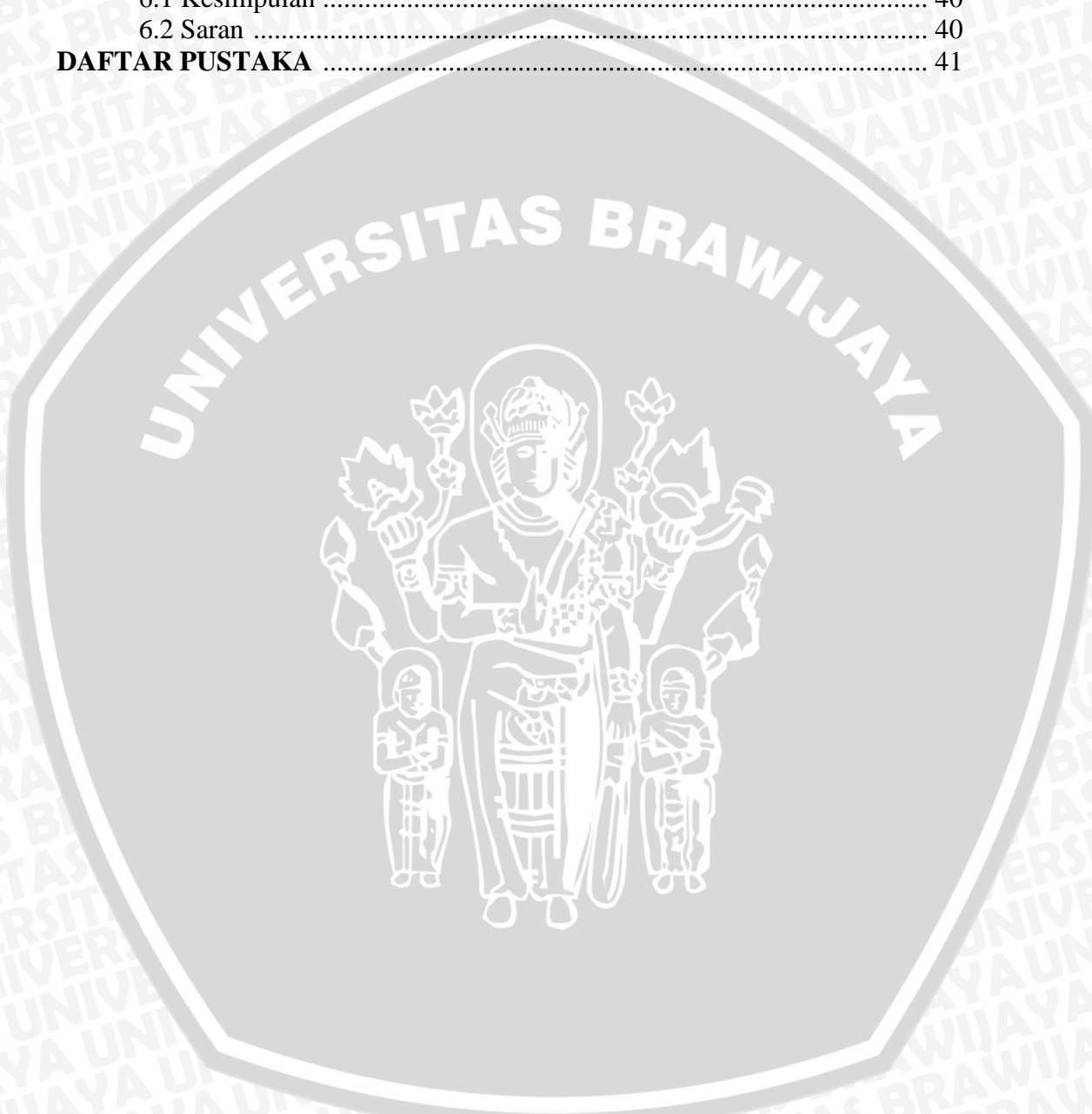
Malang, November 2013

Penulis.

DAFTAR ISI

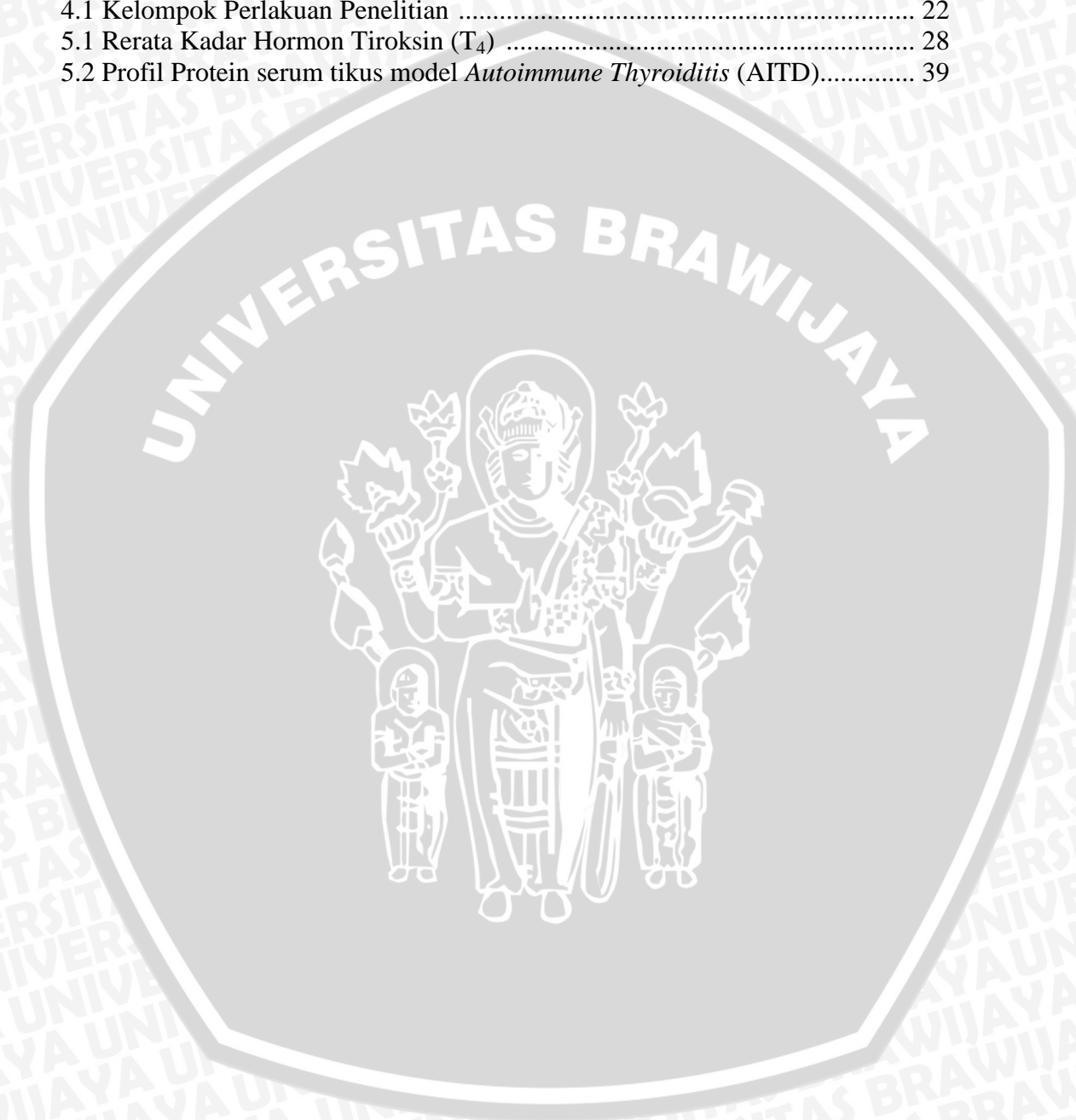
	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Peranan Yogurt Susu Kambing	6
2.2 Hewan Coba Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model AITD	8
2.3 Patomekanisme <i>Autoimmune Thyroiditis</i>	10
2.4 Kadar Hormon Tiroksin (T ₄) pada AITD	12
2.5 Analisa Profil Pita Protein pada Serum Darah Tikus AITD	15
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	17
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	17
3.2 Hipotesis Penelitian	20
BAB 4 METODE PENELITIAN	21
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	21
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	21
4.3 Rancangan Penelitian	22
4.4 Sampel Penelitian	22
4.5 Variabel Penelitian	23
4.6 Tahapan Penelitian	23
4.7 Prosedur Penelitian	23
4.7.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba	23
4.7.2 Penentuan Dosis dan Preparasi NaI	24
4.7.3 Penentuan Dosis dan Preparasi Yoghurt	24
4.7.4 Induksi NaI pada Hewan Model Tikus (<i>Rattus Norvegicus</i>)	25
4.7.5 Pemberian Yoghurt pada Tikus Sebagai Terapi	25
4.7.6 Koleksi Serum Darah dari Tikus (<i>Rattus Norvegicus</i>)	25
4.7.7 Pengukuran Kadar T ₄	26
4.7.8 Gambaran Profil Pita Protein dengan SDS-PAGE	26
4.7.9 Analisis Data	27

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	28
5.1 Kadar Hormon Tiroksin (T ₄) pada <i>Autoimmune Thyroiditis</i>	28
5.2 Gambaran Profil Protein pada <i>Autoimmune Thyroiditis</i> (AITD)	34
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	40
6.1 Kesimpulan	40
6.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41



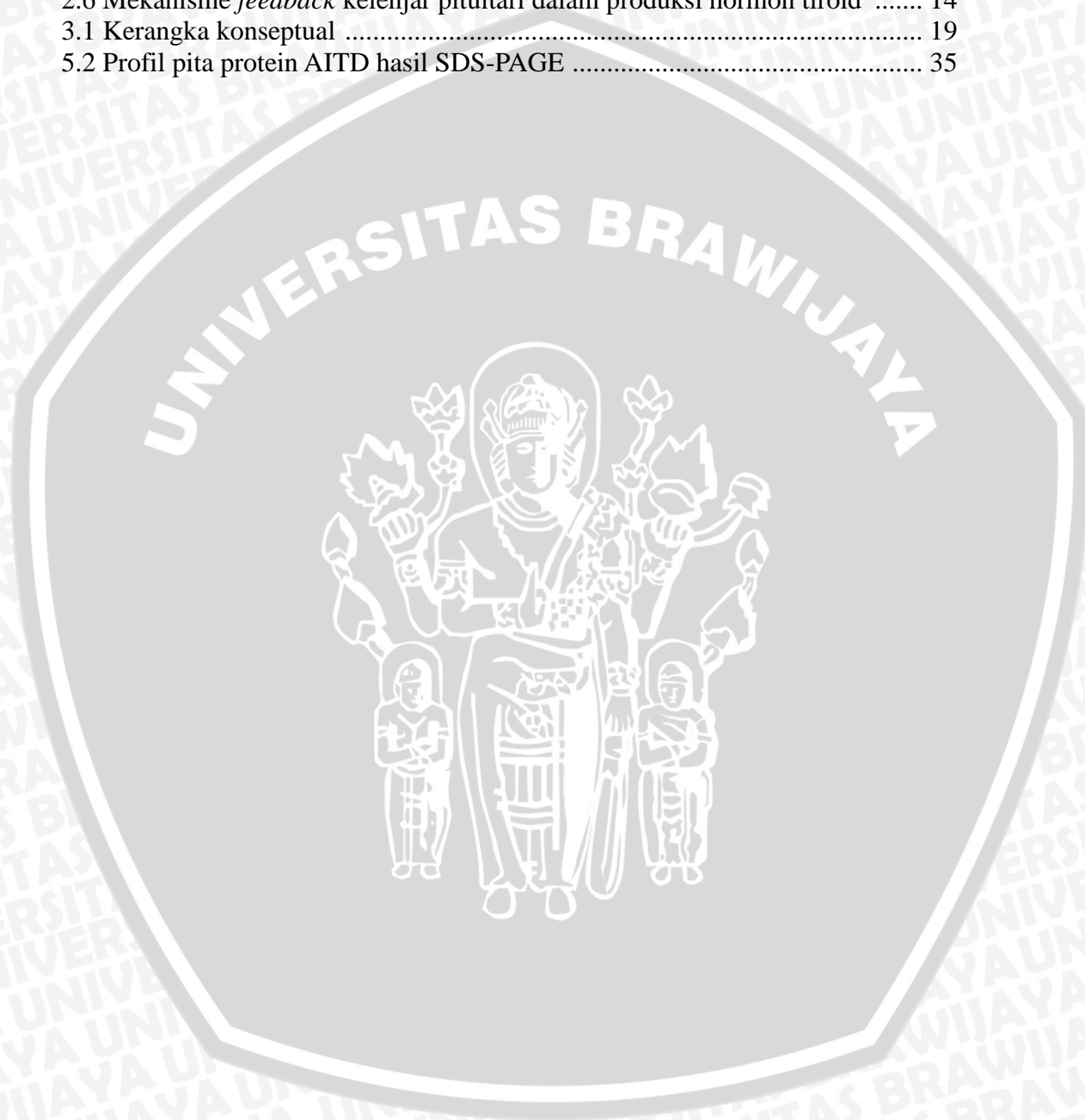
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Perbandingan Komposisi Susu Kambing	8
4.1 Kelompok Perlakuan Penelitian	22
5.1 Rerata Kadar Hormon Tiroksin (T ₄)	28
5.2 Profil Protein serum tikus model <i>Autoimmune Thyroiditis</i> (AITD).....	39



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.4 Proses Sekresi Hormon T ₃ dan T ₄ pada Kelenjar Tiroid	13
2.6 Mekanisme <i>feedback</i> kelenjar pituitari dalam produksi hormon tiroid	14
3.1 Kerangka konseptual	19
5.2 Profil pita protein AITD hasil SDS-PAGE	35



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik	48
Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian	49
Lampiran 3. Skema Jadwal Perlakuan	50
Lampiran 4. Komposisi Ransum Tikus	51
Lampiran 5. Pemeriksaan kadar T ₄ dengan <i>Rodent T₄ ELISA Test Kit</i>	52
Lampiran 6. Koleksi Serum Darah	53
Lampiran 7. Isolasi Protein Serum	54
Lampiran 8. Pemeriksaan Profil Pita Protein Dengan Metode SDS – PAGE ..	55
Lampiran 9. Diagram Alir Pembuatan Yoghurt	58
Lampiran 10. Monitoring Pembuatan Yoghurt	59
Lampiran 11. Platting Yoghurt	61
Lampiran 12. Hasil Analisa Perubahan Kadar Hormon T ₄ dan Uji Statistik ...	62
Lampiran 13. Perhitungan Berat Molekul Protein	65



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

AITD	: <i>Autoimmune Thyroiditis</i>
ANA	: <i>Antinuclear Antibody</i>
BAL	: Bakteri Asam Laktat
BM	: Berat Molekul
BNJ	: Beda Nyata Jujur
CBB	: <i>Coomassie Brilliant Blue</i>
cfu/ml	: <i>Colony forming unit per mili liter</i>
CRP	: <i>C- Reactive Protein</i>
DIT	: Diiidotironin
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Hp	: Haptoglobin
I	: Iodida
IFN	: Interferon
IL	: Interleukin
kDa	: kilo Dalton
LSD	: <i>Loves Significant different</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIT	: Monoiodotironin
µg/dl	: Mikrogram per desi liter
µl	: Mikro liter
mL	: mililiter
mg/dL	: miligram per desi liter
NaI	: <i>Natrium Iodida</i>
ng/dL	: nanogram per desi liter
PE	: Peranakan Etawa
PBS	: <i>Phospat Buffer Saline</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Spesies</i>
RSB	: <i>Reducing Sample Buffer</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Duodecyl Sulphate– Polyacrilamid Gel Electrophoresis</i>
T3	: <i>Triiodothyronine</i>
T4	: <i>Tyroxine</i>
T4 HRP	: <i>Tiroksin Horse Radish Peroksidase</i>
TG	: <i>Thyroglobulin</i>
Th	: <i>T-helper</i>
Th1	: <i>T-helper 1</i>
Th2	: <i>T-helper 2</i>
TMB	: <i>Tetramethylbenzidine</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TPO	: <i>Tyroxine Peroxidase</i>
TSH	: <i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
TSH-R	: <i>Thyroid Stimulating Hormone Reseptor</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Autoimmune thyroiditis (AITD) merupakan salah satu dari penyakit autoimun yang banyak ditemukan di dunia. Penyakit ini adalah penyakit autoimun yang bersifat organ spesifik pada kelenjar tiroid dan ditandai oleh infiltrasi sel-sel limfositik akibat mekanisme inflamasi serta diikuti hipotiroidisme akibat kerusakan jaringan tiroid. Penyakit AITD ini memiliki dua bentuk yang sering muncul yaitu *grave's disease* (hipertiroid) dan *hashimoto thyroiditis* (hipotiroid) (Agrawal, 2011).

Terjadinya AITD dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu internal dan eksternal, faktor internal diantaranya adalah faktor genetik, faktor jenis kelamin dimana persentase penyakit pada perempuan (15%) lebih tinggi dibandingkan pada laki-laki (5%) dan faktor usia dimana wanita dengan usia yang lebih tua yaitu usia 60-70 tahun lebih rentan terserang penyakit ini dibandingkan dengan usia 40-50 tahun, sedangkan faktor eksternal adalah faktor lingkungan yaitu infeksi virus, merokok, stres dan asupan iodine (Chistiakov, 2005 ; Swain *et al.*, 2005). Dilaporkan kasus hipertiroidisme di Amerika Serikat dan sekitarnya berkisar antara 60-80% terjadi akibat asupan yodium yang tinggi secara terus menerus, sedangkan penderita *thyroiditis* di Indonesia mencapai 11% orang dengan 44-48% diantaranya merupakan *hashimoto thyroiditis* (Marina, 2011). Penyakit ini juga dilaporkan menyerang beberapa anjing ras besar, misalnya pada anjing *doberman dane*, *boxer* dan *grey hound* (Dodds, 2008).

Gejala spesifik AITD antara lain adalah penurunan maupun peningkatan produksi hormon tiroid terutama hormon tiroksin (T_4). Selama ini pengujian yang telah banyak dilakukan untuk mengetahui kerusakan kelenjar tiroid adalah salah satunya dengan pengukuran kadar T_4 , karena T_4 dianggap lebih sensitif dan dapat dijadikan sebagai indikator fungsi tiroid. Indikator tersebut di katakan hipotiroidisme ketika terjadi penurunan kadar hormon T_4 , sebaliknya jika kadar hormon T_4 mengalami peningkatan maka disebut hipertiroidisme (Anwar, 2005). Kondisi ini diperparah dengan adanya kadar natrium iodida (NaI) yang berlebih dalam tubuh. Peningkatan NaI menyebabkan terbentuknya autoantigen pada kelenjar tiroid yang berakhir pada terjadinya AITD (Rose *et al.*, 2002). Gejala spesifik lainnya adalah kerusakan jaringan dan abnormalitas ekspresi sitokin ($IFN-\beta$, $TNF-\alpha$, IL-1, IL-2, IL-8) serta kemunculan protein – protein penanda autoimun seperti haptoglobin, CRP dan ANA yang terekspresi melalui gambaran profil protein serum darah, gambaran protein tersebut dapat dijadikan sebagai deteksi awal untuk diagnosa suatu penyakit (Zaias *et al.*, 2009).

Upaya pengobatan AITD sampai sekarang belum maksimal. Penderita hipertiroid harus menjalani pengobatan *iodine radioactive* dan penderita hipotiroid harus menggunakan terapi hormon tiroid sintetis. Kejadian kasus AITD terus meningkat, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mencari alternatif pengobatan yang lebih efisien, dalam penelitian ini dilakukan terapi alternatif dengan menggunakan yoghurt. Lavasani (2009) melaporkan, BAL yang terkandung dalam yoghurt dapat mengobati penyakit autoimun, dalam penelitiannya disebutkan bahwa pemberian kombinasi probiotik *Lactobacillus*

paracasei dan *Lactobacillus plantarum* terbukti dapat memodulasi sistem kekebalan tubuh tikus yang mengalami *Autoimmune Encephalomyelitis*.

Diketahui BAL yang terkandung dalam yoghurt memiliki efek imunostimulator (Lavasani, 2009). Sedikit laporan penggunaan yoghurt untuk memodulasi penyakit autoimun, bahkan belum ada penelitian yang melaporkan penggunaan yoghurt sebagai bentuk pengobatan AITD, oleh karena itu perlu diadakan pembuktian potensi maupun peran yoghurt sebagai bahan terapi AITD pada hewan model yang diinduksi natrium iodida (NaI) berdasarkan perubahan kadar hormon tiroksin (T_4) dan protein spesifik penanda autoimun melalui gambaran profil pita protein.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perumusan masalah dari penelitian ini adalah:

- a. Apakah pemberian yoghurt dengan starter (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*) memiliki pengaruh terhadap perubahan kadar hormon tiroksin (T_4) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model AITD?
- b. Apakah pemberian yoghurt dengan starter (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*) memberikan perbedaan ekspresi protein pada gambaran profil pita protein serum tikus (*Rattus norvegicus*) model AITD?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan perumusan masalah diatas, maka penelitian ini dibatasi oleh:

1. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina, strain Wistar, usia 8-12 minggu, berat badan 100-150 gram yang diperoleh dari UPHP-UGM dan sudah mendapatkan persetujuan laik etik dari KEP-UB No. 141 (Lampiran 1).
2. Induksi AITD dilakukan dengan pemberian natrium iodida (NaI) 0,05% yang diberikan melalui air minum secara *ad libitum* (Yu, 2001; Nagayama, 2007).
3. Yoghurt yang digunakan berupa yoghurt yang disiapkan sendiri di Laboratorium Kesmavet PKH – UB, dengan dosis 10^9 cfu/ml sebanyak 1 mL yoghurt *met* dengan komposisi starter *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* (Lavasani, 2009).
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar hormon tiroksin (T_4) yang diukur dengan *rodent T₄ ELISA test kit* dan gambaran profil pita protein melalui metode SDS-PAGE.

1.4 Tujuan Penelitian

- a. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan peranan yoghurt terhadap perubahan kadar hormon tiroksin (T_4) tikus (*Rattus norvegicus*) model AITD induksi natrium iodida (NaI).
- b. Membuktikan peranan yoghurt (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*) terhadap ekspresi protein pada gambaran profil pita protein serum tikus (*Rattus norvegicus*) model

AITD induksi natrium iodida (NaI).

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan rujukan untuk mengetahui peran yoghurt sebagai salah satu bahan terapi dalam mengobati penyakit AITD. Penelitian ini bersifat eksperimental pada hewan coba dan diharapkan memberikan informasi mengenai peranan yoghurt terhadap sistem kekebalan tubuh serta sebagai dasar penelitian selanjutnya dalam upaya mengatasi AITD dengan terapi menggunakan produk lainnya.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Peranan Yoghurt Susu Kambing pada AITD

Yoghurt adalah suatu produk fermentasi yang diperoleh dari susu segar dengan biakan bakteri asam laktat maupun probiotik sampai diperoleh bau dan rasa yang khas dengan atau tanpa penambahan bahan lain yang diizinkan. Yoghurt yang dikonsumsi secara teratur dapat menyeimbangkan mikroflora usus sehingga bakteri-bakteri yang merugikan dapat ditekan jumlahnya dan sebaliknya usus akan didominasi oleh bakteri yang menguntungkan (Silvia, 2002).

Mikroorganisme yang sering digunakan sebagai starter dalam pembuatan yoghurt adalah bakteri asam laktat (BAL) dari genus *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* (Hartoyo, 2008). Bakteri asam laktat dapat juga berperan sebagai probiotik, jika dikonsumsi memberikan pengaruh positif terhadap fisiologi dan kesehatan inangnya. Senyawa racun yang dihasilkan dari metabolisme protein dan lemak serta hasil pemecahan enzim tertentu dapat berkurang bila bakteri probiotik mulai menjalankan peranannya (Yulinery *et al.*, 2005). Efek fisiologis yang menguntungkan diantaranya yaitu mereduksi pH usus, memproduksi enzim pencernaan dan vitamin, memproduksi beberapa substansi antibakteri antara lain asam organik, bakteriosin, hidrogen peroksida, diasetil, *acetaldehyde*, laktoperoksidase. Probiotik juga dapat membantu dalam perbaikan mikroflora normal usus setelah diare, terapi antibiotik dan radioterapi, mereduksi level kolesterol didalam darah, menstimulasi sistem imun, menekan infeksi bakteri, menghilangkan karsinogen, dan mengoptimalkan penyerapan kalsium (Grajek *et al.*, 2005).

Melalui peranan probiotik maupun BAL yang terkandung didalam yoghurt telah terbukti sebagai imunostimulator melalui peningkatan fagositosis patogen serta memodifikasi produksi sitokin dan dapat menginduksi reaksi imun humoral (Th2) dan seluler (Th1). Dalam keseimbangannya, Th1 dan Th2 saling menghambat, IFN- γ sebagai hasil dari Th1 mampu menghambat respon Th2, sehingga sistem imun humoral tertekan. Peningkatan sistem imun seluler (Th1) pada sistem pencernaan diikuti dengan produksi IL-2, hal tersebut mampu meregulasi sistem imun seluler pada semua organ termasuk kelenjar tiroid, sehingga mampu memperbaiki kerusakan kelenjar tiroid (Delcenserie, 2009).

Susu yang digunakan dalam pembuatan yoghurt ini berasal dari susu kambing peranakan etawa (PE), ditinjau dari kualitasnya, susu kambing mempunyai komposisi nutrisi yang hampir sama dengan susu sapi dan air susu ibu (ASI) (Sutama dan Budiarsana, 1997). Sodik dan Abidin (2008), mengatakan bahwa kandungan protein, fosfor, kalsium, magnesium dalam 100 gram susu kambing jauh lebih tinggi dibandingkan kandungan dalam 100 gram susu sapi, butiran lemak susu yang berdiameter kecil dan homogen lebih banyak terdapat pada susu kambing, sehingga susu kambing lebih mudah dicerna alat pencernaan, serta tidak menimbulkan diare.

Komponen susu kambing dapat dibandingkan dengan susu sapi dan ASI. Kandungan vitamin, mineral, protein dan kalsium susu kambing relatif lebih tinggi dibandingkan dengan susu sapi dan ASI, sedangkan kandungan air dan hidrat arang dalam susu kambing lebih sedikit dibanding susu sapi dan ASI.

Kandungan lemak dalam susu kambing relatif hampir sama dengan susu sapi dan ASI (Tabel 2.1).

Tabel 2.1 : Perbandingan komponen pada susu kambing, sapi dan ASI

Komposisi	Kambing	Sapi	ASI
Air	83 – 87,5	87,2	88,3
Hidrat anorganik	4,6	4,7	6,9
Energi KCL	67	66	69,1
Protein	3,3 – 4,9	3,3	1
Lemak	4,0 – 7,3	3,7	4,4
Ca (mg)	129	117	33
P (mg)	106	151	14
Fe (mg)	0,05	0,05	0,05
Vit. A (mg)	185	138	240
Thiamin (mg)	0,04	0,03	0,01
Riboflavin	0,14	0,17	0,04
Niacin	0,3	0,08	0,2
Vit. B12	0,07	0,36	0,84

Sumber : (Anonymous, 2009)

2.2 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model AITD

Penyakit AITD (*Autoimmune Thyroiditis*) adalah salah satu penyakit autoimun yang bersifat organ spesifik pada kelenjar tiroid (Weetman, 2003). Diperlukan hewan coba untuk mempelajari mekanisme AITD yang diinduksi oleh alergen secara lebih detail. Pembuatan hewan coba model AITD pada tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan dengan induksi 0,05% natrium iodida (NaI) melalui air minum secara *ad libitum* selama 5 minggu (Yu, 2001; Nagayama, 2007). Hewan coba yang umum digunakan dalam penelitian ilmiah adalah tikus. Tikus (*Rattus norvegicus*) mudah dipelihara dan merupakan hewan yang relatif sehat dan cocok untuk berbagai penelitian. Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* antara lain memiliki berat 150 - 600 gram, usia 8 - 12 minggu dan tikus yang digunakan

adalah tikus strain Wistar dengan jenis kelamin betina. Klasifikasi tikus (*Rattus norvegicus*) menurut Besselsen (2004) adalah sebagai berikut:

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

Alasan dalam pemilihan hewan coba tikus dari strain Wistar adalah dikarenakan strain Wistar merupakan strain yang paling besar sehingga mempermudah untuk *handling*. Pemilihan jenis kelamin betina yaitu dengan alasan yang bahwa pada betina memiliki hormon esterogen yang mampu meningkatkan respon imun humoral yaitu sel- B yang mampu meningkatkan autoantibodi yang dapat meregulasi sistem imun yang bersifat autoreaktif, sehingga dapat memperparah terjadinya AITD. Ada beberapa cara dalam persiapan hewan model AITD, diantaranya adalah *induced model*, *spontaneous model* dan *transplantation model*, dalam penelitian ini digunakan metoda *spontaneous model*. *Induced model* diperoleh dengan menginduksi tiroglobulin (Tg) (Masjhur, 2010). *Spontaneous model*, yaitu merupakan kondisi AITD yang disebabkan oleh faktor lingkungan, misalnya kadar iodida yang berlebih di dalam tubuh akibat konsumsi makanan dan minuman yang mengandung iodin tinggi. *Transplantation model* dilakukan dengan cara pemindahan jaringan tiroid dari

donor ke hewan model (Prummerl dan Wiersinga, 2004).

2.3 Patomekanisme *Autoimmune Thyroiditis* (AITD)

Autoimmune thyroiditis adalah penyakit yang terjadi akibat autoreaktivitas sel T kelenjar tiroid yang menginduksi inflamasi, dan ditandai oleh abnormalitas ekspresi sitokin (IFN- β , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-8) dan peningkatan *major histocompatibility complex class II* (MHC II) pada kelenjar tiroid (Sa *et al.*, 2007). Penyakit AITD ini berhubungan dengan respon seluler dan humoral yang bekerja bersamaan dan sasarannya adalah kelenjar tiroid. Kerusakan seluler terjadi karena limfosit T tersensitasi dan antibodi antitiroid berikatan dengan membran sel tiroid yang mengakibatkan lisisnya sel dan terjadinya reaksi inflamasi. Gangguan fungsi tiroid terjadi karena interaksi antara antibodi antitiroid yang bersifat *stimulator* atau *blocking* dengan reseptor pada membran sel tiroid yang bertindak sebagai autoantigen (Tomer, 2003). Kerusakan jaringan pada AITD disebabkan karena respon inflamasi, sehingga sangat berpengaruh terhadap produksi hormon tiroid yaitu T₃ dan T₄. Tiga mekanisme yang menyebabkan AITD antara lain: toksisitas tirosit, kegagalan proses toleransi tiroglobulin (Tg) dan kerusakan pada sel T. Toksisitas tirosit disebabkan oleh oksidasi *tyroxine peroxidase* (TPO) yang menghasikan asam hipiodat serta sitokin proinflamasi seperti *reactive oxigen spesies* (ROS) dan iNOS (Rose *et al.*, 2002).

Kegagalan proses toleransi tiroglobulin terjadi karena induksi molekul MHC kelas II untuk mempresentasikan tiroglobulin sebagai autoantigen sehingga menghasilkan autantibodi yang dihasilkan oleh sel B dan menyebabkan reaksi inflamasi serta destruksi jaringan. Defek pada sel T regulator menyebabkan sel T

tidak dapat menekan respon imun autoreaktif sehingga memicu respon imun seluler sel T-*cytotoxic* (Masjhur, 2010). Penanda spesifik penyakit autoimun pada pemeriksaan imunologi seluler adalah CD25+ sedangkan penanda terjadinya inflamasi yaitu IL-1 dan IL-8. Kejadian AITD, mengakibatkan pembesaran dan nekrosis pada kelenjar tiroid sehingga menurunkan kadar hormon tiroid dalam periode yang lama.

Pembuatan hewan model AITD pada tikus *Rattus norvegicus* dilakukan dengan induksi 0,05% natrium iodida (NaI) melalui air minum selama 5 minggu. Pemberian NaI menyebabkan kelenjar tiroid tidak mampu mempertahankan sekresi hormon tiroid sehingga mengakibatkan hipertrofi tiroid (goiter) dan hipertiroidisme. Iodin merupakan komponen utama dalam hormonogenesis kelenjar tiroid. Iodin termasuk tirosin gugus monoiodotirosin (MIT) dan diiodotirosin (DIT) yang digunakan dalam pembentukan T₄ dan T₃ melalui reaksi oksidasi. Iodin dibutuhkan dalam pembentukan hormon tiroid dengan cara berikatan dengan Tg. Kelebihan iodin dalam tiroid akan dioksidasi oleh TPO yang akan membentuk radikal bebas yaitu ROS. Radikal bebas akan mengakibatkan nekrosis sel tirosit dengan cara oksidasi membran lipid dan protein (Rose *et al.*, 2002).

Iodin masuk ke dalam tubuh melalui makanan atau air minum dalam bentuk ion iodida (I⁻), kelenjar tiroid mengikat iodida serta mensintesa dan menyimpan hormon tiroid dalam lumen untuk mengkompensasi kelangkaan dari iodin. Anjuran asupan iodin setiap hari adalah 150 µg/hari, jika asupan di bawah 50 µg/hari, maka tiroid tidak mampu untuk mempertahankan sekresi hormon.

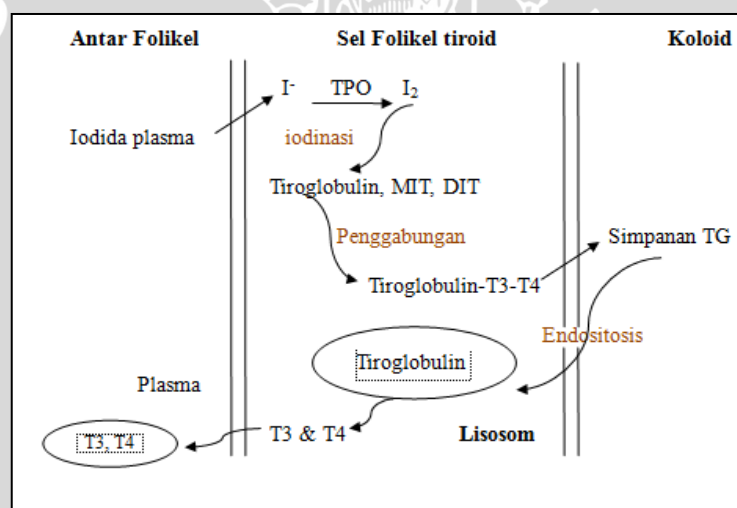
Peningkatan dosis iodida yang diberikan akan menimbulkan peningkatan organifikasi iodida dan pembentukan hormon hingga dicapai suatu kadar kritis. Pada kadar kritis ini, terjadi inhibisi organifikasi dan penurunan hormogenesis. Jika kelenjar tidak mampu melakukan adaptasi ini, maka akan timbul hipotiroidisme, seperti yang terjadi pada pasien tiroiditis autoimun dan pada pasien dishormogenesis. Sedangkan pada pasien Grave's kronis dan goiter multinodular, iodida akan menimbulkan hipertrofi (Anwar, 2005).

2.4 Kadar Hormon Tiroksin (T_4) pada AITD

Hormon tiroid, yaitu triyodotironin (T_3) dan tetraiodotironin/tiroksin (T_4) merupakan hormon yang dihasilkan oleh kelenjar tiroid yang berperan dalam mengatur ekspresi gen, diferensiasi jaringan dan perkembangan umum seperti perkembangan otak, perkembangan organ seksual serta berperan sebagai antiproteolitik dari hormon insulin (Murray *et al.*, 2000). Hormon tiroid mengandung 59-65% elemen yodium. Hormon T_4 merupakan hormon tiroid yang dihasilkan sekitar 95% dari keseluruhan produksi hormon tiroid, sedangkan T_3 merupakan konversi dari hormon T_4 . Pembentukan hormon tiroid berawal dari senyawa monoiodotirosin dan diiodotirosin yang kemudian mengalami proses *coupling* menjadi T_3 dan T_4 . Proses biosintesis hormon tiroid terdiri dari beberapa tahap yang sebagian besar diatur oleh TSH. Tahap biosintesis tersebut meliputi tahap *trapping*, oksidasi, *binding*, *coupling*, penimbunan, deiodinasi, proteolisis dan pengeluaran hormon dari kelenjar tiroid (Djokomoeljanto, 2006).

Yodium yang masuk ke dalam tubuh direduksi menjadi iodida (I^-) sebelum dicerna di saluran pencernaan dan masuk ke dalam darah sebagai I^- organik. Sel-

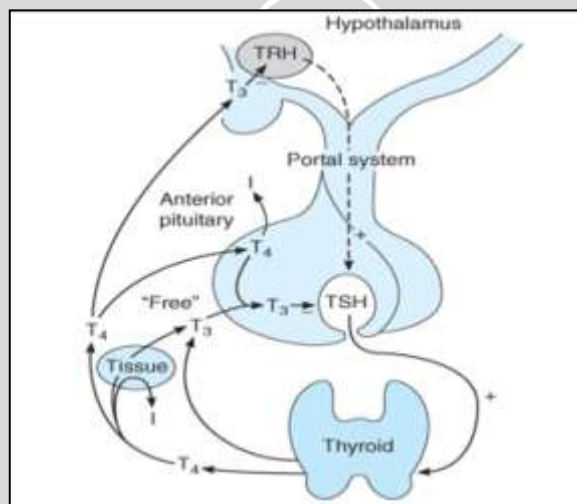
sel epitel tiroid akan mengikat I^- dalam darah sehingga iodida tereduksi dan memasuki folikel tiroid. Iodida dioksidasi menjadi I_2 (iodin erlementer) oleh TPO kemudian mengalami proses iodinasi residu tirosil menjadi MIT dan DIT. Proses ikatan MIT dan DIT dengan Tg menghasilkan T_3 dan T_4 , selanjutnya disimpan dalam koloid dan hormon yang terbentuk akan disekresi ke dalam darah dan ditransportasi ke seluruh tubuh (Gambar 2.4) (Djokomoeljanto, 2006). Menurut Marina (2011), Produksi hormon T_4 pada manusia per hari adalah 80-100 mg/dL dan hormon T_3 adalah 26-39 mg/dL, sedangkan kadar normal hormon T_4 pada tikus yaitu 1 - 3,6 ng/dL (Piechotta, 2010).



Gambar 2.4 Proses sekresi hormon T_3 dan T_4 pada kelenjar tiroid (Djokomoeljanto, 2006).

Hormon tiroksin (T_4) adalah salah satu hormon tiroid yang utama yang diproduksi oleh kelenjar tiroid. Tubuh memiliki sistem *feedback* yang mengatur berproduksi atau tidaknya hormon tiroid (Gambar 2.4.1). Ketika level T_4 di dalam darah menurun, hipotalamus mengeluarkan *thyrotropin releasing hormon*, yang menstimulasi glandula pituitari untuk mengeluarkan *thyroid stimulating hormon*

(TSH) untuk meregulasi kelenjar tiroid agar memproduksi lebih banyak hormon T_4 , namun ketika level T_4 di dalam darah tinggi, produksi TSH dihambat. Hormon T_4 merupakan 90% dari hormon tiroid. Ketika tubuh membutuhkan hormon tiroid, kelenjar tiroid mengeluarkan T_4 dalam sirkulasi darah. Dalam darah, T_4 menjadi *free* (tidak terikat protein *thyroxine-binding globulin*) dan juga menjadi T_4 total yaitu T_4 yang terikat dengan protein (*primarily bound to thyroxine-binding globulin*). Konsentrasi *free* T_4 di dalam darah hanya sekitar 0.1% dari total T_4 (Laurberg, 2005).



Gambar 2.4.1 Mekanisme *feedback pituitary gland* dalam produksi hormon tiroid (Djokomoeljanto, 2006).

Menurut Laurberg (2005), penderita AITD dapat dilakukan pemeriksaan sebagai diagnosa dengan pengukuran kadar hormon tiroid. Level serum T_4 dapat diketahui dengan kit komersial menggunakan *chemiluminescence*. Pemeriksaan terhadap total T_3 , total T_4 , *free* T_3 dan *free* T_4 merupakan beberapa metode yang sering digunakan dalam diagnosa AITD, namun sejauh ini pengukuran kadar T_4 diketahui sebagai penanda terbaik pada penyakit ini (Tar, 2011).

Ketika terjadi AITD, maka terjadi kerusakan jaringan akibat respon

inflamasi (Rose *et al.*, 2002). Kerusakan jaringan pada kelenjar tiroid akan menyebabkan gangguan pada produksi hormon tiroid sehingga produksi hormon tiroid menurun. Pemberian iodida dengan kadar berlebih mampu menyebabkan organifikasi iodida dalam kelenjar tiroid, ketika terjadi autoimun maka reseptor *blocking* pada membran sel tiroid tidak mampu menjalankan tugasnya untuk mengirim sinyal negatif pada TRH (*Thyrotropin Releasing Hormone*) agar berhenti memproduksi TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*), sehingga TRH tetap memproduksi TSH dan merangsang kelenjar tiroid untuk memproduksi hormon tiroid secara terus menerus dan terjadilah hipertiroidisme (Tomer, 2003 ; Anwar, 2005).

2.5 Analisa Profil Pita Protein pada Serum Darah Tikus AITD

Protein merupakan makromolekul yang sebagian besar menyusun bagian dari sel, sehingga banyak peneliti menggunakan protein sebagai obyek dalam suatu penelitian (Gaffar, 2007). Pada serum penderita penyakit autoimun terdapat beberapa protein penanda terjadinya infeksi/inflamasi yaitu haptoglobin (Hp), *C-Reactive Protein* (CRP) dan *Antinuclear Antibody* (ANA). Haptoglobin merupakan protein plasma darah, Menurut Na (2005) terjadi penurunan protein haptoglobin ketika terjadi autoimun, haptoglobin secara normal berfungsi untuk mengikat hemoglobin yang dikeluarkan dari eritrosit dan menghambat aktivitas oksidatif. Berat molekul Hp berkisar antara 15 – 45 kDa. Haptoglobin dapat digunakan sebagai marker dari penyakit diabetes, *cardiovascular disease pathology*, *Parkinson's* dan *Crohn's disease*.

C-Reactive Protein (CRP) adalah suatu produk respon inflamasi yang

disintesis oleh hepar akibat stimulasi sitokin, CRP pertama kali di diskripsikan oleh William Tillet dan Thomas Francis di Institut Rockefeller pada tahun 1930. Mereka mengekstraksi protein dari serum pasien yang menderita *Pneumonia pneumococcus* yang akan membentuk presipitasi dengan “C” Polisakarida dari dinding sel *Pneumococcus*. Karena reaksi antara protein dan polisakarida menyebabkan presipitasi maka protein ini diberi nama *C-reactive protein* (Casas *et al.*, 2006). Keberadaan CRP dapat muncul karena adanya induksi dari sitokin - sitokin pro inflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α , selain digunakan sebagai penanda spesifik adanya inflamasi, CRP juga dapat digunakan sebagai penanda adanya luka bakar, penyakit keganasan, kerusakan jaringan maupun penyakit autoimun. Berat molekul yang dimiliki oleh CRP adalah sebesar 115 kDa (Adji, 2004).

Antinuclear Antibody (ANA) merupakan suatu autoantibodi yang berikatan dengan nukleus (inti sel), ANA umum digunakan sebagai *screening test* untuk penyakit autoimun (Wang *et al.*, 2000). Tes terhadap ANA digunakan untuk mengidentifikasi autoantibodi yang targetnya adalah substansi yang terkandung didalam sel dan juga dapat digunakan untuk membedakan tipe spesifik dari penyakit autoimun, berat molekul yang di miliki oleh ANA adalah 160 kDa (Leisy, 2011).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

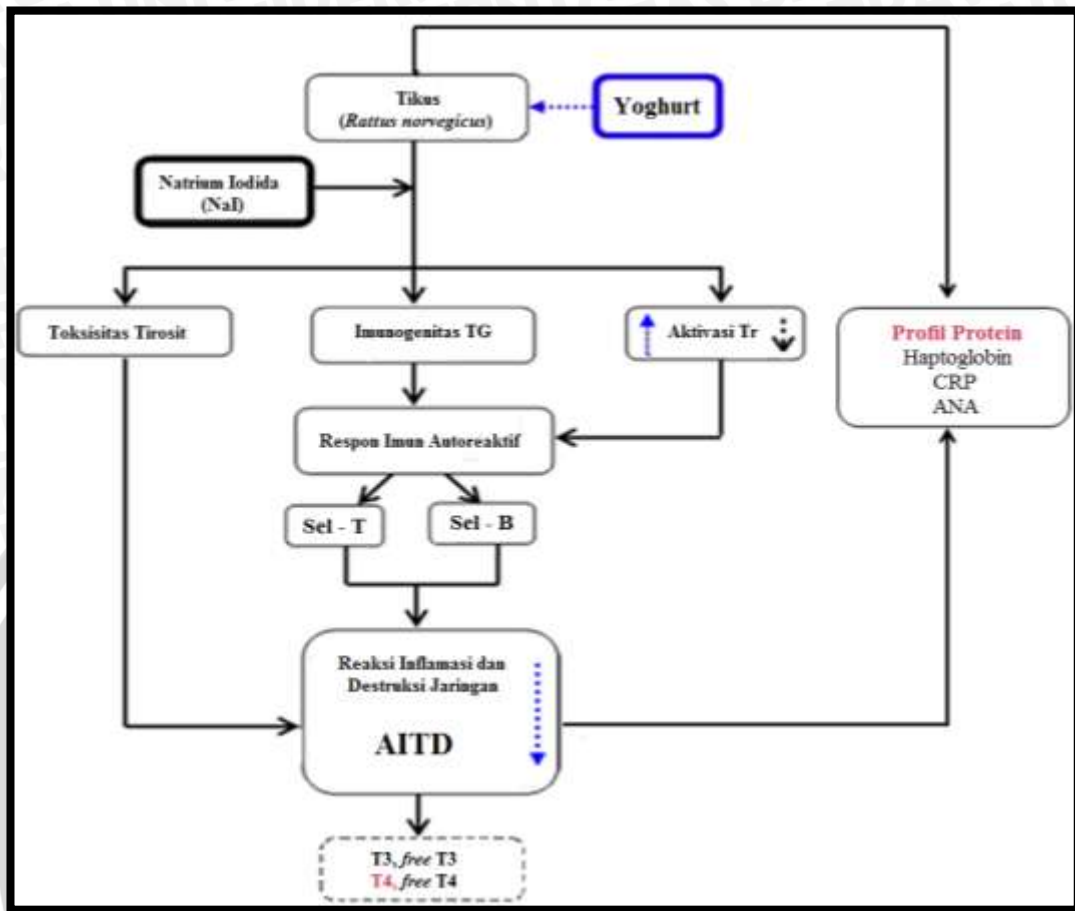
Induksi Natrium iodida (NaI) pada tikus (*Rattus norvegicus*) dapat memicu reaksi autoimunitas kelenjar tiroid yang berakibat terjadinya *autoimmune thyroiditis* (AITD). Reaksi autoimunitas pada AITD dapat terjadi melalui tiga mekanisme, yaitu: toksisitas tirosit, kegagalan proses toleransi (imunogenitas *thyroglobulin* (TG)) dan aktivitas sel *T-regulator* menurun. Toksisitas tirosit terjadi ketika ion iodida (I⁻) dalam jumlah berlebih akan dioksidasi oleh *thyroid peroxidase* (TPO) dan menghasilkan bahan reaktif berupa asam hipiodat dan *reactive oxygen species* (ROS). Bahan reaktif tersebut dapat mengakibatkan kerusakan tirosit melalui oksidasi lipid dan protein membran.

Peningkatan imunogenitas TG terjadi akibat terbentuknya epitop imunogenik oleh pengaruh ion iodida (I⁻) dalam jumlah berlebih. Didalam tiroid terdapat 3 macam protein *self* yaitu TG, TPO dan TSHR yang direspon sebagai *non self* sehingga terjadi kegagalan proses toleransi dan dapat memicu timbulnya respon imun autoreaktif. Terjadinya respon dari *self* menjadi *non self* dikarenakan adanya determinan antigen baru yang terbentuk karena adanya modifikasi struktur peptida pada permukaan protein, peptida yang termodifikasi diantaranya adalah peptida yang berfungsi sebagai sisi hormogenik (*hormogenic site*), peptida yang terdiri dari residu *iodotyrosil* dan peptida yang tidak teriodinasi.

Iodin dalam jumlah berlebih dapat mengakibatkan kerusakan maupun menurunkan aktivitas dari sel *T-regulator* yang berperan untuk menekan respon imun yang bersifat autoreaktif, sehingga ketika sel *T-regulator* rusak, mekanisme

regulasi tidak dapat menekan respon imun autoreaktif sehingga memicu respon imun seluler yang diperankan sel T (sel *T-cytotoxic*) serta aktivitas autoantibodi yang dihasilkan oleh sel B dalam imunitas humoral dan terjadi reaksi inflamasi serta destruksi jaringan sehingga dapat terjadi AITD. Dengan demikian, maka terjadilah perubahan terhadap produksi hormon yaitu terjadi gangguan terhadap produksi hormon tiroid.

Yoghurt yang dibuat mengandung BAL yang dilaporkan dapat menginduksi mekanisme regulasi reaksi autoimunitas melalui aktivasi sel *T-regulator* sehingga mampu meregulasi sistem imun seluler yaitu Th1 untuk memproduksi sitokin anti inflamasi seperti IL-2, IL-10 dan TGF- β . Aktivasi Sel *T-regulator* berperan menjalankan mekanisme regulasi, sehingga mampu menekan respon imun autoreaktif yang selanjutnya proses destruksi jaringan dan reaksi autoimunitas AITD dapat ditekan dan produksi hormon tiroid terutama hormon T_4 menjadi stabil dan kemunculan protein spesifik penanda autoimun dapat ditekan (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Keterangan :

- | | | | |
|---|--------------------|---|-----------------|
|  | : NaI |  | : Patomekanisme |
|  | : Yoghurt |  | : Efek terapi |
|  | : Variabel terikat |  | : Penurunan |
|  | : Perubahan | | |

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konseptual, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut ini : Pemberian terapi yoghurt terhadap tikus (*Rattus norvegicus*) model *autoimmune thyroiditis* (AITD) yang diinduksi dengan natrium iodida (NaI) dapat mempengaruhi perubahan produksi hormon tiroksin (T_4) serta mampu menunjukkan perbedaan ekspresi protein pada gambaran profil pita protein antara tikus tanpa perlakuan (kontrol), tikus AITD dan tikus AITD yang diberi terapi yoghurt.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret - Juni 2013 di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Fisiologi Hewan, Laboratorium Biomolekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain *rodent T₄ ELISA test kit* (Lot. No. 030413), spektrofotometer, sonikator (Branson 200), kandang pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, sonde, neraca digital, spuit, sentrifus (Hettich EBA III), labu ukur (10 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml), *bekker glass* (50 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml), *gloves*, tabung erlenmeyer, tabung *vacutainer*, *microtube* 1,5ml, mikropipet, *yellow tips*, *blue tips*, cawan petri, tabung reaksi, pH meter, *plate*, rak tabung reaksi, inkubator, *waterbath*, *refrigerator*, oven, *vortex* (Guo Huq), spatula, *thermometer*, bunsen, kertas hisap, *graph paper*, *microtiter plate reader* dan *magnetic stirer*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar, natrium iodida (NaI, *sigma USA*), yoghurt *met* (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* dan *Streptococcus thermophilus*), susu kambing, sampel serum tikus, alkohol 70%, aquades, *Reducing sample buffer* (RSB), *Commasie Brilliant Blue* (CBB), T₄ HRP, TMB *color reagent*, 2N HCl, *washing buffer*.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tikus dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan (Tabel 4.3)

Tabel 4.3 Kelompok Perlakuan Penelitian

Kelompok Tikus	Perlakuan
P ₀	Tikus kontrol, yaitu tikus tanpa perlakuan
P ₁	Tikus AITD, yaitu tikus dengan perlakuan induksi 0,05% NaI selama 5 minggu
P ₂	Tikus AITD dan terapi dengan yoghurt, yaitu tikus dengan perlakuan induksi 0,05% NaI selama 5 minggu pertama dan diberikan terapi yoghurt <i>met</i> 10 ⁹ cfu/ml sebanyak 1 mL selama 4 minggu.

4.4 Sampel Penelitian

Sampel penelitian menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar, umur 8-12 minggu, berat badan antara 100-150 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium.

Estimasi banyak sampel dihitung berdasarkan rumus :

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

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan :

P : banyaknya perlakuan

n : jumlah sampel

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 3 macam perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 6 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 18 ekor hewan coba. Starter yoghurt diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner PKH UB.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : NaI dan yoghurt.
Variabel tergantung : Profil pita protein dan kadar hormon tiroksin (T_4).
Variabel kontrol : Jenis kelamin, berat badan dan umur tikus (*Rattus norvegicus*).

4.6 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Penentuan dosis dan preparasi NaI
3. Penentuan dosis dan preparasi probiotik yoghurt
4. Induksi NaI 0,05% pada tikus
5. Pemberian yoghurt pada tikus sebagai terapi
6. Isolasi serum tikus
7. Pengukuran kadar hormon tiroksin (T_4)
8. Pemeriksaan profil pita protein dengan metode SDS – PAGE
9. Analisis data

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Hewan coba dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok kontrol yang merupakan tikus tanpa perlakuan (P_0), kelompok AITD (P_1) yang diinduksi NaI

0,05% dan kelompok AITD yang diterapi yoghurt (P₂) dengan starter (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* dan *Streptococcus thermophilus*). Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 6 ekor tikus sebagai ulangan. Hewan coba diadaptasi terhadap lingkungan selama 7 hari, dan diberi makanan berupa ransum basal pada semua tikus dengan komposisi protein kasein, minyak jagung, vitamin, mineral, air, *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dan maizena yang disusun berdasarkan standar *Associations of Analytical Communities* (2005) (Lampiran 4).

Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm, dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Kandang mudah dijaga sanitasinya, suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.7.2 Penentuan dosis dan preparasi NaI

Menurut Yu (2001) dan Nagayama (2007) dosis optimum NaI yang dapat menginduksi terjadinya AITD adalah 0,05%, NaI diberikan melalui air minum secara *ad libitum* dengan cara dilarutkan dengan aquades. Sebanyak 0,05 gram NaI dilarutkan dalam 100 ml aquades.

4.7.3 Penentuan Dosis dan Preparasi Yoghurt

Menurut penelitian Lavasani (2009), dosis optimum yoghurt *met* yang diberikan adalah 10⁹ cfu/ml. Jumlah yoghurt yang diberikan dilakukan dengan cara perhitungan volume yoghurt yang digunakan hingga mencapai dosis 10⁹

cfu/ml. Dari hasil optimasi volume yoghurt menunjukkan bahwa dengan volume yoghurt 1 ml mengandung 10^9 cfu/ml, sehingga dosis yang dibutuhkan untuk pemberian yoghurt adalah 1 ml per tikus selama 4 minggu. Yoghurt yang digunakan adalah yoghurt yang disiapkan sendiri di laboratorium Kesmavet PKH-UB (Lampiran 9).

4.7.4 Induksi NaI pada Hewan Model Tikus (*Rattus norvegicus*)

Induksi AITD dilakukan dengan pemberian natrium iodida (NaI) 0,05 % melalui air minum pada kelompok tikus P₁ dan P₂ yang terdiri dari 12 ekor tikus selama 5 minggu. Natrium Iodida (NaI) yang digunakan adalah NaI *Sigma USA*.

4.7.5 Pemberian Yoghurt Sebagai Terapi AITD

Pemberian terapi yoghurt dilakukan pada kelompok tikus P₂ yang terdiri dari enam ekor tikus secara per oral melalui sonde selama 4 minggu, optimasi dosis yang digunakan adalah 1 ml yang diberikan pada tikus setelah perlakuan NaI 5 minggu.

4.7.6 Koleksi Serum Darah dari Tikus (*Rattus norvegicus*)

Koleksi serum dilakukan tiap 2 minggu yaitu sebelum perlakuan, selama perlakuan dan setelah perlakuan. Darah diambil dari *vena coccygeal lateral*, kemudian dimasukkan pada tabung *vacutainer* dan didiamkan suhu ruang (18-26°C) selama 3-5 jam. Kemudian darah disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dari gumpalan darah dan dipindahkan ke *microtube* 1,5ml, disentrifus kembali dengan kecepatan 3000 rpm 15 menit, supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam *microtube* baru. Serum yang diperoleh disimpan di dalam *freezer* untuk pemeriksaan lebih lanjut (lampiran 6).

4.7.7 Pengukuran Kadar T₄

Pengukuran kadar T₄ dilakukan dengan menggunakan *rodent* T₄ ELISA *test kit* (Lot. No. 030413) pada seluruh kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol (tanpa perlakuan), kelompok AITD dan kelompok AITD dengan terapi yoghurt. ELISA yang digunakan adalah kompetitif ELISA dan plate yang digunakan sudah ter *coating* dengan antigen dan antibodi spesifik, konjugat yang digunakan adalah *T4-Horseradish Peroxidase* (T₄-HRP) dan menggunakan substrat TMB *color reagent*, pembacaan hasil dilakukan dengan menggunakan ELISA *reader* (*microtiter well reader*) dengan panjang gelombang 450 nm. Prinsip kerja dari kompetitif ELISA itu sendiri adalah semakin tinggi absorbansi maka semakin terang warna yang dihasilkan. Langkah kerja dari metode ini dapat dilihat pada lampiran 5.

4.7.8 Gambaran Profil Pita Protein dengan Metode SDS-PAGE

Pemeriksaan ekspresi protein pada serum darah dapat dilakukan dengan analisa gambaran profil pita protein menggunakan metode SDS-PAGE. Metode ini dapat digunakan untuk mengetahui suatu protein yang belum diketahui jenisnya dan dapat diketahui pula keberadaan suatu protein tertentu, selain itu juga dapat digunakan untuk mengukur mobilitas protein untuk kemudian menentukan berat molekulnya (Walker, 2009). Berat molekul protein dapat diukur dengan bantuan protein standar (marker) yang telah diketahui berat molekulnya melalui perbandingan nilai mobilitas relatif (Rf) (Lehninger, 2004). Protein yang telah terisolasi dapat dilakukan elektroforesis untuk pengukuran berat molekul dan memperkirakan berat molekul suatu protein yang dapat ditentukan dengan

pengukuran mobilitas molekul protein pada gel poliakrilamida yang mengandung SDS. Pengukuran mobilitas protein dapat diukur dengan rumus mobilitas *rate* (R_f atau R_f).

$$R_f = \frac{\text{Jarak pergerakan pita protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}}$$

Teknik SDS-PAGE adalah teknik elektroforesis yang sering digunakan dalam analisis protein. Metode analisa SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamic Gel Electrophoresis*) dengan ekspresi profil protein yang berbeda dapat digunakan untuk mendukung karakteristik protein yang muncul pada AITD. Analisa profil protein menggunakan SDS-PAGE diawali dengan melakukan preparasi sampel protein dengan melakukan isolasi protein serum (lampiran 7) dan selanjutnya dilakukan running untuk memperoleh hasil pita protein dari sampel yang telah di preparasi (lampiran 8). Hasil elektroforesis SDS-PAGE dan analisa profil protein dianalisa berdasarkan berat molekul.

4.7.9 Analisis Data

Data pemeriksaan profil pita protein disajikan secara deskriptif dan dianalisis secara kualitatif, sedangkan kadar T_4 disajikan dan dianalisa secara kuantitatif dengan SPSS 16.0 *Edition for Windows*, apabila terdapat perbedaan nyata uji dilanjutkan dengan uji Tukey atau Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 0.05$.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Kadar Hormon Tiroksin (T₄) pada *Autoimmune Thyroiditis* (AITD)

Perubahan kadar hormon tiroksin (T₄) sangat berkaitan dengan terjadinya penyakit *Autoimmune Thyroiditis* (AITD). Pengukuran kadar hormon T₄ dilakukan dengan menggunakan metode *rodent T₄ ELISA test kit* dan diperoleh rerata kadar hormon T₄ (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Rerata Kadar Hormon Tiroksin (T₄)

Kelompok Perlakuan	Rerata Kadar Hormon T ₄ (ng/mL)	Perubahan Kadar Hormon T ₄ Terhadap Kontrol (%)
Kontrol (P ₀)	1,3122 ^a ± 0,1548	0
AITD (P ₁)	4,4848 ^c ± 0,32938	241
AITD + Terapi (P ₂)	1,7028 ^b ± 0,163653	29

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

Berdasarkan analisa statistik, hasil pengukuran kadar hormon tiroksin (T₄) pada sampel tikus kontrol/tanpa perlakuan (P₀) memiliki rerata kadar hormon T₄ terendah 1,3122 ± 0,1548 ng/mL yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya dan kadar hormon T₄ masih dalam batas normal, sampel tikus AITD yang diberi perlakuan NaI (P₁) memiliki rerata kadar hormon T₄ tertinggi 4,4848 ± 0,32938 ng/mL yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya dan menunjukkan bahwa pada sampel P₁ mengalami peningkatan kadar hormon T₄ secara signifikan terhadap kontrol. Sampel AITD yang diberi terapi yoghurt (P₂) dengan rerata kadar hormon T₄ 1,7028 ± 0,163653 ng/ml memiliki interpretasi lebih rendah dibandingkan P₁, hal tersebut menunjukkan bahwa pada P₂ kadar hormon

mengalami penurunan yang signifikan dibandingkan dengan P_1 , akan tetapi interpretasi P_2 dengan kontrol lebih tinggi namun tidak signifikan, hal tersebut menunjukkan bahwa kadar hormon T_4 mengalami penurunan hingga mencapai batas normal.

Sampel P_1 memiliki rata – rata kadar hormon tiroksin (T_4) lebih tinggi terhadap kontrol (P_0) dan perlakuan AITD (P_2) secara signifikan ($p < 0,05$), hal ini menunjukkan sampel perlakuan P_1 mengalami kondisi hipertiroidisme. Hasil penelitian menunjukkan terjadi penurunan hormon T_4 tikus AITD diberi perlakuan terapi menggunakan yoghurt selama 4 minggu secara signifikan terhadap perlakuan tikus AITD ($p < 0,05$), kadar hormon T_4 menunjukkan kembali pada batas normal hormon T_4 yaitu 1 - 3,6 ng/dL, namun masih lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Hasil uji statistik (*One Way Anova*) menunjukkan adanya perbedaan antar perlakuan yang dilanjutkan dengan uji BNJ dan menunjukkan hasil yang berbeda nyata antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$) (lampiran 12). Persentase perubahan hormon tiroksin (T_4) pada kelompok kontrol digunakan sebagai acuan untuk menentukan adanya penurunan maupun peningkatan hormon T_4 akibat pengaruh perlakuan. Kadar hormon T_4 pada perlakuan P_1 menunjukkan adanya peningkatan sebesar 241%, sedangkan pada perlakuan P_2 kadar hormon T_4 menunjukkan penurunan kadar hormon dengan persentase 29 %.

Agrawal (2011), menyatakan bahwa penyakit AITD sangat berkaitan dengan perubahan kadar hormon T_4 . Hipertiroidisme yang terjadi dikarenakan sampel P_1 diberikan perlakuan NaI secara *ad libitum* melalui air minum selama 5

minggu. Perubahan kadar hormon yang terjadi diperkuat oleh pernyataan Piechotta (2010), yang menyatakan bahwa kadar normal hormon T₄ pada tikus adalah 1 - 3,6 ng/dL, sehingga dapat dikatakan bahwa pada perlakuan P₁ (AITD) tikus mengalami hipertiroidisme. Terjadinya AITD dapat menyebabkan abnormalitas ekspresi sitokin (IFN- β , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-8) dan peningkatan *major histocompatibility complex class II* (MHC II) pada kelenjar tiroid (Sa *et al.*, 2007). Respon tersebut berhubungan dengan sistem imun seluler dan humoral, kerusakan seluler terjadi karena limfosit T tersensitasi dan antibodi antitiroid berikatan dengan membran sel tiroid yang mengakibatkan lisisnya sel dan terjadinya reaksi inflamasi (Tomer, 2003). Pemberian NaI yang berlebih dalam tubuh menyebabkan organifikasi iodida dan pembentukan hormon terus menerus sehingga kelenjar tiroid mengalami kerusakan, maka kelenjar tiroid tidak mampu mempertahankan sekresi hormon secara normal sehingga mengakibatkan hipertrofi tiroid (goiter) dan hipertiroidisme. Kadar iodin yang berlebih dalam tiroid juga akan dioksidasi oleh TPO dan menghasilkan radikal bebas yaitu ROS, radikal bebas yang dihasilkan akan menyebabkan nekrosis sel tirosit dengan cara oksidasi lipid dan protein, sehingga penggunaan NaI secara berlebih akan berdampak pada kerusakan jaringan tiroid dan dapat mempengaruhi fungsi normal tiroid sebagai penghasil hormon tiroid yang berakibat terjadinya perubahan kadar hormon tiroid (Rose *et al.*, 2002).

Hormon tiroksin merupakan hormon tiroid yang paling utama diproduksi oleh sel – sel folikel kelenjar tiroid (Marina, 2011). Rasio produksi hormon tiroid seperti T₃ dan T₄ dapat menjadi acuan untuk diagnosa adanya penyakit AITD,

oleh karena itu dilakukan pengukuran hormon tiroksin sebagai acuan terjadinya penyakit AITD (Agrawal, 2011). Rasio kenaikan dan penurunan produksi hormon T_4 dalam darah juga dapat mengindikasikan adanya penyakit autoimun pada kelenjar tiroid (Ferguson, 2007). Hormon T_4 merupakan 90% dari hormon tiroid, hal tersebut dapat berhubungan dengan terjadinya AITD, ketika tubuh membutuhkan hormon tiroid, kelenjar tiroid akan mengeluarkan T_4 dalam sirkulasi darah. Keadaan terjadinya autoimun, tubuh tidak dapat mengontrol produksi hormon yang berlebih didalam tubuh, sehingga kadar hormon tiroksin meningkat secara signifikan (Laurberg, 2005). Keadaan tersebut dapat diperbaiki dengan pemberian yoghurt, dengan harapan pemberian yoghurt mampu mengembalikan kadar normal hormon T_4 (Grajek *et al.*, 2005).

Kadar hormon tiroksin (T_4) pada P_2 (AITD + terapi) menunjukkan hormon T_4 berada pada batas normal, namun masih lebih tinggi di bandingkan dengan kontrol (P_0), hal ini menunjukkan bahwa pemberian terapi yoghurt yang diberikan selama 4 minggu mampu menurunkan kadar hormon T_4 hingga mencapai kadar normal dan menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap perlakuan P_1 (AITD). Menurut Delcensserie (2009), bakteri asam laktat (BAL) yang terkandung dalam yoghurt telah terbukti sebagai imunostimulator dengan memodifikasi produksi sitokin dan memproduksi sitokin anti inflamasi seperti IL-2, IL-10 dan TGF- β sehingga menyebabkan peningkatan fagositosis patogen. Penggunaan BAL dengan komposisi *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* pada terapi AITD diharapkan mampu mengembalikan fungsi normal sel-sel kelenjar tiroid, BAL memiliki peranan

yang sangat penting sebagai imunostimulator yang mengatur regulasi sistem imun dan mampu meningkatkan sistem imun di dalam tubuh, BAL yang terkandung dalam yoghurt akan meregulasi sistem imun seluler (Th1) serta humoral (Th2). Berdasarkan keseimbangannya, Th1 dan Th2 saling menghambat, IFN- γ sebagai produk dari Th1 mampu menghambat respon Th2, sehingga sistem imun humoral tertekan. Peningkatan sistem imun seluler (Th1) pada sistem pencernaan diikuti dengan produksi IL-2, hal tersebut mampu meregulasi sistem imun seluler pada semua organ termasuk kelenjar tiroid, sehingga mampu memperbaiki kerusakan kelenjar tiroid yang rusak akibat reaksi inflamasi (Delcenserie, 2009).

Zat-zat makanan yang terkandung dalam yoghurt juga berperan memodulasi sistem imun dan mampu meregulasi produksi sitokin proinflamasi dalam tubuh seperti *macronutrient* (PUFA, asam amino, karbohidrat), *micronutrient* seperti vitamin C yang berperan sebagai antioksidan yang bekerja menghambat sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan TNF- α , vitamin B6 yang dapat menekan produksi radikal bebas seperti NOS dan vitamin E yang berperan sebagai antioksidan untuk menekan oksidasi lipid dan ROS sehingga mampu menekan terjadinya toksisitas tirosit. Kandungan mineral (iron, dan selenium) ikut berperan dalam *blocking* NOS, IFN- γ dan sitokin proinflamasi lainnya. Yoghurt juga mengandung BAL yang memiliki kandungan Muramyl dipeptide (MDP) yang dapat menekan produksi sitokin proinflamasi (Gamal, 2011). Dengan kandungan makronutrien, mikronutrien, vitamin, serta mineral tersebut mampu memberikan efek terapi yang baik dalam perbaikan sel – sel tiroid seperti misalnya sel epitel tiroid pada jaringan penyusun dinding folikel tiroid yang

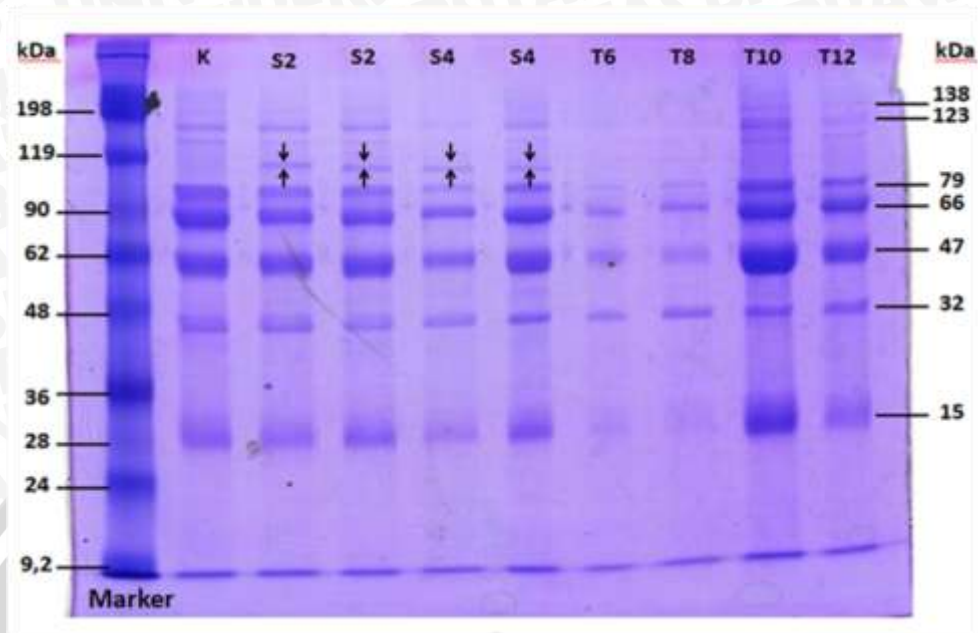
tersusun beraturan kembali dan lumen normal berisi koloid, dengan perubahan dan perbaikan jaringan tersebut diharapkan mampu mengembalikan fungsi normal kelenjar tiroid sebagai penghasil hormon tiroid. Perubahan kadar hormon tiroksin dapat pula dipengaruhi oleh dosis probiotik yoghurt yang masuk ke dalam tubuh hewan coba, semakin tinggi tingkat konsumsi yoghurt maka akan memberikan efek terapi yang lebih baik sehingga mampu mengembalikan kadar normal hormon tiroid (Lavasani, 2009).

Perubahan hormon tiroksin signifikan antar perlakuan, keadaan tikus yang mengalami AITD terjadi peningkatan hormon tiroksin yang signifikan, keadaan tersebut dapat dikatakan sebagai keadaan hipertiroidisme akibat dari pemberian NaI yang berlebih pada tikus model. Pemberian NaI terhadap tikus berpengaruh secara nyata ($p > 0$) dalam kenaikan hormon T_4 pada serum tikus. Hal tersebut dapat diketahui melalui kenaikan nilai rata-rata hormon T_4 pada kelompok AITD dibandingkan dengan kelompok kontrol dan AITD + Terapi, namun setelah tikus mendapatkan terapi yoghurt, kadar hormon menunjukkan pada batas normal namun masih lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol, hal tersebut menunjukkan pemberian terapi yoghurt cukup efektif dalam pengobatan dan perbaikan kelenjar tiroid tikus yang mengalami AITD. Perbedaan kadar hormon yang terjadi dapat dipengaruhi oleh kandungan yang terdapat dalam yoghurt salah satunya adalah BAL yang memiliki peranan dalam menstimulasi sistem imun dan menekan produksi sitokin proinflamasi, memproduksi sitokin anti inflamasi, serta dapat mensupresi infeksi, sehingga mampu memberikan efek terapi pada AITD dan mampu mengendalikan produksi normal hormon tiroid (Grajek *et al.*, 2005).

5.2 Gambaran Profil Pita Protein pada *Autoimmune Thyroiditis* (AITD)

Hasil analisa gambaran profil pita protein akan mendukung hasil karakterisasi sampel AITD yang dapat digunakan untuk membedakan progresivitas tingkat keparahan antara sampel serum tikus sakit dengan pemberian NaI 0,05% selama 5 minggu dan yang diterapi dengan yoghurt dengan dosis 10^9 cfu/ml selama 4 minggu dengan volume 1 ml yang akan dibandingkan dengan sampel serum tikus sehat dengan cara menganalisa protein – protein spesifik penanda terjadinya autoimun yang terekspresi pada gel SDS, sampel sakit berasal dari serum tikus setelah diberi perlakuan 0,05% NaI selama 2 minggu dan 4 minggu, sedangkan sampel terapi berasal dari serum tikus yang memperoleh terapi yoghurt pada minggu ke- 6, 8, 10 dan 12 (Gambar 5.2).

Kemiripan profil pita protein yang terekspresi menunjukkan bahwa pada sampel tersebut mempunyai karakteristik yang sama dan mempunyai kemiripan protein antar sampel. Running dengan elektroforesis menggunakan acuan protein marker *nacalai* (lot. L2B2356) dengan berat molekul 9,2 hingga 198 kDa, berdasarkan hasil running pada gel SDS dapat terdeteksi pita protein yang terekspresi dan dapat diketahui berat molekul sampel protein serum pada tikus sehat, tikus AITD dan tikus AITD dengan terapi yoghurt. Hasil analisis protein pada gel elektroforesis berupa protein yang berbentuk pita sehingga dapat memperkirakan berat molekul dan jumlah pita protein. Berat molekul suatu protein dapat ditentukan dengan pengukuran mobilitas molekul protein pada gel poliakrilamida yang mengandung SDS (Walker, 2009).



Gambar 5.2 Profil pita protein AITD hasil SDS-PAGE

S₂ : Sakit minggu ke 2

T₈ : Terapi minggu ke 8

S₄ : Sakit minggu ke 4

T₁₀ : Terapi minggu ke 10

T₆ : Terapi minggu ke 6

T₁₂ : Terapi minggu ke 12

Data perhitungan berat molekul pita protein diperoleh dari beragam pita protein yang terbentuk dari 10 sampel protein yang di elektroforesis dengan berat molekul dengan kisaran 15 kDa hingga 138 kDa, profil protein yang terekspresi menunjukkan perbedaan sampel sehat, sakit dan terapi. Pada sampel sakit yaitu S₂ dan S₄ menunjukkan ekspresi protein spesifik penanda autoimun yaitu CRP (*C-Reactive Protein*) dengan berat molekul 115 kDa. Pada sampel terapi yaitu T₆, T₈ tidak menunjukkan ekspresi CRP dan beberapa protein tidak terekspresi, sedangkan pada sampel T₁₀, T₁₂ menunjukkan ekspresi protein sama dengan kontrol dan protein CRP tidak terekspresi.

Protein merupakan makromolekul yang sebagian besar menyusun bagian dari sel, sehingga banyak peneliti menggunakan protein sebagai obyek dalam suatu penelitian (Gaffar, 2007). Dalam penelitian ini perlakuan sakit di induksi

dengan menggunakan NaI 0,05% selama 5 minggu. Kadar NaI yang berlebih didalam tubuh akan dioksidasi oleh TPO dan menghasilkan radikal bebas salah satunya adalah *Reactive oxygen species* (ROS) (Rose *et al.*, 2002), *Reactive oxygen species* (ROS) menyebabkan stres oksidatif dan dapat merusak membran sel sehingga mampu berlanjut pada terjadinya reaksi inflamasi serta destruksi jaringan tiroid, selain itu radikal bebas juga dapat merusak komponen intrasel termasuk protein, sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada protein yang terkandung didalam serum dan berakibat beberapa protein tidak terekspresi (Day *et al.*, 2004 ; Mohssen, 2001).

Gambaran protein yang terekspresi pada sampel S₂ dan S₄ menunjukkan adanya ekspresi protein penanda terjadinya inflamasi serta autoimun yaitu *C-reactive protein* (CRP) dengan berat molekul 115 kDa (Gambar 5.2). Terekspresinya protein tersebut menunjukkan bahwa tikus sudah mengalami sakit dengan perlakuan NaI yang diberikan selama 5 minggu. Pernyataan tersebut diperkuat oleh Irkula *et al.*, (2013) yang menyatakan bahwa CRP merupakan protein fase akut yang dapat digunakan sebagai marker spesifik dan sensitif penanda terjadinya aktivitas inflamasi. *C-reactive protein* yang terekspresi pada penelitian ini adalah CRP dengan berat molekul 115 kDa, hal ini diperkuat oleh pernyataan Adji (2004), yang menyatakan bahwa berat molekul CRP adalah 115 kDa.

Sebagian besar CRP dalam plasma berasal dari hati, diatur oleh IL-6 dan sitokin pro-inflamasi yang lain seperti IL-1 dan TNF- α , sebagian kecil CRP dapat juga disintesis secara lokal pada lesi organ yang mengalami inflamasi oleh sel otot

polos dan sel monosit. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa CRP selain di produksi oleh hati juga dapat di produksi oleh makrofag pada *atherosclerotic plaque* (Yasojima *et al.*, 2001), sel epitel otot polos (Yasojima *et al.*, 2001 ; Jabs *et al.*, 2003) dan jaringan adipose (Ouchi, 2003). Menurut Devaraj (2005), produksi CRP dapat di induksi oleh molekul inflamasi yaitu sitokin – sitokin pro-inflamasi, hal tersebut juga di perkuat dengan pernyataan Kaiso dan Alkira (2002), bahwa sitokin – sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α yang di dikeluarkan oleh makrofag mampu menginisiasi produksi protein penanda inflamasi. *C-Reactive Protein* dapat berperan langsung dengan mengaktifkan komplemen, apoptosis, aktivasi sel vaskuler, pengambilan monosit, akumulasi lipid dan trombosis (Paffen dan deMaat, 2006).

Autoimmune Thyroiditis menyebabkan terjadinya respon inflamasi pada jaringan yang mengaktifasi sitokin pro inflamasi seperti misalnya IL-1, IL-6 dan TNF- α (Santi, 2013 ; Legatawa, 2013). Pemberian NaI juga dapat menyebabkan terjadinya respon inflamasi sistemik yang ditandai dengan mobilisasi dan aktivasi sel inflamasi ke dalam sirkulasi darah seperti sitokin pro-inflamasi yaitu IL-1, IL-6 dan TNF- α . Proses inflamasi ini akan merangsang sistem hematopoetik terutama sumsum tulang untuk melepaskan leukosit dan trombosit serta merangsang hepar untuk memproduksi *acute phase protein* seperti CRP dan fibrinogen (Eeden, 2005). Menurut Taylor *et al.*, (2005), CRP dapat diinduksi oleh sitokin pro-inflamasi yaitu IL-1 dan juga peningkatan kadar CRP dapat disebabkan oleh pelepasan TNF- α dan IL-6. Sitokin - sitokin yang disekresikan oleh makrofag akan menuju ke sirkulasi darah dan menginduksi respon inflamasi yang ditandai

dengan meningkatnya kadar CRP (Wang, 2010).

Sampel T₆, T₈, T₁₀ dan T₁₂ adalah sampel dari tikus AITD yang diberi perlakuan terapi yoghurt, gambaran profil protein yang terekspresi pada sampel T₆ dan T₈ memiliki molekul kisaran 15 kDa hingga 79 kDa. Terapi yang diberikan pada minggu ke-6 dan ke-8 sudah mulai menunjukkan adanya perbaikan yang ditandai dengan tidak munculnya ekspresi protein CRP, dan pada sampel T₁₀ dan T₁₂, protein yang terekspresi memiliki berat molekul kisaran 15 kDa hingga 138 kDa dan menunjukkan gambaran pita protein yang sama dengan kontrol, hal ini berkaitan dengan optimasi dosis yoghurt yang diberikan sebagai terapi pada tikus AITD. Lavasani (2009) menyatakan, bahwa dosis yoghurt yang tepat untuk terapi AITD adalah 10⁹ cfu/ml dan volume yoghurt yang diberikan sebanyak 1 ml. Proses penyembuhan AITD sudah dapat terlihat dengan tidak terekspresinya CRP pada sampel T₆ dan T₈. Gambaran yang terlihat pada sampel T₁₀ dan T₁₂ menunjukkan protein yang terekspresi sama dengan kontrol, hal ini membuktikan penelitian yang telah dilakukan Lavasani (2009) bahwa pemberian yoghurt dengan dosis 10⁹ cfu/ml dengan volume 1 ml diyakini mampu menyembuhkan dan memperbaiki jaringan tiroid pada tikus yang mengalami AITD (Tabel 5.2 ; Gambar 5.2). Menurut peranannya, BAL yang terkandung didalam yoghurt telah terbukti mampu berperan sebagai imunostimulator dengan memproduksi sitokin – sitokin antiinflamasi seperti IL-2, IL-10 dan TGF- β sehingga mampu meningkatkan fagositosis patogen dan meregulasi sistem imun seluler dan humoral, hal tersebut mampu meregulasi sistem imun pada semua organ termasuk kelenjar tiroid, sehingga mampu memperbaiki kerusakan yang terjadi pada

kelenjar tiroid dan produksi sitokin proinflamasi dapat ditekan sehingga protein penanda autoimun dan inflamasi tidak terekspresi (Delcenserie, 2009).

Tabel 5.2 Profil Protein serum tikus model *Autoimmune Thyroiditis* (AITD) berdasarkan Berat Molekul Protein Hasil SDS PAGE dengan satuan (kDa).

Marker	Sehat	Sakit (2) A _{1,3}	Sakit (2) A _{2,3}	Sakit (4) B _{1,1}	Sakit (4) B _{2,2}	Terapi(6) B _{1,2}	Terapi(8) B _{2,2}	Terapi(10) B _{2,2}	Terapi(12) B _{2,2}
198	138	138	138	138	138	138	138	138	138
	123	123	123	123	123	-	-	123	123
119	-	115	115	115	115	-	-	-	-
	79	79	79	79	79	79	79	79	83
90	66	66	66	66	66	66	70	66	70
62	50	47	47	47	47	47	50	50	50
48	32	32	32	32	32	32	34	34	34
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	15	15	15	15	15	15	16	16	17
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : Tanda (-) menunjukkan pita protein dengan berat molekul tersebut tidak terekspresi.

Pita protein yang terdeteksi berkaitan dengan tingkat keparahan dari sampel AITD hasil induksi NaI dengan menganalisa protein yang terekspresi. Berdasarkan gambaran protein yang terekspresi diperoleh ekspresi *C-reactive protein* (CRP) yang muncul pada ekspresi protein sampel tikus AITD. Variasi profil pita protein dari masing-masing isolat menggambarkan keragaman protein yang muncul antara tikus kontrol, sakit dan terapi. Semakin banyak kesamaan jumlah pita protein yang terdeteksi menunjukkan kesamaan karakteristik dan protein tersebut dapat menjadi penanda bahwa sampel sakit dapat kembali normal ketika telah diterapi dengan yoghurt. **Variasi profil pita protein dari masing-masing isolat menggambarkan keragaman protein yang muncul antara tikus kontrol, sakit dan terapi. Semakin banyak kesamaan jumlah pita protein yang**

terdeteksi menunjukkan kesamaan karakteristik dan protein tersebut dapat menjadi penanda bahwa sampel sakit dapat kembali normal ketika telah diterapi dengan yoghurt.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian Natrium Iodida (NaI) pada tikus (*Rattus norvegicus*) menyebabkan peningkatan kadar hormon tiroksin (T_4), serta terjadi penurunan kadar hormon T_4 menjadi normal setelah diberi terapi yoghurt.
2. Terdapat ekspresi protein yang diyakini sebagai protein spesifik penanda terjadinya inflamasi maupun autoimun, berupa *C-Reactive Protein* (CRP) dengan berat molekul 115kDa pada sampel protein serum tikus AITD yaitu S_2 dan S_4 .

6.2 Saran

1. Perlu adanya penelitian lanjutan untuk menganalisa kandungan makronutrien, mikronutrien, vitamin dan mineral yang ada di dalam yoghurt dengan starter (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*) sehingga dapat menyebabkan perbaikan dan pengobatan AITD.
2. Dilakukan pengujian protein spesifik autoimun lainnya yang muncul pada AITD dan dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui bahan apa saja yang dapat menginduksi munculnya CRP.

DAFTAR PUSTAKA

- Adji, D. 2009. The Alteration of Hepatic Function Liver Expression of C-Reactive Protein (CRP) After Laparotomy Surgery. *J. Sain. Vet.* Vol. 27 No. 2.
- Agrawal, N.K. 2011. *Thyroiditis*. <http://www.japi.org/>. Diakses 2 April 2013.
- Anwar, R. 2005. *Fungsi dan Kelainan Kelenjar Tiroid*. [Skripsi]. Bandung : Fakultas kedokteran Universitas Padjajaran Bandung.
- Besselsen, DG. 2004. *Biology of Laboratory Rodent*. <http://www.ahsc.arizona.edu/>. Diakses 2 April 2013.
- Casas, J. P., Shah, T., Cooper, J., *et al.* 2006. Insight into The Nature of The CRP-coronary Event Association Using Mendelian Randomization. *International Journal of Epidemiology*. 35, 922-931.
- Chistiakov, D. A. 2005. Immunogenetics of Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Autoimmune Diseases*, 2:1 doi:10.1186/1740-2557-2-1.
- Day, L., Shikuma C, Gerschenson . M. 2004. *Mitochondrion* 4. 95-109.
- Delcenserie, V.D. Martel, M. Lamoureux, J. Amiot, Y. Boutin, and D. Roy. 2009. Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract. *Curr. Issues Molecular Biology*. vol 10. pp 37-54.
- Devaraj, S., Du Clos T.W., Jialal I. 2005. Binding and internalization of C-Reactive Protein by Fcγ Receptors on Human Aortic Endothelial cells mediates biological effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1359–1363.
- Dharmana, E. 2007. *Aspek Imunologik. Autoimmine Thyroid Diseases*. *Tiroidologi klinik* :53_63. Semarang.
- Djokomoeljanto, R. 2006. *Kelenjar Tiroid, Hipotiroidisme dan Hipertiroidisme*. Ilmu penyakit Dalam Jilid III Edisi IV. FKUI: 1955-65.
- Dodds, W. J. 2008. *Thyroid Disease and Autoimmune Thyroiditis*. Fall. Saluki sightings.
- Eeden, SF., Yeung A, Quinlan K, Hogg JC. 2005. Systemic Response to Ambient Particulate Matter. *Proc Am Thorac Soc*. 2:61-7.

- Ferguson D.C. 2007. Testing for Hypothyroidism in Dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 37 : 647 – 669.
- Gaffar, S. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Bandung. FMIPA Kimia Universitas Padjajaran.
- Gamal, Y.M.E., O.A. Elmasry, dan D.H.E. Ghoneimy. 2011. Immunomodulatory effects of food. Departement of Pediatrics, Ain Shams University, Cairo. *Egypt journal of food technology* 1:3-13.
- Grajek, W., A. Olejnik and A. Sip. 2005. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Food Microbiology*. Vol. 52 No. 3/2005, 665–671.
- Hartoyo, A. 2008. Probiotik, Prebiotik dan Sinbiotik. <<http://duniapangankita.wordpress.com/2008/03/31/25/>>. Diakses 2 April 2013.
- Irkulla, S., Ujam. B., Gaze. D., Kumar .D. and Mendall .M. A. 2013. Abdominal adiposity is the main determinant of the C-reactive response to injury in subjects undergoing inguinal hernia repair. *Journal of Inflammation*. 10:5.
- Jabs, W. J., B. A. Logering, P. Gerke. 2003. The Kidney as A Second Site of Human C- Reactive Protein Formation in Vivo. *European Journal of Immunology* 33, 152-161.
- Kaiso, T., and S. Alkira. 2002. Toll-like Receptor as Adjuvant Receptor Biochem. Biophy. Acta ; 1589 : 1-13.
- Kusriningrum, R.S. 2010. *Perancangan Percobaan*. Surabaya. Airlangga University Press.
- Laurberg, P., S, Andersen., B, Pedersen, I., A, Carle., 2005. Hypothyroidism in the elderly: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Drugs Aging* 22, 23—38.
- Lavasani, S. D., B. Nouri, M. Fak, F. Buske, S. Molin, G. Thorlaciuss, H. Alenfall, J. Jeppsson, and B. Westrom. 2009. A Novel Probiotics Mixture Exert a Therapeutic Effect on Experimental Autoimmun Encephalomyelitis Mediated by IL-10 Producing Regulatory T-Cell. *Autoimmunity*. vol 5. pp 1-11.
- Leisy, P. S. "My ANA is positive . What does that mean?" *Lupus News* (a publication of the Lupus Foundation of America).
- <www.lupus.org/webmodules/webarticlesnet/templates/new_empty.aspx?articleid=402&zoneid=76>. Diakses 3 juni 2013.

- Legatawa, H. 2013. *Peran Yoghurt Terhadap Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) dan Gambaran Histopatologi Jaringan Tiroid Tikus Model AITD*. [Skripsi]. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Mohssen M. 2001. *Environ. Res. Sec.* 87 : 31-36.
- Marina, Y. 2011. *Peran Propiltiourasil Sebagai Terapi Inisial Terhadap Kadar T3, T4, TSH Dan IL – 4 pada Penyakit Graves*. [Thesis]. Universitas Andalas Padang.
- Masjhur, J.S. 2010. *Penyakit Tiroid Autoimun..* Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. RS Dr. Hasan Sadikin Bandung. Indonesia.
- Na, N. 2005. Serum free Hemoglobin concentrations in healthy individuals are related to Haptoglobin type. *Clin. Chem.* 51: 1754-1755.
- Nagayama, Y., I. Horie., O. Saitoh., M. Nakahara., N. Abiru. 2007. CD4+ CD25+ naturally occurring regulatory T cells and not lymphopenia play a role in the pathogenesis of iodide-induced autoimmune thyroiditis in NOD-H2h4 mice. *Journal of Autoimmunity* 29 pp:195-202.
- Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., *et al.* 2003. Reciprocal Association of C-Reactive Protein With Adiponectin in Blood Stream and Adipose Tissue. *Circulation* 107, 671-674.
- Paffen, E., deMaat MPM., 2006, C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor?. *Cardiovascular Research* 71: 30-39.
- Piechotta, M., M. Arndt and H. O. Hoppen. 2010. Autoantibodies Against Thyroid Hormones and Their Influence on Thyroxine Determination with Chemiluminescence Immunoassay in Dog. *J. Vet. Sci.*, 11(3): 191-196.
- Prummel, M. F., S. Thea and Wiersinga. W.M. 2004. The environment and autoimmune thyroid diseases. *European Journal of Endocrinology* .150 605–618.
- Prummerl. M. F and Wiersinga. W.M. 2004. Thyroid Autoimmunity and Miscariage. *European Journal of Endocrinology*. 150: 751 – 755.
- Rose, N.R., B. Raphael, and B. Lynne. 2002. Iodine: an environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmunity Reviews* 1 pp: 97–103.
- Sa, E., J. Un-Ho, K. Dong-Soo, and K. Bong-Seok. 2007. Herbal Medicine Gamgungtang Down-Regulates Autoimmunity through Induction of TH2 Cytokine Production by Lymphocytes in Experimental Thyroiditis

Model. *Ethnopharmacology*. vol 109. pp 472-479.

Santi, P. 2013. *Gambaran Histopatologi Tiroid dan Ekspresi IL-1 pada Hewan Model Tikus (Rattus norvegicus) AITD Hasil Injeksi Tiroid Kambing*. [Skripsi]. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.

Silvia. 2002. Pembuatan yoghurt kedelai (soygart) dengan menggunakan kultur campuran *Bifidobacterium bifidum* dan *Streptococcus thermophilus*. [skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Sodiq A, Abidin Z. 2008. Meningkatkan Produksi Susu Kambing Peranakan Etawa. Agromedia Pustaka. Jakarta.

Stokight, J. 2003. Assessment of Thyroid Function : Towards an Integrated Laboratory – Clinical Approach. *Clin Biochem Rev*. 24:109-122.

Sutama, IK., Budiarsana, IGM. 1997. Kambing PE penghasil susu sebagai sumber baru subsektor peternakan. Prosiding Seminar Nasional Peternakan Dan Veteriner. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Bogor.

Swain, M., Swain, T. and Mohanty. B.K. 2005. Autoimmune Thyroid Disorders - An Update. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 20 (1) 9-17.

Tar, C., A., Yap CYF. 2011. Thyroid Function Test. Laboratory Insight. Proceeding of Singapore Healthcare. 20:132-137.

Taylor, K. E., Giddings, J. C. & Van Den Berg, C. W. 2005. C- Reactive Protein Induced in Vitro Endothelial Cell Activation is An Artefact Caused by Azide and Lipopolysaccharide. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 25, 1225-1230.

Tomer, Y., and T.F. Davies. 2003. Thyroid Disease and Autoimmunity. *Endocrine*. vol 24. pp 694-717.

Walker, J. M. 2009. *SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins*. Di dalam: Walker JM, editor. *The Protein Protocols Handbook*. Ed ke-3. UK: Human Press. Hlm 177-186.

Wang.D.Y, P.C. Yang, W. L. Yu, S. H. Kuo, N. Y. Hsu. 2000. Serial antinuclear antibodies titre in pleural and pericardial fluid. *Eur Respir J* 2000; 15: 1106±1110. Printed in UK ± all rights reserved.

Wang, Z., Nakayama, T. 2010. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators of inflammation*. 1-17.

Weetman, A.P. 2003. Autoimmune thyroid disease: propagation and progression.

European Journal of Endocrinology pp: 148 1–9.

Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G., *et al.* 2001. Generation of C- Reactive Protein and Complements in Atherosclerotic plaques. *American Journal of Pathology* 158, 1039-1051.

Yu,S., M. Brad., H. Yagita and H. Braley-Mullen. 2001. Characteristics of Inflammatory Cells in Spontaneous Autoimmune Thyroiditis of NOD.H-2h4 Mice. *Journal of Autoimmunity* pp: 16, 37–46.

Yulinery, T, Y. Eko, dan N. Novik. 2005.Uji Fisiologis Probiotik Lactobacillus spp. Mar 8 yang Telah Dienkapsulasi dengan Menggunakan Spray Dryer untuk Menurunkan Kolesterol. *Jurnal Biodiversitas*. vol 7, no.2, halaman 118-122.

Zaias J., M. Mineau., C. Cray., D. Yoon., and N. H. Aitman. 2009. Reference Values for Serum Proteins of Common Laboratory Rodent Strains. *Journal of The American Association for Laboratory Animal Science*. Vol 48 (4) : 387 – 390.





LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 141-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 : PENGARUH PEMBERIAN PROBIOTIK PADA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) MODEL AUTOIMUNE THYROIDITIS
(AITD) YANG DI INDUKSI SUPLEMENTASI SODIUM
IODAT (NaI₂)

PENELITI : HENDRA LEGATAWA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

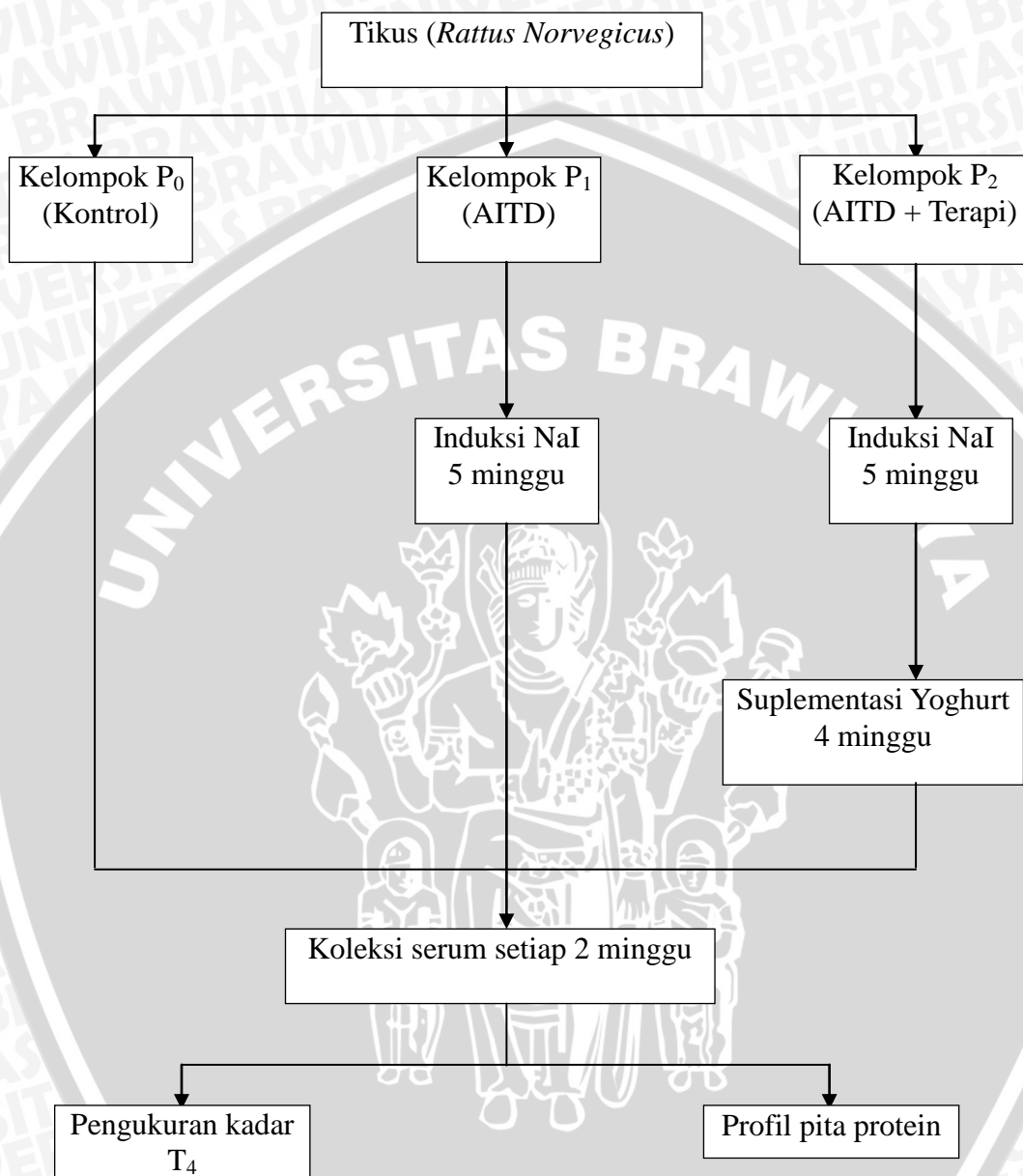
DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 12 April 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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

Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian

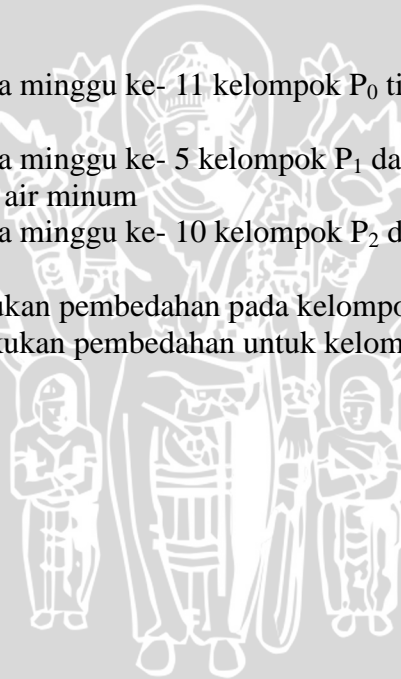


Lampiran 3. Skema Jadwal PerlakuanKontrol (P_0) Tanpa perlakuanKel. P_2 Terapi yoghurtKel. P_1 & P_2 Induksi NaIKel. P_1 PembedahanKel. P_0 & P_2

pembedahan

**Keterangan :**

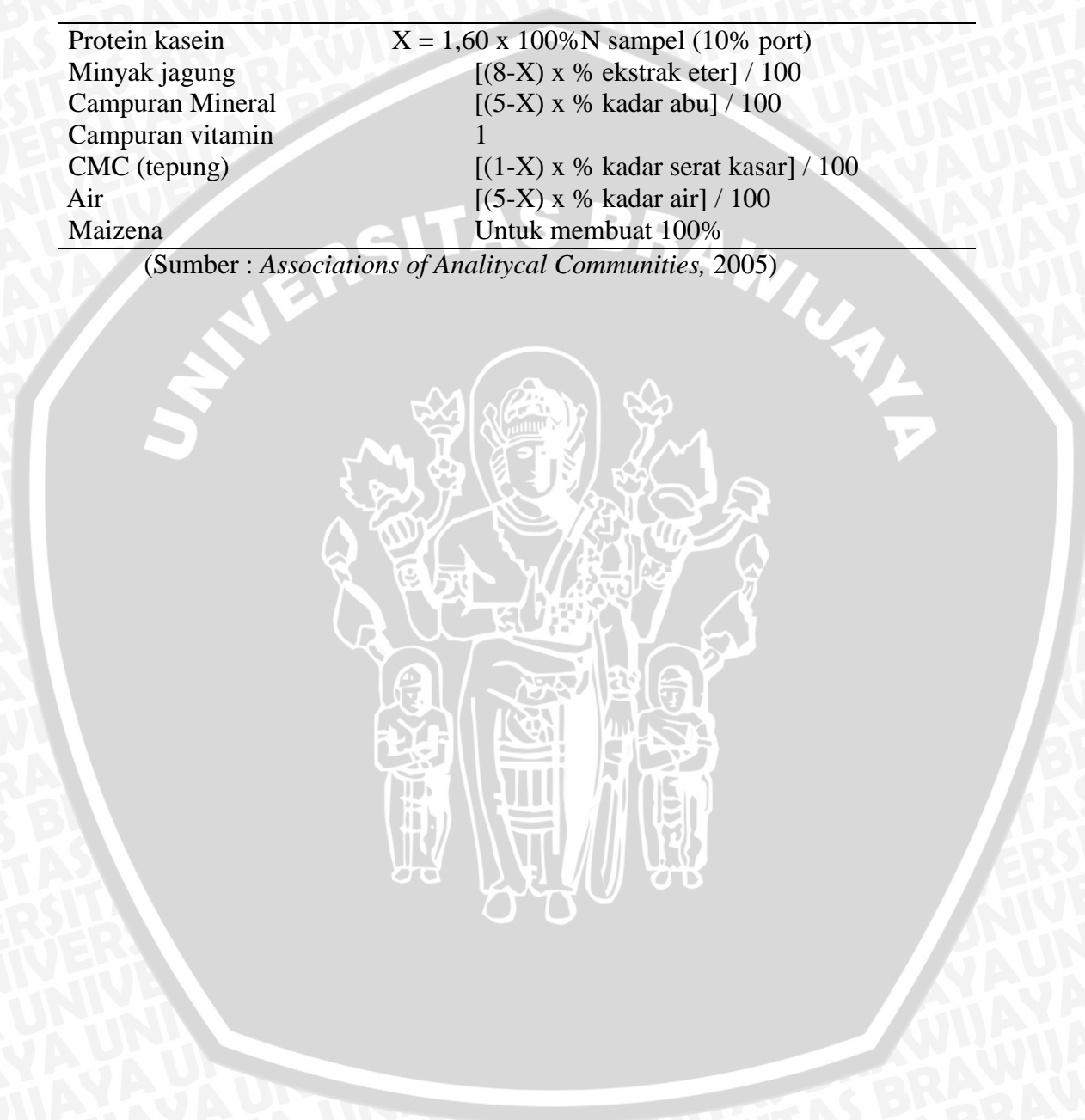
- c. Minggu ke- 1 hingga minggu ke- 11 kelompok P_0 tidak diberikan perlakuan apapun
- d. Minggu ke- 1 hingga minggu ke- 5 kelompok P_1 dan kelompok P_2 diberi induksi NaI melalui air minum
- e. Minggu ke- 6 hingga minggu ke- 10 kelompok P_2 diberi suplementasi yoghurt
- f. Minggu ke- 6 dilakukan pembedahan pada kelompok P_1
- g. Minggu ke- 11 dilakukan pembedahan untuk kelompok P_0 dan kelompok P_2

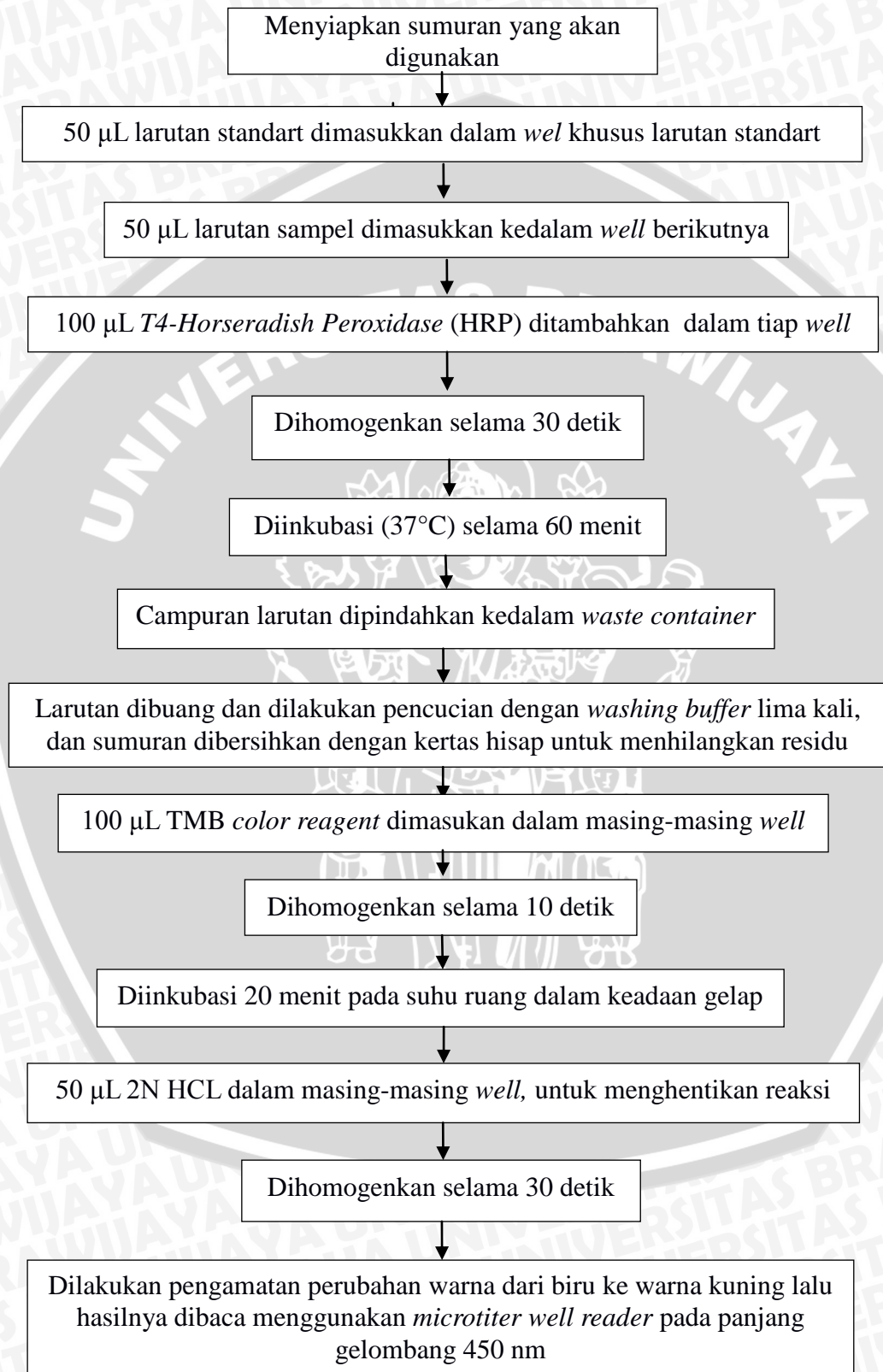


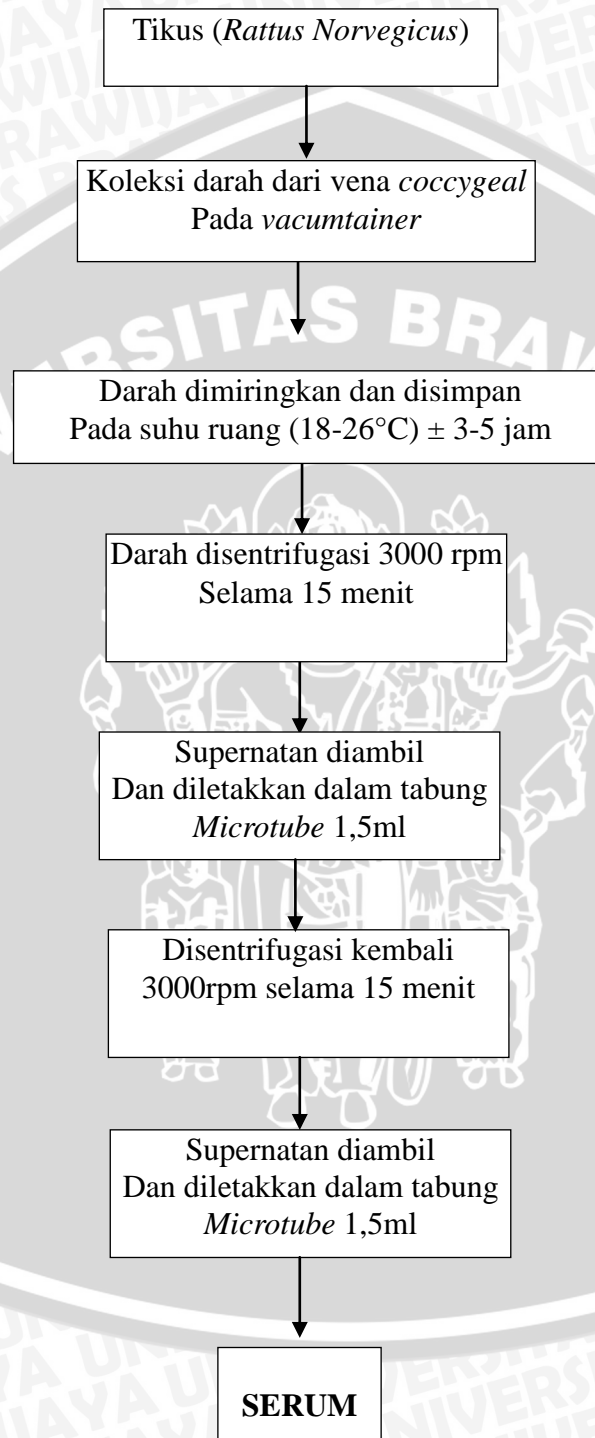
Lampiran 4. Komposisi ransum basal tikus percobaan

Bahan – Bahan	Jumlah (%)
Protein kasein	$X = 1,60 \times 100\%N$ sampel (10% port)
Minyak jagung	$[(8-X) \times \% \text{ekstrak eter}] / 100$
Campuran Mineral	$[(5-X) \times \% \text{kadar abu}] / 100$
Campuran vitamin	1
CMC (tepung)	$[(1-X) \times \% \text{kadar serat kasar}] / 100$
Air	$[(5-X) \times \% \text{kadar air}] / 100$
Maizena	Untuk membuat 100%

(Sumber : *Associations of Analytical Communities*, 2005)

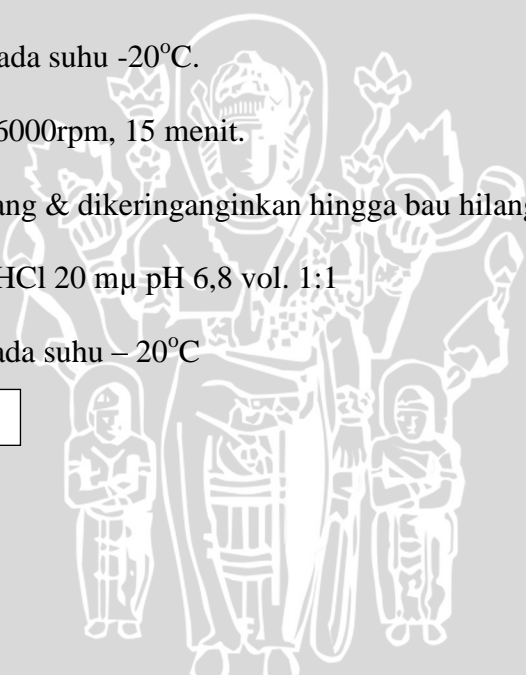


Lampiran 5. Pemeriksaan kadar T₄ dengan ELISA kit

Lampiran 6. Koleksi serum darah

Lampiran 7. Isolasi Protein Serum**SERUM**

5. Bila serum beku, serum di *tawing* dan di sentrifus 3000 rpm 15 menit.
6. Diambil 10 mL dan dimasukkan ke dalam *microtube*.
7. Tambahkan PBST – PMSF 5x volume serum.
8. Disonikasi 10 menit.
9. Disentrifus 6000rpm, 15 menit.
10. Supernatan diambil & diberi etanol absolut 1:1
11. Overnight pada suhu -20°C.
12. Disentrifus 6000rpm, 15 menit.
13. Etanol dibuang & dikeringanginkan hingga bau hilang
14. Diberi Tris-HCl 20 mM pH 6,8 vol. 1:1
15. Disimpan pada suhu - 20°C

Protein Serum

Lampiran 8. Pemeriksaan profil pita protein dengan metode SDS – PAGE

Menyiapkan sampel

10. Sampel buffer ditambahkan kedalam sampel protein (1:1) dalam tabung *microtube* 1,5ml
11. Sampel dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit
12. Setelah sampel dingin, simpan pada suhu 20°C bila sampel tidak langsung dipakai.

Menyiapkan separating gel dan stacking gel

13. Susun plate pembentuk gel
14. Buat separating gel 12,5% dengan cara sebagai berikut :
 - *siapkan tabung propilen 50 mL
 - *masukkan 3,125 mL stok akrilamida dalam tabung
 - *masukkan 2,75 mL 1 M Tris pH 8,8. Tabung ditutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
 - *masukkan aquabides 1,505 mL. Tabung ditutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
 - *masukkan 75 μ L SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan
 - * masukkan 75 μ L APS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan
 - *masukkan 6,25 μ L TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan

*segera tuang larutan kedalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 mL(jaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai batas yang terdapat pada plate.

*secara perlahan, tambahkan aquades di atas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang.

- Biarkan gel memadat selama \pm 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan diantara batas air dan gel yang terbentuk). Setelah itu, buang air yang menutup separating gel.

- Sesudah separating gel memadat, siapkan stacking gel 3% dengan cara yang sama seperti prosedur nomor 2 di atas, dengan volume larutan sebagai berikut:

* Bis-akrilamida 30%	0,45 mL
* 1 M Tris pH 6,8	0,38 mL
* Aquabides	2,11 mL
* SDS 10%	30 μ L
* TEMED	5 μ L
* APS 10%	30 μ L

Memasukkan sampel pada sumuran gel

15. Masukkan plate yang sudah berisi gel ke dalam chamber elektroforesis.
16. Tuang running buffer sampai bagian atas dan bawah gel terendam.
17. Bila terbentuk gelembung udara pada dasar gel atau diantara sumur sampel, maka gelembung tersebut harus dihilangkan

18. Masukkan sampel sebanyak 10-20 μL (yang kandungan proteinnya minimal 0,1g dan maksimal 20-40g) secara hati-hati ke dalam dasar sumur gel menggunakan syringe Hamilton.
19. Bilas syringe 3x dengan air atau dengan running buffer sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur gel berikutnya.

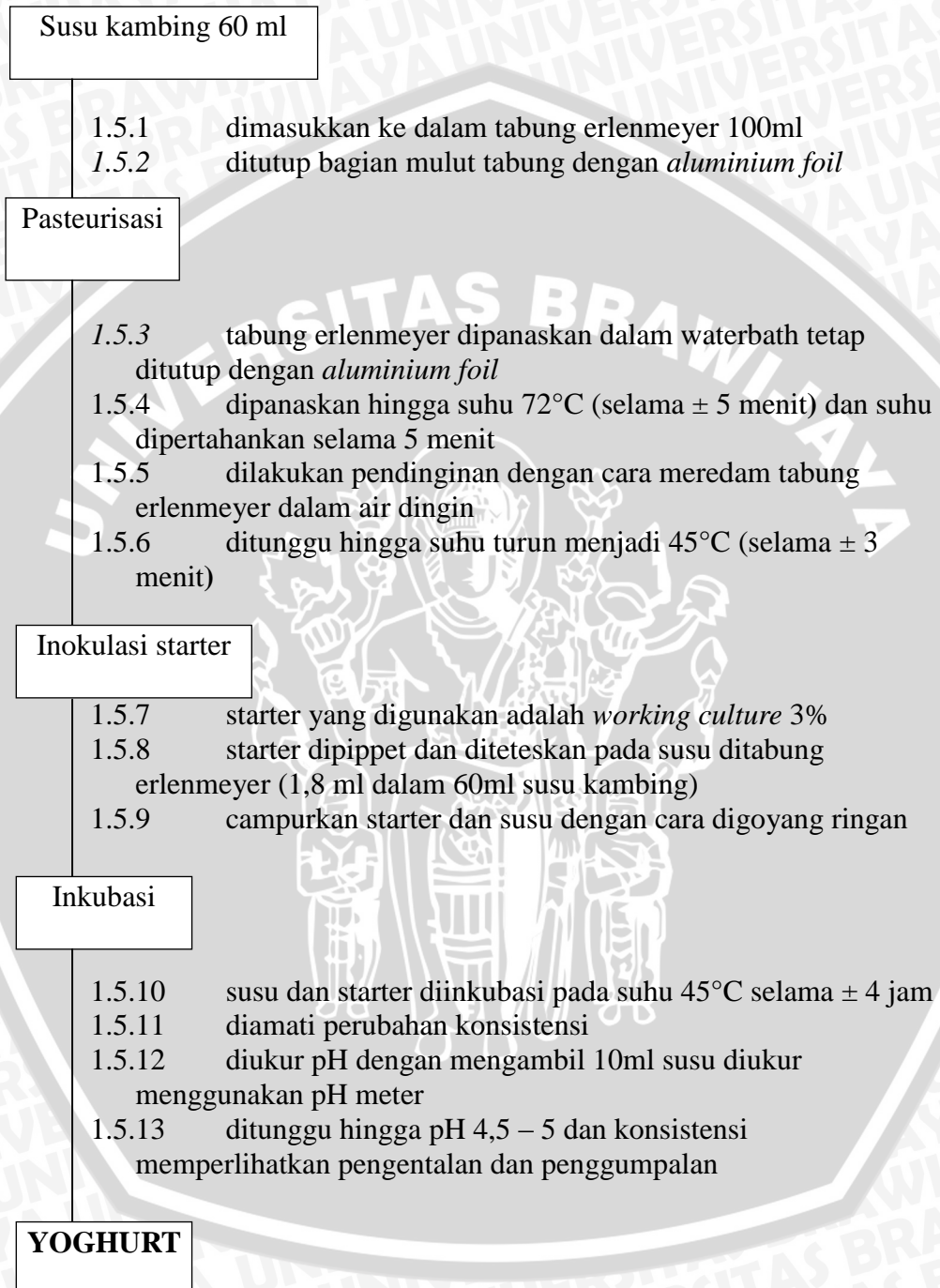
Running gel

20. Hubungkan perangkat elektroforesis dengan sumber listrik.
21. Lakukan running pada arus konstan 20mA selama kurang lebih 40-50 menit atau sampai *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel.
22. Setelah selesai, tuang running buffer dan ambil gel dari plate.

Pewarnaan gel dengan Coomassie Brilliant Blue (CBB)

23. Disiapkan larutan staining dan destaining untuk mewarnai protein pada gel dan menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein.
24. Rendam gel dalam 20mL staining solution sambil digoyangkan ± 15 menit. Setelah itu, tuang kembali larutan staining pada wadahnya.
25. Cuci dengan air beberapa kali. Setelah itu, rendam gel dalam 50 mL destaining solution sambil digoyang ± 30 menit atau sampai pita protein terlihat jelas.

Profil Pita Protein

Lampiran 9. Diagram alir pembuatan yoghurt

Lampiran 10. Monitoring Pembuatan Yoghurt

12/4 & 13/4 minggu I

Monitoring *working culture*

Yoghurt 3%			
Waktu	pH	Suhu	Konsistensi
14.42	-	-	-
15.42	-	-	-
16.18	6,23	30 °C	-
17.17	6,18	29 °C	-
18.00	5,8	30 °C	-
20.20	5,3	30 °C	-
21.29	4,9	29 °C	+
22.02	4,7	30 °C	++
22.22	4,59	36,2 °C	+++

Monitoring Yoghurt

Yoghurt 3%			
Waktu	pH	Suhu	Konsistensi
23.03	-	-	-
05.07	4,03	30,2 °C	+++

20/4 & minggu 2

Monitoring *working culture*

Yoghurt 3%			
Waktu	pH	Suhu	Konsistensi
14.34	-	-	-
17.27	6,20	30 °C	-
18.33	6,02	29 °C	-
21.36	5,40	31,3 °C	-
23.00	5,08	30,7 °C	+
00.24	4,87	25 °C	+++
01.07	4,78	29,2 °C	+++

21/4

Monitoring Yoghurt

Yoghurt 3%			
Waktu	pH	Suhu	Konsistensi
02.07	-	-	-
05.08	5,46	31,5 °C	-
06.36	5,43	29,6 °C	-
06.47	5,15	30,3 °C	-
15.09	4,78	31,0 °C	-
16.17	4,43	32,0 °C	-

26/4 minggu 3

Monitoring *working culture*

Yoghurt 3%			
Waktu	pH	Suhu	Konsistensi
14.37	-	-	-
22.30	5,58	28,5 °C	-
23.49	5,2	30,2 °C	+
00.41	5,0	29,4 °C	++

27/4

Monitoring Yoghurt

Yoghurt 3%			
Waktu	pH	Suhu	Konsistensi
02.30	-	-	-
12.40	5,3	28,5 °C	-
13.30	5,5	30,2 °C	+

Minggu 4

Monitoring Yoghurt

Yoghurt 3%			
Waktu	pH	Suhu	Konsistensi
12.00	-	-	-
17.57	5,4	34 °C	-
18.30	4,7	47 °C	-

Monitoring Yoghurt

Yoghurt 3%			
Waktu	pH	Suhu	Konsistensi
22.22	-	-	-
04.27	5,25	30 °C	+
06.06	4,55	32 °C	+++

Lampiran 11. Platting Yoghurt**Minggu ke-1**

Pengenceran	cfu/ml
10^7	$160. 10^7$
10^8	$80. 10^8$

Minggu ke-2

Pengenceran	cfu/ml
10^7	$84. 10^7$
10^8	$90. 10^8$

Minggu ke-3

Pengenceran	cfu/ml
10^7	$30. 10^7$
10^8	$40. 10^8$

Minggu ke-4

Pengenceran	cfu/ml
10^7	$30. 10^7$
10^8	$40. 10^8$

Lampiran 12. Hasil Analisa Perubahan Kadar Hormon Tiroksin (T_4) dan Uji Statistik Kadar T_4 dengan SPSS

12.1 Kurva Baku Rodent T_4 ELISA *test kit*

No	Kode sampel	Konsentrasi (ng/mL)	Log Konsentrasi	O.D 450		O.D 450 rata-rata
				I	II	
1	Standar 1	0		1,391	1,388	1,3895
2	Standar 2	5	0,699	1,383	1,306	1,3445
3	Standar 3	10	1,000	1,291	1,057	1,174
4	Standar 4	25	1,398	0,955	0,821	0,888
5	Standar 5	50	1,699	0,572	0,645	0,6085
6	Standar 6	100	2,000	0,446	0,483	0,4645
7	Standar 7	300	2,477	0,228	0,228	0,228

12.2 Data Perubahan kadar hormon Tiroksin (T_4)

SEHAT	SAKIT	TERAPI
1,491	4	1,597
1,353	4,89	1,741
1,283	4	1,611
1,364	5	1,591
1,07	4,69	1,974
Rata - rata		
1,3122	4,4848	1,7028

12.3 Perhitungan Statistik dengan SPSS

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		T4
N		15
Normal Parameters ^a	Mean	2.4999
	Std. Deviation	1.47760
Most Extreme Differences	Absolute	.306
	Positive	.306
	Negative	-.186
Kolmogorov-Smirnov Z		1.184
Asymp. Sig. (2-tailed)		.121

Jika nilai signifikansi $> 0,05$ maka data dikatakan normal. Nilai probabilitas

atau $sig. > 0.05$ yaitu 0.121 maka varian sampel berdistribusi normal.

Test of Homogeneity of Variances

T4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.928	2	12	.188

Jika nilai signifikansi (sig) $> 0,05$ maka data dikatakan homogen. Nilai *levene statistic* adalah 1.928 dengan nilai probabilitas atau $sig > 0,05$ yaitu 0,188 maka varian sampel adalah homogen.

ANOVA

T4	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	29.929	2	14.965	281.941	.000
Within Groups	.637	12	.053		
Total	30.566	14			

Nilai $F = 281.941$, dengan derajat kebebasan (df) : $k - 1 = 3 - 1 = 2$ dan $n - k = 14 - 2 = 12$ dan nilai $sig. = 0,000$. Karena nilai $sig. < \alpha = 0,05$, maka H_0 ditolak.

Kesimpulan : Ketiga perlakuan P_0 , P_1 dan P_2 memiliki perbedaan kadar hormon T_4 yang signifikan.

Multiple Comparisons

T4

Tukey HSD

(I) kelomp ok	(J) kelomp ok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	-3.17260*	.14571	.000	-3.5613	-2.7839
	2	-.39060*	.14571	.049	-.7793	-.0019
1	0	3.17260*	.14571	.000	2.7839	3.5613
	2	2.78200*	.14571	.000	2.3933	3.1707
2	0	.39060*	.14571	.049	.0019	.7793
	1	-2.78200*	.14571	.000	-3.1707	-2.3933

Hasil uji menunjukkan H_0 ditolak (ada perbedaan), maka uji lanjut (*Post Hoc Test*) harus dilakukan :

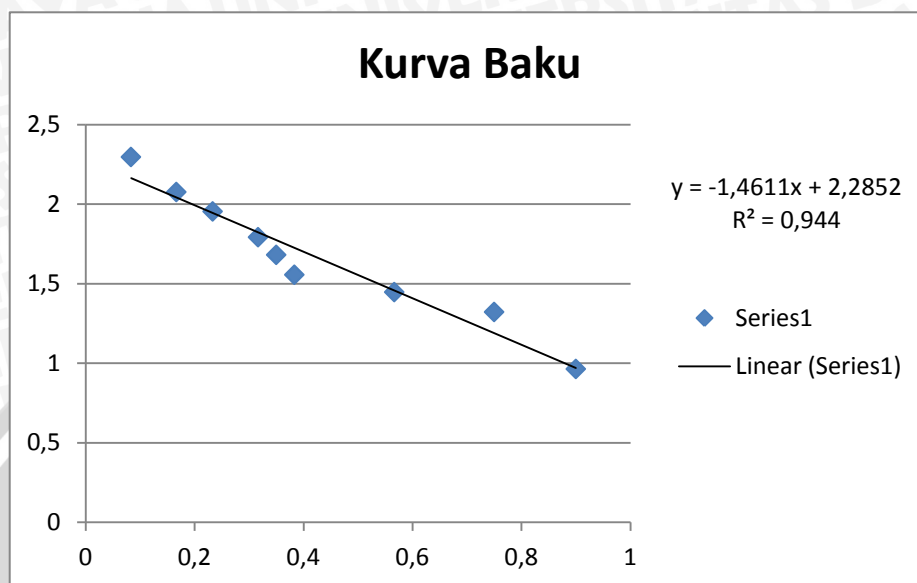
Rata-rata tanpa perlakuan (P_0) berbeda dengan rata-rata perlakuan sakit (P_1) dan rata-rata perlakuan sakit + terapi (P_2). Tabel di atas memperlihatkan bahwa kelompok yang menunjukkan adanya perbedaan rata-rata kadar hormon T_4 (ditandai dengan tanda bintang "*").

T4				
Tukey HSD				
kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	5	1.3122		
2	5		1.7028	
1	5			4.4848
Sig.		1.000	1.000	1.000

Dari tabel *Homogeneous Subsets* terlihat bahwa untuk subset 1 beranggotakan P_0 , subset 2 beranggotakan P_2 dan subset 3 beranggotakan P_1 , hal ini menunjukkan bahwa antar perlakuan berbeda dengan lainnya. Hasil *Homogeneous Subsets* ini melengkapi hasil *Multiple Comparison*.



Lampiran 13. Perhitungan berat molekul protein



Kurva Baku Perhitungan Berat Molekul

A	B	X (RF)	Y (Log BM)	Y
0,5	6	0,083333	2,296	2,16325
1	6	0,166667	2,076	2,0415
1,4	6	0,233333	1,954	1,9441
1,9	6	0,316667	1,792	1,82235
2,1	6	0,35	1,681	1,77365
2,3	6	0,383333	1,556	1,72495
3,4	6	0,566667	1,447	1,4571
4,5	6	0,75	1,322	1,18925
5,4	6	0,9	0,964	0,9701

Tabel Perhitungan Laju dan Jarak Pita Protein

13. 3 Perhitungan Berat Molekul

TIKUS	A	B	X (RF)	Y (Log BM)	BM
Sehat (kontrol)	0,8	6	0,133333	2,0902	123,0835
	1,6	6	0,266667	1,8954	78,59592
	1,9	6	0,316667	1,82235	66,42782
	2,4	6	0,4	1,7006	50,18801
	3,2	6	0,533333	1,5058	32,04793
	4,5	6	0,75	1,18925	15,46144
	sakit A1.3 (2)	0,6	6	0,1	2,1389
0,8		6	0,133333	2,0902	123,0835
0,9		6	0,166667	2,0415	115,0272



	1,3	6	0,216667	1,96845	92,99294
	1,6	6	0,266667	1,8954	78,59592
	1,9	6	0,316667	1,82235	66,42782
sakit A2.3 (2)	0,6	6	0,1	2,1389	137,6892
	0,8	6	0,133333	2,0902	123,0835
	0,9	6	0,166667	2,0415	115,0272
	1,3	6	0,216667	1,96845	92,99294
	1,6	6	0,266667	1,8954	78,59592
	1,9	6	0,316667	1,82235	66,42782
Sakit B1.1 (4)	0,8	6	0,133333	2,0902	123,0835
	0,9	6	0,166667	2,0415	115,0272
	1,3	6	0,216667	1,96845	92,99294
	1,6	6	0,266667	1,8954	78,59592
	1,9	6	0,316667	1,82235	66,42782
Sakit B2.2 (4)	0,8	6	0,133333	2,0902	123,0835
	0,9	6	0,166667	2,0415	115,0272
	1,3	6	0,216667	1,96845	92,99294
	1,6	6	0,266667	1,8954	78,59592
	1,9	6	0,316667	1,82235	66,42782
Terapi (6)	1,6	6	0,266667	1,8954	78,59592
	1,9	6	0,316667	1,82235	66,42782
	2,5	6	0,416667	1,67625	47,45151
	3,2	6	0,533333	1,5058	32,04793
	4,5	6	0,75	1,18925	15,46144
Terapi (8)	1,6	6	0,266667	1,8954	78,59592
	1,8	6	0,3	1,8467	70,25868
	2,4	6	0,4	1,7006	50,18801
	3,1	6	0,516667	1,53015	33,89612
	4,4	6	0,733333	1,2136	16,3531
Terapi (10)	0,8	6	0,133333	2,0902	123,0835
	1,6	6	0,266667	1,8954	78,59592
	1,9	6	0,316667	1,82235	66,42782
	2,4	6	0,4	1,7006	50,18801
	3,1	6	0,516667	1,53015	33,89612
	4,4	6	0,733333	1,2136	16,3531
Terapi (12)	0,8	6	0,133333	2,0902	123,0835
	1,5	6	0,25	1,91975	83,12851
	1,8	6	0,3	1,8467	70,25868
	2,4	6	0,4	1,7006	50,18801
	3,1	6	0,516667	1,53015	33,89612
	4,3	6	0,716667	1,23795	17,29617

13.2 Hasil Perhitungan Berat Molekul Protein :

Marker	Sehat	Sakit A _{1,3}	Sakit A _{2,3}	Sakit B _{1,1}	Sakit B _{2,2}	Terapi(6) B _{1,2}	Terapi(8) B _{2,2}	Terapi(10) B _{2,2}	Terapi(12) B _{2,2}
198	138	138	138	138	138	138	138	138	138
	123	123	123	123	123	-	-	123	123
119	-	115	115	115	115	-	-	-	-
	79	79	79	79	79	79	79	79	83
90	66	66	66	66	66	66	70	66	70
62	50	47	47	47	47	47	50	50	50
48	32	32	32	32	32	32	34	34	34
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	15	15	15	15	15	15	16	16	17
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

