

**EFEK TERAPI KASEIN YOGURT SUSU KAMBING
TERHADAP KADAR MDA (*Malondialdehyde*) DAN
HISTOPATOLOGI AORTA ABDOMINAL TIKUS
(*Rattus Norvegicus*) MODEL HIPERTENSI
YANG DIINDUKSIGARAM-DOCA
(*Deoxycorticosteroneacetate*)**

SKRIPSI

Oleh :

MONICK ROSETA

0911313030



PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN

PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

**EFEK TERAPI KASEIN YOGURT SUSU KAMBING
TERHADAP KADAR MDA (*Malondialdehyde*) DAN
HISTOPATOLOGI AORTA ABDOMINAL TIKUS
(*Rattus Norvegicus*) MODEL HIPERTENSI
YANG DIINDUKSIGARAM-DOCA
(*Deoxycorticosteroneacetate*)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

MONICK ROSETA

0911313030



PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN

PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Efek Terapi Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap KadarMDA
(Malondialdehyde) dan Histopatologi Aorta Abdominal Tikus
(*Rattus Norvegicus*) Model Hipertensi Yang Diinduksi
Garam-DOCA (*Deoxycorticosterone acetate*)**

Oleh :

MONICK ROSETA

0911313030

Telah dipertahankan di depan Majelis Pengujipada tanggal 10 Februari 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc

NIP. 19560210 198402 2 001

drh. Rositawati Indrati, MP

NIP. 19590529 198601 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan
Program Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : MONICK ROSETA

NIM : 0911313030

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

“Efek Terapi Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap KadarMDA(*Malondialdehyde*) dan Histopatologi Aorta Abdominal Tikus(*Rattus norvegicus*) Model Hipertensi yang diinduksi Garam-DOCA (*Deoxycorticosterone acetate*)”

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 termasuk 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, 10 Februari 2014

Yang menyatakan,

(Monick Roseta)

NIM. 0911313030

**Efek Terapi Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap
KadarMDA(Malondialdehyde)dan HistopatologiAorta Abdominal
Tikus(*Rattus norvegicus*) Model Hipertensi yang diinduksi Garam-DOCA
(*Deoxycorticosterone acetate*)**

ABSTRAK

Hipertensi saat ini masih menjadi masalah utama di dunia yang paling banyak menyebabkan kematian. Salah satu pengobatan alternatif yang digunakan untuk penderita hipertensi adalah kasein yogurt susu kambing. Bioaktif peptida yang terdapat pada kasein yogurt susu kambing memiliki peran sebagai antihipertensi (ACE-Inhibitor) yaitu β -kasein dan antioksidan yaitu α_s -kasein. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek terapi kasein yogurt susu kambing dalam menurunkan kadar MDA dan memperbaiki kerusakan jaringan aorta abdominal tikus. Desain penelitian menggunakan RAL. Parameter yang diamati adalah kadar MDA yang diukur menggunakan TBA dan gambaran histopatologi aorta abdominal (pewarnaan HE). Kelompok perlakuan terdiri dari 5 yaitu kelompok tikus normal (A), tikus hipertensi induksi Garam-DOCA (B), tikus terapi captopril 5 mg/kg BB (C), tikus terapi kasein yogurt susu kambing 300 mg/kg BB (D) dan 600 mg/kg BB (E). Hasil penelitian menunjukkan terapi kasein yogurt susu kambing dapat menurunkan kadar MDA dan mengurangi kerusakan jaringan aorta abdominal pada tikus hipertensi yang dibuktikan dengan penurunan kadar MDA kelompok D ($0,43 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$) dan E ($0,42 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$) terhadap kelompok B ($0,61 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$). Pada tikus kelompok E menunjukkan gambaran histopatologi yang paling baik yang ditunjukkan dengan penurunan proliferasi sel otot polos dan perbaikan struktur endotel.

Kata kunci :Hipertensi, Garam-DOCA, Kasein yogurt susukambing, biopeptida, MDA, Histopatologi

repository.ub.ac.id

**Therapeutic Effect of Goat Milk Yogurt Casein to MDA (Malondialdehyde)
Level and Histopathology in Abdominal Aortic of Hypertension Rats
(Rattus norvegicus) Model Induced DOCA
(Deoxycorticosterone acetate)-Salt**

ABSTRACT

Hypertension is major problem in the world that most causes of death. One of the alternative medicine used for patients with hypertension is goat milk yogurt casein. Bioactive peptides found in goat milk yogurt casein have a role as an antihypertension (ACE-inhibitory) which β -casein and antioxidation which α -casein. The aim of this study was to determine the effect of goat milk yogurt casein in decrease the MDA levels and repair tissue damage of rats abdominal aortic. The research design using completely randomized design. The Parameters observed were levels MDA measured by using TBA methods and histopathological picture of the abdominal aortic (HE staining). The group consists of 5 groups were normal rats (A), rats hypertension induced DOCA-Salt (B), rats therapy captopril 5 mg/kg (C), rats therapy goat milk yogurt casein 300 mg/kg (D), and 600 mg/kg body weight (E). The results showed that therapeutic goat milk yogurt casein could reduce levels of MDA and abdominal aortic tissue damage in hypertensive rats as evidenced by the decreased levels of MDA group D (0.43 ± 0.08 $\mu\text{g/mL}$) and E (0.42 ± 0.04 $\mu\text{g/mL}$) to group B (0.61 ± 0.09 $\mu\text{g/mL}$). In group E rats showed the best histopathological observation indicated by decreased smooth muscle cell proliferation and endothelial repair structures.

Key words :Hypertension, DOCA-Salt, goat milk yogurt casein, biopeptide, MDA, histopathology.

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Efek Terapi Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap KadarMDA(Malondialdehyde)danHistopatologiAorta Abdominal Tikus(*Rattus norvegicus*) Model Hipertensi yang diinduksi Garam-DOCA (Deoxycorticosterone acetate)”** dengan sabar dan lancar.

Melalui penulisan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada segenap pihak baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih kepada :

1. drh Masdiana C. Padaga, M.App.Sc dan drh. Rositawati Indrati, MP selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan petunjuk selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Dr. Dra. Med. Vet. Herawati, MP dan drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M. Biotech selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES, selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Universitas Brawijaya yang telah membantu memberikan fasilitas dan kemudahan selama penelitian.
4. Pihak Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Unit 4 Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta khususnya bapak Suroso yang telah membantu selama pemeliharaan hewan coba.
5. Seluruh staff Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner (KESMAVET) Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya, Laboratorium Farmakologi dan Terapi serta Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo Surabaya yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian.

6. Tim Penelitian BIOPEPTIDA SUSU KAMBING khususnya Novia Rachmawati, Rr Arum Rizki Dianita, Ayu Alfisa, Ika Kusnia Widyanti, Baend Aprilidya Supriyanto, Nevi Kristi Yunani, Fitria Adinda dan Adi Candra atas semangat dan kerja sama tim yang solid dan saling membantu dalam pelaksanaan penelitian ini sehingga berjalan dengan lancar dan menyenangkan.
7. Ibu dan Bapak yang senantiasa memberikan dukungan dan doa yang tiada henti demi keberhasilan anaknya tercinta.
8. Adik-adikku tercinta Debrina Rosset dan Anissa Zelitha atas dukungan dan kesabarannya menunggu mbakmu hingga penyelesaian penulisan skripsi ini dapat terwujud.
9. Teman-teman dan sahabat lama SMP dan SMA atas dukungannya yang terus memberi semangat selama masa penelitian dan penulisan skripsi ini.

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

Malang, 10 Februari 2014

Penulis

DAFTAR ISI

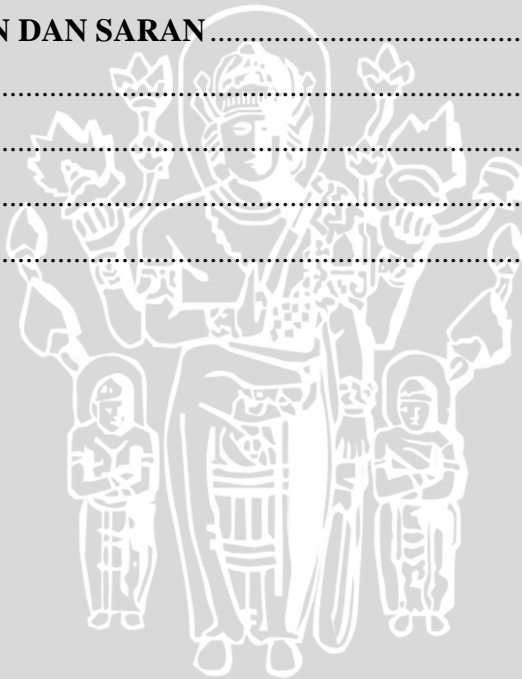
| | Halaman |
|---|---------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| LEMBAR PENGESAHAN | ii |
| LEMBAR PERNYATAAN | iii |
| ABSTRAK | iv |
| ABSTRACT | v |
| KATA PENGANTAR | vi |
| DAFTAR ISI | viii |
| DAFTAR TABEL | xi |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiii |
| DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG | xiv |
| BAB 1 PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Batasan Masalah | 3 |
| 1.4 Tujuan Penelitian | 4 |
| 1.5 Manfaat Penelitian | 4 |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1 Hipertensi | 5 |
| 2.1.1 Etiologi | 5 |
| 2.1.2 Patomekanisme Garam-DOCA Terhadap Peningkatan Tekanan Darah | 7 |
| 2.1.3 Patofisiologi Perubahan bentuk Sistem Pembuluh Darah Pada Hipertensi | 8 |
| 2.1.4 Aktivitas Stres Oksidatif dan MDA Pada Pembuluh Darah Tikus Hipertensi Induksi Garam-DOCA | 10 |
| 2.1.5 Gambaran histopatologi Pembuluh Darah Pada Tikus Hipertensi Induksi Garam-DOCA | 13 |



| | |
|--|-----------|
| 2.2 Terapi Antihipertensi | 14 |
| 2.3 Karakteristik Yogurt Susu Kambing | 16 |
| 2.3.1 Karakteristik kasein | 16 |
| 2.3.2 Biopeptida Dalam Kasein Yogurt Susu Kambing | 18 |
| BAB 3 KERANGKA KONSEPDAN HIPOTESIS PENELITIAN | 21 |
| 3.1 Kerangka Konseptual..... | 21 |
| 3.2 Hipotesis Penelitian | 24 |
| BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN..... | 25 |
| 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian..... | 25 |
| 4.2 Alat dan Bahan | 25 |
| 4.3 Tahapan Penelitian..... | 26 |
| 4.3.1 Rancangan Penelitian | 26 |
| 4.4 Prosedur Kerja | 28 |
| 4.4.1 Pembuatan Kasein Yogurt Susu..... | 28 |
| 4.4.1.1 Pembuatan Starter | 28 |
| 4.4.1.2 Pembuatan Yogurt..... | 28 |
| 4.4.1.3 Pembuatan Kasein Yogurt..... | 29 |
| 4.4.2 Persiapan Hewan Coba Hipertensi Induksi Garam-DOCA | 30 |
| 4.4.3 Induksi Tikus Hipertensi dengan Garam-DOCA..... | 30 |
| 4.4.4 Perlakuan Terapi dengan Captopril | 30 |
| 4.4.5 Perlakuan Terapi dengan Kasein | 30 |
| 4.4.6 Pengukuran Parameter | 31 |
| 4.4.6.1 Pengukuran Tekanan Darah Hewan Coba..... | 31 |
| 4.4.6.2 Persiapan Organ untuk Pengukuran MDA dan Histopatologi..... | 31 |
| 4.4.6.2.1 Proses Eutanasia tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) | 31 |
| 4.4.6.2.2 Pengukuran MDA..... | 31 |
| 4.4.6.2.2.1 Pembuatan Kurva Standar MDA | 31 |
| 4.4.6.2.2.2 Pengukuran Kadar MDA Aorta Abdominal Metode TBA ... | 32 |
| 4.4.6.2.3 Pembuatan Preparat Histopatologi | 33 |

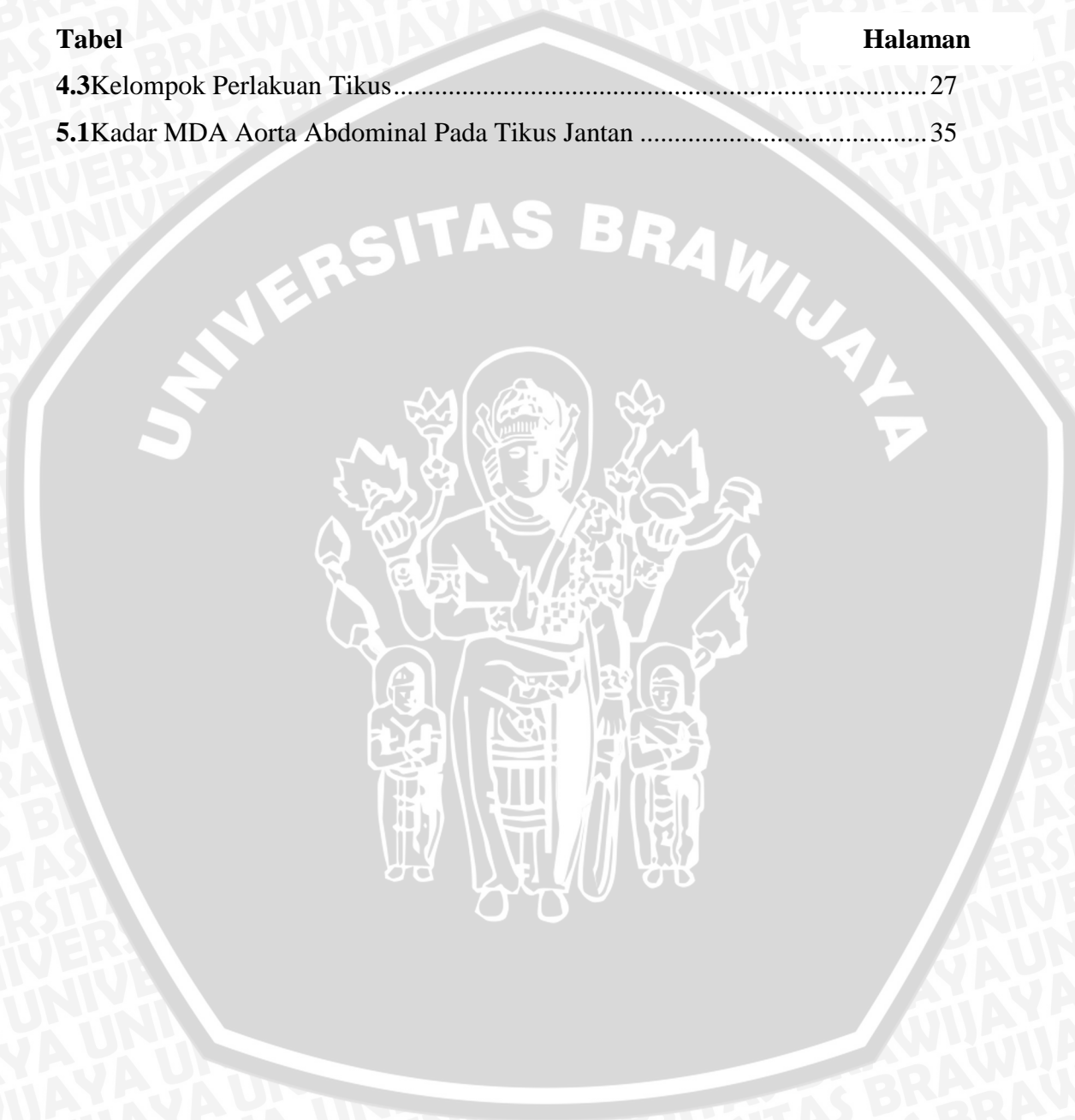


| | |
|---|-----------|
| 4.4.6.2.3.1 Pewarnaan HE..... | 33 |
| 4.4.6.2.3.2 Pengamatan | 34 |
| 4.5 Analisis Data..... | 34 |
| BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN | 35 |
| 5.1 Efek Terapi Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar MDA (Malondialdehyde) Aorta Abdominal Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan | 35 |
| 5.2 Efek Terapi Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Gambaran Histopatologi Aorta Abdominal Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Hipertensi | 39 |
| BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN | 44 |
| 6.1 Kesimpulan | 44 |
| 6.2 Saran | 44 |
| DAFTAR PUSTAKA | 45 |
| LAMPIRAN..... | 53 |



DAFTAR TABEL

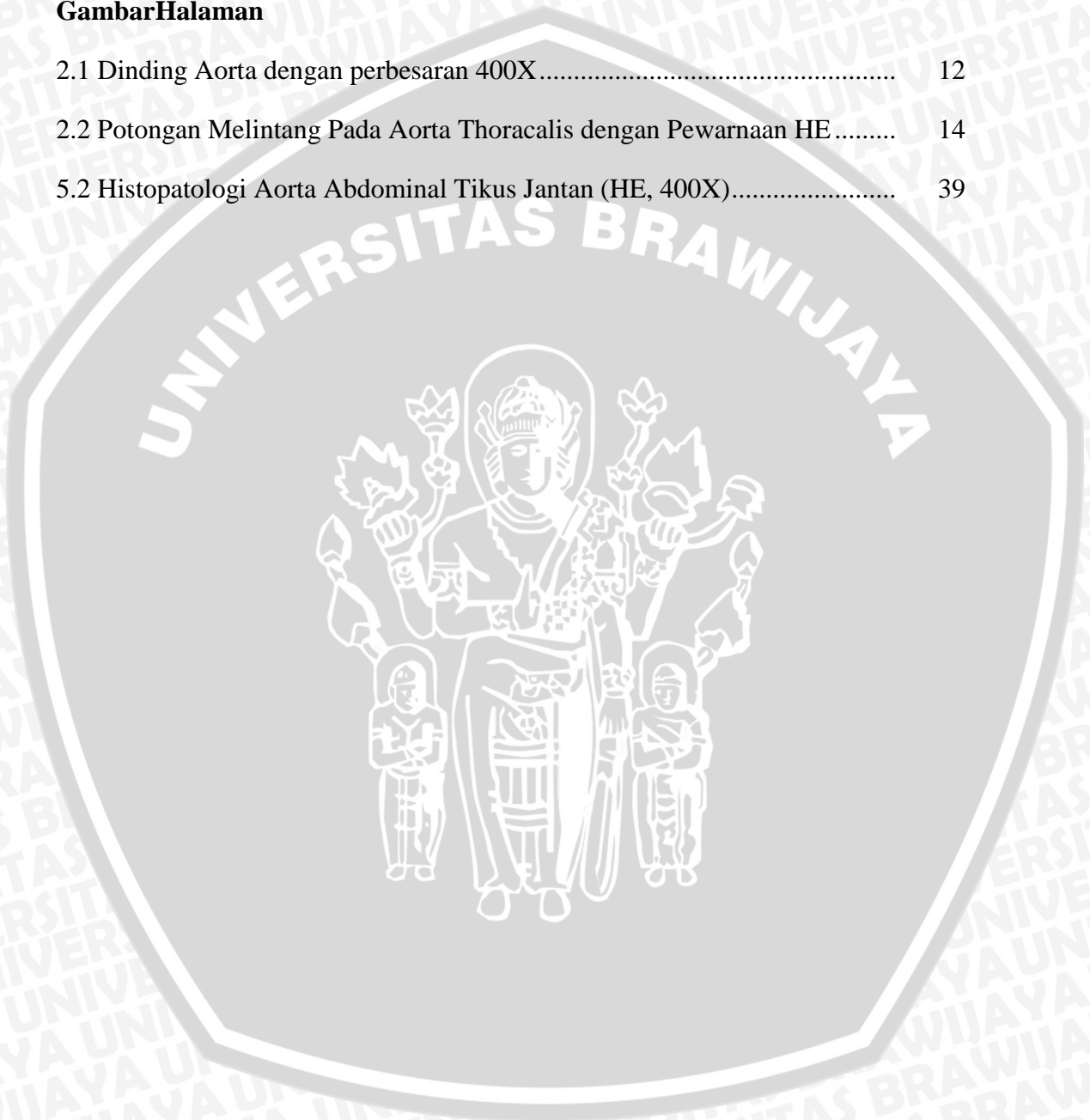
| Tabel | Halaman |
|--|----------------|
| 4.3Kelompok Perlakuan Tikus..... | 27 |
| 5.1Kadar MDA Aorta Abdominal Pada Tikus Jantan | 35 |



DAFTAR GAMBAR

GambarHalaman

| | |
|---|----|
| 2.1 Dinding Aorta dengan perbesaran 400X..... | 12 |
| 2.2 Potongan Melintang Pada Aorta Thoracalis dengan Pewarnaan HE..... | 14 |
| 5.2 Histopatologi Aorta Abdominal Tikus Jantan (HE, 400X)..... | 39 |



DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|--|---------|
| 1. Sertifikat Layak Etik Penelitian | 54 |
| 2. Surat Pernyataan Payung Penelitian..... | 55 |
| 3. Skema Kerja Penelitian..... | 56 |
| 4. Perhitungan Dosis Pemberian DOCA..... | 57 |
| 5. Perhitungan Dosis Pemberian Captopril | 60 |
| 6. Perhitungan Dosis Pemberian Kasein Yogurt Susu Kambing..... | 62 |
| 7. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum | 65 |
| 8. Pembuatan Kurva Standar MDA | 66 |
| 9. Pengukuran Kadar MDA Aorta Abdominal Metode TBA | 67 |
| 10. Pembuatan Preparat Untuk Pengamatan Histopatologi | 68 |
| 11. Tekanan Darah Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Jantan Selama Pemeliharaan..... | 72 |
| 12. Perhitungan Kadar <i>Malondialdehyde</i> (MDA)..... | 73 |
| 13. Dokumentasi Penelitian | 79 |

DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

| | |
|---------|---|
| ACEI | : <i>Angiotensin Converting-Enzyme-Inhibitory.</i> |
| BNF | : <i>Buffer Neutral Formalin.</i> |
| BPs | : <i>Bioaktif peptida.</i> |
| DOCA | : <i>Deoxycorticosterone acetate.</i> |
| ET | : <i>Endotelin.</i> |
| HE | : <i>Hematoksilin-Eosin.</i> |
| 2K1C | : <i>Dua-ginjal satu-klip (2 Kydney 1 Clip).</i> |
| MDA | : <i>Malondialdehyde.</i> |
| NADPH | : <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate.</i> |
| Na-Thio | : <i>Thiobarbiturat acid.</i> |
| NO | : <i>Nitric Oxide.</i> |
| PBS | : <i>Phospate Buffer Saline.</i> |
| ROS | : <i>Reactive Oxygen Spesies.</i> |
| SHR | : <i>Spontaneous Hypertension Rat.</i> |
| SOD | : <i>Superoxide dismutase.</i> |
| TBA | : <i>Thiobarbituric Acid.</i> |
| TCA | : <i>TriChloro Asetat.</i> |
| VSMC | : <i>Vascular Smooth Muscle Cell</i> |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hipertensi saat ini masih menjadi masalah utama di dunia dan merupakan salah satu faktor resiko kardiovaskular yang paling banyak menyebabkan kematian karena hampir diderita oleh 1 milyar orang di seluruh dunia (Chobanian *et al.*, 2003; Bowman, 2007). Hipertensi tidak hanya terjadi pada manusia namun juga dapat terjadi pada hewan, salah satunya adalah kucing. Hipertensi pada kucing selain menyerang sistem kardiovaskular juga dapat menyebabkan kerusakan pada sistem pembuluh darah. Kejadian hipertensi sekunder pada kucing, umumnya sering disebabkan oleh kerusakan ginjal kronis dan akut, diabetes melitus dan obesitas. Sebanyak 50% kasus hipertensi pada kucing tidak diketahui penyebabnya (Atkins, 2012).

Terdapat beberapa model untuk mencapai hipertensi pada tikus yaitu pada hipertensi primer menggunakan model SHR (*Spontaneous Hypertension Rat*) dan Dahl, sedangkan hipertensi sekunder menggunakan garam-DOCA (*Deoxycorticosterone acetate*) dan 2K1C (*2 Kidney 1 Clip*). Garam-DOCA lebih tepat dijadikan model hipertensi hewan coba karena lebih cepat meningkatkan tekanan darah dan tingkat morbiditasnya rendah. (Badyal *et al.*, (2003); Oates & Brown (2001)). Oleh karena itu dalam penelitian ini, untuk mencapai hipertensi pada hewan coba menggunakan induksi garam-DOCA.

Hipertensi yang terjadi akibat induksi garam-DOCA, menstimulus aktivasi angiotensin II yang dapat meningkatkan sintesis protein dalam sediaan sel otot

polos pembuluh darah sehingga berdampak pada hipertropi endotel yang dapat meningkatkan tekanan darah (Bagrov & Lakatta, 2004). Pemberian pakan yang banyak mengandung garam dapat menginduksi perubahan pada sel endotel di pembuluh darah, dan peningkatan regulasi pada reseptor angiotensin II (Wardener, 2002).

Pemahaman dan penanganan hipertensi sudah banyak dilakukan tetapi masih belum dapat diatasi secara optimal (Bowman, 2007). Pengobatan penyakit hipertensi pada umumnya membutuhkan jangka waktu yang lama. Oleh karena itu, faktor keamanan penggunaan obat jangka panjang menjadi perhatian utama untuk pemilihan obat, selain itu pemberian obat sintesis kurang efektif dibanding dengan suplementasi obat produk alam, seperti yogurt, kefir dan sebagainya (Bray, 2006; Sukamdar, 2006).

Susu kambing memiliki sifat nutrisi khusus yang menarik perhatian konsumen karena susu kambing mengandung kalsium lebih tinggi dibanding susu sapi sehingga sangat baik untuk pertumbuhan tulang bagi anak-anak selain itu produk susu kambing memiliki daya cerna yang lebih tinggi dan sifat alergi yang lebih rendah daripada susu sapi, sehingga permintaan akan produk susu kambing semakin berkembang (Martin *et al.*, (2003); Silanikove *et al.*, 2010).

Menurut Sharma *et al.*,(2011), protein susu merupakan sumber bioaktif peptida yang secara fisiologi memiliki berbagai peran penting. Kitts & Weiler,(2003) menambahkan bahwa bioaktif Peptida (BPs) sebagai fragmen-fragmen protein spesifik, memiliki dampak positif pada fungsi tubuh sehingga dapat mempengaruhi kesehatan. Fraksi kasein yang terdiri dari α -kasein, β -kasein

dan κ -kasein didalam protein susu kambing merupakan sumber bioaktif peptida. Mekanisme kerja dari BPs dalam menurunkan tekanan darah dengan cara mensintesis ACEI (*Angiotensin Converting-Enzyme-Inhibitory*) sehingga berperan penting di dalam penyakit hipertensi (FitzGerald *et al.*, 2004; Akuzawa *et al.*, 2009).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek kasein yogurt susu kambing dalam memperbaiki kerusakan jaringan aorta abdominal tikus model hipertensi induksi garam-DOCA.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana efek terapi kasein yogurt susu kambing pada tikus model hipertensi induksi garam-DOCA terhadap kadar MDA ?
2. Bagaimana gambaran histopatologi dinding aorta abdominal pada model tikus hipertensi induksi garam-DOCA yang diberikan terapi kasein yogurt susu kambing ?

1.3 Batasan Masalah

1. Penelitian ini menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) / strain Wistar jantan berumur 10-12 minggu dengan berat badan 200-250 gr sebanyak 20 ekor yang berasal dari LPPT Universitas Gajah Mada.
2. Pembuatan keadaan hipertensi pada tikus menggunakan model Garam-DOCA, dengan garam (NaCl 2%) diberikan melalui air minum dan DOCA yang diberikan secara injeksi subcutan dengan dosis 20 mg/kg BB pada 5

kali injeksi pertama kemudian dosis 10 mg/kg BB pada 5 kali injeksi berikutnya.

3. Susu kambing yang digunakan berasal dari jenis PE/Peranakan Etawa segar yang diperoleh di BBPP Batu-Malang Jawa Timur, Indonesia dan menggunakan starter *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, dan *L. bulgaricus* yang diperoleh dari Yogourmet, Canada.
4. Kasein yogurt susu kambing sebagai terapi hipertensi diberikan dengan dosis 300 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB.
5. Variabel yang diamati adalah kadar MDA dan histopatologi aorta abdominal tikus (*Rattus norvegicus*).

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui efek terapi kasein yogurt susu kambing pada tikus model hipertensi induksi garam-DOCA terhadap kadar MDA.
2. Mengetahui gambaran histopatologi dinding aorta abdominal pada tikus model hipertensi induksi garam-DOCA yang diberikan terapi kasein yogurt susu kambing.

1.5 Manfaat

1. Memberikan informasi tentang manfaat dari kasein yogurt susu kambing dalam menurunkan tekanan darah dan memperbaiki kerusakan fungsi organ pada penderita hipertensi khususnya hipertensi sekunder, baik pada manusia maupun hewan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hipertensi

2.1.1 Etiologi

Hipertensi terjadi karena adanya kenaikan tekanan darah (Badyal *et al.*, 2003). Tekanan darah normal sistolik pada tikus adalah 84-174 mmHg dan diastolik 58-145 mmHg (Kusumawati, 2004). Tikus dikatakan hipertensi bila tekanan darah sistolik melebihi 120 mmHg (Guyton, 2006). Hipertensi dapat dibagi menjadi dua yaitu :

1. Hipertensi esensial (primer)

Hipertensi esensial (primer) penyebab pasti belum diketahui. Berbagai faktor diduga sebagai penyebab hipertensi primer, seperti bertambahnya umur, stres psikologis, dan hereditas. Kurang lebih 90% penderita hipertensi tergolong hipertensi primer sedangkan 10%-nya tergolong hipertensi sekunder. Sebanyak 70-80% kasus hipertensi esensial, didapatkan riwayat hipertensi di dalam keluarga (Oates dan Brown, 2001).

Penggunaan hewan coba sebagai model hipertensi primer meliputi hipertensi genetik dan hipertensi lingkungan. Pada hipertensi genetik, menggunakan model SHR dan Dahl sedangkan hipertensi lingkungan, menggunakan model stress (Sjakoer dan Permatasari, 2011).

Okamoto & Aoki dalam Dornas & Silva., (2011) menjelaskan model SHR (*Spontaneously hypertensive rat*) adalah hasil inbreeding dari tikus wistar dan

wistar-kyoto (WKY) non hipertensi. Selanjutnya Henning *et al.*,(2010) menambahkan bahwa model SHR ini dapat menyebabkan hipertropi pada pembuluh darah dan ketebalan dindingnya akan menipis (meregang). Berkurangnya fungsi dari Pembuluh darah, akan menyebabkan beberapa komplikasi seperti hemorhagic pada otak, trombosis, nephrosclerosis dan lesi myocardial. Selain itu Pinto*etal.*, (1998)&Badyal *etal.*, (2003) menambahkan bahwa pada model SHR, ketika di tahap awal tidak memiliki kecenderungan terhadap stroke namun pada tahap berikutnya model ini rawan menuju stroke dan mempunyai kecenderungan yang kuat untuk mati.

Secara fisiologis, ginjal yang normal mempunyai kemampuan dalam mengekskresi garam, tanpa menunjukkan peningkatan volume ekstraseluler. Pada kondisi terjadi intake garam yang berlebih menunjukkan keadaan yang tidak baik bagi tubuh yaitu terjadi hipertensi (Sharma *et al.*, 2010). Pada model Dahl, diberikan perlakuan dengan cara memberi asupan garam yang tinggi. Pada model ini, hipertensi terjadi setelah mengganti air minum dengan natrium klorida 1-2% selama 9-12 bulan(Badyal *etal.*, 2003).

2. Hipertensi sekunder

Hipertensi sekunder adalah hipertensi yang penyebabnya dapat diketahui, antara lain kelainan pembuluh darah ginjal, gangguan kelenjar tiroid (hipertiroid), penyakit kelenjar adrenal (hiperaldosteroneisme)(Oates dan Brown, 2001).Pada hewan model hipertensi sekunder dilakukan dengan induksi garam-DOCA atau dengan model 2K1C pada ginjal (Sun dan Zhang, 2005).

Dua ginjal satu klip (2K1C = 2 *kidney* 1 *clip*) adalah salah satu model eksperimental hipertensi yang dikembangkan oleh Harry Golblatt. Model tikus hipertensi ini dilakukan dengan cara menjepit salah satu arteri ginjal, suatu model yang secara klinis identik dengan hipertensi ginjal (Armenia dkk., 2007). Kegiatan menjepit salah satu arteri ini menyebabkan peningkatan tekanan darah akibat dari terjadinya peningkatan aktifitas plasma renin, sehingga terbentuklah angiotensin II, tetapi tidak terjadi retensi garam dan air karena arteri pada salah satu ginjal yang tidak dijepit tetap dalam keadaan normal. Oleh sebab itu, hipertensi ini yang bekerja adalah sistem renin-angiotensin (Sharma *et al.*, 2010).

Garam-DOCA merupakan salah satu model hipertensi sekunder karena pengaruh endokrin (hormon). Deoxycorticosterone adalah hormon steroid yang dihasilkan oleh kelenjar adrenal yang memiliki aktifitas sebagai mineralokortikoid dan bertindak sebagai precursoraldosterone. Jalur utama untuk produksi aldosterone yaitu pada zona glomerulosa adrenal (Blacker, 1992 ; Don dan Lo, 2007). Berbeda dengan model 2K1C, pada model hipertensi induksi Garam-DOCA, terjadi pengurangan produksi plasma rennin (Ortiz & Garvin, 2001). Jenis hipertensi ini memproduksi mineralcorticoid (aldosteron) dan glucocorticoid (Badyal *et al.*, 2003).

2.1.2 Patomekanisme Garam-DOCA Terhadap Peningkatan Tekanan Darah

Selye *et al.*, dalam Badyal, *et al.*, (2003) adalah orang yang pertama kali membuktikan bahwa DOCA menghasilkan hipertensi pada hewan yang diujikan ke tikus. *Deoxycorticosteroneacetate* (DOCA) termasuk mineralokortikoid yang

menyebabkan retensi natrium dan air dalam tubuh sampai terjadi diuresis dan peningkatan tekanan pada ginjal. Paparan garam-DOCA menghasilkan hipertensi pada tikus (Badyal *et al.*, 2003).

Deoxycorticosterone salah satu mineralkortikoid secara kualitatif mempunyai kemiripan dengan *aldosterone*, serta merupakan hormon steroid yang berperan penting pada ginjal. Untuk mengatur volume cairan ekstraseluler, *aldosterone* akan mengurangi ekskresi NaCl(garam) dengan cara mereabsorpsinya dari tubulus ginjal. Naiknya konsentrasi NaCl akan diencerkan kembali dengan cara meningkatkan volume cairan ekstraseluler sehingga akan meningkatkan volume dan tekanan darah (Don dan Lo, 2007).

Hasil penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Eun *et al.*, (2005), terjadi peningkatan tekanan darah sistolik secara signifikan 146 ± 2 mmHg (tikus liar), model hipertensi hasil induksi garam (saline 1%)-DOCA (200mg/tikus) yang diberikan selama 14 hari bila dibandingkan ketika dalam keadaan normal (115 ± 3 mmHg). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Somer *et al* (2000), pada tikus hipertensi hasil induksi garam (saline 1%)-DOCA (100 mg/kg) selama 3 minggu, juga mengalami peningkatan tekanan darah sistolik sebesar 189 ± 4 mmHg dari yang normal yaitu 126 ± 2 mmHg.

2.1.3 Patofisiologi Perubahan Bentuk Pembuluh Darah Pada Hipertensi

Peningkatan tekanan darah terjadi karena faktor genetik dan atau lingkungan serta peningkatan produksi neurohumoral/hormone (endokrin, parakrin, autokrin).Salah satu pemicu tersebut baik secara langsung ataupun tidak langsung

berpengaruh terhadap peptida vasoaktif seperti angiotensin II dan ET-1, yang memediasi peningkatan stress oksidatif, vasokonstriksi, pertumbuhan sel otot polos dan apoptosis, derajat inflamasi dan terjadi fibrosis pada sistem pembuluh darah serta perubahan bentuk. Perubahan bentuk pada sistem pembuluh darah merupakan umpan balik dari tekanan darah yang semakin meningkat (Intengan & Schifrin, 2001).

Deoxycorticosterone acetate (DOCA) adalah suatu mineralkortikosteroid yang secara kualitatif mempunyai kemiripan dengan aldosteron (Sjakoer dan Permatasari, 2011). Aldosteron adalah hormon yang terlibat dalam sejumlah penyakit kardiovaskuler termasuk hipertensi sistemik dan menyebabkan kerusakan organ target (Krum & Martin, 2007; Ling & Chai, 2007). Pada manusia, peningkatan konsentrasi plasma aldosteron berhubungan dengan salah satunya adalah disfungsi endotel (Brown *et al.*, 2005).

Shepherd (2007), Krum & Martin (2007) and Kirchengast & Luz (2005) menjelaskan bahwa endotelin merupakan vasokonstriktor peptida endogen yang penting dalam mengontrol tekanan darah. Peptida tersebut diproduksi diberbagai jaringan termasuk endotel pembuluh darah. Endotelin dibagi menjadi tiga bagian besar yaitu Endotelin-1, 2, dan 3. ET-1 dan ET-2 sangat efektif pada otot polos pembuluh darah sedangkan ET-3 efeknya minimal. Ikatan reseptor ET-1 oleh ET-1 merangsang peningkatan kadar Ca^{2+} intraseluler yang mengakibatkan vasokonstriktor. Selanjutnya Masanori *et al.*, (2001) menjelaskan bahwa peningkatan produksi AT-1 di aorta dapat terjadi pada tikus hipertensi model induksi Garam-DOCA. Oparil *et al.*, (2003) menambahkan bahwa peran dari ET-1

adalah bertindak sebagai vasokonstriktor, pertumbuhan sel dan proliferasi, melepaskan aldosteron, aktivasi saraf simpatis, retensi sodium dan air, menghambat pelepasan renin.

Terjadinya vasokonstriksi yang kronis dapat memicu pemendekan struktur pembuluh darah yang tersusun atas sel otot polos sehingga lumen disekitarnya akan mengecil. Selanjutnya peningkatan tekanan darah menginduksi terjadinya disfungsi endotel yang juga dimediasi oleh berkurangnya bioavailabilitas NO, dimana NO inilah yang dicari oleh radikal bebas, yang juga memicu perubahan bentuk sistem pembuluh darah. NO dalam kondisi di bawah normal, bekerja dengan menghambat vasokonstriksi, faktor pertumbuhan, penurunan kolagen dan apoptosis. Perubahan bentuk pada awalnya dapat menyesuaikan diri namun pada akhirnya tidak dapat menyesuaikan diri dan membahayakan fungsi organ dan menyebabkan terjadinya hipertensi (Intengan & Schifrin, 2001).

2.1.4 Aktivitas Stres Oksidatif dan MDA Pada Pembuluh Darah Tikus Hipertensi Induksi Garam-DOCA

Hipertensi Induksi Garam-DOCA dapat memicu terjadinya peningkatan stres oksidatif. Stress oksidatif diperoleh dari ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan. Peningkatan stress oksidatif tepatnya dimediasi oleh ET-1 dimana menciptakan terbentuknya ROS, sedangkan ROS itu sendiri adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas dan kelompok non radikal. Stress oksidatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas dapat ditentukan dengan mengukur salah satu

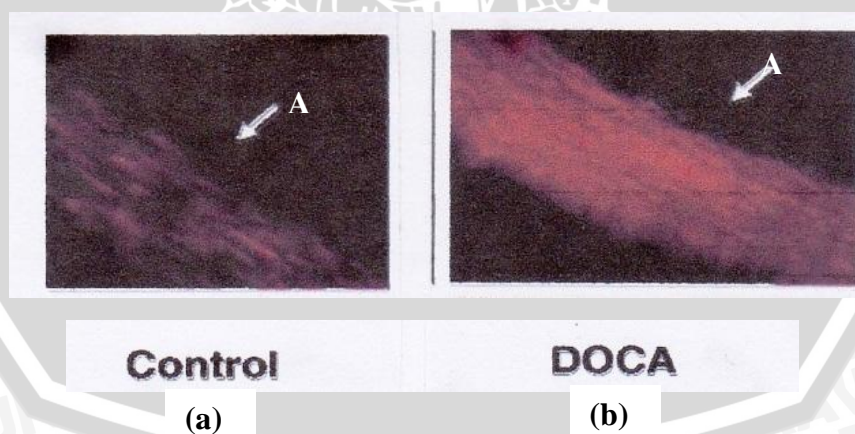
parameter yaitu kadar MDA. Kadar MDA yang tinggi menunjukkan bahwa sel mengalami stress oksidatif (Callera *et al.*, 2006; Halliwell dan Whiteman, 2004; Harjanto, 2004; Valko *et al.*, 2006).

Malondialdehyde (MDA) adalah suatu senyawa yang merupakan hasil dari oksidasi lipid yang menjadi peroksida. Malondialdehida terbentuk dari peroksidasi lipid (*lipid peroxidation*) pada membrane sel yaitu reaksi radikal bebas (radikal hidroksil) dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA). Reaksi tersebut terjadi secara berantai, akibat akhir dari reaksi rantai tersebut akan terbentuk hydrogen peroksida. Hydrogen peroksida tersebut dapat menyebabkan dekomposisi beberapa produk aldehyd yang bersifat toksik terhadap sel dan berbeda panjang rantainya antara lain MDA, yang merupakan salah satu aldehyd utama yang terbentuk. Pengukuran kadar MDA terdapat beberapa metode yang dapat digunakan, salah satunya TBA (*thiobarbituric acid*) *reactivity test*, yang dapat dilakukan baik secara *invivo* maupun *invitro*. Tes ini didasarkan pada reaksi kondensasi antara molekul MDA dengan dua molekul TBA pada kondisi asam (Edyon, 2002).

Adanya ET-1 yang terdapat pada pembuluh darah merupakan sumber dari ROS yang didapat dari respirasi mitokondria (Callera *et al.*, 2006). Peran ET-1 dalam pembentukan hipertensi dan menyebabkan kerusakan jaringan seperti hipertropi pembuluh darah dapat dibuktikan dari hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Masanori *et al.*, (2001), dimana kadar ET-1 pada tikus hipertensi induksi Garam(NaCl 0,1%)-DOCA(dosis 15 mg/kgBB) mengalami peningkatan

sebanyak 3 kali lipat (3.30 ± 0.44 ng/g jaringan) dibandingkan dengan tikus normal (1.24 ± 0.06 ng jaringan).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Jiménez *et al.*, (2007), pada tikus hipertensi hasil induksi garam (NaCl 1%)-DOCA (12,5mg/tikus/minggu) selama 5 minggu menunjukkan adanya stres oksidatif yang dapat dilihat dari pemeriksaan *vascular superoxide* (O_2^{*-}) dimana pada pemberian *dihydroethidium*(DHE) akan menghasilkan *red nuclear fluorescence*. Semakin banyak warna merah yang dihasilkan, menandakan produksi *superoxide* (O_2^{*-}) di aorta thoracalis semakin besar, dengan kata lain semakin banyak produksi *superoxide* (O_2^{*-}) maka radikal bebas yang terbentuk semakin banyak. *Red nuclear* yang terlihat adalah tunika adventitia, tunika media dan sel endotel. Pada **Gambar 2.1**, cincin aorta thoracalis tikus hipertensi induksi Garam-DOCA terlihat warna merah yang sangat jelas dibanding tikus normal.



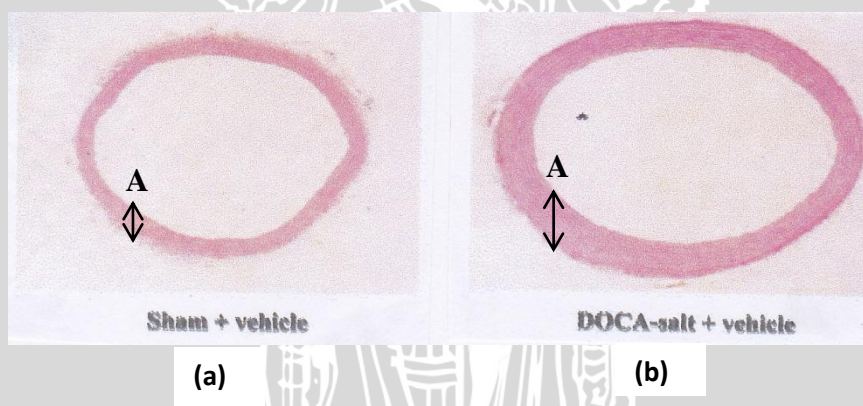
Gambar 2.1 Dinding aorta dengan perbesaran 400 \times . (a) dinding aorta thoracalis pada tikus normal yang tersusun atas tunika intima, media, dan edventitia, tidak terjadi stres oksidatif yang ditunjukkan oleh warna merah dalam jumlah sedikit (b) dinding aorta thoracalis pada tikus yang diberi induksi garam-DOCA terjadi peningkatan stres oksidatif. (A): \downarrow dinding aorta (Jiménez *et al.*, 2007).

2.1.5 Gambaran histopatologi Pembuluh Darah Pada Tikus Hipertensi Induksi Garam-DOCA

Pemberian DOCA yang dikombinasikan dengan NaCl pada tikus muda dan dewasa dapat menyebabkan kerusakan jaringan seperti fibrosis, hipertropi dan abnormalitas serta disfungsi endotel. *Intake* NaCl secara berlebih menyebabkan infiltrasi mononuklear sel dan pelepasan molekul oksidatif. Infiltrasi mononuklear sel dan pelepasan molekul oksidatif adalah ekspresi dari terbentuknya angiotensin II dan adanya angiotensin II pada hipertensi berakibat pada luka (*injury*) pembuluh darah dan hipertropi. Adanya luka dan hipertropi pada pembuluh darah dikarenakan pembuluh darah yang terus menerus mengalami vasokonstriksi. (Nakagawa *et al.*, 2003; Kanellis *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2000; Quiroz *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2008).

Takahashi (2006) menjelaskan bahwa pada hipertensi hasil induksi Garam-DOCA menyebabkan peningkatan kadar ET-1 dimana menginduksi VSMC (*Vascular Smooth Muscle Cell*)/tonus sel otot polos vaskuler selanjutnya VSMC menstimulus terjadinya hipertropi dan hiperplasia. VSMC komponen utama pada dinding arteri dan berperan dalam pembentukan lesi pembuluh darah. Hasil penelitian Dao *et al.*, (2006) menunjukkan bahwa adanya kadar ET-1 yang rendah, menstimulus terjadinya hipertropi pada arteri dan kadar ET-1 yang tinggi menstimulus terjadinya hiperplasia. Hasil penelitian Atkins *et al.*, (2005) menunjukkan bahwa induksi Garam-DOCA dapat menyebabkan terjadinya proliferasi sel otot polos di pembuluh darah.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Takaoka *et al.*, (2001), pada tikus hipertensi induksi Garam (NaCl 1%)-DOCA (15 mg/kg BB) yang diberikan selama 4 minggu, menyebabkan *injury* pada jaringan aorta yang dapat dilihat dari berat aorta yang lebih besar $13.2 \pm 0,8$ mg/cm dibandingkan tikus normal 10.3 ± 0.3 mg/cm dan hasil pengamatan histopatologi aorta. Pada **gambar 2.2** hasil potongan melintang pada aorta thoracalis menunjukkan terjadinya peningkatan ketebalan dinding aorta thoracalis di tunika media sebesar 0.77 ± 0.33 mm² dibandingkan dengan tikus normal yaitu 0.51 ± 0.02 mm². Peningkatan ketebalan dinding aorta memiliki karakteristik yang dapat dilihat dari terjadinya hipertropi. Hipertropi pada dinding aorta terjadi akibat dari meningkatnya tekanan darah.



Gambar 2.2 Potongan Melintang pada Aorta Thoracalis dengan Pewarnaan HE. (a)dinding aorta pada tikus dalam keadaan normal, (b)aorta pada tikus yang diberi induksi garam-DOCA mengalami penebalan(hipertropi) pada dinding aorta. (A):dinding aorta (Takaoka *et al.*, 2001).

2.2 Terapi Antihipertensi

Golongan obat antihipertensi yang banyak digunakan yaitu: diuretik, penyekat reseptor beta adrenergik (β -blocker), penghambat *angiotensin*-

converting enzyme (ACE-Inhibitor), antagonis angiotensin II dan antagonis kalsium dan *alpha-blocker* (Gormer, 2008).

Menurut Syarif dkk (2009), secara umum ACE-inhibitor dibedakan atas dua kelompok: 1) bekerja langsung, contohnya captopril dan lisinopril. 2) *Prodrug*, contohnya enalapril, kuinapril, perindopril, ramipil, silazapril, benazepril, fosinopril dan lain-lain. Miguel-Carrasco *et al.*,(2010) menjelaskan bahwa captopril adalah ACE-Inhibitor yang digunakan untuk mengobati hipertensi arteri dan penyakit kardiovaskular.

Cara kerja dari obat golongan ACE-Inhibitor adalah menghambat perubahan angiotensin I menjadi angiotensin II, dimana zat ini dapat menyebabkan peningkatan tekanan darah (Depkes, 2008). Berkurangnya produksi angiotensin II oleh ACE-Inhibitor akan mengurangi sekresi aldosteron. Akibatnya terjadi ekskresi air dan natrium sedangkan kalium mengalami retensi sehingga ada tendensi terjadinya hiperkalemia terutama pada gangguan fungsi ginjal (Syarif dkk, 2009).

Beberapa diantara golongan ACE-Inhibitor dapat digunakan pada hipertensi akut seperti captopril dan enalaprilat. Obat ini efektif pada sekitar 70% pasien. ACE-Inhibitor terpilih untuk hipertensi dengan gagal jantung kongesti. Obat ini juga menunjukkan efek positif terhadap lipid darah dan mengurangi resistensi insulin sehingga sangat baik dalam menurunkan tekanan darah penderita hipertensi diabetes, dislipidemia dan obesitas. Obat ini juga sering digunakan untuk mengurangi proteinuria pada sindrom nefrotik dan nefropati diabetes

melitus. Selain itu ACE-Inhibitor juga sangat baik untuk hipertensi dengan hipertropi ventrikel kiri, penyakit jantung dan lain-lain (Syarif dkk, 2009).

Efek samping dari obat antihipertensi golongan ACE-Inhibitor adalah terjadi hipotensi (terjadi pada awal pemberian ACE-Inhibitor, terutama pada hipertensi dengan aktifitas renin yang tinggi), batuk kering (efek samping ini bergantung pada besarnya dosis dan bersifat reversibel bila obat dihentikan), hiperkalemia (dapat terjadi pada pasien dengan gangguan fungsi ginjal), gangguan pengecap (karena adanya gugus sulfhidril pada captopril yang tidak dimiliki ACE-Inhibitor yang lain), edema angioneurotik, gagal ginjal akut (Departement of Health and Human Service, 2004). Selain itu penggunaan obat golongan ACE-Inhibitor beresiko terjadi kematian pada bayi dengan angka kejadian sebanyak 3-7% terutama pada kehamilan trimester pertama (Cooper *et al.*, 2006).

Secara farmakokinetik, captopril diabsorpsi dengan baik pada pemberian oral dengan bioavailabilitas 70-75%. Pemberian bersama makanan akan mengurangi absorpsi sekitar 30%, oleh karena itu obat ini harus diberikan 1 jam sebelum makan (Syarif dkk, 2009).

2.3 Kasein Yogurt Susu Kambing

2.3.1 Karakteristik Kasein

Kambing Peranakan Etawa (PE) adalah salah satu penyedia protein hewani asal ternak berupa daging atau susu. Kambing PE merupakan persilangan antara kambing etawa dan kambing kacang yang keberadaannya sudah adaptif dengan topografi di Indonesia (Tanius dan Setiawan, 2005). Kambing PE merupakan jenis

kambing perah yang unggul karena mempunyai kemampuan memproduksi susu sebanyak 1,5-3 liter per hari (Setiawan, 2002).

Kasein terdiri dari lebih dari satu protein (α_{S1} -kasein, α_{S2} -kasein, β -kasein, dan κ -kasein). Struktur primer dari tiap kasein berbeda-beda. Kasein memiliki fosfoserine dan mengandung proline yang relative tinggi. Letaknya terdapat pada asam amino hidrofilik dan hidrofobik. α_{S1} -kasein, α_{S2} -kasein, β -kasein berada pada wilayah yang mempunyai fosfoserine dan presipitasinya berdekatan dibawah kalsium sehingga disebut dengan *calcium receptivity caseins*. κ -kasein hanya memiliki satu fosfoserine dan presipitasinya tidak berdekatan dibawah kalsium sehingga disebut dengan *calcium non-receptivity caseins* (Akuzawa *et al.*, 2009).

Ukuran kasein pada susu kambing lebih besar yaitu 100-200 nm dibanding susu sapi yang berukuran 60-80 nm. Perbedaan lainnya yaitu kandungan dari α_{S1} -kasein. Kandungan α_{S1} -kasein yang terdapat pada susu kambing antara 0-7 g/L. Variasi ini berkaitan dengan polimorfisme genetik α_{S1} -kasein (Martin *et al.*, 2003). Susu kambing mengandung sedikit α_{S1} -kasein dan lebih banyak mengandung β -kasein bila dibandingkan dengan susu sapi (Clark & Sherbon, 2000).

β -kasein dapat diisolasi secara langsung dari hasil rennet susu skim berdasarkan kelarutan dari β -kasein yang diolah pada temperature yang rendah. Kandungan β -kasein dapat meningkat dengan menurunkan suhu inkubasi. Konsentrasi β -kasein pada susu kambing 43% lebih tinggi daripada susu sapi. β -

kasein yang diekstrak lebih efisien dibandingkan rennet β -kasein susu kambing, sehingga hasil ekstraksi β -kasein pada susu kambing lebih tinggi 53% daripada susu sapi. Kemurnian dari β -kasein yang diekstrak dapat meningkat hingga mencapai 90% setelah diinkubasi pada suhu 0°C. (Lamothe *et al.*, 2007).

Menurut Winarno (2002), kandungan protein susu kambing lebih tinggi daripada susu sapi sehingga susu kambing mampu membantu memulihkan kondisi orang yang telah sembuh dari suatu penyakit. Hal ini disebabkan protein berfungsi sebagai zat pembangun yaitu membentuk jaringan-jaringan baru di dalam tubuh dan mengganti jaringan tubuh yang rusak dan yang perlu di perbaiki.

2.3.2 Biopeptida Dalam Kasein Yogurt Susu Kambing

Yogurt berasal dari susu yang mengalami fermentasi (Tamime dan Robinson, 2007). Yogurt dapat dibuat dari susu, susu kambing (Stelios dan Emmanuel, 2004). Yogurt yang dipasarkan biasanya dibuat menggunakan fermentasi susu yang ditambahkan kultur *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* yang tiap organisme memiliki tingkat keasaman dan spesifikasi pada rasa dan aroma produk yogurt serta kedua spesies ini bersifat *mutual synergism*. (Almena *et al.*, 2005; Masato *et al.*, 2005).

Menurut Sharma *et al.*, (2011) bioaktif peptida adalah protein yang disintesis di dalam sel dalam bentuk prepropeptida besar yang kemudian dipecah dan dimodifikasi dalam bentuk produk aktif. Biopeptida dikenal sebagai fragmen protein spesifik yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh. Berdasarkan fungsinya, biopeptida dibedakan menjadi beberapa macam yaitu sebagai antimikrobal,

antitrombotik, antihipertensi, *opioid* imunomodulator, mineral *binding*, dan antioksidan. Bioaktif peptida dapat diperoleh dari makanan, supplement makanan, dan makanan yang digunakan untuk pengobatan. Bioaktif peptida inaktif dalam rangkaian protein induk dapat dilepaskan dengan 3 cara: 1) melalui hidrolisis oleh enzim digesti, 2) melalui hidrolisis protein oleh mikroorganisme proteolitik dan 3) melalui enzimproteolitik yang berasal dari mikroorganisme atau tanaman (Korhonen & Pihlanto, 2006). Peptida ACE-Inhibitor, peptida imunomodulator, dan *caseinophosphopeptides* adalah bioaktif peptida yang paling banyak terdapat pada produk makanan yang diformulasikan untuk kesehatan tubuh (Sharma *et al.*, 2011).

Peptida yang berasal dari β -kasein susu berpotensi sebagai aktivitas biologi dimana dapat bertindak sebagai antihipertensi dan imunostimulus. Peningkatan aktivitas biologi diperlukan untuk memproduksi bioaktif peptida spesifik (Lamothe *et al.*, 2007). Bioaktif peptida dipengaruhi oleh struktur molekul peptida dan banyaknya perbedaan di dalam sequence AA dan modifikasi post translasi seperti fosforilasi dan glikosilasi (Neveu *et al.*, 2002).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Geerling *et al.*, (2006) ACE-Inhibitor pada susu kambing yang dihidrolisis, dapat menurunkan tekanan darah sistolik tikus hipertensi model SHR. Terapi susu kambing yang dihidrolisis yang diberikan selama 4 minggu dapat mencegah peningkatan tekanan darah sistolik pada tikus hipertensi model SHR. Menurut Maes *et al.*, (2004) ; Sipola *et al.*, (2002) ; Nurminen *et al.*, (2000) ACE-Inhibitor dari peptida susu dapat bertindak sebagai antihipertensi yang bekerja dengan cara menghambat pelepasan endotelin-1 oleh

sel endotel, meningkatkan endotelium sehingga memproduksi NO, dan meningkatkan kegiatan vasodilator.

Peptida antioksidan dapat diperoleh dari kasein yang dihidrolisis oleh enzim digesti dan proses fermentasi susu oleh enzim proteolitik bakteri asam laktat (Korhonen *et al.*,2003).Peptida yang paling banyak diidentifikasi sebagai antioksidan berasal dari α _s-kaseinyang bekerja dengan cara menangkap aktivitas radikal bebas dan menghambat peroksida lipid enzimatik dan non enzimatik, dimana target utamanya adalah radikal bebas asam lemak berlebih (Rival *et al.*,2001).



BAB III

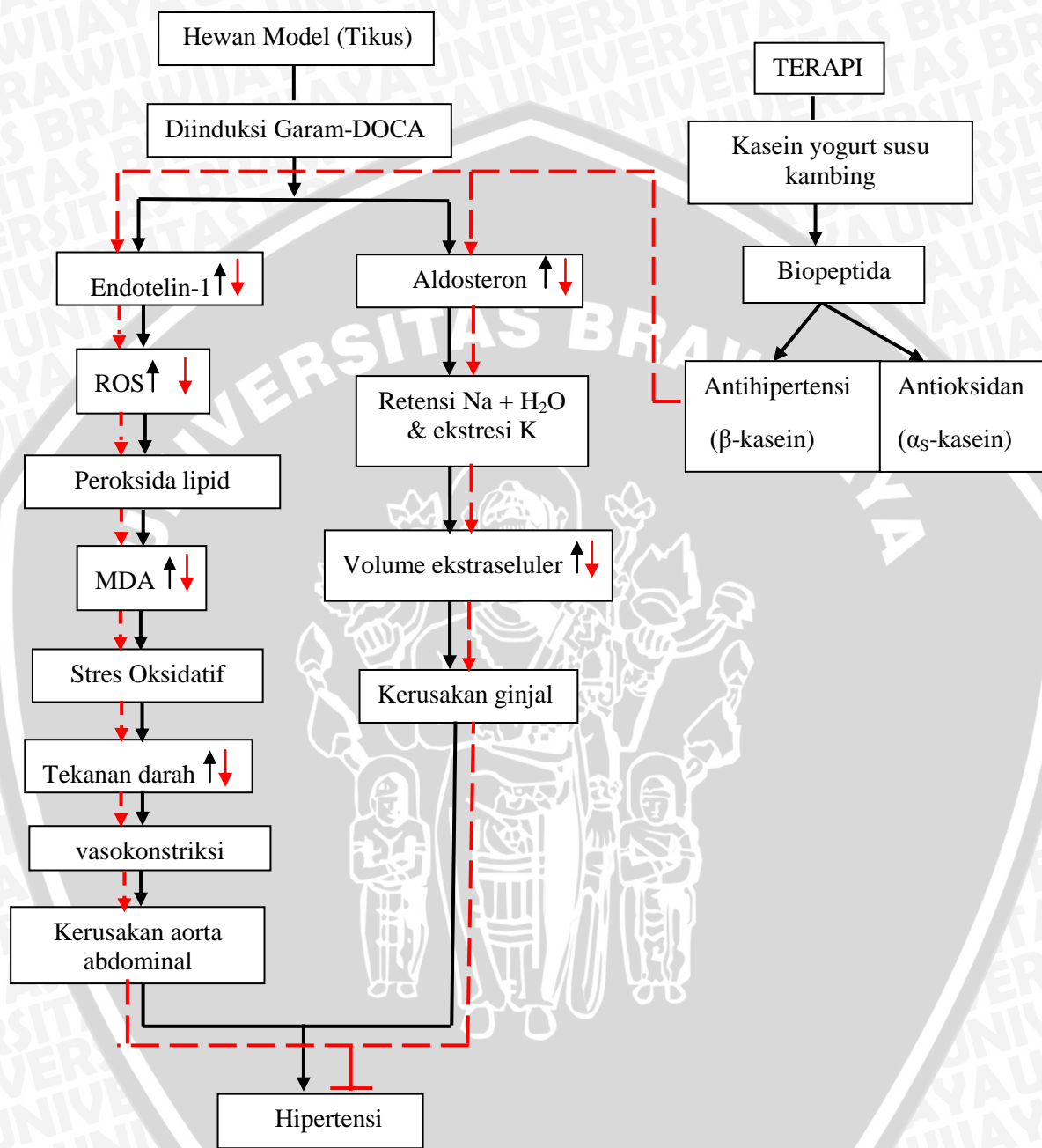
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Induksi garam-DOCA pada tikus menyebabkan stres oksidatif di dalam sel otot polos dan endotelial pembuluh darah. Terjadinya stress oksidatif diawali dari DOCA yang memicu terbentuknya produksi aldosteron dan peningkatan produksi Endotelin-1. Peningkatan sekresi aldosteron menyebabkan retensi natrium dan air di ginjal dan juga ekskresi kalium, sehingga terjadilah peningkatan volume cairan ekstraseluler. Selain terbentuknya produksi aldosteron, induksi garam-DOCA dapat menyebabkan peningkatan produksi endotelin-1 di pembuluh darah. endotelin-1 berperan dalam pembentukan radikal bebas dan bekerja sebagai vasokonstriktor. Selanjutnya radikal bebas menyebabkan terbentuknya peroksida lipid dimana produk akhirnya adalah MDA dan terbentuklah stres oksidatif. Stress oksidatif menyebabkan kerusakan jaringan aorta abdominal yang ditandai dengan terjadi proliferasi sel otot polos. Kerusakan jaringan dan peningkatan tekanan darah menyebabkan terjadinya hipertensi.

Terapi kasein yogurt susu kambing yang mengandung biopeptida, dapat bertindak sebagai antihipertensi yang diperoleh dari β -kasein dan sebagai antioksidan dari α_s -kasein. Peptida antihipertensi dalam bentuk β -kasein bekerja dengan cara mensintesis ACE-Inhibitor. Selanjutnya ACE-Inhibitor akan menghambat pelepasan endotelin-1 oleh sel endotel, meningkatkan endotelium sehingga meningkatkan produksi NO, dan terjadi vasodilatasi.

Peptida antioksidan berupa α_S -kasein bekerja dengan cara menangkap aktivitas radikal bebas. Radikal bebas yang berasal dari adanya peningkatan produksi ET-1 pada hipertensi induksi garam-DOCA dapat menyebabkan kerusakan seluruh membran biologis dengan cara menyerang protein lipid, asam nukleat, dan glikonjugat. Selain menangkap aktivitas radikal bebas, α_S -kasein juga bekerja dengan cara menghambat peroksida lipid enzimatis dan non enzimatis, dimana target utamanya adalah radikal bebas asam lemak berlebih sehingga akan terjadi penurunan peroksida lipid yang menghasilkan produk akhir berupa MDA. Penurunan kadar MDA menyebabkan tingkat stres oksidatif pada jaringan akan menurun yang ditandai dengan penurunan proliferasi sel otot polos sehingga akan terjadi perbaikan jaringan pada tikus hipertensi induksi garam-DOCA yang diterapi kasein yogurt susu kambing.



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konsep

Keterangan :

- - - - -> = mekanisme terapi kasein
- ↑ = efek induksi Garam-DOCA
- ↓ = pengaruh terapi kasein
- ⊥ = menghambat hipertensi
- - - - -> = mekanisme induksi Garam-DOCA

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :terapi kasein yogurt susu kambing terhadap tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai model hipertensi yang telah diinduksi Garam-DOCA dapat menurunkan tekanan darah penderita hipertensi dan mengurangi kerusakan jaringan aorta abdominal, yang diamati berdasarkan pengukuran kadar MDAdan histopatologi jaringan aorta abdominal.



BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner, Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Malang, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Malang, Laboratorium Fitokimia, Departemen Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, LPPT (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu), Rumah Sakit Dr Soetomo Surabaya, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan Laboratorium Farmakologi & Toksikologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada dan Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya. Pelaksanaan penelitian berlangsung selama 1 tahun mulai bulan Januari-Desember 2013.

4.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari timbangan digital (*Precisa 3000 D*), lemari es (*Sharp*), autoclave, inkubator (*Memmert Ine500*), sentrifuse dingin (*thermoscientificsorrall biofuge primo R centrifuge*), oven *carbolite*, pH meter (*Eutech Instrument Cyberscan pH 310*), kompor gas, *freeze dryer (Christ Beta 1-8 K)*, *Blood Pressure Analyzer(IITC model 179, woodland hills-USA)*, spektrofotometer UV-Vis (*thermoscientificgenesys 20*), rotary microtome, sentrifuse (*thermoscientific sorvall legend micro 17*) dan mikroskop cahaya (*olympus BX 51*), kamera (*olympus XC 10*), kandang besi ukuran 41 cm x

31 cm x 27 cm, *tissue processor*, *tissue embedding*, *water bath*, tempat staining, dan vortex. Peralatan glassware yang digunakan yaitu botol Schott 1000 ml, gelas ukur 250 ml (Pyrex ® *Iwaki*), tabung erlenmeyer 250 ml (Pyrex ® *Iwaki*) dan gelas beaker 100 ml (Pyrex ® *Iwaki*), *object glass*, dan *cover glass*. Peralatan pendukung yang digunakan yaitu karet bulb, aluminium foil, termometer, spatula, kertas pH, bunsen, pipet ukur 5 ml (Pyrex ® *Iwaki*), sekam padi sebagai alas kandang, botol minum yang dilengkapi saluran air dan box pakan tikus, syringe 1 ml, 3 ml & 12 ml, alat sonde dan penyaring minyak jagung (Sartorius Minisart ®).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tikus (*Rattus norvegicus*)/strain Wistar jantan berumur 10–12 minggu dengan berat 200–250 gram sebanyak 20 ekor, pakan komersial AD II (Comfeed, Indonesia), air minum RO (*Reverse Osmosis*), susu kambing PE/Peranakan Etawa segar (BBPP Batu-Malang, Indonesia), starter yogurt (*Yógourmet 5 g Lyo San Inc-Canada* mengandung bakteri *L.bulgaricus* *S. thermophilus*, *L. acidophilus*), DOCA (Sigma Pcode 1001376001, USA), NaCl (Merck, Denmark), minyak jagung (Sigma Pcode 1000925370), HCl 1 N, Na-Thio 1%, aquades, Formaldehid 10%, kloroform 10%, TCA 10%, etanol, parafin, xylol, dan captopril 25 mg (Indofarma, Indonesia), formaldehid 10%, etanol 70%, 80%, 90% dan 95%, xylol I, xylol II, dan xylol III.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok tersebut

terdiri dari kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok tikus model hipertensi yang diterapi captopril, kelompok tikus model hipertensi yang diterapi kasein yogurt susu kambing dosis 300 mg/kg BB dan kelompok tikus model hipertensi yang diterapi kasein yogurt susu kambing dosis 600 mg/kg BB.

Keseluruhan penelitian ini dilakukan atas persetujuan Komisi Etik Penelitian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus menurut Montgomery & Kowalsky, 2011:

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

Keterangan :

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

P = jumlah kelompok hewan coba

$$5n-5 \geq 15$$

n = jumlah ulangan yang diperlukan

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 perlakuan/kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga dalam penelitian ini membutuhkan 20 ekor hewan coba. Tiap-tiap Kelompok perlakuan dijelaskan pada **Tabel 4.3**

Tabel. 4.3 Kelompok Perlakuan Tikus

| Kelompok Tikus | Perlakuan |
|----------------|--|
| A | tikus sehat tanpa perlakuan |
| B | tikus hipertensi (Garam-DOCA) |
| C | Tikus hipertensi(Garam-DOCA) yang diterapi dengan captopril dosis 5 mg/kg BB |
| D | Tikus hipertensi (Garam-DOCA yang diterapi dengan kasein yogurt susu kambing dosis 300 mg/kg BB |
| E | Tikus hipertensi (Garam-DOCA) yang diterapi dengan kasein yogurt susu kambing dosis 600 mg/kg BB |

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variable bebas : induksi garam-DOCA, dan terapi (captopril, kasein yogurt susu kambing).

Variabel tergantung : kadar MDA, dan histopatologi aorta abdominal.

Variabel kontrol : umur, jenis kelamin, berat badan tikus, pakan, dan tekanan darah

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu pembuatan kasein yogurt (mulai dari pembuatan starter hingga kasein yogurt), sentrifugasi kasein yogurt, *freeze drying* kasein yoghurt susu kambing, persiapan hewan coba, induksi tikus hipertensi dengan garam-DOCA, pemberian terapi, pengukuran tekanan darah hewan coba, pengukuran kadar MDA dan pengamatan preparat histopatologi aorta abdominal tikus.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Pembuatan Kasein Yogurt Susu Kambing

4.4.1.1 Pembuatan Starter

Proses pembuatan starter menurut Anonymous (2013) yaitu starter yogurt ditimbang sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan ke dalam gelas piala 100 ml. Susu kambing sebanyak 100 ml yang telah dipasteurisasi, dituang ke dalam starter yogurt (pH 4,63) untuk melarutkan starter yogurt dan diaduk hingga homogen.

4.4.1.2 Pembuatan Yogurt

Metode pembuatan yogurt menurut Posecion *et al.*, (2005), susu kambing sebanyak 500 ml dituangkan ke dalam botol Schott 1000 ml lalu dipasteurisasi

pada suhu 72°C selama 5 menit. Selanjutnya susu didinginkan hingga suhu mencapai 40°C–45°C. Inokulasikan starter 5% ke dalam susu kambing 500 ml (v/v). Lakukan inkubasi pada suhu 40°C–45°C selama 4–8 jam, setelah menjadi yogurt, selanjutnya dimasukkan ke dalam lemari pendingin. Yogurt susu kambing memiliki pH 4,52.

4.4.1.3 Pembuatan Kasein Yogurt

Quiros (2005) menjelaskan langkah pertama proses pembuatan kasein yogurt yaitu yogurt susu kambing disentrifugasi untuk mendapatkan kasein yogurt susu kambing. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 5°C. Hasil sentrifugasi akan terbentuk endapan dan supernatan. Hasil endapan yang berwarna putih tersebut adalah kasein yogurt susu kambing. Selanjutnya kasein yogurt susu kambing di freeze dry dan disimpan pada suhu -20°C untuk selanjutnya digunakan pada penelitian.

4.4.2 Persiapan Hewan Coba Hipertensi Induksi Garam-DOCA

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar dengan jenis kelamin jantan berumur 10-12 minggu, dan berat 200-250 gram. Hewan coba diadaptasikan dengan kondisi kandang dan pakan selama 3 hari. Tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan. Air minum diberikan secara *ad libitum* dan diberikan pakan komersial AD II (Comfeed, Indonesia). Tikus dipelihara dalam kandang dengan populasi 5 ekor/kandang. Menurut Malkoff (2005), tikus dipelihara dalam ruang bersuhu 26°C.

4.4.3 Induksi Tikus Hipertensi dengan Garam-DOCA

Metode penelitian ini adalah hasil modifikasi antara Badyal *et al* (2003) dan Prahalathan *et al* (2012) dimana tikus diberi DOCA(*Deoxycorticosterone Acetate*) yang diinjeksi secara subkutan (SC) 2 kali seminggu dengan dosis 20 mg/kg BB pada 5 kali injeksi awal, kemudian dosis 10 mg/kg BB pada 5 kali injeksi berikutnya yang sudah dilarutkan ke dalam minyak jagung 0,5 ml dan diberi 2% (w/v) cairan NaCl sebagai air minum secara ad libitum. Tikus diinduksi hipertensi selama 5 minggu. Perhitungan pemberian dosis garam-DOCA dijelaskan pada **Lampiran 4**.

4.4.4 Perlakuan Terapi dengan Captopril

Dosis dan lama pemberian captopril diperoleh dari metode Contreras (2009) yaitu tikus hipertensi selanjutnya diberikan captopril selama 4 minggu dengan dosis 5 mg/kg/hari dan pemberian dilakukan dengan sonde. Perhitungan pemberian dosis captopril dijelaskan pada **Lampiran 5**.

4.4.5 Perlakuan Terapi dengan Kasein

Tikus hipertensi yang diberikan terapi kasein yogurt susu kambing dibedakan menjadi 2 dosis yang diberikan yaitu dosis 300 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB dan diberikan selama 4 minggu, pemberian dilakukan dengan sonde. Dosis dan lama yang dibutuhkan untuk terapi menggunakan kasein berdasarkan metode Contreras 2011. Perhitungan pemberian dosis kasein dijelaskan pada **Lampiran 6**.

4.4.6 Pengukuran Parameter

4.4.6.1 Pengukuran Tekanan Darah Hewan Coba

Pengukuran tekanan darah menurut Badyal *et al.*, (2003), dilakukan dengan ekor tikus dimasukkan ke dalam *tail cuff* (IITC, USA) selanjutnya tombol "On" di tekan dan pengukuran dimulai dan dicatat. *Tail-Cuff* digelembungkan hingga tekanan darah diatas 200 mmHg kemudian tekanan *cuff* dikurangi perlahan-lahan. Tekanan darah diukur seminggu sekali.

4.4.6.2 Persiapan Organ Untuk Pengukuran MDA dan Histopatologi

4.4.6.2.1 Proses Eutanasia tikus (*Rattus norvegicus*)

Proses eutanasia pada tikus, dimulai dari persiapan kapas yang telah dibasahi kloroform 10% kemudian tikus dimasukkan kedalam tabung yang telah berisi kapas yang telah dibasahi kloroform 10% kemudian tabung tersebut ditutup dan tikus dibiarkan didalam tabung selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan proses pembedahan tikus untuk pengambilan jaringan aorta abdominal. Selanjutnya jaringan disimpan kedalam larutan formalin 10% untuk pembuatan preparat histopatologi dan yang disimpan ke dalam larutan PBS untuk pengukuran MDA.

4.4.6.2.2 Pengukuran MDA

4.4.6.2.2.1 Pembuatan Kurva Standar MDA

Larutan stok kit MDA dengan konsentrasi yaitu 0,1,2,3,4,5,6,7 dan 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diambil masing-masing sebanyak 100 μL dan dimasukkan ke dalam tabung apendorf kemudian ditambahkan 500 μL aquades dan 100 μL TCA 10% lalu dihomogenkan dan ditambahkan 250 μL HCl 1 N serta dihomogenkan kemudian ditambahkan 100 μL Na-Thio 1% dan dihomogenkan. Setelah itu

disentrifugasi pada kecepatan 500 rpm selama 10 menit dan dihasilkan endapan dan supernatan. Supernatan diambil lalu direndam dalam *waterbath* pada suhu 100°C selama 30 menit kemudian dibiarkan dalam suhu ruang serta diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) dan diperoleh absorbansi larutan kemudian dibuat kurva standar MDA dan dihasilkan persamaan linear. Pembuatan kurva standar MDA dijelaskan pada **Lampiran 8**.

4.4.6.2.2 Pengukuran Kadar MDA Aorta Abdominal Metode TBA

Pengukuran kadar MDA menurut Aulanni'am dkk (2012), dimulai dari aorta abdominal diambil jaringannya dan ditimbang sebanyak 1,8 gram kemudian digerus dalam mortar hingga halus. Tambahkan NaCl fisiologis 0,9% dan dihomogenkan. Supernatant 100 μ L dimasukkan ke tabung ependorf lalu ditambah 550 μ L aquades steril, TCA 10% 100 μ L dan dihomogenkan, tambahkan HCL 1 N 100 μ L lalu dihomogenkan kemudian ditambahkan Na-Thio 1% 100 μ L dan dihomogenkan. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Hasil Supernatan dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 100°C selama 30 menit kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada χ_{maks} (530nm) sehingga diperoleh absorbansi sampel. Absorbansi kemudian diplotkan pada persamaan linear sehingga diperoleh nilai kadar MDA. Metode pengukuran kadar MDA dijelaskan pada **Lampiran 9**.

4.4.6.2.3 Pembuatan Preparat Histopatologi

Proses pembuatan preparat histopatologi menurut Wati dkk (2013) yaitu dimulai dari proses dehidrasi dimana aorta abdominal direndam dalam larutan formaldehid 10%. Kemudian fiksasi yang dilakukan dengan cara direndam dalam larutan etanol 70%, 80%, 90%, 95% secara berturut-turut selama 20 menit. Proses clearing dilakukan dengan cara jaringan dimasukkan xylol I, II dan III secara berturut-turut selama 20 menit. Selanjutnya proses embedding yaitu parafin dimasukkan ke dalam cetakan sampai setengah, kemudian potongan jaringan dimasukkan dan cetakan ditambah dengan parafin hingga penuh dan dilabel. Sediaan lalu dibekukan dan didinginkan sebelum dilakukan pemotongan dengan menggunakan *microtome*. Sectioning dilakukan dengan cara jaringan aorta abdominal dipotong dengan menggunakan rotary microtome dengan ketebalan 5 μ m dan hasil irisan ditempelkan pada gelas objek, kemudian dikeringkan dan disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40°C selama 24 jam sampai dilakukan pewarnaan. Metode pembuatan preparat histopatologi secara langsung dapat dilihat di **Lampiran 10**.

4.4.6.2.3.1 Pewarnaan HE

Pewarnaan menggunakan HE yang diawali dengan proses deparafinasi menggunakan xylol I, II dan III masing-masing selama 5 menit, alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Sediaan dicuci dengan air kran dan dilanjutkan dengan air aquades. Sediaan diwarnai dengan pewarna hematoxilin \pm 10 menit, kemudian dicuci dengan air kran dan air aquades setelah itu diwarnai dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci

kembali dengan air aquades. Setelah sediaan diwarnai, kemudian dimasukkan dalam etanol 80%, 90%, 95%, etanol absolute, xylol I, dan II. Selanjutnya dikering-anginkan dan dilakukan mounting.

4.4.6.2.3.2 Pengamatan

Pengamatan preparat histopat dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran lemah (100X) dilanjutkan dengan perbesaran kuat (500X) untuk melihat perubahan sel-sel otot polos yang terdapat pada tunika media pada aorta abdominal semua kelompok tikus perlakuan.

4.5 Analisis Data

Dalam penelitian ini dilakukan analisis deskriptif kualitatif dari hasil pengamatan histopatologi jaringan aorta abdominal sedangkan untuk perubahan kadar MDA dianalisis statistika secara kuantitatif. Data yang diperoleh dari hasil perlakuan dianalisis menggunakan *Microsoft office excel dan SPSS 16.0 for windows* dengan analisis ragam One Way ANOVA untuk mengetahui perbedaan atas perlakuan yang dilanjutkan dengan uji Tukey untuk mengetahui perlakuan yang berbeda secara signifikan (Loch *et al.*, 2007).



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Efek Terapi Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar MDA (Malondialdehyde) Aorta Abdominal Tikus (*Rattus norvegicus*) Hipertensi

Terapi kasein yogurt susu kambing pada tikus hipertensi menyebabkan terjadi penurunan kadar MDA aorta abdominal. Hasil uji ANOVA yang dilanjutkan dengan uji *Tukey* terhadap rata-rata kadar MDA aorta abdominal menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan yang disajikan pada tabel 5.1 dan data pengujian statistik dijelaskan pada **Lampiran 12**.

Tabel 5.1 Kadar MDA Aorta Abdominal ($\mu\text{g/mL}$) Pada Tikus Jantan

| Perlakuan | Rata-rata Kadar MDA (\pm SD) $\mu\text{g/mL}$ |
|---|---|
| Tikus normal (A) | $0,31 \pm 0,08^a$ |
| Tikus hipertensi (B) | $0,61 \pm 0,09^c$ |
| Tikus terapi captopril dosis 5 mg/kg BB (C) | $0,52 \pm 0,02^{bc}$ |
| Tikus terapi kasein dosis 300 mg/kg BB (D) | $0,43 \pm 0,08^{ab}$ |
| Tikus terapi kasein dosis 600 mg/kg BB (E) | $0,42 \pm 0,04^{ab}$ |

Keterangan : Perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan.

Berdasarkan data pada tabel 5.1 diketahui bahwa nilai rata-rata kadar MDA pada tikus terapi kasein yogurt susu kambing kelompok (D dan E) dan tikus hipertensi hasil induksi Garam-DOCA (B) menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$) pada masing-masing perlakuan, namun tidak berbeda nyata dengan tikus kelompok normal (A). Nilai rata-rata kadar MDA tikus kelompok terapi captopril (C) tidak berbeda nyata dengan tikus hipertensi hasil induksi Garam-DOCA (B)

namun berbeda nyata dengan normal (A). Nilai rata-rata kadar MDA pada tikus kelompok (A) adalah $0,3180 \pm 0,08753 \mu\text{g/mL}$. Nilai tersebut menunjukkan standar nilai rata-rata kadar MDA pada tikus dalam keadaan normal. Nilai rata-rata kadar MDA tikus kelompok (B) menunjukkan nilai paling tinggi yaitu $0,6122 \pm 0,09716 \mu\text{g/mL}$.

Rata-rata kadar MDA pada kelompok tikus hipertensi induksi Garam-DOCA (B) ($0,6122 \pm 0,09716 \mu\text{g/mL}$) berbeda nyata dengan kelompok tikus normal (A) ($0,3180 \pm 0,08753 \mu\text{g/mL}$). Hal ini menunjukkan pada kelompok (B) yang diinduksi Garam-DOCA, dapat menyebabkan peningkatan kadar radikal bebas dalam tubuh yang ditandai dengan peningkatan kadar MDA sehingga terjadilah hipertensi dan kerusakan jaringan. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Somer (2000) yang menjelaskan hipertensi hasil induksi Garam-DOCA memproduksi *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) sehingga dapat mengakibatkan terjadinya peningkatan penebalan endotelial dan otot polos. Callera *et al.*, (2006) menjelaskan sumber dari ROS yang didapat dari respirasi mitokondria yang terdapat pada pembuluh darah disebabkan karena adanya ET-1. Menurut Beswick *et al.*, (2001) hipertensi dapat meningkatkan pembentukan hidrogen peroksida (H_2O_2) dan superoksida (O_2^-) dalam jaringan dan darah. Hasil tersebut dibuktikan oleh penelitian Jiménez *et al.*, (2007) bahwa pada tikus hipertensi induksi garam-DOCA, produksi *superoxide* (O_2^{*-}) di aorta thoracalis semakin besar yang menandakan radikal bebas yang terbentuk semakin banyak.

Harjanto (2004) menjelaskan bahwa ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan disebut stress oksidatif. Stress oksidatif jangka panjang dapat menimbulkan berbagai penyakit. Sharma *et al.*, (2003) menambahkan, radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan seluruh membrane biologis dengan cara menyerang protein, lipid, asam nukleat, dan glikonjugat. Peroksidasi lipid merupakan proses oksidasi asam lipid tidak jenuh berantai panjang (*polyunsaturated fatty acid* atau PUFA) pada membran sel yang menghasilkan radikal peroksida-lipid, hidroperoksida dan produk aldehida misalnya malondialdehida (MDA). Selanjutnya menurut Valko *et al.*, (2006) kadar MDA yang tinggi menunjukkan bahwa sel mengalami stress oksidatif. Stress oksidatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameter yaitu kadar MDA. Edyon, (2002) menjelaskan bahwa kadar malondialdehide pada aorta abdominal tikus (*Rattus norvegicus*) jantan diukur menggunakan metode uji TBA (*Trichloro barbiturate acid*). Uji ini didasarkan pada reaksi kondensasi antara molekul MDA dengan dua molekul TBA pada kondisi asam.

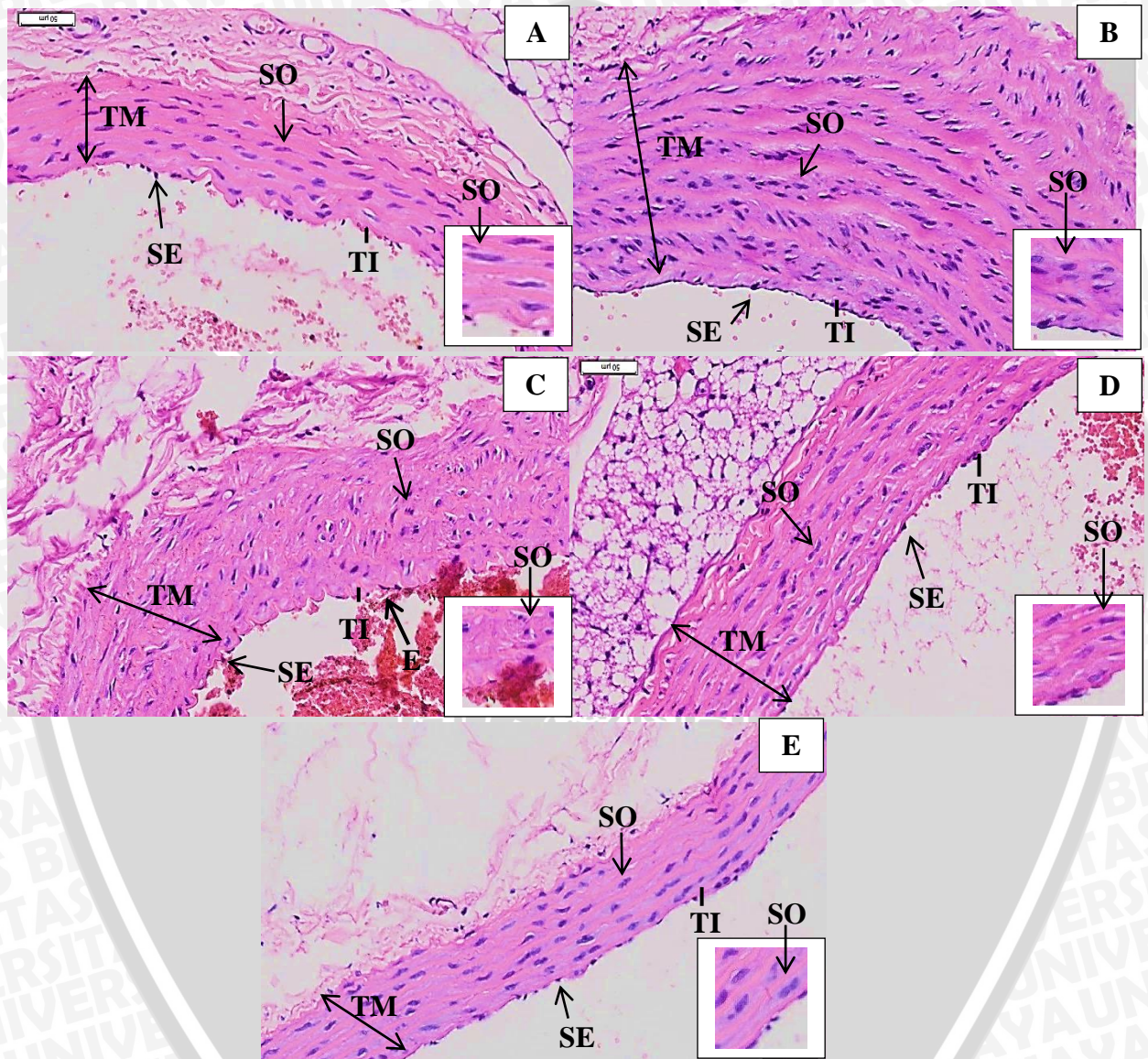
Pada tikus kelompok (C) yang diterapi dengan captopril dosis 5 mg/kg BB tidak berbeda nyata dengan kelompok hipertensi (B) namun berbeda nyata dengan kelompok normal (A). Hal ini menunjukkan bahwa tikus yang diterapi captopril tidak menunjukkan penurunan kadar MDA. Bhuyan & Muges (2011), menjelaskan bahwa captopril dapat bertindak sebagai ACE-Inhibitor. Captopril mengandung mineral esensial yaitu selenium, dimana selenium ini bertindak sebagai antioxidant. Namun penggunaan selenium dalam jangka lama dapat

menyebabkan keracunan. Perbedaan hasil pada penelitian ini disebabkan karena tikus kelompok (C) hipertensi induksi Garam-DOCA, yang diterapi captopril dosis 5 mg/kg BB dilaksanakan dalam waktu yang kurang lama yaitu hanya selama 4 minggu.

Hasil rata-rata kadar MDA pada tikus kelompok D dan E yang diterapi kasein yogurt susu kambing, tidak berbeda nyata dengan tikus kelompok A namun berbeda nyata dengan tikus kelompok B. Hal ini menunjukkan bahwa terapi kasein yogurt susu kambing mampu menurunkan kadar radikal bebas dalam tubuh yang ditandai dengan penurunan kadar MDA. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rival *et al.*, (2001) peptida yang paling banyak diidentifikasi sebagai antioksidan berasal dari α_s -kasein yang bekerja dengan cara menangkap aktivitas radikal bebas dan menghambat peroksida lipid enzimatik dan non enzimatik, dimana target utamanya adalah radikal bebas asam lemak berlebih. Korhonen & Pihlanto, (2003) menjelaskan peptida antioksidan dapat diperoleh dari kasein yang dihidrolisis oleh enzim digesti dan proses fermentasi susu oleh enzim proteolitik bakteri asam laktat.

Terapi kasein yogurt susu kambing baik pada dosis 300 mg/kg BB (D) maupun dosis 600 mg/kg BB (E) dapat menurunkan kadar MDA lebih baik bila dibandingkan dengan terapi captopril dosis 5 mg/kg BB (C). Terapi kasein yogurt susu kambing dosis 300 mg/kg BB (D) dan dosis 600 mg/kg BB (E) tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap penurunan kadar MDA sehingga dapat dikatakan bahwa terapi kasein yogurt susu kambing dosis 300 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB memiliki efek yang sama dalam menurunkan kadar MDA.

5.2 Efek Terapi Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Gambaran Histopatologi Aorta Abdominal Tikus (*Rattus norvegicus*) Hipertensi



Gambar 5.1 Histopatologi Aorta Abdominal tikusjantan (HE, 400X),

- (A) Tikus normal, sel otot polos normal
- (B) Tikus hipertensi, terjadi proliferasi sel otot polos
- (C) Tikus terapi captopril, terjadi kerusakan sel otot polos
- (D) Tikus terapi kasein 300 mg/kg BB, terjadi perbaikan sel otot polos mendekati normal
- (E) Tikus terapi kasein 600 mg/kg BB, terjadi perbaikan sel otot polos mendekati normal

(TM): Tunika Media; (SO): Sel Otot Polos; (TI): Tunika Intima; (SE): Sel Endotel; (E): Eritrosit

Gambaran histopatologi kelompok normal (A) menunjukkan adanya sel otot polos yang terletak pada tunika media terlihat normal dan dinding aorta abdominal yang normal yang dapat dilihat dari struktur tunika media dan intima yang teratur dan utuh.

Kelompok hipertensi (B), secara histopatologi terlihat adanya proliferasi sel otot polos di tunika media. Takahashi (2006) menjelaskan bahwa pada hipertensi hasil induksi Garam-DOCA menyebabkan peningkatan kadar ET-1 dimana menginduksi VSMC (*Vascular Smooth Muscle Cell*)/tonus sel otot polos vaskuler selanjutnya VSMC menstimulus terjadinya hipertropi dan hiperplasia. VSMC komponen utama pada dinding arteri dan berperan dalam pembentukan lesi pembuluh darah. Hasil penelitian Dao *et al.*, (2006) menunjukkan bahwa adanya kadar ET-1 yang rendah, menstimulus terjadinya hipertropi pada arteri dan kadar ET-1 yang tinggi menstimulus terjadinya hiperplasia. Hasil penelitian Atkins *et al.*, (2005) menunjukkan bahwa induksi Garam-DOCA dapat menyebabkan terjadinya proliferasi sel otot polos di pembuluh darah. Selanjutnya menurut Somer, (2000) peningkatan produksi superoxide oleh garam-DOCA dapat mengubah pelebaran endothelium dan relaksasi pembuluh darah.

Nitric Oxide (NO) berperan penting dalam regulasi tekanan darah dengan mempertahankan otot pembuluh darah di beberapa tempat. Selama hipertensi, efek vasodilator endogen dicegah karena interaksi dengan ROS, terutama superoksida, sehingga meningkatkan resistensi pembuluh darah dan elevasi tekanan darah (Beswick *et al.*, 2001).

Oparil *et al.*, (2003) menjelaskan bahwa angiotensin II diproduksi di berbagai macam jaringan yaitu pembuluh darah, jantung, adrenal dan otak yang dikontrol oleh ACE dan enzim lainnya. Angiotensin II ini berperan dalam menginduksi terjadinya hipertropi dan hiperplasia pada sel jantung dan pembuluh darah yang secara langsung diaktivasi oleh reseptor angiotensin II tipe I (AT-1).

Pada kelompok terapi captopril (C), secara histopatologi terlihat adanya kerusakan sel otot polos dan adanya eritrosit yang menempel pada tunika intima. Adanya eritrosit ini menandakan bahwa terjadi kerusakan pada fungsi endotel sehingga menyebabkan eritrosit dapat menempel. Masih terdapatnya kerusakan jaringan pada tikus kelompok C, yang diterapi dengan captopril, mengindikasikan bahwa terapi captopril yang diterapi selama 4 minggu, belum memberikan hasil terhadap perbaikan jaringan pada aorta abdominal.

Pada kelompok D dan E, secara umum terlihat adanya perbaikan gambaran histopatologi aorta abdominal. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa terjadi penurunan proliferasi sel otot polos. Gambar D dan E menunjukkan gambaran histopatologi yang mendekati gambaran aorta abdominal normal (Gambar A). Hasil tersebut didukung oleh penelitian Lamothe *et al.*, (2007) ; Quiros *et al.*, (2007) peptida yang berasal dari β -casein hasil fermentasi susu berpotensi sebagai aktivitas biologi dimana dapat bertindak sebagai antihipertensi dan imunostimulus. Peningkatan aktivitas biologi diperlukan untuk memproduksi bioaktif peptida spesifik. Menurut Maes *et al.*, (2004) ; Sipola *et al.*, (2002) ; Nurminen *et al.*, (2000) ACE-Inhibitor dari peptida susu dapat bertindak sebagai antihipertensi yang bekerja dengan cara menghambat pelepasan endotelin-1 oleh

sel endotel, meningkatkan endotelium sehingga memproduksi NO, dan meningkatkan kegiatan vasodilator. Cai & Harrison dalam Oparil *et al.*, (2003) menjelaskan NO memiliki beberapa peran yaitu sebagai vasodilator, menghambat adhesi platelet dan agregasi, menekan migrasi dan proliferasi sel otot polos pembuluh darah, menghambat hipertropi dan menetralkan radikal bebas.

Konsumsi susu dapat menjaga kesehatan tubuh dimana dalam produk susu tersebut mengandung peptida dan peptida dapat menurunkan aktivitas dari ACE yang bekerja sebagai vasokonstriktor di dalam pembuluh darah (Michaelidou, 2008). Peptida antihipertensi atau peptida ACE-inhibitor dapat diisolasi dari enzim digesti yang berasal dari bermacam-macam protein makanan dan masuk ke dalam kelompok biopeptida (Korhonen & Pihlanto, 2007). Peptide ACE-inhibitory baru-baru ini dapat ditemukan oleh hasil hidrolisis dari kasein susu kambing (Lee *et al.*, 2005). Bioaktif peptida pada protein susu kambing berasal dari fraksi (pecahan) *casein*, α -CN, β -CN, dan κ -CN (Lee *et al.*, 2005; Minervini *et al.*, 2003; Quiros *et al.*, 2005; Lopez-Exposito & Recio 2006; Geerlings *et al.*, 2006; Hernandez-Ledesma *et al.*, 2002; Rizzello *et al.*, 2005; dan Recio & Visser 2000).

Gambaran histopatologi yang paling baik ditunjukkan oleh kelompok E yang diterapi kasein yogurt susu kambing dosis 600 mg/kg BB dimana perbaikan fungsi endotel yang mulai terlihat yang diketahui dari struktur tunika intima yang utuh dan hampir mendekati normal bila dibandingkan dengan kelompok D yang diterapi kasein yogurt susu kambing dosis 300 mg/kg BB.

Dari kedua kelompok terapi kasein yogurt susu kambing baik pada dosis 300 mg/kg BB (D) maupun dosis 600 mg/kg BB (E) memiliki gambaran

histopatologi aorta abdominal yang mendekati normal seperti kelompok Amaka dapat dikatakan bahwa kasein yogurt susu kambing dapat berperan dalam memperbaiki jaringan aorta abdominal penderita hipertensi.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Terapi kasein yogurt susu kambing pada dosis 300 mg/kg BB (D) dan 600 mg/kg BB (E) dapat menurunkan kadar MDA dan mengurangi kerusakan jaringan aorta abdominal pada tikus hipertensi model induksi garam-DOCA.

2. Perbaikan gambaran histopatologi aorta abdominal yang paling baik adalah pada kelompok terapi kasein yogurt susu kambing dosis 600 mg/kg BB dimana terlihat adanya penurunan proliferasi sel otot polos dan terjadi perbaikan pada struktur endotel.

6.1 Saran

Kasein yogurt susu kambing dapat memperbaiki kerusakan organ dan jaringan sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas SOD sebagai antioksidan enzimatis pada aorta abdominal baik pada tikus hipertensi hasil induksi Garam-DOCA ataupun yang diterapi kasein yogurt susu kambing.

DAFTAR PUSTAKA

- Akuzawa, R., A. Miura, and H. Kawakami. 2009. Bioactive Components in Caseins, Caseinates and Cheese. Willey-Blackwell 8: 217-233.
- Alferez, M.J., M. Barrionuevo, Lopez- I. Aliaga, Sanz- M.R. Sampelayo, F. Lisbona, J.C.Robles, and M.S. Campos.2001. Digestive Utilization of Goat and Cow Milk Fat in Malaabsorption Syndrome. *J. of Dairy Research*,68: 451-461.
- Almena, M., K. McEvoy, B. Yonand and A. Howard. 2005. University of Vermont, Burlington.
- Anonymous. 2013.www.Yogourmet.com. Canada.
- Armenia. 2007. Daun Tanaman Akar Mambu (*Connarus grandis* Jack) Sebagai Obat Antihipertensi: Efektivitas Ekstrak Etanolnya Pada Tikus Hipertensi 2K1C Goldblatt. *J. Sains dan Teknologi Farmasi*, 12 (2): 100-107.
- Atkins, K.B., Carrie, A., Northcott., Stephanie W.W., and Frank, C.B. 2005.Effects of PPAR- γ Ligands on Vascular Smooth Muscle Marker Expression in Hypertensive and Normal Arteries. *American J. of Physiology*.288: H235-H243.
- Atkins, C. 2012. Hipertension. *IVIS* 22(1): 17-23.
- Aulanni'am, A., Roosdiana, and N.L. Rahmah. 2012. The Potency of Sargassum Duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy on *Rattus Norvegicus*. *J. of life Science*. 6: 144-154.
- Badyal,D.K., H. Lata.,and A.P.Dadhich. 2003. Animal Models of Hypertension and Effect of Drugs. *Indian J. of Pharmacology*, 35: 349-362.
- Bagrov, A.Y., E.G.Lakatta. 2004. The Dietary Sodium-Blood Pressure Plot "Stiffens." *J.Hypertension*,44:22-24.
- Beswick, R.A., Zhang, H., Marable, D., Catravas, J.D., Hill, W.D., and Webb, R.C.2001. Long-Term Antioxidant Administration Attenuates Mineralocorticoid Hypertension and Renal Inflammatory Response. *J. Hypertension*,37:781-6.
- Bhuyan, B.J., and Muges, G. 2011. Angiotensin converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *Current science*, 101 (7): 881-887.
- Blacker, C. 1992. Ovulation Stimulation and Induction Endocrinol. *Metab Clin North Am*, 21:57.

- Bowman, T.S., J.M. Gaziano.,J.E.Buring.,and H.D.Sesso. 2007.A Prospective Study of Cigarette Smoking And Risk of Incident Hypertension in Women. *J Am Coll Cardiol*, 20;50(21):2085-92.
- Bray, T.M. 2006. The Role of Free Radical in Nutrition and Prevention of Chronic Disease, College of Health and Human Science, Oregon State University. Oregon, USA, 1-37.
- Brown NJ. 2005. Aldosterone and End-Organ Damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens* Vol 14 : 235-241
- Callera, G.E., R.C. Tostes.,Y.Alvaro.,A.C.I.Montezano., and R.M.Touyz.2006.Endothelin-1-Induced Oxidative Stress in DOCA-Salt Hypertension Involves NADPH-Oxidase-Independent Mechanisms.*Clinical Science*, 110: 243–253.
- Carrasco-Migue, J.L., Zambrano, Z., Blanca, A.J., Mate, A., and Vazquez, C.M. 2010. Captopril Reduces Cardiac Inflammatory Markers in Spontaneously Hypertensive Rats by Inactivation of NF-kB. *J. of Inflammation*, 7:21.
- Chobanian, A.V., Bakris, G.L., Black, H.R., Cushman, W.C., Green, L.A., Izzo, J.L., Jones, D.W., Materson, B.J., Oparil, S, Wright, J.T., Rocella, E.J., 2003. The National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, andTreatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, 42: 1206-52.
- Clark, S., and Sherbon, J.W., 2000. Genetic Variants of Alpha (s1)-CN In Goat Milk: Breed Distribution and Associations With Milk Composition And Coagulation Properties. *Small Rumin Res*, 38: 135–143.
- Contreras, M.M., Carron, R., Jose, M., Montero., Ramos, M., and Recio, I. 2009. Novel Casein-Derived Peptides With Antihypertensive Activity. *Elsevier*, 19: 566–573.
- Contreras, M.M., M.A. Sevilla., J. Monroy-Ruiz., L. Amigo.,B. Gómez-Sala., E. Molina., M. Ramos., Recio., and Isidra. 2011. Food-Grade Production of an Antihypertensive Casein Hydrolysate and Resistance of Active Peptides to Drying and Storage. *Elsevier*. 21: 470-476.
- Cooper, W.O., Hernandez- S. Diaz., P.G. Arbogast., J.A. Dudley., S. Dyer., P.S. Gideon., K. Hall., and W.A. Ray. 2006. Major Congenital Malformations After First-Trimester Exposure To ACE Inhibitors. *N Engl J Med*, 354: 2443–2451.

- Dao, H.H., Bouvet, C., Moreau, S., Beaucage, P., Lariviere, R., and Servant, M. 2006. Endothelin is a Dose-Dependent Trophic Factor and a Mitogen in Small Arteries in Vivo. *Cardiovasc Res*,71: 61–8.
- Depkes RI. 2008. *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Hipertensi*.Direktorat jendral bina kefarmasi dan alat kesehatan. Jakarta.
- Don, B.R., and J.C.Lo. 2007. Endocrine Hypertension. In: Gardner DG, Shoback D (Ed). Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology.6 th Ed. International Edition Mc Graw Hill, New York. 396-420.
- Dornas, W.C.,and Silva, M.E.2011. Animal Models For The Study of Arterial Hypertension. *J. Biosci*,36: 1-12.
- Edyson, 2002. Pengaruh pemberian kombinasi Vit C dan E terhadap aktivitas superoxide dismutase (SOD) dan kadar malondialdehyde (MDA) pada eritrosit rattus norvegicus galur winstar yang diinduksi L-Tiroksin [Thesis]. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Eun, A.K., F. Amiri., N.H. Pandey., D. Javeshghani., E. Leibovitz., R.M. Touyz., and E.L. Schiffrin. 2006. Resistance Artery Remodeling in Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertension is Dependent on Vascular Inflammation: Evidence From M-CSF-Deficient Mice. *Am J. Physiol Heart Circ Physiol*, 292:1789-1795.
- FitzGerald, R.J., B.A.Murray., and G.J.Walsh. 2004. Hypotensive Peptides From milk proteins. *J. Nutr*, 134: 980S–988S.
- Franco, M., Sanchez- L.G.Lozada., R.Bautista.,R. J.Johnson., Rodriguez-B.Iturbe. 2008.Pathophysiology of Salt-Sensitive Hypertension: A New Scope of an Old Problem. *Blood Purif*, 26: 45–48.
- Geerlings, A., Villar, L.C., Hidalgo Zarco, F., Sanchez, M., Vera, R., Zafra Gomez, A., Boza, J., and Duarte, J. 2006. Identification and Characterization of Novel Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Obtains From Goat Milk. *J. Dairy Sci*. 89:3326-3335.
- Gobbetti, M., F. Minervini., and C.G.Rizzello.2007. Bioactive Peptides in Dairy Products . In: Handbook of Food Products Manufacturing. Y.H. Hui, eds. John Wiley & Sons, Inc , Hoboken, NJ. pp. 489 – 517.
- Guyton, A.C., 2006. *Basic and Clinical Pharmacology*, Eight edition. Philadelphia, Pennsylvania.
- Halliwell, B., and M.Whiteman. 2004. Measuring Reactive Spesies and Oxidative Damage in Vivo And in Cell Culture: How Should You Do It and What do The Result Mean? *Br.J. Pharmacol*, 142: 231-255.

- Harjanto. 2004. Pemulihan Stres Oksidatif Pada Latihan Olahraga. *J. Kedokteran Yarsi*, 3(12): 81-87.
- Henning, E.C., Warach, S., and Spatz, M. 2010. Hypertension-Induced Vascular Remodeling Contributes to Reduced Cerebral Perfusion And The Development of Spontaneous Stroke In Aged SHRSP Rats. *J. Cerebr. Blood F. Me.*, 30: 827–836.
- Hernandez- Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M., and Amigo, L. 2002. Preparation of Ovine and Caprine β -Lactoglobulin Hydrolysates With ACE–Inhibitory Activity. Identification of Active Peptides From Caprine β -Lactoglobulin Hydrolysed With Thermolysin. *Int Dairy J*, 12: 805 – 812.
- Intengan, H.D., and E.L. Schiffrin. 2001. Vascular Remodeling in Hypertension: Roles of Apoptosis, Inflammation, and Fibrosis. *J. of the American Heart Association*, 38:581-587.
- Jimenez, R., R. Lopez-Sepulveda., M.Kadmiri., M.Romero., R.Vera., M.Sánchez., F.Vargas., F.O'Valle.,A.Zarzuolo.,M.Dueñas.,C. Santos-Buelga., J.Duarte.2007. Polyphenols Restore EndothelialFunction in DOCA-Salt Hypertension: Role of Endothelin-1 and NADPH Oxidase. *Free Radical Biology & Medicine*,43: 462-473.
- Kanellis. J., T. Nakagawa., and Herrera-J. Acosta. 2003. A Single Pathway For The Development of Essential Hypertension. *Cardiol Rev*, 11:180–196.
- Kirchengast. M., and M. Luz. 2005. Endothelin Receptor Antagonists: Clinical Realities and Future Direction. *J. Cardiovasc Pharmacol.* 45: 182-91.
- Kitts, D.D., and K.Weiler.2003. Bioactive Proteins And Peptides From Food Sources. Applications of Bioprocesses Used in Isolation and Recovery. *Curr Pharm Des*, 9: 1309–1323.
- Korhonen, H., and Pihlanto-Leppala, A. 2003. Food-Derived Bioactive Peptides: Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1297-1308.
- Krum. H., and J. Martin. 2007. Novel Drug Treatments For Hypertension. Dalam: Hall JE, Lip GYH, eds. *Comprehensive Hipertension*. Philadelphia: Mosby, p.1049-60.
- Kusumawati, D., 2004. Bersahabat dengan Hewan Coba. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.

- Lamothe, S., G. Robitalile., D. St-Gelais., and M. Britten. 2007. Short Communication: Extraction of β -Casein From Goat Milk. *J. of dairy science*, 90: 5380-5382.
- Lee, K.J., Kim, S.B., Ryu, J.S., Shin, H.S., and Lim, J.W. 2005. Separation and Purification of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides From Goat's Milk Casein Hydrolysates. *Asian - Aust. J. Anim Sci*, 18: 741-746.
- Ling, L.F, and Chai, P. Eplerenone. 2007. Medical Progress (a Review). 34(6):291-6.
- Loch, D., Hoey, A., Morisseau, C., B.O. Hammock., and Brown, L. 2007. Prevention of Hypertension in DOCA-Salt Rats by an Inhibitor of Soluble Epoxide Hydrolase. *Cell Biochemistry and Biophysic*, 47:87-97.
- Lopez-Exposito, I, and Recio, I. 2006. Antibacterial Activity of Peptides and Folding Variants From Milk Proteins. *Int Dairy J*, 16: 1294 - 1305.
- Korhonen, H., and A. Pihlanto. 2006. Bioactive Peptides: Production and Functionality. *Int. Dairy J*, 16: 945-960.
- Maes, W., Van C.J., Vermeirssen, V., Hemeryck, M., Ketelslegers, J.M., Schrezenmeier, J. 2004. Influence of The Lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on The Release of Endotelin-1 by Endothelial Cells. *Regulatory Peptides*, 118: 105-109.
- Malkoff, J. 2005. Non-Invasive Blood Pressure For Mice And Rats. Animal Lab News. Kent Scientific Corporation. 1-7.
- Martin-Diana, A.B., C. Janer., C. Pelaez., and T. Requena. 2003. Development of A Fermented Goat's Milk Containing Probiotic Bacteria. *International Dairy J*, 13: 827-833.
- Masato, O., M, Yoshiaki., and N, Toshihide. 2008. Sensory Properties And Taste Compounds of Fermented Milk Produced by Lactococcus Lactis And Streptococcus Thermophilus. *Food Sci Technol Res*, 14(2):183-189.
- Michaelidou, A.M. 2008. Factors Influencing Nutritional And Health Profile of Milk And Milk Products. *Elsevier*, 79: 42-50.
- Miguel, J.L-Carrasco., S. Zambrano., A. J. Blanca., A. Mate., and C.M. Vazquez. 2010. Captopril Reduces Cardiac Inflammatory Markers in Spontaneously Hypertensive Rats By Inactivation of NF-kB. *J. of Inflammation*, 7-21.
- Montgomery, D., & S. Kowalsky. 2011. Design And Analysis Of Experiment. John Willey and Sains Inc. ISBN 978-0-470-16990-2.

- Muller, D.N., Dechend. R, and E.M. Mervaala.2000. NF κ - β Inhibition Ameliorates Angiotensin II-Induced Inflammatory Damage In Rats. *Hypertension*, 35: 193–201.
- Nakagawa, T., D.H. Kang.,and R. Ohashi. 2003. Tubulointerstitial Disease: Role Of Ischemia And Microvascular Disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12: 233–241.
- Neveu, C., D. Molle., J. Moreno., P. Martin., and J. Leonill. 2002. Heterogeneity of Caprine Beta-Casein Elucidated by RP-HPLC/MS: Genetic Variants And Phosphorylations. *J. Prot. Chem*, 2:557-567.
- Nurminen, M.L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppala, A., Piilola, K., Korpela, R. 2000. α -Lactorphin Lowers Blood Pressure Via Radiotelemetry in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *Life Sciences*, 66: 1535:1543.
- Oates, JA., and N.J.Brown.2001.Antihypertensive Agents and Drug Therapy of Hypertension. In: Hardman JG, Gilman AG (Ed). The pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. New York : McGraw-Hill; Vol 891-895.
- Oparil, S., Zaman, M.A., and Calhoun, D.A. 2003. Pathogenesis Of Hypertension. *Ann Intern Med*, 139: 761-776.
- Ortiz, P.A., and Garvin, J.L. 2001. Intrarenal Transport and Vasoactive Substances in Hypertension. *Hypertension*, 38: 621–624.
- Pinto YM, Paul M, Ganten D. 1998.. Lessons From Rat Models of Hypertension; From Goldbaltt tom Genetic Engineering. *Cardiovascular Research*, 39: 77-88.
- Posecion, N.C., N.L. Crowe., A.R. Robinson., and S.K. Asiedu. 2005. The Development Of A Goat's Milk Yogurt. *J. of the Science of Food and Agriculture*, 85:1909–1913.
- Prahalathan, P., Kumar, S., and Raja, B. 2012. Effect of Morin, A Flavonoid Against DOCA-Salt Hypertensive Rats: A Dose Dependent Study. *Asian Pacific J. of Tropical Biomedicine*, 43-448.
- Quiroz, Y., H. Pons., and K.L. Gordon.2001. Mycophenolate Mofetil Prevents Salt-Sensitive Hypertension Resulted From Nitric Oxide Synthesis Inhibition. *Am J. Physiol*, 281:F38–F47.
- Quiros, A., B. Hernandez-Ledesma., M. Ramos., L. Amigo., and I. Recio. 2005. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir. *J. of Dairy Science*, 88: 3480-3487.

- Recio, I., Quiros, A., Hernandez-Ledesma, B., Gomez-Ruiz, J.A., Miguel, M., Amigo, L., López-Expósito, I., Ramos, M., Recio, I., and Visser, S. 2000. Antibacterial and Binding Characteristics of Bovine, Ovine and Caprine Lactoferrins: A comparative study. *Int Dairy J*, 10: 597 – 605.
- Rival, S.G., Boeriu, C.G., and Wichers, H.J. 2001. Caseins and Casein Hydrolysates. 2. Antioxidative Properties and Relevance to Lipoxygenase Inhibition. *J. of Agriculture Food Chemistry*, 49: 295-302.
- Rizzello, C.G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M.D., and Zambonin, P.G. 2005. Antibacterial Activities of Peptides From The Water-Soluble Extracts of Italian Cheese Varieties. *J. Dairy Sci*, 88: 2348 – 2360.
- Rodriguez-B. Iturbe.,Y. Quiroz.,and M. Nava.2003. Reduction Of Renal Immune Cell Infiltration In Blood Pressure Control In Genetically Hypertensive Rats. *Hypertension*, 41: 341–346.
- Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H., and Nurminen, M.L. 2002. Effect of Long-Term Intake of Milk Products on Blood Pressure in Hypertensive Rats. *J. of Dairy Research*, 69, 103–111.
- Sharma, A., S. Bansal., and R.K. Nagpal. 2003. Lipid Peroxidation in Bronchial Asthma. *Indian J. of Pediatrics*,70(9): 715-717.
- Sharma, P.K., Vyawahare, N.S., and Ladhha, A. 2010. Preclinical Screening Models For Hypertension In Rodents :A Review. *Pharmacologyonline*, 3: 458-472.
- Sharma, S., R. Singh., and S. Rana. 2011. Bioactive Peptides. *Int. J. Bio Automation*, 15(4): 223-250.
- Shepherd, A.M.M. 2007. New And Investigational Drugs For Hipertension. Dalam: Elliott, W.J., Black, H.R. ed Hypertension A Companion To Braunwald's Heart Disease. Canada: *Saunders Elsevier*, p. 295-302.
- Sjakoer, N.A.A., dan N.Permatasari. 2011. Mekanisme Deoxycorticosterone Acetate (DOCA)-Garam Terhadap Peningkatan Tekanan Darah Pada Hewan Coba. *El-Hayah*, 1(4): 199-213.
- Somer, M.J., K. Mavromatis., Z.S. Galis., G. David., and Harrison. 2000. Vascular Superoxide Production and Vasomotor Function in Hypertension Induced by Deoxycorticosterone Acetate–Salt. *J. of the American Heart Association*,101:1722-1728.

Stelios, K., and A. Emmanuel. 2004. Characteristics Of Set-Type Yoghurt Made From Caprine Or Ovine Milk And Mixtures Of The Two. *Int J. Food Sci Technol*,39(3): 319–324.

Sukamdar, E.Y. 2006. *Alam Sumber Kesehatan; Manfaat dan Kegunaan*. Balai Pustaka, Jakarta.

Sun, Z., and Z.Zhang. 2005. Perspectives and Recent Advances in Major Animal Models of Hypertension. *Acta Pharmacologica Sinica*, 3: 295-30.

Syarif, A., A. Estuningtyas., A. Setiawati., A. Arif., B. Bahry., D.S. Frans., R.D. Hedi., H. Utama., I. Darmansjah., S.S.W. Metta., Nafrialdi., F.W. Petrus., P. Ascobat., R. Setiabudi., S. Wardhini., K.S. Suharti., G.G. Sulistia., H.S.G. Vincent., W. Arozal., Y. Mariana., H.I. Yati., D.S. Zunilda., M. Louisia, dan Elysabeth. 2009. *Farmakologi dan Terapi*. Balai Penerbit FKUI. Jakarta. 341-360.

Takahashi, M. 2006. The Role of Endothelin-1 In Vascular Remodeling In Vivo. *Cardiovascular Research*, 71: 4–5.

Takaoka, M., Y. Kobayashi.,M. Yuba.,M. Ohkita., and Y.Matsumura.2001. Effects Of α -Lipoic Acid on Deoxycorticosterone Acetate-Salt Induced Hypertension in Rats. *European J. of Pharmacology*, Vol 424:121-129.

Tamime, A.Y., and R.K.Robinson. 2007. *Yoghurt Science And Technology*. 3rd ed. Abington, Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd. LLC, NW, U.S.A.: CRC Press. 791 p.

Valko, M. 2006. Free Radical, Metal And Antioxidant In Oxidative Stress Induced Cancer. *J.Chen–Bio*, Rusia(160): 1-40.

Wati, L.P., Aulanni'am dan C. Mahdi. 2013. Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi *Cyclosporine-A*. *Kimia Student J.*, 1(2): 257-263.

Winarno, F.G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.



LAMPIRAN



Lampiran 1. Sertifikat Layak Etik Penelitian



UNIVERSITAS GADJAH MADA
LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU
KOMISI ETHICAL CLEARANCE UNTUK PENELITIAN PRAKLINIK

KETERANGAN KELAIKAN ETIK

(*Ethical Clearance*)

Nomor: 134/KEC-LPPT/II/2014

Komisi *Ethical Clearance* untuk penelitian praklinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, setelah mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan bahwa penelitian:

- Judul penelitian** : Kajian *In Vivo* Antihipertensi Alami Berbasis Peptida Bioaktif Susu Kambing Hasil Fermentasi Bakteri Asam Laktat
- Peneliti Utama** : drh. Masdiana C. Padaga, M. App.Sc.
- Asal Instansi** : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang
- Lokasi Penelitian** : Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu UGM

Telah dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk dilaksanakan penelitian tersebut pada hewan uji tikus. Komisi *Ethical Clearance* mempunyai hak untuk melakukan pemantauan selama penelitian berlangsung.

Yogyakarta, 7 Februari 2014

Komisi *Ethical Clearance*

Ketua

Prof. Dr. drh. Budi Astuti, MP.

Lampiran 2. Surat pernyataan payung penelitian

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Monick Roseta

NIM : 0911313030

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Fakultas : Program Kedokteran Hewan

Universitas : Brawijaya

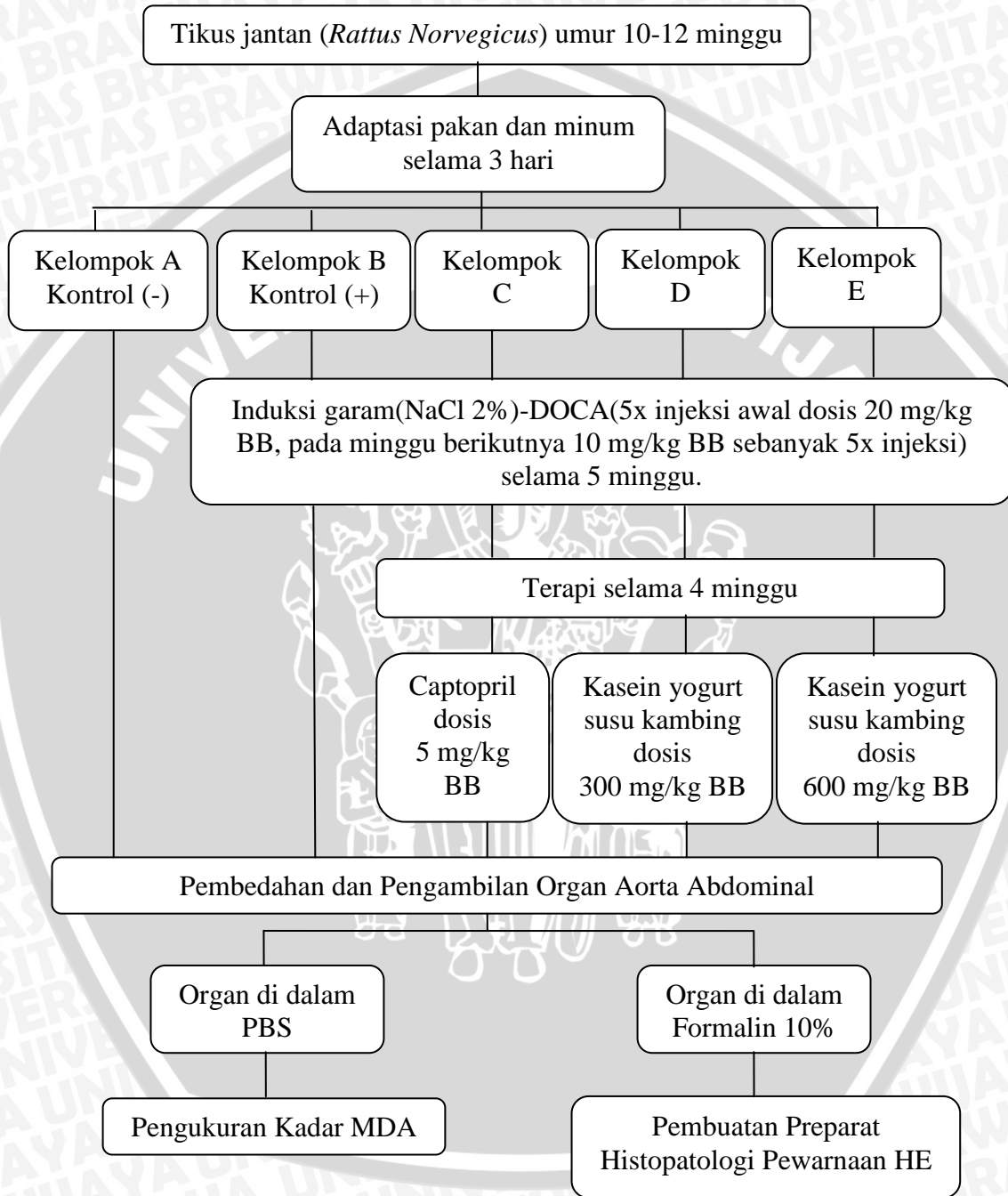
Menyatakan bahwa penelitian saya yang berjudul “Efek Terapi Kasein Yogurt Susu Kambing Terhadap Kadar MDA (*Malondialdehyde*) dan Histopatologi Aorta Abdominal Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipertensi Yang Diinduksi Garam-DOCA (*Deoxycorticosterone acetate*)” merupakan bagian dari penelitian yang berjudul “Kajian *In Vivo* Antihipertensi Alami Berbasis Peptida Bioaktif Susu Kambing Hasil Fermentasi Bakteri Asam Laktat”. Untuk itu kepemilikan dan hak publikasi menjadi hak milik dari peneliti utama drh. Masdiana C. Padaga, M. App.Sc.

Malang, 10 Februari 2014

Yang membuat pernyataan

Monick Roseta
NIM. 0911313030

Lampiran 3. Skema Kerja Penelitian



Lampiran 4. Perhitungan Dosis Pemberian DOCA

Induksi DOCA yang diberikan secara subcutan untuk membuat tikus hipertensi adalah 20 mg/kg BB pada 5 kali injeksi pertama kemudian 10 mg/kg BB pada 5 kali injeksi berikutnya.

Tabel 2.1 Perhitungan Dosis Pemberian DOCA

| Dosis | Injeksi | N | Kel B | | Kel C | | Kel D | | Kel E | |
|-------|---------|---|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|
| | | | BB (gr) | DOCA (mg) | BB (gr) | DOCA (mg) | BB (gr) | DOCA (mg) | BB (gr) | DOCA (mg) |
| 20 mg | 1 | 4 | 224,7 | 4,494 | 211 | 4,220 | 218,9 | 4,378 | 214 | 4,280 |
| | 2 | 4 | 224,7 | 4,494 | 211 | 4,220 | 218,9 | 4,378 | 214 | 4,280 |
| | 3 | 4 | 202,9 | 4,058 | 190,7 | 3,814 | 221,9 | 4,438 | 197 | 3,940 |
| | 4 | 4 | 202,9 | 4,058 | 190,7 | 3,814 | 221,9 | 4,438 | 197 | 3,940 |
| | 5 | 4 | 194,1 | 3,882 | 205,5 | 4,110 | 219,6 | 4,392 | 203,9 | 4,078 |
| 10 mg | 6 | 4 | 194,1 | 1,941 | 205,5 | 2,055 | 219,6 | 2,196 | 203,9 | 2,039 |
| | 7 | 4 | 205,3 | 2,053 | 220,0 | 2,200 | 245,5 | 2,455 | 226,5 | 2,265 |
| | 8 | 4 | 205,3 | 2,053 | 220,0 | 2,200 | 245,5 | 2,455 | 226,5 | 2,265 |
| | 9 | 4 | 218,9 | 2,189 | 237,3 | 2,373 | 229,2 | 2,292 | 240,2 | 2,402 |
| | 10 | 4 | 218,9 | 2,189 | 237,3 | 2,373 | 229,2 | 2,292 | 240,2 | 2,402 |

Contoh perhitungan dosis pemberian DOCA dosis 20 mg/kg BB :

$$\text{Tikus 1 (berat badan = 243,5 gr)} \rightarrow \frac{243,5 \text{ gr}}{1000} \times 20 \text{ mg} = 4,870 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 2 (berat badan = 210,7 gr)} \rightarrow \frac{210,7 \text{ gr}}{1000} \times 20 \text{ mg} = 4,214 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 3 (berat badan = 228,4gr)} \rightarrow \frac{228,4 \text{ gr}}{1000} \times 20 \text{ mg} = 4,568 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 4 (berat badan = 216,3 gr)} \rightarrow \frac{216,3 \text{ gr}}{1000} \times 20 \text{ mg} = 4,326 \text{ mg}$$

$$\text{Total} = 898,9 \text{ gr} = 17,978 \text{ mg}$$

$$\text{Rata-rata} = 224,7 \text{ gr} = 4,494 \text{ mg}$$

Selanjutnya DOCA tersebut, dilarutkan ke dalam minyak jagung 0,5 ml.

$$\text{Tikus 1 (berat badan = 243,5 gr)} \rightarrow \frac{4,870 \text{ mg}}{4,494 \text{ mg}} \times 0,5 \text{ ml} = 0,541 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 2 (berat badan = 210,7 gr)} \rightarrow \frac{4,214 \text{ mg}}{4,494 \text{ mg}} \times 0,5 \text{ ml} = 0,468 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 3 (berat badan = 228,4gr)} \rightarrow \frac{4,568 \text{ mg}}{4,494 \text{ mg}} \times 0,5 \text{ ml} = 0,508\text{ml}$$

$$\text{Tikus 4 (berat badan = 216,3 gr)} \rightarrow \frac{4,326 \text{ mg}}{4,494 \text{ mg}} \times 0,5 \text{ ml} = 0,481\text{ml}$$

$$\text{Total} = 1,998 \text{ ml}$$

- Dalam 1,998 ml minyak jagung terdapat 17,978 mg DOCA
- Untuk keperluan percobaan tiap kelompok perlakuan disajikan 2,5 ml larutan DOCA
- Untuk 2,5 ml larutan, DOCA yang dibutuhkan adalah :
 - $\frac{2,5 \text{ ml}}{1,998 \text{ ml}} \times 17,978 \text{ mg} = 22,494\text{mg DOCA}$

Contoh perhitungan dosis pemberian DOCA dosis 10 mg/kg BB :

$$\text{Tikus 1 (berat badan = 194,5gr)} \rightarrow \frac{194,56 \text{ gr}}{1000} \times 10 \text{ mg} = 1,945\text{mg}$$

$$\text{Tikus 2 (berat badan = 196,4gr)} \rightarrow \frac{196,41 \text{ gr}}{1000} \times 10 \text{ mg} = 1,964\text{mg}$$

$$\text{Tikus 3 (berat badan = 194,3gr)} \rightarrow \frac{194,32 \text{ gr}}{1000} \times 10 \text{ mg} = 1,943\text{mg}$$

$$\text{Tikus 4 (berat badan = 191,1 gr)} \rightarrow \frac{191,18 \text{ gr}}{1000} \times 10 \text{ mg} = 1,911\text{mg}$$

$$\text{Total} = 776,3 \text{ gr} = 7,763 \text{ mg}$$

$$\text{Rata-rata} = 194,0 \text{ gr} = 1,940 \text{ mg}$$

Selanjutnya DOCA tersebut, dilarutkan ke dalam minyak jagung 0,5 ml.

$$\text{Tikus 1 (berat badan = 194,5 gr)} \rightarrow \frac{1,945 \text{ mg}}{1,940 \text{ mg}} \times 0,5 \text{ ml} = 0,501\text{ml}$$

$$\text{Tikus 2 (berat badan = 196,4 gr)} \rightarrow \frac{1,964 \text{ mg}}{1,940 \text{ mg}} \times 0,5 \text{ ml} = 0,506\text{ml}$$

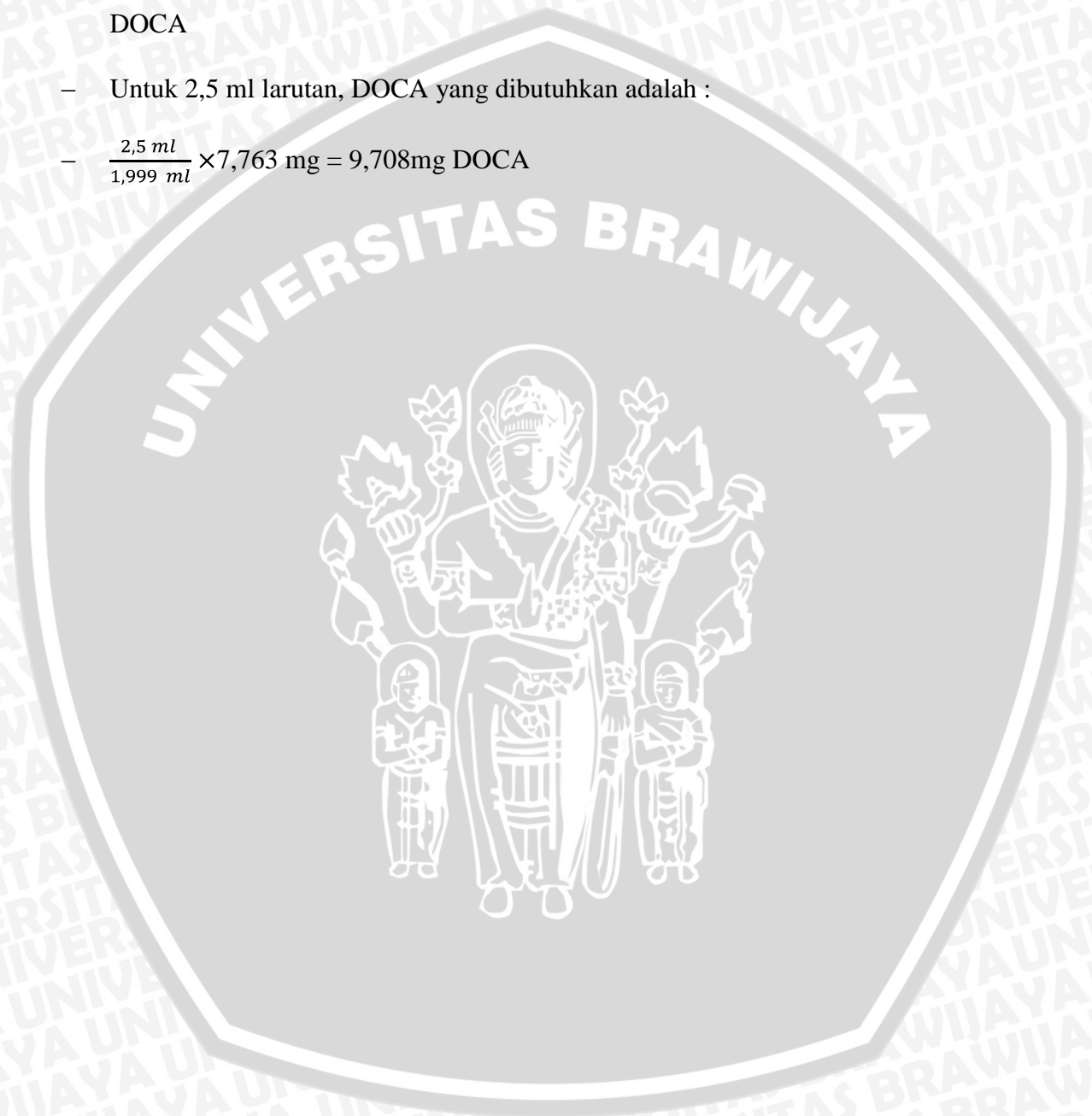
$$\text{Tikus 3 (berat badan = 194,3gr)} \rightarrow \frac{1,943 \text{ mg}}{1,940 \text{ mg}} \times 0,5 \text{ ml} = 0,500\text{ml}$$

$$\text{Tikus 4 (berat badan = 191,1gr)} \rightarrow \frac{1,911 \text{ mg}}{1,940 \text{ mg}} \times 0,5 \text{ ml} = 0,492\text{ml}$$

$$\text{Total} = 1,999 \text{ ml}$$



- Dalam 1,999 ml minyak jagung terdapat 7,763 mg DOCA
- Untuk keperluan percobaan tiap kelompok perlakuan disajikan 2,5 ml larutan DOCA
- Untuk 2,5 ml larutan, DOCA yang dibutuhkan adalah :
- $\frac{2,5 \text{ ml}}{1,999 \text{ ml}} \times 7,763 \text{ mg} = 9,708 \text{ mg DOCA}$



Lampiran 5. Perhitungan Dosis Pemberian Captopril

Dosis untuk captopril adalah 5 mg/kg BB dan diberikan setiap hari selama 4 minggu.

Tabel 3.1 Perhitungan Dosis Pemberian Captopril

| Hari ke- | N | Kelompok C | |
|----------|---|------------|-------|
| | | BB | Hasil |
| 1 | 4 | 257,5 | 1,287 |
| 2 | 4 | 257,5 | 1,287 |
| 3 | 4 | 257,5 | 1,287 |
| 4 | 4 | 257,5 | 1,287 |
| 5 | 4 | 257,5 | 1,287 |
| 6 | 4 | 257,5 | 1,287 |
| 7 | 4 | 257,5 | 1,287 |
| 8 | 4 | 264,5 | 1,322 |
| 9 | 4 | 264,5 | 1,322 |
| 10 | 4 | 264,5 | 1,322 |
| 11 | 4 | 264,5 | 1,322 |
| 12 | 4 | 264,5 | 1,322 |
| 13 | 4 | 264,5 | 1,322 |
| 14 | 4 | 264,5 | 1,322 |
| 15 | 4 | 280,4 | 1,402 |
| 16 | 4 | 280,4 | 1,402 |
| 17 | 4 | 280,4 | 1,402 |
| 18 | 4 | 280,4 | 1,402 |
| 19 | 4 | 280,4 | 1,402 |
| 20 | 4 | 280,4 | 1,402 |
| 21 | 4 | 280,4 | 1,402 |
| 22 | 4 | 292,6 | 1,463 |
| 23 | 4 | 292,6 | 1,463 |
| 24 | 4 | 292,6 | 1,463 |
| 25 | 4 | 292,6 | 1,463 |
| 26 | 4 | 292,6 | 1,463 |
| 27 | 4 | 292,6 | 1,463 |
| 28 | 4 | 292,6 | 1,463 |

Contoh perhitungan dosis pemberian captopril:

$$\text{Tikus 1 (berat badan = 218,4gr)} \rightarrow \frac{218,4 \text{ gr}}{1000} \times 5 \text{ mg} = 1,092 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 2 (berat badan = 269,8gr)} \rightarrow \frac{269,8 \text{ gr}}{1000} \times 5 \text{ mg} = 1,349 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 3 (berat badan = 294,4gr)} \rightarrow \frac{294,4 \text{ gr}}{1000} \times 5 \text{ mg} = 1,472 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 4 (berat badan = 247,6gr)} \rightarrow \frac{247,6 \text{ gr}}{1000} \times 5 \text{ mg} = 1,238 \text{ mg}$$

$$\text{Total} = 1030,2 \text{ gr} = 5,151 \text{ mg}$$

$$\text{Rata-rata} = 257,5 \text{ gr} = 1,287 \text{ mg}$$

Selanjutnya captopril tersebut, dilarutkan ke dalam aquades 1 ml

$$\text{Tikus 1 (berat badan = 218,4gr)} \rightarrow \frac{1,092 \text{ mg}}{1,287 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,848 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 2 (berat badan = 269,8gr)} \rightarrow \frac{1,349 \text{ mg}}{1,287 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,048 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 3 (berat badan = 294,4gr)} \rightarrow \frac{1,472 \text{ mg}}{1,287 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 1,143 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 4 (berat badan = 247,6gr)} \rightarrow \frac{1,238 \text{ mg}}{1,287 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,961 \text{ ml}$$

$$\text{Total} = 4 \text{ ml}$$

- Dalam 4 ml aquades terdapat 5,151 mg Captopril
- Untuk keperluan percobaan tiap kelompok perlakuan disajikan 5 ml larutan Captopril
- Untuk 5 ml larutan, Captopril yang dibutuhkan adalah :
- $\frac{5 \text{ ml}}{4 \text{ ml}} \times 5,151 \text{ mg} = 6,438 \text{ mg}$ Captopril

Lampiran 6. Perhitungan Dosis Pemberian Kasein Yogurt Susu Kambing

Pemberian dosis kasein yogurt susu kambing dibagi menjadi 2 yaitu dosis 300 mg/kg BB dan dosis 600 mg/kg BB.

Tabel 4.1 Perhitungan Dosis Pemberian Kasein

| Hari ke- | N | Kelompok D (terapi kasein 300 mg/kg BB) | | Kelompok E (terapi kasein 600 mg/kg BB) | |
|----------|---|--|-------|--|-------|
| | | BB | Hasil | BB | Hasil |
| 1 | 4 | 252,1 | 75,65 | 251,5 | 150,9 |
| 2 | 4 | 252,1 | 75,65 | 251,5 | 150,9 |
| 3 | 4 | 252,1 | 75,65 | 251,5 | 150,9 |
| 4 | 4 | 252,1 | 75,65 | 251,5 | 150,9 |
| 5 | 4 | 252,1 | 75,65 | 251,5 | 150,9 |
| 6 | 4 | 252,1 | 75,65 | 251,5 | 150,9 |
| 7 | 4 | 252,1 | 75,65 | 251,5 | 150,9 |
| 8 | 4 | 284,6 | 85,38 | 268,2 | 80,46 |
| 9 | 4 | 284,6 | 85,38 | 268,2 | 80,46 |
| 10 | 4 | 284,6 | 85,38 | 268,2 | 80,46 |
| 11 | 4 | 284,6 | 85,38 | 268,2 | 80,46 |
| 12 | 4 | 284,6 | 85,38 | 268,2 | 80,46 |
| 13 | 4 | 284,6 | 85,38 | 268,2 | 80,46 |
| 14 | 4 | 284,6 | 85,38 | 268,2 | 80,46 |
| 15 | 4 | 307,2 | 92,16 | 287,8 | 172,6 |
| 16 | 4 | 307,2 | 92,16 | 287,8 | 172,6 |
| 17 | 4 | 307,2 | 92,16 | 287,8 | 172,6 |
| 18 | 4 | 307,2 | 92,16 | 287,8 | 172,6 |
| 19 | 4 | 307,2 | 92,16 | 287,8 | 172,6 |
| 20 | 4 | 307,2 | 92,16 | 287,8 | 172,6 |
| 21 | 4 | 307,2 | 92,16 | 287,8 | 172,6 |
| 22 | 4 | 323,6 | 97,0 | 298,2 | 178,9 |
| 23 | 4 | 323,6 | 97,0 | 298,2 | 178,9 |
| 24 | 4 | 323,6 | 97,0 | 298,2 | 178,9 |
| 25 | 4 | 323,6 | 97,0 | 298,2 | 178,9 |
| 26 | 4 | 323,6 | 97,0 | 298,2 | 178,9 |
| 27 | 4 | 323,6 | 97,0 | 298,2 | 178,9 |
| 28 | 4 | 323,6 | 97,0 | 298,2 | 178,9 |

Contoh perhitungan dosis pemberian kasein yogurt susu kambing dosis 300 mg/kg BB:

$$\text{Tikus 1 (berat badan = 207,9gr)} \rightarrow \frac{207,9 \text{ gr}}{1000} \times 300 \text{ mg} = 62,37 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 2 (berat badan = 300,2gr)} \rightarrow \frac{300,2 \text{ gr}}{1000} \times 300 \text{ mg} = 90,06 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 3 (berat badan = 269,4gr)} \rightarrow \frac{269,4 \text{ gr}}{1000} \times 300 \text{ mg} = 80,82 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 4 (berat badan = 231,2gr)} \rightarrow \frac{231,2 \text{ gr}}{1000} \times 300 \text{ mg} = 69,36 \text{ mg}$$

$$\text{Total} = 1008,7 \text{ gr} = 302,61 \text{ mg}$$

$$\text{Rata-rata} = 252,1 \text{ gr} = 75,65 \text{ mg}$$

Selanjutnya kasein tersebut, dilarutkan ke dalam aquades 1,5 ml.

$$\text{Tikus 1 (berat badan = 207,9gr)} \rightarrow \frac{62,37 \text{ mg}}{75,65 \text{ mg}} \times 1,5 \text{ ml} = 1,236 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 2 (berat badan = 300,2gr)} \rightarrow \frac{90,06 \text{ mg}}{75,65 \text{ mg}} \times 1,5 \text{ ml} = 1,785 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 3 (berat badan = 269,4gr)} \rightarrow \frac{80,82 \text{ mg}}{75,65 \text{ mg}} \times 1,5 \text{ ml} = 1,602 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 4 (berat badan = 231,2gr)} \rightarrow \frac{69,36 \text{ mg}}{75,65 \text{ mg}} \times 1,5 \text{ ml} = 1,375 \text{ ml}$$

$$\text{Total} = 5,998 \text{ ml}$$

- Dalam 5,998 ml aquades terdapat 302,61 mg kasein
- Untuk keperluan percobaan tiap kelompok perlakuan disajikan 7,5 ml larutan kasein
- Untuk 7,5 ml larutan, kasein yang dibutuhkan adalah :
- $\frac{7,5 \text{ ml}}{5,998 \text{ ml}} \times 302,61 \text{ mg} = 378,38 \text{ mg}$ kasein

Contoh perhitungan dosis pemberian kasein yogurt susu kambing dosis 600 mg/kg BB:

$$\text{Tikus 1 (berat badan = 271,7gr)} \rightarrow \frac{271,7 \text{ gr}}{1000} \times 600 \text{ mg} = 163,02 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 2 (berat badan = 239,6gr)} \rightarrow \frac{239,6 \text{ gr}}{1000} \times 600 \text{ mg} = 143,76 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 3 (berat badan = 243,9gr)} \rightarrow \frac{243,9 \text{ gr}}{1000} \times 600 \text{ mg} = 146,34 \text{ mg}$$

$$\text{Tikus 4 (berat badan = 250,8gr)} \rightarrow \frac{250,8 \text{ gr}}{1000} \times 600 \text{ mg} = 150,48 \text{ mg}$$

$$\text{Total} = 1006 \text{ gr} = 603,6 \text{ mg}$$

$$\text{Rata-rata} = 251,5 \text{ gr} = 150,9 \text{ mg}$$

Selanjutnya kasein tersebut, dilarutkan ke dalam aquades 1,5ml.

$$\text{Tikus 1 (berat badan = 271,7gr)} \rightarrow \frac{163,02 \text{ mg}}{150,9 \text{ mg}} \times 1,5 \text{ ml} = 1,620 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 2 (berat badan = 239,6gr)} \rightarrow \frac{143,76 \text{ mg}}{150,9 \text{ mg}} \times 1,5 \text{ ml} = 1,429 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 3 (berat badan = 243,9gr)} \rightarrow \frac{146,34 \text{ mg}}{150,9 \text{ mg}} \times 1,5 \text{ ml} = 1,454 \text{ ml}$$

$$\text{Tikus 4 (berat badan = 250,8gr)} \rightarrow \frac{150,48 \text{ mg}}{150,9 \text{ mg}} \times 1,5 \text{ ml} = 1,495 \text{ ml}$$

$$\text{Total} = 5,998 \text{ ml}$$

- Dalam 5,998 ml aquades terdapat 603,6 mg kasein
- Untuk keperluan percobaan tiap kelompok perlakuan disajikan 7,5 ml larutan kasein
- Untuk 7,5 ml larutan, kasein yang dibutuhkan adalah :
- $\frac{7,5 \text{ ml}}{5,998 \text{ ml}} \times 603,6 \text{ mg} = 754,75 \text{ mg}$ kasein

Lampiran 7. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

100 ml Larutan standar MDA 4 ppm

- Ditambahkan 550 μL aquades
- Ditambahkan 100 μL TCA 10%
- Dihomogenkan dengan vortex
- Ditambahkan 250 μL HCl 1 N
- Ditambahkan 100 μL Na-Thio 1%
- Dihomogenkan dengan vortex
- Direndam di waterbath dengan suhu 100°C selama 30 menit
- Disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit
- Diangkat dan didinginkan pada suhu $26-27^{\circ}\text{C}$
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada λ 500-600 nm

Panjang Gelombang Maksimum

Lampiran 8. Pembuatan Kurva Standar MDA

100 μ L stok kit MDA dengan konsentrasi
0,1, 2,3,4,5,6,7 dan 8 μ g/mL

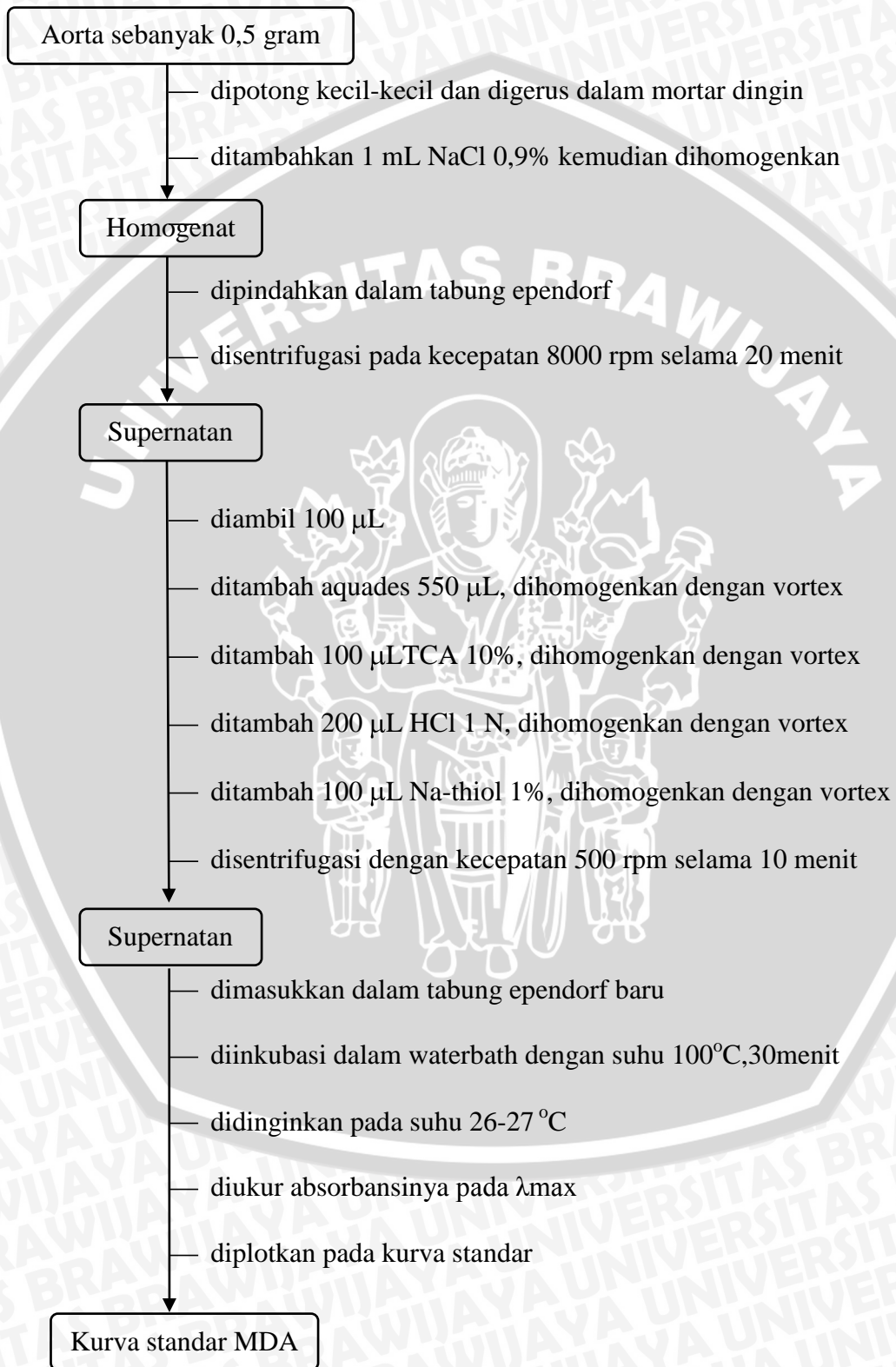
- Dimasukkan dalam apendorf
- Ditambahkan 550 μ L aquades
- Ditambahkan 100 μ L TCA 10%
- Dihomogenkan dengan vortex
- Dihomogenkan, ditambahkan 250 μ L HCl 1 N
- Ditambahkan 100 μ L Na-Thio 1%, dihomogenkan
- Dihomogenkan dengan vortex
- Disentrifugasi kecepatan 500 rpm, 10 menit
- Diambil supernatan

Supernatan

- Direndam dalam waterbath dengan suhu 100°C selama 30 menit
- Didinginkan pada suhu ruang 26-27°C
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum ($\lambda_{\text{maks}} = 530 \text{ nm}$)

Absorbansi larutan standar
dan Kurva standar MDA

Lampiran 9. Pengukuran Kadar MDA Aorta Abdominal Metode TBA



Lampiran 10. Pembuatan Preparat Untuk Pengamatan Histopatologi

I. Pengambilan jaringan hewan coba

Tikus (*Rattus norvegicus*)

- Dieutanasia dengan cara dimasukkan ke dalam tabung berisi kapas yang dibasahi kloroform
- Dibiarkan dalam tabung selama 5 menit
- Dilakukan pembedahan
- Diambil jaringan aorta abdominal

Aorta abdominal dalam formalin 10%

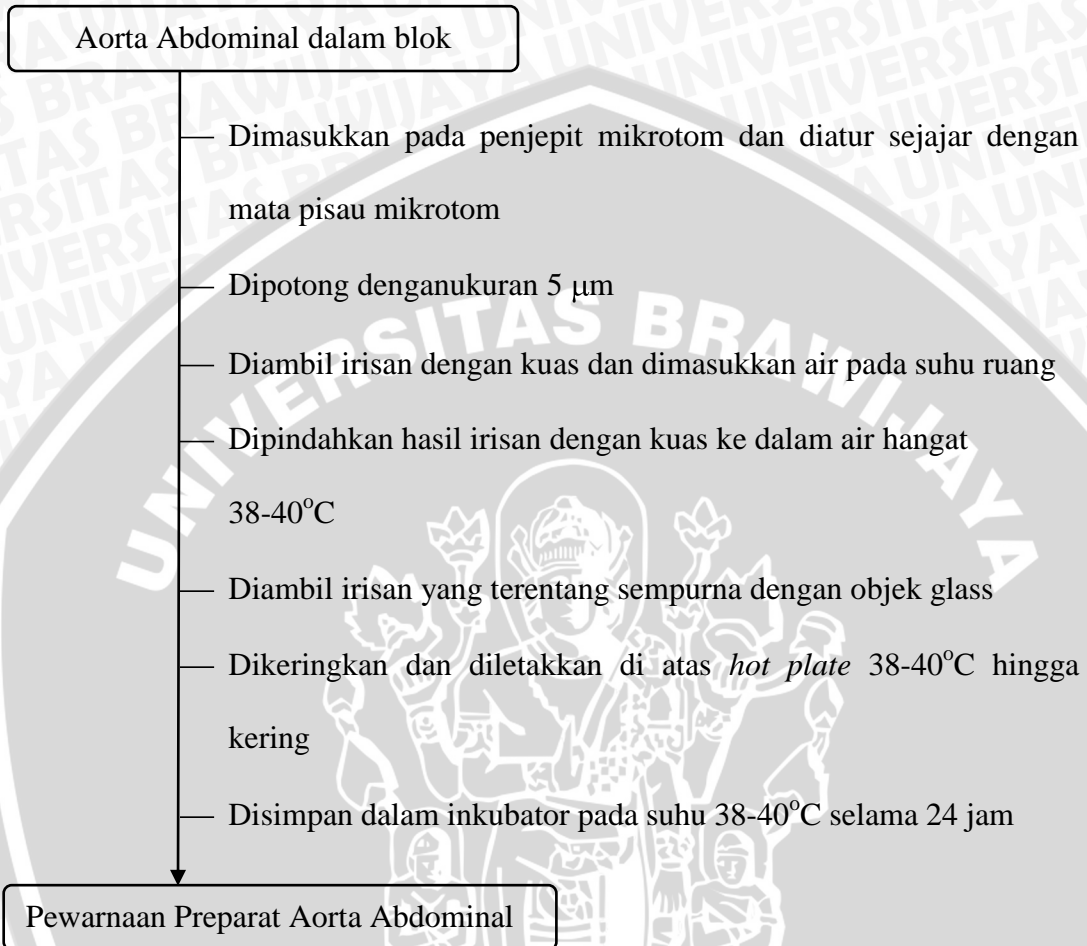
II. Embedding Aorta Abdominal

Aorta Abdominal

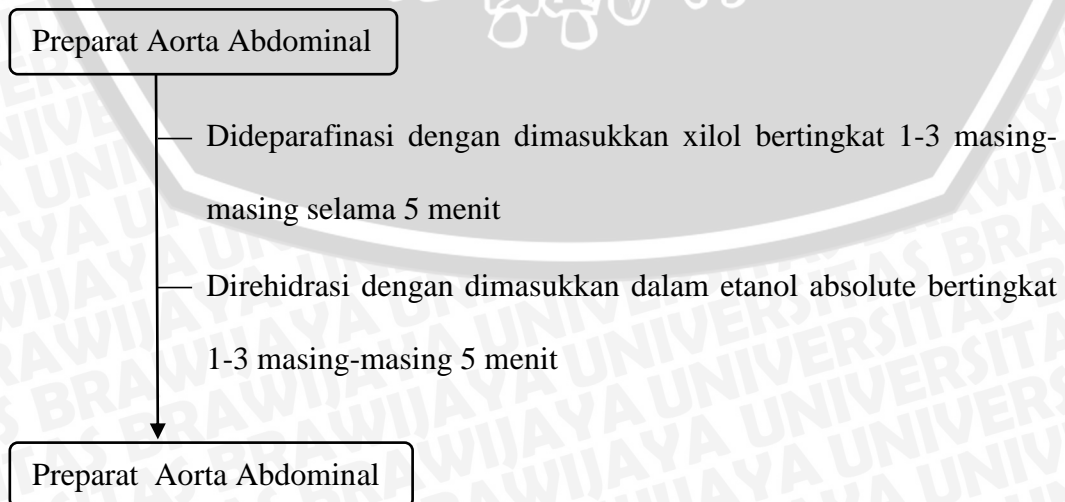
- Direndam dalam larutan formaldehid 10%
- Direndam dalam etanol 70% selama 24 jam
- Dipindahkan dalam etanol 80% selama 2 jam
- Direndam dalam etanol 90% selama 20 menit
- Direndam dalam etanol 95% selama 20 menit
- Direndam dalam etanol absolut selama 20 menit dan diulang sebanyak 3 kali
- Dimasukkan pada larutan xylol I selama 20 menit
- Dimasukkan pada larutan xylol II selama 20 menit
- Dimasukkan pada larutan xylol III selama 30 menit pada suhu 60-63°C
- Dichelupkan dalam parafin cair yang telah dituang ke dalam wadah

Aorta Abdominal dalam blok parafin

III. Pembuatan Preparat Aorta Abdominal



IV. Pewarnaan Hematoxylen-Eosin



Preparat Aorta Abdominal

- Dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam pewarna hematoxylen hingga diperoleh hasil warna terbaik kurang lebih 10 menit
- Dicuci dengan air mengalir selama 30 menit
- Dibilas dengan aquades
- Dimasukkan dalam pewarna eosin selama 5 menit
- Direndam dalam aquades untuk menghilangkan kelebihan eosin
- Dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol absolute 1-3 selama 2 menit
- Dimasukkan dalam xylol I
- Dimasukkan dalam xylol II
- Dikering anginkan
- Dilakukan mounting dengan etellan

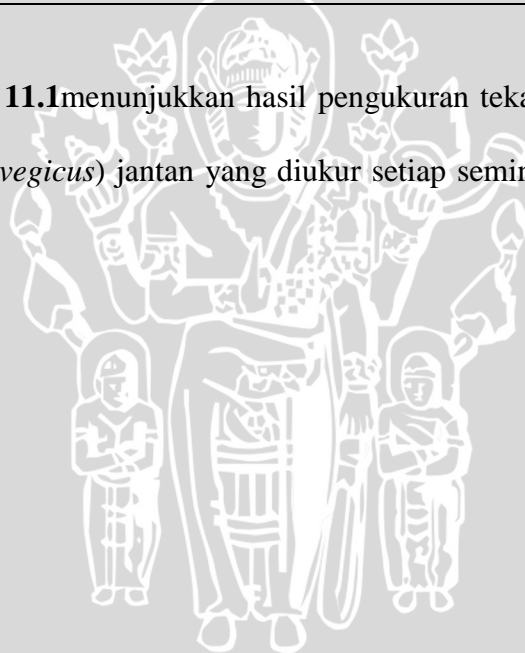
Preparat Aorta Abdominal
Pewarnaan HE

Lampiran 11. Tekanan darah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan selama pemeliharaan

Tabel 11.1 Data Deskriptif Tekanan darah (mmHg) tikus jantan

| Kelompok | N | Minggu ke- (MmHg) | | | | | | | | |
|------------|---|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| kontrol + | 4 | 107,75 | 167,50 | 171,25 | 181,00 | 181,25 | 189,50 | | | |
| kontrol - | 4 | 104,25 | 109,50 | 110,00 | 109,75 | 101,75 | 114,75 | 123,00 | 107,00 | 130,50 |
| captopril | 4 | 146,50 | 163,00 | 192,25 | 182,25 | 195,75 | 209,00 | 174,50 | 170,00 | 165,50 |
| kasein 300 | 4 | 114,00 | 156,00 | 156,00 | 182,25 | 196,00 | 208,25 | 190,75 | 169,25 | 162,50 |
| kasein 600 | 4 | 120,75 | 175,50 | 177,75 | 189,50 | 181,00 | 195,25 | 189,25 | 181,25 | 166,50 |

Datapada **Tabel 11.1** menunjukkan hasil pengukuran tekanan darah sistolik pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan yang diukur setiap seminggu sekali selama masa pemeliharaan.

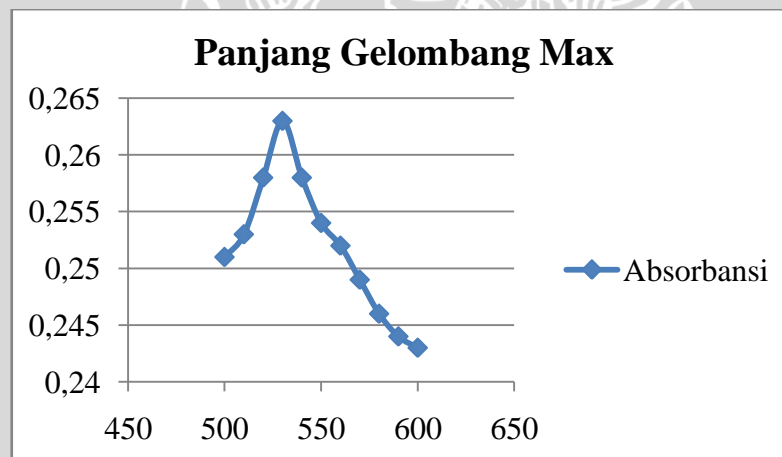


Lampiran 12. Perhitungan Kadar *Malondialdehyde* (MDA)

L.12.1 Penentuan Panjang Gelombang (λ) Maksimum

Tabel L.12.1 Absorbansi larutan standar MDA pada berbagai panjang gelombang

| λ | Absorbansi |
|-----------|------------|
| 500 | 0,251 |
| 510 | 0,253 |
| 520 | 0,258 |
| 530 | 0,263 |
| 540 | 0,258 |
| 550 | 0,254 |
| 560 | 0,252 |
| 570 | 0,249 |
| 580 | 0,246 |
| 590 | 0,244 |
| 600 | 0,243 |

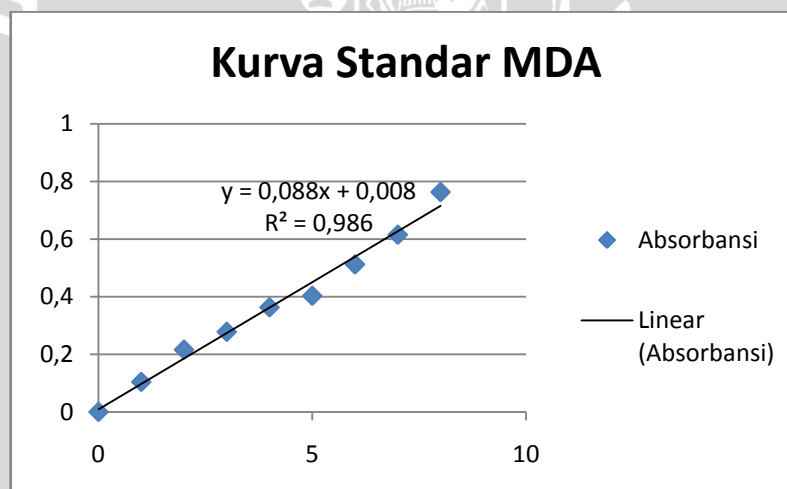


Gambar L.12.1 Kurva penentuan panjang gelombang maksimum untuk MDA

L.12.2 Pembuatan Kurva Standar MDA

Tabel L.12.2 Hasil pengukuran larutan standar MDA Pada $\lambda=530$ nm

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbansi |
|----------------------------------|------------|
| 0 | 0 |
| 1 | 0,104 |
| 2 | 0,216 |
| 3 | 0,278 |
| 4 | 0,363 |
| 5 | 0,403 |
| 6 | 0,512 |
| 7 | 0,615 |
| 8 | 0,763 |



Gambar L.12.2 Kurva standar MDA pada $\lambda=530$ nm

Lampiran 12.3 Data Absorbansi dan Perhitungan Kadar MDA

Tabel L.12.3. Absorbansi dan Konsentrasi MDA

| Sampel | Ulangan | Absorbansi | Konsentrasi($\mu\text{g/mL}$) |
|----------------------|---------|----------------|---------------------------------|
| Kelompok A | 1 | 0,047 | 0,440 |
| | 2 | 0,033 | 0,281 |
| | 3 | 0,029 | 0,236 |
| | 4 | 0,036 | 0,315 |
| Rata-rata kelompok A | | 0,03625 | 0,318 |
| Kelompok B | 1 | 0,075 | 0,756 |
| | 2 | 0,057 | 0,553 |
| | 3 | 0,057 | 0,553 |
| | 4 | 0,060 | 0,587 |
| Rata-rata kelompok B | | 0,06225 | 0,612 |
| Kelompok C | 1 | 0,053 | 0,507 |
| | 2 | 0,052 | 0,496 |
| | 3 | 0,054 | 0,519 |
| | 4 | 0,058 | 0,564 |
| Rata-rata kelompok C | | 0,05425 | 0,522 |
| Kelompok D | 1 | 0,045 | 0,417 |
| | 2 | 0,040 | 0,360 |
| | 3 | 0,057 | 0,553 |
| | 4 | 0,046 | 0,428 |
| Rata-rata kelompok D | | 0,047 | 0,440 |
| Kelompok E | 1 | 0,052 | 0,496 |
| | 2 | 0,045 | 0,417 |
| | 3 | 0,044 | 0,406 |
| | 4 | 0,043 | 0,394 |
| Rata-rata kelompok E | | 0,046 | 0,428 |

Data absorbansi yang didapat di hitung konsentrasinya dengan menggunakan kurva baku MDA yang sudah ada.

Contoh perhitungan konsentrasi MDA

$$Y = 0,0884x + 0,0081$$

$$0,03625 = 0,0884x + 0,0081$$

$$X = (0,03625 - 0,0081) / 0,0884 = 0,318 \mu\text{g/ML}$$

Lampiran 12.4 Analisis statistik kadar MDA pada aorta abdominal menggunakan

SPPS 16

Tabel L.12.4. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | MDA |
|--------------------------------|----------------|---------|
| N | | 20 |
| Normal Parameters ^a | Mean | .46390 |
| | Std. Deviation | .120114 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .105 |
| | Positive | .103 |
| | Negative | -.105 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | .471 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .979 |

a. Test distribution is Normal.

Tabel L.12.5. Oneway

Descriptives

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Kontrol Negatif | 4 | .31800 | .087533 | .043766 | .17872 | .45728 | .236 | .440 |
| Terapi Casein 600 | 4 | .42825 | .046133 | .023066 | .35484 | .50166 | .394 | .496 |
| Terapi Casein 300 | 4 | .43950 | .081324 | .040662 | .31009 | .56891 | .360 | .553 |
| Terapi Captopril | 4 | .52150 | .029850 | .014925 | .47400 | .56900 | .496 | .564 |
| Kontrol Positif | 4 | .61225 | .097164 | .048582 | .45764 | .76686 | .553 | .756 |
| Total | 20 | .46390 | .120114 | .026858 | .40768 | .52012 | .236 | .756 |

Tabel L.12.6. Uji homogenitas

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.020 | 4 | 15 | .428 |

Tabel L.12.7. Uji one way Anova

| MDA | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | .194 | 4 | .048 | 9.066 | .001 |
| Within Groups | .080 | 15 | .005 | | |
| Total | .274 | 19 | | | |

Tabel L.12.8. Uji lanjutan (*posthoc test*) menggunakan *tukey test*

| (I) Perlakuan | (J) Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------------------|-------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol (-) (A) | Terapi Casein 600 | -.110250 | .051707 | .257 | -.26992 | .04942 |
| | Terapi Casein 300 | -.121500 | .051707 | .183 | -.28117 | .03817 |
| | Terapi Captopril | -.203500* | .051707 | .010 | -.36317 | -.04383 |
| | Kontrol Positif | -.294250* | .051707 | .000 | -.45392 | -.13458 |
| Terapi Casein 600 (E) | Kontrol Negatif | .110250 | .051707 | .257 | -.04942 | .26992 |
| | Terapi Casein 300 | -.011250 | .051707 | .999 | -.17092 | .14842 |
| | Terapi Captopril | -.093250 | .051707 | .407 | -.25292 | .06642 |
| | Kontrol Positif | -.184000* | .051707 | .020 | -.34367 | -.02433 |
| Terapi Casein 300 (D) | Kontrol Negatif | .121500 | .051707 | .183 | -.03817 | .28117 |
| | Terapi Casein 600 | .011250 | .051707 | .999 | -.14842 | .17092 |
| | Terapi Captopril | -.082000 | .051707 | .528 | -.24167 | .07767 |
| | Kontrol Positif | -.172750* | .051707 | .031 | -.33242 | -.01308 |
| Terapi Captopril (C) | Kontrol Negatif | .203500* | .051707 | .010 | .04383 | .36317 |
| | Terapi Casein 600 | .093250 | .051707 | .407 | -.06642 | .25292 |
| | Terapi Casein 300 | .082000 | .051707 | .528 | -.07767 | .24167 |
| | Kontrol Positif | -.090750 | .051707 | .433 | -.25042 | .06892 |
| Kontrol (+) (B) | Kontrol Negatif | .294250* | .051707 | .000 | .13458 | .45392 |
| | Terapi Casein 600 | .184000* | .051707 | .020 | .02433 | .34367 |
| | Terapi Casein 300 | .172750* | .051707 | .031 | .01308 | .33242 |
| | Terapi Captopril | .090750 | .051707 | .433 | -.06892 | .25042 |

Tabel L.12.9. Homogeneous subsets

| KELOMPOK | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|--------------------------------------|---|-------------------------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Normal (A) | 4 | .31800 | | |
| Terapi kasein dosis 600 mg/Kg BB (E) | 4 | .42825 | .42825 | |
| Terapi kasein dosis 300 mg/kg BB (D) | 4 | .43950 | .43950 | |
| Terapi captopril (C) | 4 | | .52150 | .52150 |
| Hipertensi (B) | 4 | | | .61225 |
| Sig. | | .183 | .407 | .433 |



Lampiran 13. Dokumentasi penelitian

Proses Pembuatan Kasein Yogurt Susu Kambing



Gambar 1. Pasteurisasi



Gambar 2. Dibiarkan dalam suhu ruang hingga suhu 45°C



Gambar 3. Inokulasi Starter



Gambar 4. Inkubasi



Gambar 5. Pendinginan



Gambar 6. Yogurt susu kambing



Gambar 7. Proses sentrifugasi



Gambar 8. Yogurt hasil sentrifugasi (endapan berwarna putih adalah kasein)



Gambar 9. Proses freeze drying



Gambar 10. Kasein hasil freeze drying

Proses perlakuan terhadap hewan coba



Gambar 10. Kandang tikus selama penelitian



Gambar 11. Kegiatan induksi DOCA



Gambar 12. Kegiatan terapi kasein yogurt susu kambing



Gambar 13. Peralatan *blood pressure analyzer*



Gambar 14. Kegiatan pengukuran tekanan darah



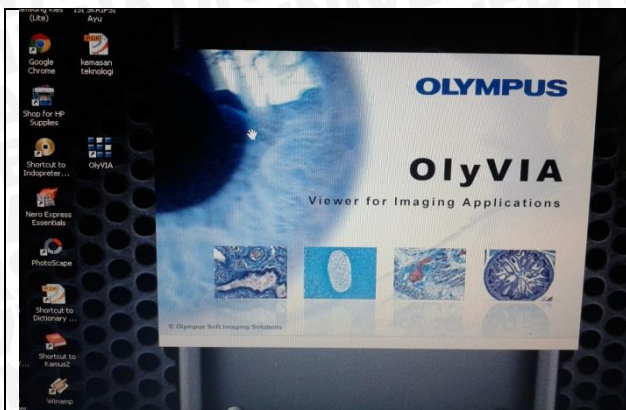
Gambar 15. Prosedur euthanasia tikus menggunakan chlorofom



Gambar 16. Proses pembedahan



Gambar 17. Aorta abdominal



Gambar 18. Peralatan Pemeriksaan Preparat histologi dan histopatologi



Gambar 19. Kegiatan Pengukuran kadar MDA

