

**EFEK PENCEGAHAN YOGURT SUSU KAMBING TERHADAP
EKSPRESI *TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA* (TNF- α) DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI AORTA PADA HEWAN MODEL
TIKUS (*Rattus norvegicus*) HIPERKOLESTEROLEMIA**

SKRIPSI

Oleh :

**MAULIDA ARI PUSPITO RATRI
105130107111009**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**EFEK PENCEGAHAN YOGURT SUSU KAMBING TERHADAP
EKSPRESI *TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA* (TNF- α) DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI AORTA PADA HEWAN MODEL
TIKUS (*Rattus norvegicus*) HIPERKOLESTEROLEMIA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

MAULIDA ARI PUSPITO RATRI
105130107111009



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Maulida Ari Puspito Ratri

NIM : 105130107111009

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Efek Pencegahan *Yogurt* Susu Kambing terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) dan Gambaran Histopatologi Aorta pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hiperkolesterolemia

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, 26 November 2014
Yang Menyatakan,

Maulida Ari P. Ratri

NIM. 105130107111009



**EFEK PENCEGAHAN YOGURT SUSU KAMBING TERHADAP
EKSPRESI *TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA* (TNF- α) DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI AORTA PADA HEWAN MODEL
TIKUS (*Rattus norvegicus*) HIPERKOLESTEROLEMIA**

ABSTRAK

Hiperkolesterolemia merupakan keadaan dimana kadar kolesterol khususnya *Low Density Lipoprotein (LDL)* dalam darah melebihi batas normal. LDL yang seharusnya menuju ke jaringan akan terakumulasi pada pembuluh darah yang nantinya akan menyebabkan oksidasi LDL pada pembuluh darah sehingga memicu terjadinya reaksi inflamasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pencegahan yogurt susu kambing pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hiperkolesterolemia terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) dan gambaran histopatologi pembuluh darah aorta. Penelitian ini menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan, *strain Wistar* yang dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok hiperkolesterolemia, kelompok pencegahan dosis 300 mg/kg BB, dosis 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB. Pencegahan yogurt susu kambing diberikan selama 28 hari kemudian dilanjutkan dengan pemberian diet hiperkolesterolemia bersamaan dengan pemberian yogurt selama 14 hari. Analisis yang digunakan dalam penelitian ini secara deskriptif kuantitatif ekspresi TNF- α pada jaringan pembuluh darah aorta dengan *One Way Analisis Of Variance* (ANOVA) apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan uji *Tukey* 5% dan secara kualitatif dengan membandingkan gambaran histopatologi aorta dari masing-masing kelompok perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) pada ekspresi TNF- α . Pencegahan dosis 900 mg/Kg BB merupakan dosis terbaik menurunkan ekspresi TNF- α . Selain itu yogurt susu kambing dapat mencegah kerusakan jaringan aorta yang ditunjukkan dengan keadaan lapisan aorta yang tersusun atas tunika intima, media dan adventisia mendekati keadaan tikus normal.

Kata kunci : Hiperkolesterolemia, Yogurt susu kambing, TNF- α , Histopatologi aorta.

The Prevention Effects of Goat Milk *Yogurt* Reducing Expression of *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) and Histopaology of Aortic on Rats (*Rattus norvegicus*) Hypercholesterolemia

ABSTRACT

Hypercholesterolemia is a condition where the cholesterol levels specifically *Low Density Lipoprotein* (LDL) in the blood exceeds the normal limits. The increasing of LDL causes LDL oxidation in the vascular tissue that trigger the inflammatory reaction. The purpose of this study was to determine the preventive effect of goat milk yogurt in animal models of hypercholesterolemic rats (*Rattus norvegicus*) on the expression of *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) and aortic vascular histopathology. This study used male rats (*Rattus norvegicus*), strain Wistar were divided into 5 groups: control group, hypercholesterolemic group, prevention group was dose of 300 mg / kg BW, 600 mg / kg BW and 900 mg/kg BW. Prevention of hypercholesterolemia was conducted by administered *yogurt* for 28 days then gave dietary hypercholesterolemia with *yogurt* simultaneously for 14 days. The analysis used in this research was quantitative descriptive for expression of TNF - α in aortic with One Way Analysis of Variance (ANOVA) 5% and qualitatively by comparing the aortic histopathology from each group. The results showed that there were significantly difference ($p < 0.05$) in the expression of TNF- α . Prevention dose of 900 mg / kg bw was the best dose to decrease expression of TNF- α . In addition, goat milk yogurt could prevent aortic tissue damage as indicated by the aorta was composed of layers of tunica intima, media and adventitia approaching a normal rat.

Keywords: Hypercholesterolemia, goat milk *yogurt*, TNF- α , Histopathology of aortic.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena atas rahmat, karunia, dan hidayah - Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Efek Pencegahan Yogurt Susu Kambing terhadap Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) dan Gambaran Histopatologi Aorta pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hiperkolesterolemia”**. Penelitian ini merupakan payung penelitian dosen yang diketuai oleh Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS serta salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Studi Kedokteran Hewan, Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

Pada penulisan skripsi ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. drh. Masdiana C. Padaga M.App.Sc selaku dosen pembimbing I atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu dalam penulisan skripsi ini.
2. Dyah Kinasih Wuragil, S.Si, MP., M.S selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu dalam penulisan skripsi ini.
3. drh. Ani Setyaningrum selaku dosen penguji I atas koreksi, kritik, saran, kesabaran dan waktu yang diberikan.
4. drh. Dyah Ayu Oktaviani, M.Biotech selaku dosen penguji II atas koreksi, kritik, saran, kesabaran dan waktu yang diberikan.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES, selaku ketua Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas fasilitas dan waktu yang diberikan.
6. Analis dan Staf Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang, yang telah membantu penulis dalam pelaksanaan penelitian.
7. Bapak Sudardji, Ibu Sri Suprpti S.Pd, Kakak Wahyu, Dewi, Ilham, Rofik adik Niken, Dite dan Arya, serta keluarga besar tercinta yang senantiasa memberikan dorongan, semangat, dan doa yang tiada henti.
8. drh. Syahrial Kurnia Bimantaka yang selalu menyemangati disetiap langkah penulisan.

9. Teman-teman *Hypercholesterolemia Project* Yuni, Tika, Sherena, Hendra, Rachmad, Bondan, Ivan, Soekarno, Adin, Sultan, Lala, Fahmi dan Anggun atas semangat dalam berjuang bersama dalam penelitian ini.
10. Teman-teman terbaik COMPAC Nisa, Nita, Nella, Habyb, Ninoek, Vianty, Rizy, Kupi dan angkatan 2010, serta seluruh kolega PKH UB yang selalu memberikan dorongan semangat, inspirasi dan keceriaan.
11. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan proposal skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.

Malang, 25 November 2014

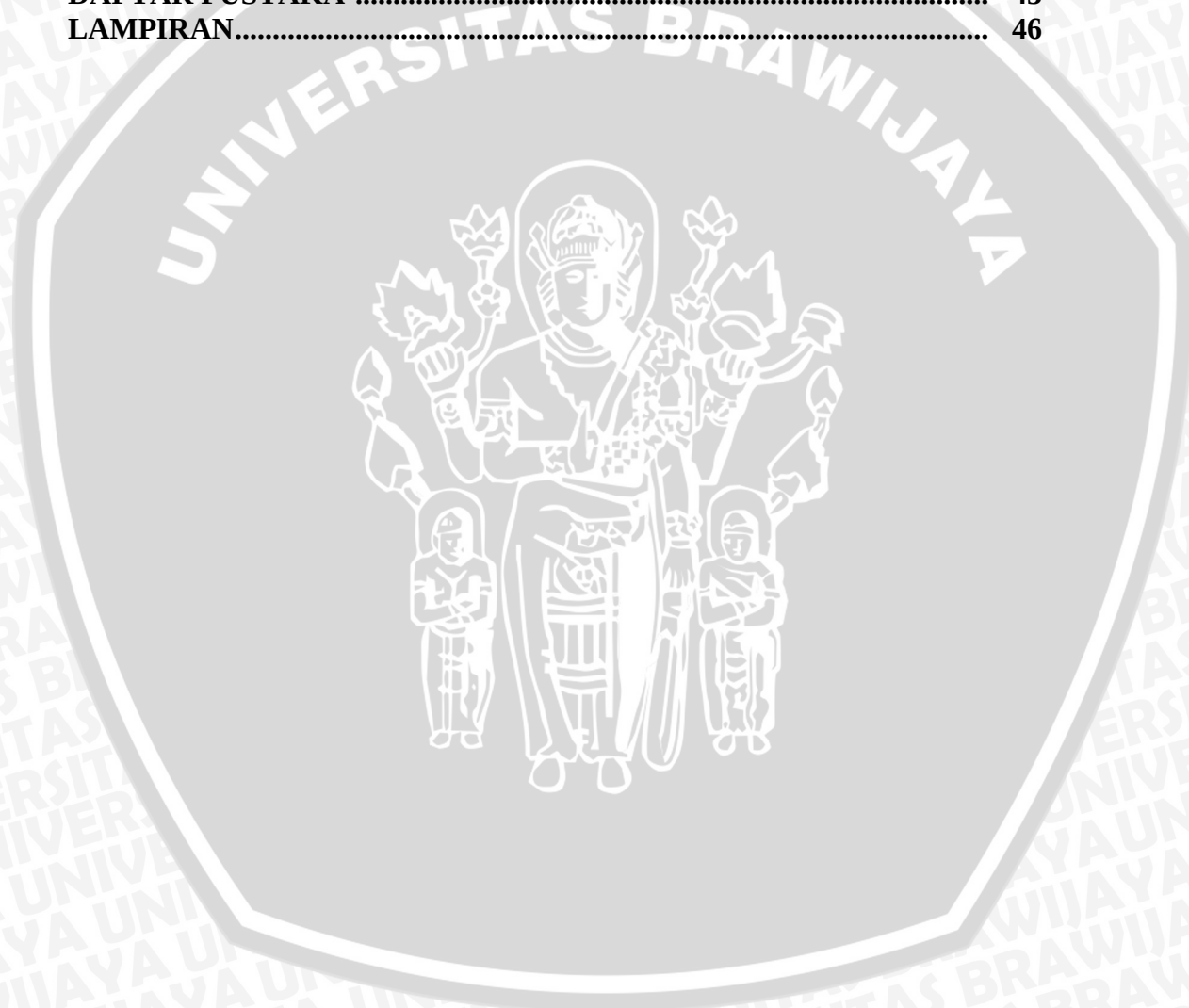
Penulis



DAFTAR ISI

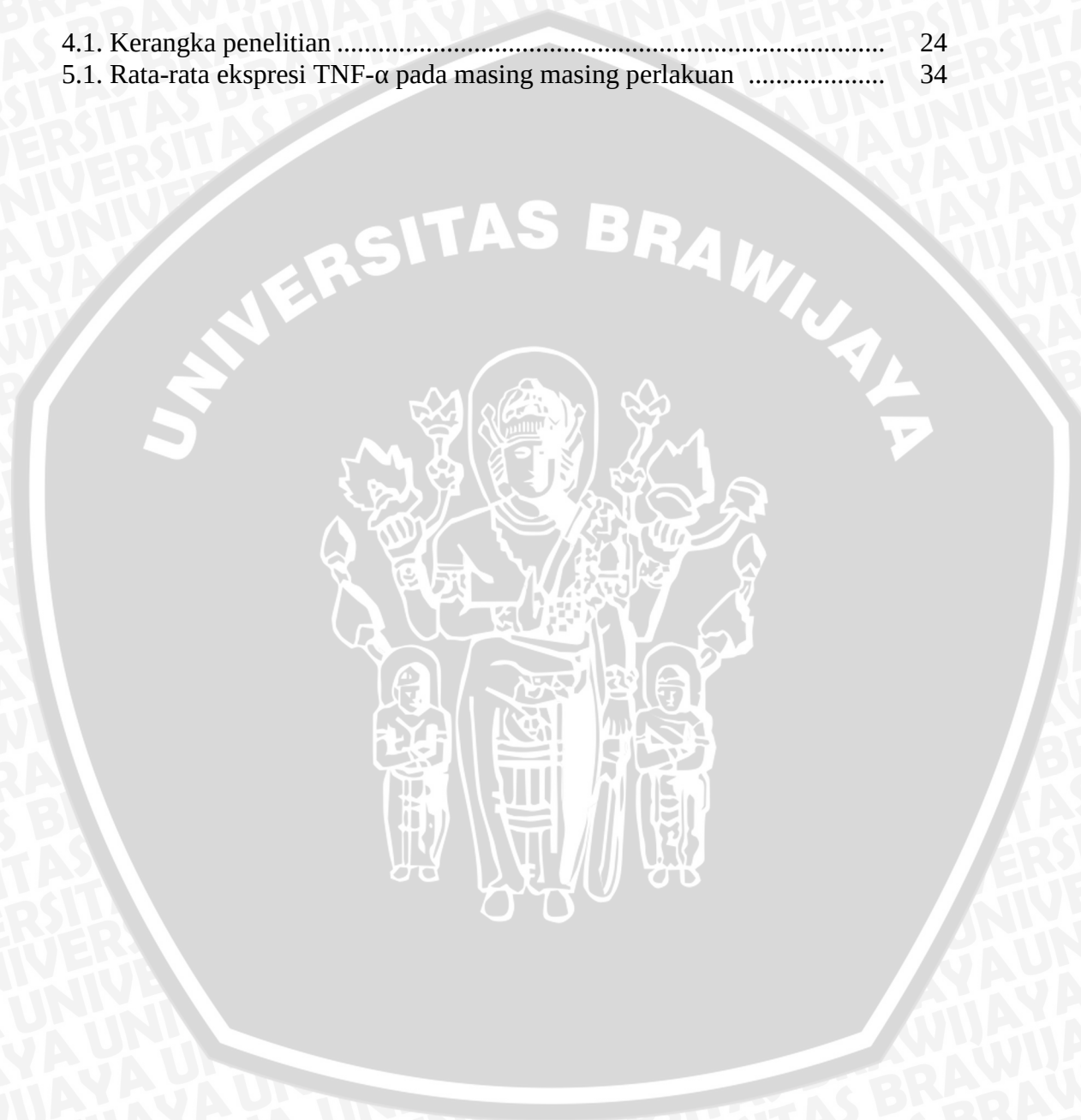
	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Hiperkolesterolemia.....	6
2.2.1 Patomekanisme Hiperkolesterolemia	7
2.2.2 Ekspresi <i>TNF-α</i> akibat Hiperkolesterol.....	9
2.2.3 Histologi Jaringan Pembuluh Darah Aorta Hiperkolesterol... ..	10
2.2 Hewan Model Tikus Hiperkolesterolemia.....	12
2.3 <i>Yogurt</i> Susu Kambing sebagai Antihiperkolesterol.....	14
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	17
3.1 Kerangka Konseptual	17
3.2 Hipotesis Penelitian	21
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	22
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	22
4.3 Tahapan Penelitian	23
4.4 Prosedur Kerja	24
4.4.1 Kerangka Penelitian dan Preparasi Hewan Coba Tikus	26
4.4.2 Penentuan Dosis dan Perlakuan Preventif <i>Yogurt</i>	26
4.4.3 Pembuatan <i>Yogurt</i> susu Kambing.....	26
4.4.3.1 Persiapan Starter	26
4.4.3.2 Pembuatan <i>Yogurt</i>	27
4.4.3.3 Pembuatan <i>Freezedried Yogurt</i> Susu Kambing	27
4.4.4 Pemberian <i>Yogurt</i> Susu Kambing sebagai Tindakan Pencegahan	27
4.4.5 Pemberian diet Hiperkolesterolemia dan Pencegahan <i>Yogurt</i>	28
4.4.6 Pembuatan Preparat Preparat dan Analisis Ekspresi <i>TNF-α</i>	28
4.4.6.1 Pengambilan Pembuluh Darah Aorta	28
4.4.6.2 Pembuatan Preparat Imunohistokimia	29
4.4.7 Metode Pembuatan Preparat dan Analisis Histopatologi	30

4.4.7.1 Pewarnaan <i>Hematoxylin-Eosin</i>	31
4.4.8 Analisa Data	32
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	33
5.1 Efek Pencegahan <i>Yogurt</i> Susu kambing Terhadap Ekspresi Tumor <i>Necrosis Factor Alpha</i> (TNF- α) pada Aorta Tikus Hiperkolesterol	33
5.2 Efek Pencegahan <i>Yogurt</i> Susu Kambing Terhadap Gambaran Histopatologi Aorta Tikus Hiperkolesterol	38
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	42
6.1 Kesimpulan	42
6.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	46



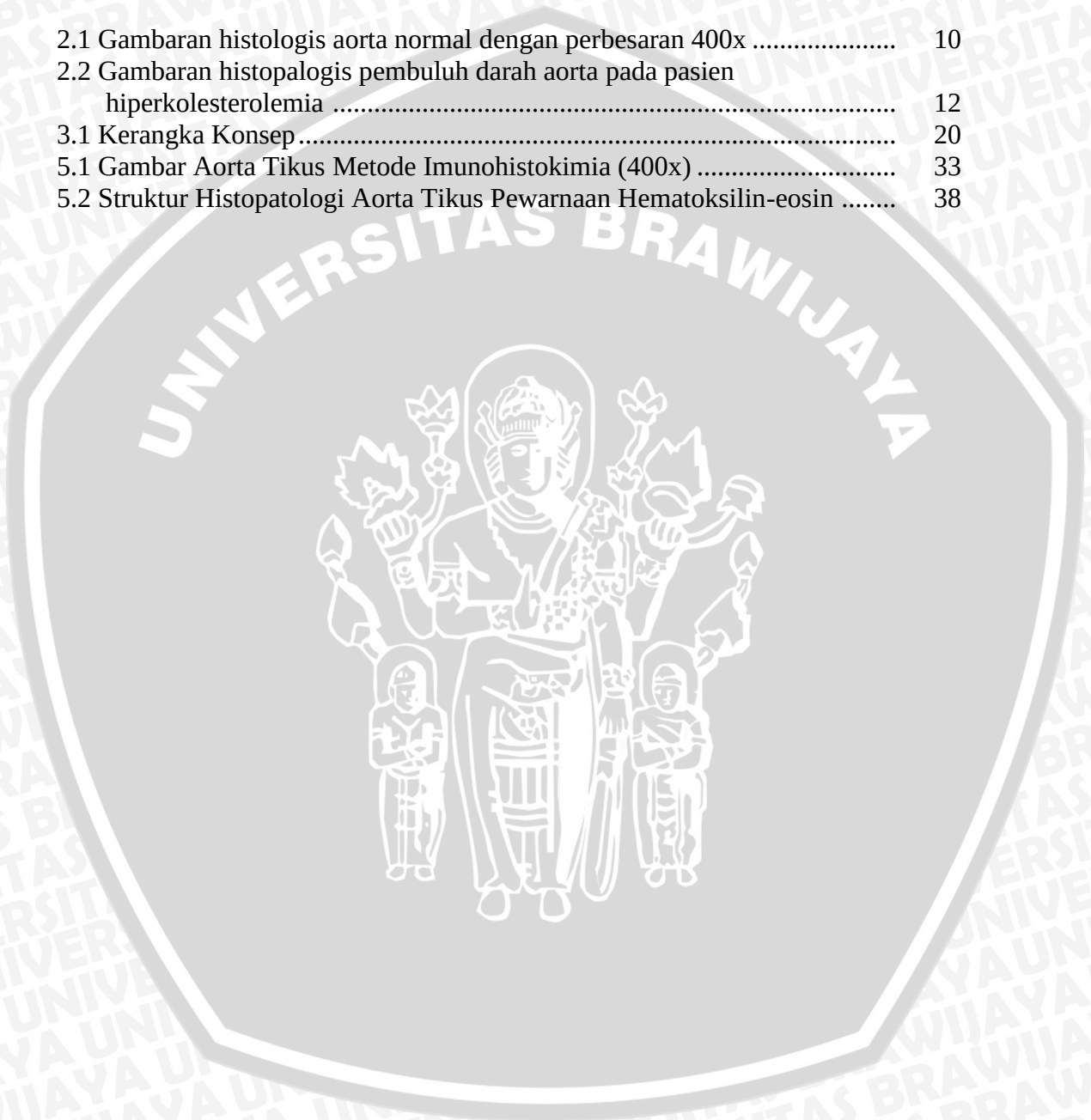
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Kerangka penelitian	24
5.1. Rata-rata ekspresi TNF- α pada masing masing perlakuan	34



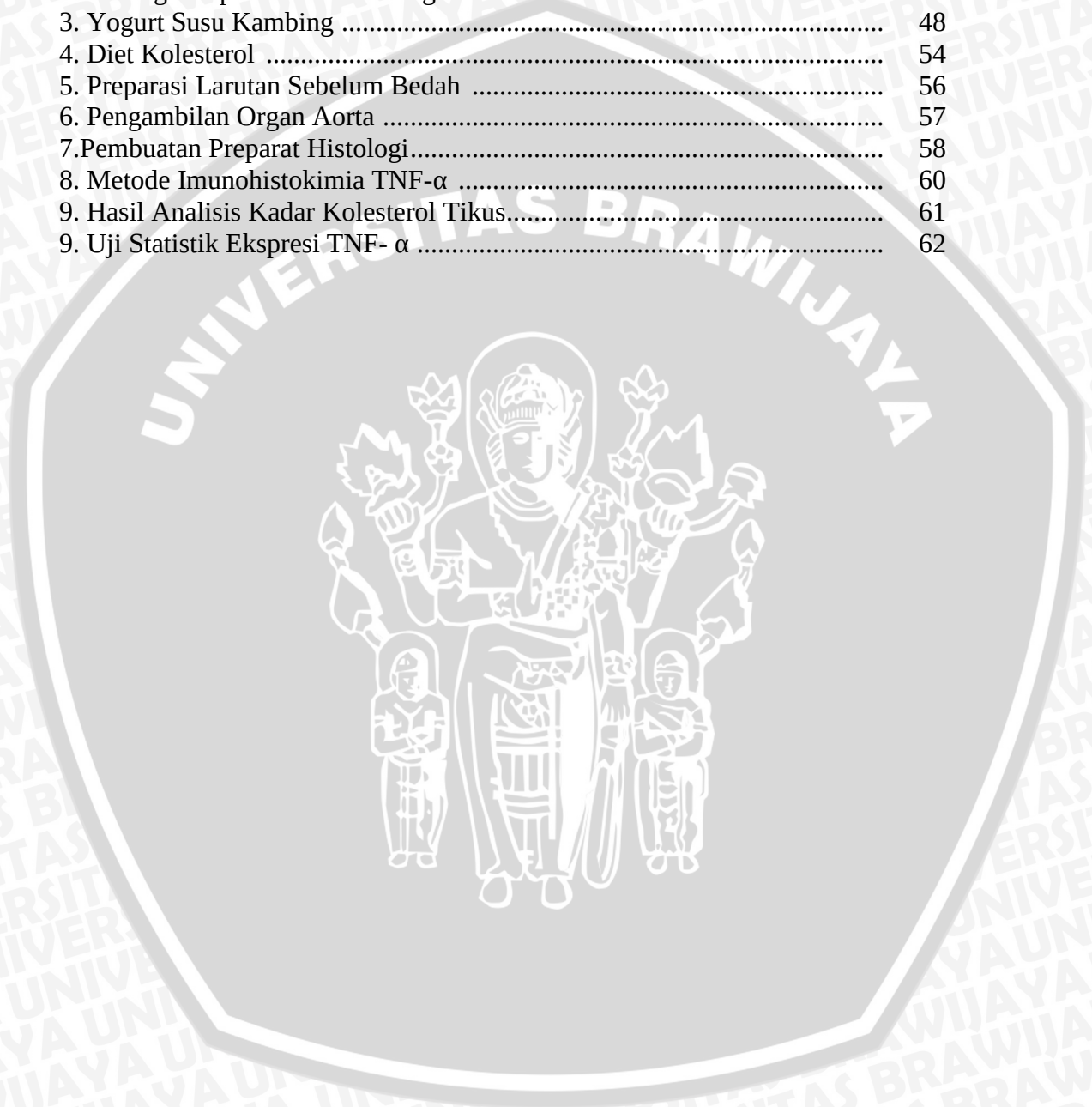
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Gambaran histologis aorta normal dengan perbesaran 400x	10
2.2 Gambaran histopatologis pembuluh darah aorta pada pasien hiperkolesterolemia	12
3.1 Kerangka Konsep	20
5.1 Gambar Aorta Tikus Metode Imunohistokimia (400x)	33
5.2 Struktur Histopatologi Aorta Tikus Pewarnaan Hematoksilin-eosin	38



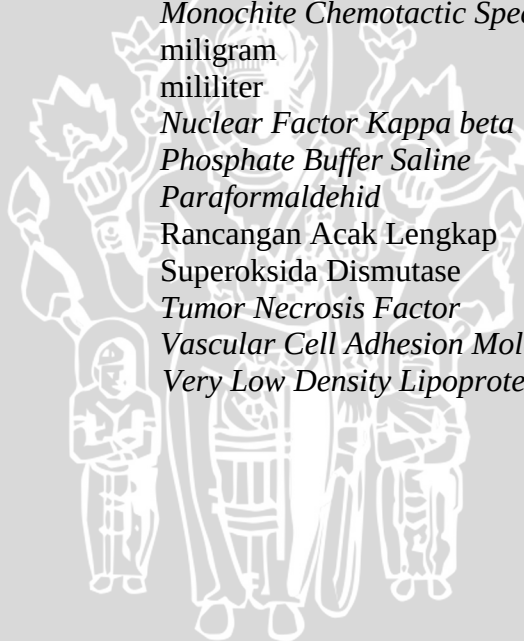
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Keterangan Laik Etik	46
2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian	47
3. Yogurt Susu Kambing	48
4. Diet Kolesterol	54
5. Preparasi Larutan Sebelum Bedah	56
6. Pengambilan Organ Aorta	57
7. Pembuatan Preparat Histologi.....	58
8. Metode Imunohistokimia TNF- α	60
9. Hasil Analisis Kadar Kolesterol Tikus.....	61
9. Uji Statistik Ekspresi TNF- α	62



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/singkatan	Keterangan
ANOVA	<i>analisis of variant</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BAL	Bakteri Asam Laktat
BSH	<i>Bile Salt Hidrolase</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HE	<i>hematoksilin eosin</i>
ICAM-1	<i>Inter Cellular Adhesion Molecule -1</i>
I κ β	<i>Inhibitor Kappa beta</i>
IL-10	<i>Inter Leukin -10</i>
kg	kilogram
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LPL	Lipoprotein Lipase
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Specific</i>
mg	miligram
ml	mililiter
NF- κ β	<i>Nuclear Factor Kappa beta</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	<i>Paraformaldehid</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
SOD	Superoksida Dismutase
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule -1</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hiperkolesterolemia merupakan keadaan kadar kolesterol dalam darah melebihi batas normal (Tortora, 2005). Kadar kolesterol normal pada manusia 120 - 240 mg/dl, pada *pet animal* seperti anjing 150 - 300 mg/dl, dan pada tikus putih 10 - 54 mg/dl (Murray *et al.*, 2003 dan Bauer, 2004). Kondisi hiperkolesterolemia sering terjadi pada *pet animal* seperti anjing dan kucing akibat dari diet yang tidak seimbang (Jeusette *et al.*, 2005). Hiperolesterolemia sering terjadi pada anjing jenis *Schnauzers Miniatur* dan *Brittany Spaniel* (Barriga *et al.*, 2011). Tingginya kadar kolesterol dalam darah pada pasien hiperkolesterolemia merupakan salah satu faktor resiko utama terjadinya penyakit jantung koroner (PJK) dan atherosclerosis (Price dkk, 2006). Menurut World Health Organization (WHO) pada tahun 2008 kejadian penyakit hiperkolesterolemia pada manusia sekitar 68% yang merupakan salah satu faktor pemicu terjadinya kematian.

Pada keadaan hiperkolesterolemia kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) dalam darah meningkat. LDL secara normal dapat masuk dan keluar dari dinding arteri melalui endotel. Masuknya LDL ke lapisan dinding pembuluh darah meningkat seiring tingginya jumlah LDL dalam plasma darah. Keadaan ini akan memicu terjadinya LDL - oksidasi, LDL - oksidasi yang sangat tinggi dapat mengaktifkan faktor transkripsi NF κ - β yang terlibat dalam ekspresi imun dan inflamasi gen. NF κ - β yang aktif dapat menginduksi terbentuknya protein pada sistem imun seperti protein sitokin (TNF- α , IL-1), adhesi molekul (VCAM-1,

ICAM-1) sehingga menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi yang dapat mengakibatkan disfungsi endotel pembuluh darah (Suryohudoyo, 2000). *TNF- α* akan menginisiasi munculnya sel-sel inflamasi seperti makrofag, neutrofil dan leukosit sehingga akan berpengaruh pada sel endotel dari pembuluh darah salah satunya aorta dan dalam kondisi yang kronis dapat menyebabkan gangguan pada pembuluh darah aorta (Faraci, 2004 *et al.*, 2003).

Penggunaan obat kimia sebagai anti hiperkolesterol dalam jangka lama memiliki efek samping bagi penderita hiperkolesterol karena senyawa obat kimia setelah dimetabolisme sulit didegradasi. Oleh karena itu dibutuhkan bahan alami yang dapat didegradasi dalam tubuh sehingga tidak berefek samping pada tubuh. *Yogurt* merupakan salah satu produk susu fermentasi yang dapat dihasilkan dari susu sapi atau susu kambing. *Yogurt* dari susu kambing memiliki kandungan gizi yang lebih unggul, selain itu lemak dan protein pada susu kambing lebih mudah dicerna. Bakteri asam laktat yang terkandung dalam *yogurt* dapat memproduksi enzim yang disebut *Bile Salt Hydrolase* (BSH). Enzim ini dapat bekerja mengurangi konjugasi garam empedu sehingga akan meningkatkan asam empedu bebas yang tidak mudah diserap oleh usus halus dibanding dengan asam empedu konjugasi (Nursini, 2010). Hal ini membuat garam empedu yang kembali ke hati selama sirkulasi enterohepatik menjadi berkurang, sehingga total kolesterol dalam tubuh menjadi berkurang (Begley *et al.*, 2006; Noriega *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2010).

Yogurt susu kambing juga mengandung biopeptida yang diduga *laktoferin* berfungsi sebagai anti inflamasi yang dapat menghambat sitokin pro

inflamasi *Tumor Necrosis Factor Alpha* ($TNF-\alpha$), *Interleukin-1* (IL-1), dan *Interferon Gamma* (IFN- γ) di pembuluh darah. *Yogurt* susu kambing juga mengandung antioksidan yang dapat menekan radikal bebas yang terjadi akibat LDL-oksidasi. Berdasarkan latar belakang diatas, perlu dilakukan penelitian penggunaan *yogurt* susu kambing sebagai pencegahan penyakit hiperkolesterol, sehingga mengetahui potensi *yogurt* sebagai pencegah penyakit hiperkolesterol berdasarkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor* ($TNF-\alpha$) dan gambaran histopatologi aorta.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pencegahan menggunakan *yogurt* susu kambing dapat menurunkan ekspresi $TNF-\alpha$ tikus (*Rattus norvegicus*) setelah diinduksi diet hiperkolesterol?
2. Apakah *yogurt* susu kambing dapat mencegah kerusakan jaringan aorta tikus (*Rattus norvegicus*) setelah diinduksi diet hiperkolesterol?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari UPHP Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan umur 8 - 12 minggu dan berat badan antara 150-200 gram. Penggunaan hewan coba ini telah mendapatkan persetujuan Laik Etik dari KEP UB (Lampiran 1).
- 2) Pembuatan keadaan hiperkolesterolemia pada hewan model tikus dilakukan dengan pemberian asam kholat (No. M5M5306) 0,1 %, Minyak Babi 10%,

dan kuning telur puyuh 5% sebanyak 1,5 ml menggunakan metode *Force Feeding* (Gani et al.,2013).

- 3) *Yogurt* dibuat dari susu kambing yang diperoleh dari Balai Besar Pelatihan Pertanian (BBPP) Songgoriti, Kota Batu dengan starter *yogurt* Met (Canada) dengan komposisi starter berisi *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* dengan dosis 10^9 cfu/ml dalam bentuk *freezedry*.
- 4) Dosis preventif *yogurt* susu kambing yang diberikan pada hewan model hiperkolesterolemia dengan sonde lambung yaitu : dosis 300 mg/kg BB, dosis 600 mg/kg BB, dosis 900 mg/kg BB selama 4 minggu.
- 5) Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi *TNF- α* dengan imunohistokimia dan gambaran histopatologi aorta menggunakan pewarnaan Hematoksilin – Eosin.

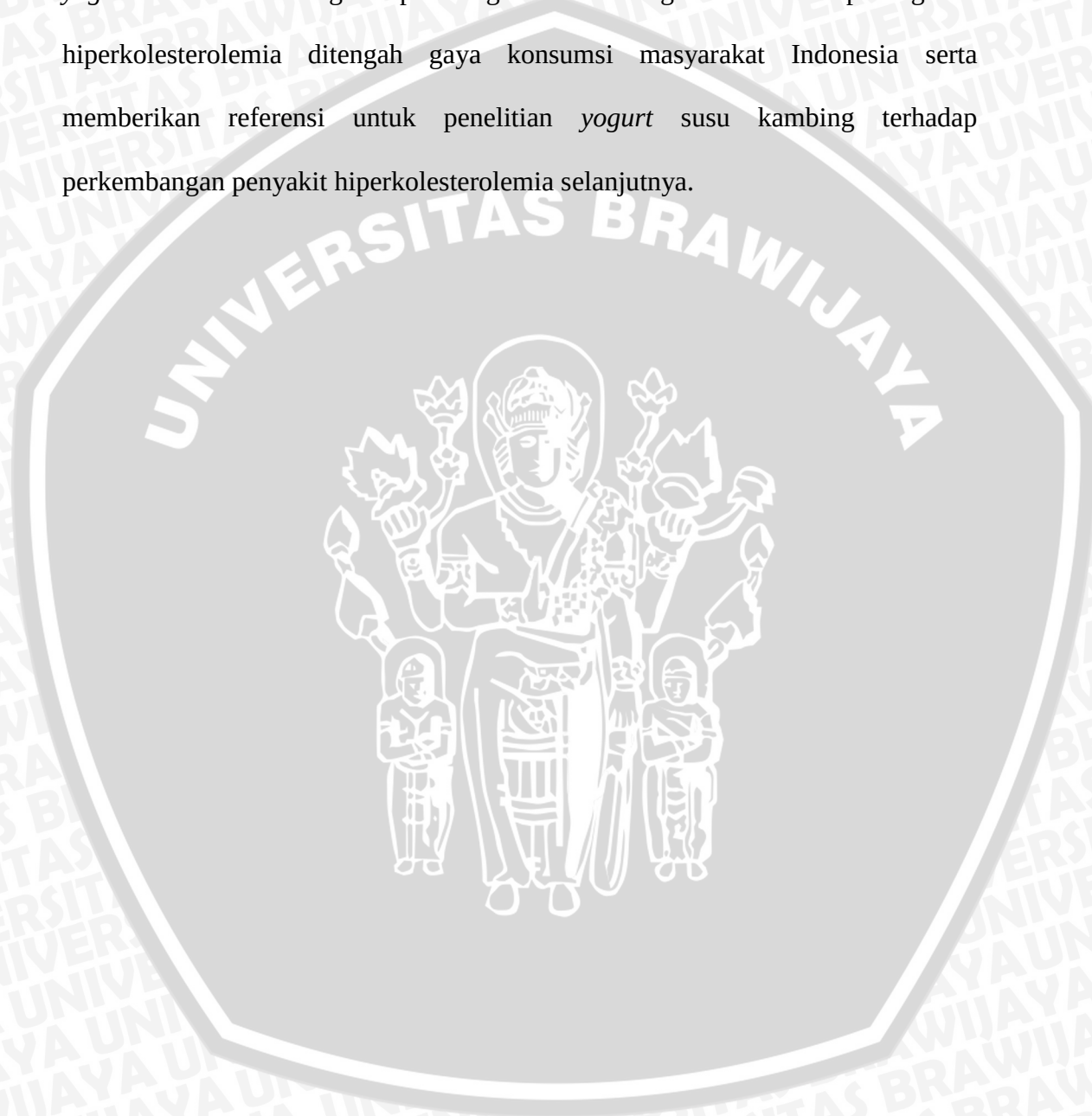
1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui peran pencegahan *yogurt* susu kambing dalam menurunkan ekspresi *TNF- α* tikus (*Rattus norvegicus*) setelah diinduksi diet hiperkolesterol.
2. Mengetahui peran *yogurt* susu kambing dalam mencegah kerusakan jaringan aorta tikus (*Rattus norvegicus*) setelah diinduksi diet hiperkolesterol.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan pengetahuan bahwa yogurt susu kambing dapat digunakan sebagai alternatif pencegahan hiperkolesterolemia ditengah gaya konsumsi masyarakat Indonesia serta memberikan referensi untuk penelitian yogurt susu kambing terhadap perkembangan penyakit hiperkolesterolemia selanjutnya.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hiperkolesterolemia

Hiperkolesterolemia adalah kondisi saat konsentrasi kolesterol di dalam darah melebihi batas normal. Diet yang kaya akan kolesterol dan lemak jenuh dapat menekan pembentukan reseptor *Low Density Lipoprotein* sehingga meningkatkan jumlah kolesterol yang beredar di dalam darah, keadaan ini dapat memicu terjadinya kondisi hiperkolesterolemia. Menurut (WHO) pada tahun 2008 kejadian penyakit hiperkolesterolemia pada manusia sekitar 68% yang merupakan salah satu faktor pemicu terjadinya kematian. Pada hewan kejadian penyakit hiperkolesterolemia sekitar 13% (Tapan, 2005).

Hati mensintesis sekitar 20 % kolesterol dalam tubuh (Gropper *et al.*, 2005). Berdasarkan kerapatannya (densitas), kolesterol dapat di bedakan menjadi: kilomikron, *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL), *Low Density Lipoprotein* (LDL), *High Density Lipoprotein* (HDL). Dari keempat jenis lipoprotein tersebut, LDL memiliki kadar kolesterol yang paling tinggi (Gropper *et al.*, 2005; Hirakawa, 2005). Keadaan hiperkolesterolemia dapat disebabkan karena pola makan diet kaya kolesterol yang menyebabkan obesitas. Hiperkolesterolemia yang tidak disebabkan oleh kelainan genetik dapat dicegah dengan meminimumkan konsumsi makanan dengan kadar kolesterol tinggi, asam lemak jenuh, mencegah obesitas, serta mengkonsumsi makanan dengan suplemen yang dibutuhkan tubuh. Berbagai senyawa diketahui dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah (Menys, 2007).

2.1.1 Patomekanisme Hiperkolesterolemia

Kolesterol dalam tubuh diserap dalam bentuk asam kolat di hati yang dikonjugasikan dengan bahan lain membentuk garam empedu. Garam empedu membantu pencernaan dan penyerapan lemak (Hofmann, 2004; Hirakawa, 2005). Kolesterol dari makanan dan hasil sintesa digunakan dalam pembentukan membran dan sintesa hormon steroid dan asam empedu. Kolesterol ini sebagian besar digunakan dalam proses sintesis asam empedu (King, 2010). LDL dan HDL akan mengedarkan kolesterol ke seluruh sel (Hirakawa, 2005). *Low Density Lipoprotein* merupakan komponen lipoprotein yang terbesar membawa kolesterol (60% total serum kolesterol), ke jaringan tubuh, yang digunakan untuk pembentukan membran atau dimetabolisme menjadi hormon *steroid*. *High Density Lipoprotein* memiliki peran yang bertentangan dengan LDL, yaitu mengangkut kolesterol dan lipoprotein lainnya yang sudah terakumulasi dari sel dan mengembalikan kolesterol ke hati untuk selanjutnya diekskresikan dalam empedu (Gropper *et al.*, 2005).

Kolesterol dalam makanan diserap dari usus bersama lipid lainnya, termasuk kolesterol yang disintesis dalam usus. Kolesterol yang diserap kemudian dibawa menuju ke jaringan ekstra hepatic atau jaringan lemak dan mengalami hidrolisis. Hasil hidrolisis dibawa menuju hepar oleh enzim *Lipoprotein Lipase* (LPL) melalui pembuluh darah kapiler. Lipid selanjutnya dimetabolisme didalam hepar. Kilomikron sebagai transport lipid masuk ke hati disintesa menjadi HDL dan *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL), selanjutnya

VLDL diubah menjadi IDL dan kemudian *Low Density Lipoprotein* (LDL). *Low Density Lipoprotein* (LDL) merupakan lipoprotein yang memiliki kandungan kolesterol tertinggi dibandingkan lipoprotein lainnya dan bertugas mengedarkan kolesterol ke sel-sel jaringan melalui darah untuk digunakan didalam sel (Murray *et al.*, 2003). Pada pasien hiperkolesterolemia, jumlah sisa LDL yang tidak masuk kedalam sel menjadi berlebih dalam darah akibat banyaknya kolesterol yang masuk melalui makanan sehingga tidak mampu dibawa oleh HDL menuju hepar untuk dimetabolisme.

Tubuh berusaha menyeimbangkan kadar kolesterol plasma dengan jalan mengubah kolesterol menjadi asam empedu. Reaksi 7 α -hidroksilasi merupakan tahap pertama pada biosintesis asam empedu dan juga membatasi laju reaksi hidroksilase, suatu enzim mikrosomal yang memerlukan oksigen, NADPH, dan sitokrom P-450. Di dalam reaksi hidroksilasi kolesterol ini, oksigen mudah tereduksi menjadi radikal bebas anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$). Efek kimiawi $O_2^{\cdot-}$ dalam jaringan akan menimbulkan reaksi rantai radikal bebas. $O_2^{\cdot-}$ yang terikat pada sitokrom P-450 merupakan intermediat dalam pengaktifan oksigen pada berbagai reaksi hidroksilasi. Semakin banyak empedu yang disintesis, semakin tinggi aktivitas sitokrom P-450 dan semakin banyak oksigen yang diperlukan. Peningkatan tersebut akan menghasilkan radikal bebas sebagai hasil sampingan sehingga radikal bebas terbentuk secara berlebihan pada kondisi hiperkolesterolemia. Produksi radikal bebas berlebihan akan mengakibatkan enzim antioksidan dalam tubuh khususnya di organ hati seperti superoksida dismutase (SOD) tidak mampu mengatasinya. Hal ini akan menimbulkan kondisi

stres oksidatif, yaitu suatu keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan di dalam tubuh (Halliwell, 2006; Valko *et al.*, 2006). Pada kondisi stres oksidatif, radikal bebas akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel dan merusak organisasi membran sel. Pada keadaan hiperkolesterol LDL yang berlebih dalam darah akan berikatan dengan radikal bebas membentuk LDL-oks yang nantinya akan mengendap di pembuluh darah sehingga terjadi penyumbatan pembuluh darah hingga atherosklerosis (Baigent & Clarke, 2008). Akibatnya, dinding pembuluh darah yang semula elastis akan menjadi tidak elastis lagi (Murray, 2002).

2.2.2 Ekspresi TNF- α akibat Hiperkolesterol

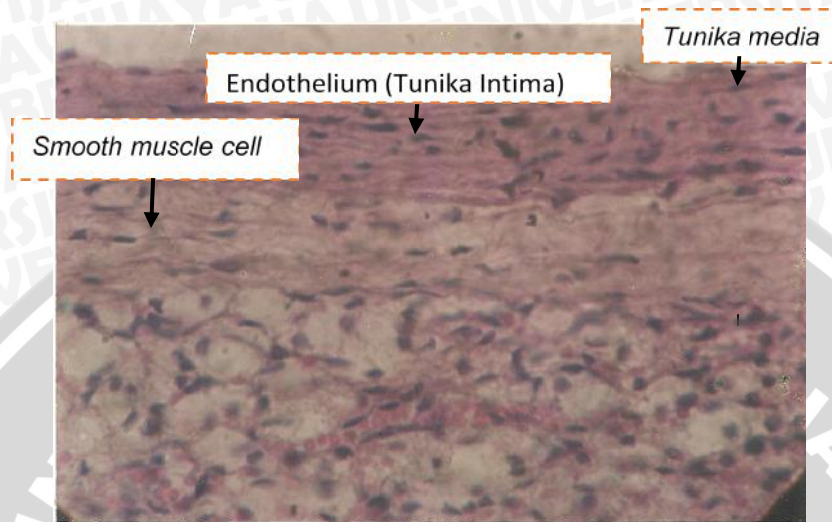
Pada kondisi hiperkolesterolemia, LDL yang meningkat dalam plasma darah akan berikatan dengan radikal bebas membentuk LDL-oksidasi. LDL-oksidasi akan mengaktifkan faktor transkripsi NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa Beta*) yang terlibat dalam ekspresi imun dan inflamasi gen. NF- κ B sebagai faktor transkripsi, ketika dalam keadaan non aktif berada di sitoplasma dan berikatan dengan I κ B (*Inhibitor kappa beta*). NF- κ B terdiri dari dua protein heterodimer yaitu p50 dan P65 (Collin, 2001). Jika mengalami stimuli dari luar, seperti ROS akibat LDL-oksidasi, I κ B yang semula berikatan dengan p50 dan p65 terfosforilasi dan ubiquitinasi yang akan terjadi degradasi proteasom 26S. Hal ini menyebabkan terbebasnya dimer NF- κ B (p50 dan p65) dari kompleks sitoplasmik NF- κ B-I κ B menuju nukleus. NF- κ B kemudian terikat pada gen target dan menginduksi transkripsi dan gen proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α). TNF- α merupakan sitokin proinflamasi utama yang memiliki berat molekul sebesar 26

kDa (Green, Eynon dan Flavel, 2000). Sumber utama TNF- α adalah fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK dan sel mas. Pada keadaan hiperkolesterolemia yang terlihat aktivasi sel endothelial, leukosit, dan monosit. Leukosit akan muncul di sepanjang lumen dan dinding sel sehingga terjadi peningkatan permeabilitas, sedangkan monosit berperan dalam memperbaiki dinding pembuluh darah. Peningkatan monosit menyebabkan monosit menempel pada endotel yang diperantarai oleh beberapa molekul adhesi pada permukaan sel endotel, yaitu *Inter Cellular Adhesion Molecule -1* (ICAM-1), *Vascular Cell Adhesion Molecule -1* (VCAM-1) dan Selectin kemudian monosit berdiferensiasi menjadi makrofag (Davis, 2005). Makrofag berfungsi untuk melakukan fagositosis pada daerah yang mengalami gangguan. (Junaidi, 2000).

2.2.3 Histopatologi Jaringan Pembuluh Darah Aorta akibat Hiperkolesterol

Pembuluh darah aorta adalah pembuluh darah besar bagian dari sistem sirkulasi sistemik, yang keluar dari jantung dan berfungsi untuk membawa darah dari jantung yang berisi oksigen ke pembuluh arteri. Pembuluh darah aorta memiliki percabangan berupa arteri yang berfungsi membawa keseluruh tubuh. Pembuluh darah aorta memiliki lapisan dinding yang tebal (Edminster *et al.*, 2008). Gambaran histologi pembuluh darah aorta dalam keadaan normal dapat dilihat pada Gambar 2.1. Lapisan tersebut terdiri dari *Tunika intima*, *tunika media*, dan *tunika adventitia* (Ikechukwu *et al.*, 2009). *Tunika intima* terdiri atas endotel dan sub endotel. *Tunika media* terdiri satu seri lamina elastis ferforata, sel-sel otot

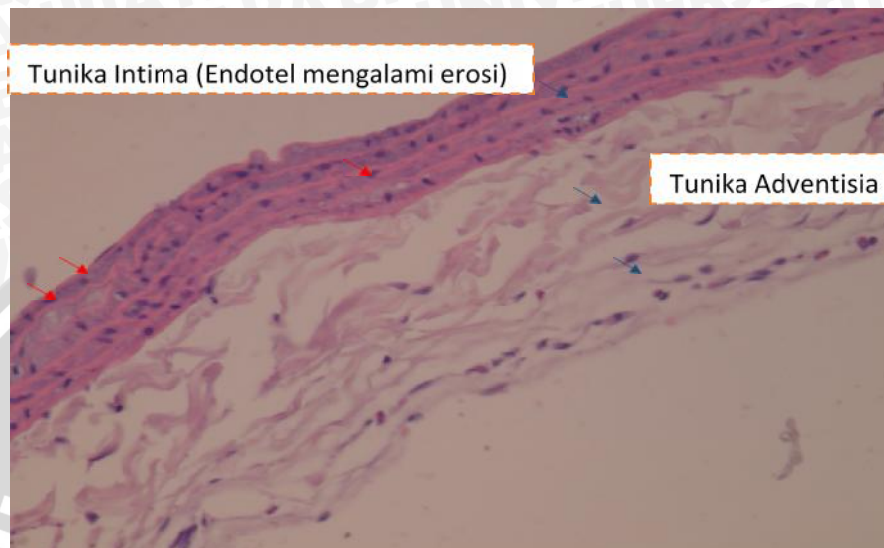
polos, serat retikulin. *Tunika Adventitia* mengandung serat elastis dan serat kolagen (Charlos,2002).



Gambar 2.1 Gambaran histologi aorta normal dengan perbesaran 400x (Ikechukwu *et al.*, 2009)

Studi histopatologi pembuluh darah aorta pada kasus hiperkolesterolemia menjelaskan bahwa hiperkolesterolemia mempengaruhi perubahan seluler akibat infiltrasi sel inflamatori pembuluh darah aorta yang dapat menyebabkan atherosclerosis. Pada keadaan hiperkolesterolemia, sisa LDL dalam darah yang tinggi tidak mampu dibawa kembali ke hepar oleh HDL dan memicu terjadinya oksidasi LDL akibat radikal bebas menjadi LDL-Oksidasi yang memicu terjadinya reaksi inflamasi (Baigent and Clarke, 2008). Reaksi inflamasi akibat hiperkolesterol ditandai dengan munculnya sitokin proinflamasi dan sel sel inflamasi seperti makrofag, neutrofil, dan leukosit. Leukosit akan muncul disepanjang lumen dan dinding pembuluh darah aorta sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan permeabilitas. Hal ini menyebabkan sel endotel mengalami perubahan susunan sel dan abnormalitas struktur sel endotel dari aorta

(Faraci, 2004 dan Ungvari *et al.*, 2003).. Gambaran histopatologis pembuluh darah aorta pada aorta hiperkolesterolemia dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Gambaran histopatologis pembuluh darah aorta pada Tikus strain wistar hiperkolesterolemia 400X (Murwani, 2013)
Keterangan = Infiltrasi lipid (panah merah), infiltrasi sel radang (panah biru).

2.2 Hewan Model Tikus Hiperkolesterolemia

Hewan coba merupakan hewan yang dikembangkan untuk digunakan sebagai hewan coba. Tikus sering digunakan pada berbagai macam penelitian medis selama bertahun-tahun. Hal ini dikarenakan tikus memiliki karakteristik genetik yang unik, mudah berkembang biak, murah serta mudah untuk mendapatkannya. Tikus merupakan hewan yang melakukan aktivitasnya pada malam hari (*nocturnal*). Tikus digolongkan ke dalam Ordo Rodentia (hewan pengerat), Famili Muridae dari kelompok mamalia (hewan menyusui). Menurut Priyambodo (1995) Ordo Rodentia merupakan ordo terbesar dari kelas mamalia karena memiliki jumlah spesies (40%) dari 5.000 spesies di seluruh mamalia.

Klasifikasi tikus putih menurut Myres & Armitage (2004).

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Sub-Famili	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Sebagai hewan percobaan, tikus memiliki beberapa keunggulan, yaitu pemeliharaan dan penanganan mudah, kemampuan reproduksi tinggi dan masa kebuntingan singkat, serta cocok untuk berbagai macam penelitian tentang kebuntingan. Selain itu, tikus tidak dapat muntah karena struktur anatomi tidak lazim pada tempat bermuara esofagus ke dalam lambung sehingga mempermudah proses pencekakan perlakuan menggunakan sonde lambung. Rata-rata umur tikus adalah 4 sampai 5 tahun dengan berat badan umum tikus jantan dewasa berkisar antara 267 sampai 500 gram dan betina 225 sampai 325 gram. Tikus memasuki usia dewasa pada umur 40-60 hari, masa bunting selama 23 hari dan disapih pada umur 21 hari (Sirois, 2005).

Pemberian diet hiperkolesterol merupakan salah satu model hewan coba standar yang digunakan untuk menjelaskan patomekanisme hiperkolesterolemia (Aulanni'am, 1993). Preparasi hewan coba hiperkolesterolemia pada *Rattus*

norvegicus melalui pemberian diet hiperkolesterol. Diet hiperkolesterol merupakan komposisi pakan yang terdiri dari kuning telur puyuh rebus, minyak babi dan asam kholat. Pemberian induksi diet hiperkolesteol selama 14 hari akan menyebabkan terganggunya metabolisme kolesterol dalam tubuh. Hal ini menyebabkan dalam tubuh tikus kadar TG dan kolesterol tinggi yang menyebabkan aktivitas enzim lipoprotein lipase menurun sehingga terjadinya hiperkolesterolemia (Gani *et al.*, 2013).

2.3 Yogurt Susu Kambing sebagai antihiperkolesterol

Susu kambing merupakan salah satu sumber protein hewani yang memiliki gizi tinggi dan sangat sempurna nutrisinya (Sarwono, 2007). Janness (1980) telah meneliti, secara khusus membandingkan komposisi kandungan nutrisi antara susu kambing dan susu sapi. Susu kambing memiliki kandungan protein jauh lebih tinggi dibanding air susu sapi dalam kaitanya dengan jumlah kalori. Pada susu kambing, 25% dari energy total berasal dari protein, sedangkan pada air susu sapi hanya 7% yang berasal dari protein. Susu kambing memiliki butir lemak yang lebih kecil dibanding susu sapi. Disamping itu susu kambing juga memiliki proporsi asam lemak rantai pendek dan rantai sedang dalam jumlah yang lebih tinggi, sehingga susu kambing lebih mudah dicerna dibanding susu sapi. Dalam penelitian yang dipublikasi *The American Journal of Clinical Nutrition*, susu kambing terbukti mempercepat pembakaran lemak rendah kolesterol dan kadar laktosa lebih rendah 13% dari susu sapi. Susu kambing juga tidak mengandung *beta-lactoglobulin*, senyawa ini merupakan pemicu reaksi alergi seperti asma,

bendungan saluran pernapasan, infeksi radang telinga, kemerahan pada kulit, dan gangguan pencernaan makanan.

Penelitian Padaga dkk. (2009) tentang pangan nutrasetika dengan bahan susu menunjukkan bahwa terdapat protein spesifik pada berat molekul 36-55 kDa yang berbeda dengan susu sapi. Protein spesifik ini berpotensi menurunkan proses peradangan dan terbukti berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi dan imunomodulator dalam perbaikan jaringan target pada tikus yang menderita rheumatoid arthritis (RA) (Padaga dkk. 2009). Protein pada susu tidak selalu aktif dan bermanfaat ketika masih dalam bentuk aslinya (*native*) namun akan aktif ketika ada aktivitas proteolitik yang mengubah protein tersebut menjadi molekul yang lebih kecil dan aktif. Salah satu cara untuk mengaktifkan protein melalui proses fermentasi.

Produk fermentasi susu salah satunya adalah *yogurt*. *Yogurt* mengandung bakteri asam laktat (BAL) seperti : *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* sp. yang memiliki banyak manfaat diantaranya sebagai imunomodulator, biopreservatif dan food fermenter (Herich dan Levkut, 2002). Metabolisme dari bakteri asam laktat yang digunakan dalam pembuatan *yogurt* mampu menghidrolisis kasein menjadi molekul protein yang lebih kecil (peptida) dan diduga mengaktifkan fungsi dari protein (Ramchandran *et al* , 2009). Beberapa strain BAL mampu memetabolisme kolesterol dari makanan dalam usus halus sehingga tidak diserap oleh tubuh. Pengaruh bakteri asam laktat terhadap penurunan kolesterol diduga karena kemampuannya dalam mengasimilasi kolesterol dan mendeconjugasi garam empedu (Ngatirah *et al*. 2000). Bakteri

asam laktat dapat memproduksi enzim yang disebut *Bile Salt Hydrolase* (BSH). Mekanisme penurunan kolesterol oleh aktivitas BAL disebabkan oleh enzim BSH yang mendekongugasi garam empedu, dimana glisin atau taurin dipisahkan dari steroid, sehingga menghasilkan garam empedu bebas atau terdekonjugasi. Enzim BSH menghasilkan garam empedu terdekonjugasi dalam bentuk asam kolat bebas yang kurang diserap oleh usus halus. Dengan demikian garam empedu yang kembali ke hati selama sirkulasi enterohepatik menjadi berkurang, sehingga total kolesterol dalam tubuh menjadi berkurang. BAL juga memiliki dinding sel yang mampu mengikat kolesterol dalam usus halus sebelum kolesterol diserap oleh tubuh (Suroño, 2004; Ooi dan Liong, 2010).

Enzim BSH juga akan memberikan keuntungan khusus bagi strain bakteri asam laktat yang tumbuh pada lingkungan yang penuh persaingan dalam saluran pencernaan dengan memberikan daya tahan yang lebih baik terhadap garam empedu, sehingga konsentrasi kolesterol dalam darah dapat direduksi dan kadar kolesterol menjadi lebih stabil (Begley *et al.*, 2006; Noriega *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2010). *Yogurt* susu kambing juga terdapat senyawa biopeptida yang diduga mengandung *laktoferin* yang berfungsi sebagai anti inflamasi yang mampu menghambat kemunculan sitokin proinflamasi seperti *TNF- α* , *IL-1* dan *IFN- γ* (Hayashida *et al.*, 2004; Ebringer *et al.*, 2008). Zat-zat yang terkandung dalam *yogurt* susu kambing juga berperan dalam memodulasi sistem imun tubuh seperti *basic nutrient* (PUFA, asam amino, karbohidrat), *micronutrient* (vitamin C), dan mineral (*iron*, dan selenium) ikut berperan dalam meregulasi sistem imun.

Vitamin C berperan sebagai antioksidan yang bekerja menekan radikal bebas yang disebabkan LDL- oks di pembuluh darah dan sebagai anti inflamasi.



BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Tikus (*Rattus norvegicus*) normal diberikan yogurt susu kambing sebagai tindakan pencegahan (preventif) terhadap hiperkolesterolemia. Pemberian yogurt ini diharapkan dapat menghambat ekspresi *TNF- α* dan mencegah kerusakan jaringan aorta yang disebabkan oleh proses inflamasi akibat hiperkolesterolemia. Yogurt susu kambing yang mengandung bakteri asam laktat akan mempengaruhi keseimbangan jumlah kolesterol dalam tubuh (Ngatirah *et al.* 2000). Yogurt susu kambing juga terdapat senyawa biopeptida yang diduga mengandung *laktoferin* yang berfungsi sebagai anti inflamasi serta terdapat vitamin E dan C yang dapat berperan sebagai antioksidan yang bekerja menekan radikal bebas. Setelah batas waktu pemberian yogurt susu kambing pada 4 minggu pertama sebagai tindakan pencegahan (preventif), dilanjutkan dengan pemberian diet hiperkolesterol bersamaan dengan pemberian yogurt susu kambing selama 2 minggu berikutnya. Pemberian diet hiperkolesterol akan membuat kadar kolesterol didalam darah meningkat. Kadar kolesterol dalam tubuh yang meningkat akan membuat kadar LDL naik. *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang bertugas mengedarkan kolesterol ke sel-sel jaringan melalui pembuluh darah untuk digunakan didalam sel pada kondisi hiperkolesterol, sisa LDL yang tinggi di pembuluh darah tidak mampu dibawa kembali ke hepar oleh HDL dan memicu terjadinya radikal bebas pada pembuluh darah.

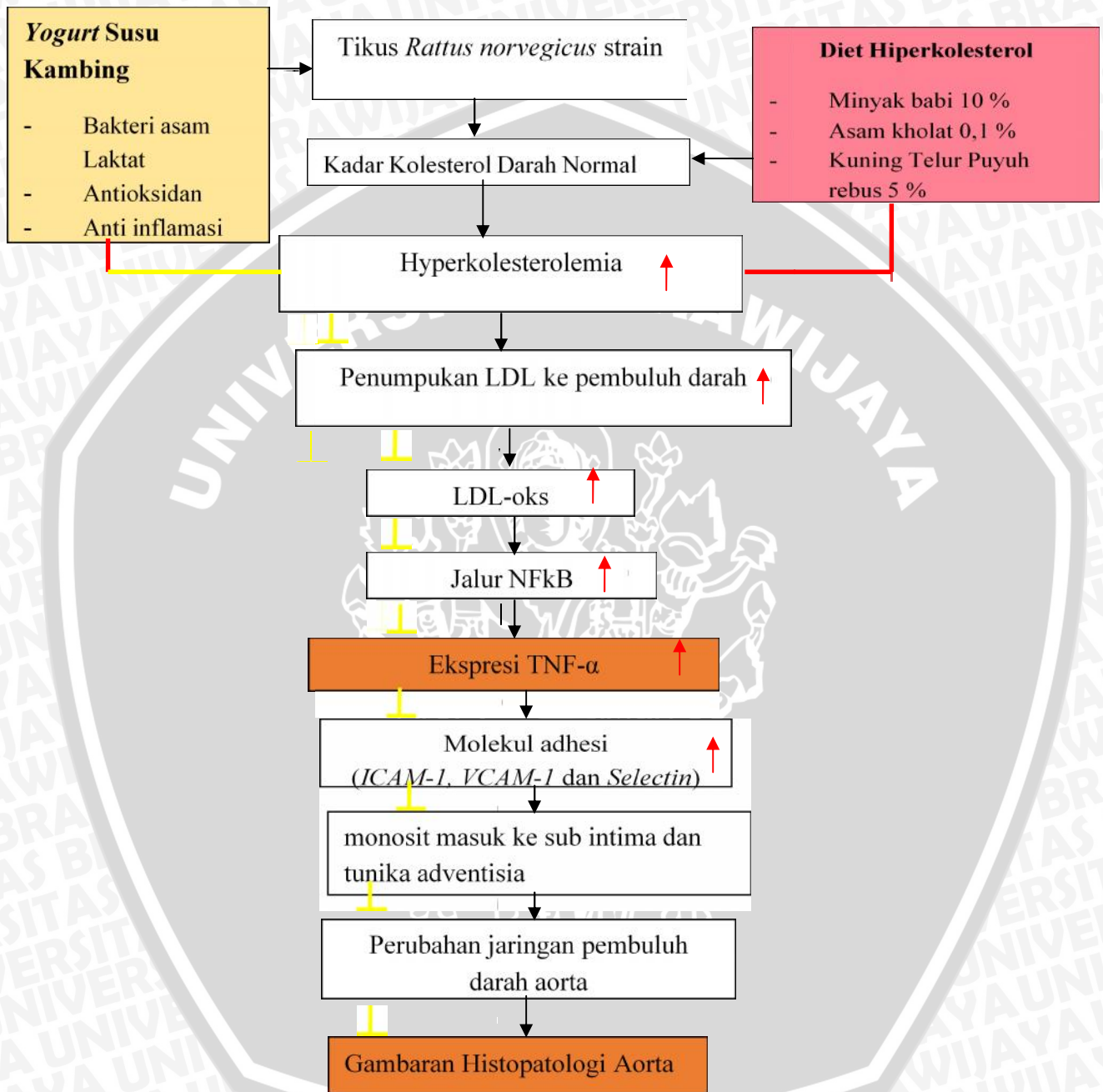
Produksi radikal bebas berlebihan akan mengakibatkan enzim antioksidan dalam tubuh khususnya di organ hati seperti superoksida dismutase (SOD) tidak

mampu mengatasinya. Hal ini akan menimbulkan kondisi stres oksidatif. Pada kondisi stres oksidatif, radikal bebas akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel dan merusak organisasi membran sel. Pada keadaan hiperkolesterol LDL yang berlebih dalam darah akan berikatan dengan radikal bebas membentuk LDL-oks dan menginisiasi faktor transkripsi NF- κ B untuk menginduksi terbentuknya protein pada sistem imun. Sitokin pro inflamasi seperti TNF- α akan aktif sehingga akan menginisiasi sel inflamasi. Leukosit yang berada di endotel yang berfungsi sebagai pertahanan tubuh internal pada kondisi normal akan meningkat. Endotel akan melepaskan MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Specific*) yang berperan menginisiasi monosit sebagai respon primer dan awal indikasi inflamasi. Peningkatan monosit menyebabkan monosit menempel pada endotel pembuluh darah salah satunya aorta, yakni arteri terbesar yang berfungsi mengedarkan nutrisi keseluruhan tubuh. Monosit akan menempel pada endotel aorta ini diperantarai oleh beberapa molekul adhesi pada permukaan sel endotel, yaitu *Inter Cellular Adhesion Molecule -1* (ICAM-1), *Vascular Cell Adhesion Molecule -1* (VCAM-1) dan *Selectin*. Monosit yang terakumulasi pada endotel aorta dalam keadaan kronis akan menyebabkan kerusakan jaringan aorta.

Pemberian yogurt susu kambing ini diharapkan dapat menghambat kerusakan jaringan akibat hiperkolesterolemia karena yogurt dapat menginduksi sistem imun seluler dengan menginduksi sitokin antiinflamasi (TGF- γ dan IL-10) yang berfungsi sebagai penghambat proses inflamasi. Bakteri Asam Laktat (BAL) dalam yogurt dapat memproduksi enzim yang disebut *Bile Salt Hydrolase* (BSH) yang dapat mendekongugasi garam empedu. Mekanisme penurunan kolesterol

oleh aktivitas BAL disebabkan oleh enzim BSH yang mendeconjugasi garam empedu, dimana glisin atau taurin dipisahkan dari steroid, sehingga menghasilkan garam empedu bebas atau terdeconjugasi. Enzim BSH menghasilkan garam empedu terdeconjugasi dalam bentuk asam kolat bebas yang kurang diserap oleh usus halus, dengan demikian garam empedu yang kembali ke hati selama sirkulasi enterohepatik menjadi berkurang, sehingga total kolesterol dalam tubuh menjadi berkurang. BAL juga memiliki dinding sel yang mampu mengikat kolesterol dalam usus halus sebelum kolesterol diserap oleh tubuh (Surono, 2004; Ooi dan Liong, 2010). *Yogurt* juga mengandung biopeptida aktif diduga mengandung *laktoferin* berperan sebagai inflamasi dan kandungan vitamin C dan E sebagai anti oksidan merupakan inhibitor poten yang dapat menghambat aktivasi NF- κ B sehingga dapat mencegah peningkatan ekspresi TNF- α dan mencegah kerusakan jaringan aorta.

Secara skematis kerangka konsep penelitian ini dapat diketahui pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan Gambar:



: Variabel bebas



: Variabel terikat



: Meningkatkan



: Menstimulasi



: Menghambat

3.2 Hipotesis Penelitian

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

1. Pemberian yogurt susu kambing dapat menurunkan ekspresi *TNF- α* tikus (*Rattus norvegicus*) setelah diinduksi diet kolesterol.
2. Pemberian yogurt susu kambing dapat mencegah kerusakan jaringan aorta tikus (*Rattus norvegicus*) setelah diinduksi diet hiperkolesterol.



BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan, Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Laboratorium FAAL Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit dr. Soetomo Surabaya. Waktu penelitian yaitu pada bulan Agustus 2013 – November 2014.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Penelitian ini, peralatan yang digunakan antara lain: Kandang tikus, botol minum tikus, *animal restrain*, alat sonde lambung, timbangan digital (*Precisa 3000 D*), box tikus, sekam kayu, gelas ukur, labu ukur, tabung reagen (*scott 1000 ml*, dan *100 ml*), corong kaca, tabung erlenmeyer *250 ml*, *syringe* (*3 ml*, *5 ml* dan *10 ml*), *microtube*, tabung flacon *100 ml*, pipet (ukur *10 ml*, *5 ml* dan *2 ml*), karet bulb, aluminium foil, *scalpel*, pinset, cawan petri, bunsen, *sentrifuge*, *spatula*, gelas beker *100 ml*, botol berulir, mikro pipet *100 µl*, gunting, pH meter (*Eutech pH Testr 30*), pH indikator, objek glass, termometer raksa, pengukur kadar kolesterol (*Easy Touch blood cholesterol GCU*), beker glass, kertas label, *autoclave*, *microtome*, *tissue processor*, *tissue embedding*, *water bath*, tempat untuk *staining*, *paraffin cassette*, mesin *freeze dryer* (*Christ beta 18K*), mesin inkubator (*Memmert Ine500*), *autoclave* dan mikroskop cahaya (*Olympus BX51*).

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar (usia 8-12 minggu berat 150-200 gram) diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta, susu kambing yang diperoleh dari Balai Besar Pelatihan Peternakan (BBPP), kuning telur puyuh, asam kholat (Catalog No: M5M5306), minyak babi, PBS, PFA, starter yogurtmet, alkohol, spirtus, water steril, aquades dan NACL fisiologis 0,9%.

4.3 Tahapan Penelitian

Adapun tahapan penelitian sebagai berikut:

1. Kerangka penelitian dan preparasi hewan model tikus.
2. Perhitungan dosis yogurt.
3. Preparasi yogurt.
4. Pemberian yogurt sebagai pencegahan hiperkolesterolemia pada tikus.
5. Pemberian diet hiperkolesterolemia dan pemberian yogurt.
6. Analisis ekspresi *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α)
7. Analisis histopatologi pembuluh darah aorta.
8. Analisis data.

4.4 Prosedur Kerja

4.4. Kerangka Penelitian dan Preparasi Hewan Model Tikus

Kerangka Penelitian dan Preparasi Hewan Model Tikus

Penelitian ini bersifat eksperimental dan rancangan untuk penelitian adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (sehat), kelompok kontrol positif (hiperkolesterolemia), kelompok pencegahan (300 mg/ kg BB, 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB) ditambah diet kolesterol.

	Kontrol Sehat (negatif) (A)				Kontrol Diet Hiperkoles terol (Positif) (B)				Kelompok Pencegahan Hiperkolesterol Dengan Yogurt Susu Kambing											
									Dosis 300 mg/kg BB (C)				Dosis 600 mg/kg BB (D)				Dosis 900 mg/kg BB (E)			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Ekspresi TNF- α																				
Histopatologi aorta																				

Rancangan penelitian ditunjukkan dalam Tabel 4.1

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Yogurt susu kambing, Diet kolesterol.

Variabel kontrol : Tikus (berat badan,jenis,umur)

Variabel terikat : Ekspresi TNF- α serta gambaran histopatologi aorta

Sampel penelitian menggunakan tikus sebagai hewan percobaan. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies *Rattus norvegicus* strain wistar berumur 10-12 minggu. Berat badan tikus sekitar 150-200 gram. *Rattus norvegicus* dipakai karena tergolong omnivora dan kebutuhan asam amino esensialnya seperti halnya hewan mamalia lainnya. Hewan coba diaklimatisasi terlebih dahulu selama tujuh hari untuk menyesuaikan kondisi di laboratorium. Estimasi sampel yang dibutuhkan dapat dihitung berdasarkan rumus (Montgomery and Kowalsky, 2011):

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

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5 = n \geq 4$$

Keterangan

P = jumlah kelompok (terdiri dari empat macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk hewan menjadi 5 kelompok diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba. Persiapan tikus perlu dilakukan tindakan untuk menyesuaikan keadaan tikus dengan lingkungan laboratorium. Hal tersebut dilakukan selama 7 hari dengan pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Tikus kemudian dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok terdapat 4 tikus didalamnya. Kandang tikus berukuran 17,5 cm x 23,75 cm x 17,5 cm berbahan plastik dengan tutup besi serta lantai kandang mudah disanitasi dan dibersihkan. Ditempatkan di Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Brawijaya.

4.4.2 Perhitungan Dosis dan Perlakuan Preventif Yogurt

Perhitungan dosis yogurt ada 3 yakni untuk dosis 300 mg/kg BB, dosis 600 mg/kg BB dan dosis 900 mg/kg BB. Dosis 300 mg/kg BB digunakan untuk kelompok C, dosis 600 mg/kg BB untuk tikus kelompok D dan dosis 900 mg/kg

BB untuk tikus kelompok E. Masing - masing kelompok terdapat 4 ekor tikus.

Adapun perhitungan dosis untuk perlakuan Preventif Yogurt dapat dilihat pada

Lampiran 3.

4.4.3 Pembuatan Yogurt Susu Kambing

4.4.3.1 Persiapan Starter

Pada penelitian ini dilakukan terlebih dahulu pembuatan starter cair sebagai berikut:

1. Susu kambing sebanyak 50 ml dipasteurisasi selama 5 menit dengan suhu 72°C dan didinginkan sampai mencapai 45°C.
2. Susu kambing diinokulasi dengan starter kering beku sebanyak 0,25 gram untuk 50 ml susu dan dilakukan homogenisasi.
3. Susu yang telah diinokulasikan selanjutnya diinkubasi pada suhu 45°C selama 4 jam, sampai pH mencapai kisaran 4,4- 4,5.

4.4.3.2 Pembuatan Yogurt

Tahapan pembuatan *yogurt* susu kambing dalam penelitian ini sebagai berikut (Posecion *et al*, 2005) :

1. Susu kambing sebanyak 500 ml dilakukan pasteurisasi pada suhu 72°C dan didinginkan hingga mencapai pada suhu 45°C
2. Susu kambing 500 ml yang sudah dipasteurisasi diinokulasi dengan starter cair sebanyak 3% dan dilakukan homogenasi.
3. Yoghurt susu kambing diinkubasi pada inkubator dengan suhu 45°C selama 4-8 jam hingga diperoleh pH kisaran 4,4- 4,5 dan selanjutnya simpan yogurt ke dalam *refrigerator*.

4.4.3.3 Pembuatan Freezedry Yogurt Susu Kambing

Pada penelitian ini untuk menjaga kandungan dari yogurt agar tidak berubah dan untuk memudahkan perlakuan terapi pada hewan coba, yogurt susu kambing yang telah terbentuk diubah menjadi bentuk serbuk. Pengubahan yogurt susu kambing dari cair menjadi serbuk dengan mesin *freezedry* (Christ LMC-2 atau Christ beta 1-8K). Yogurt susu kambing sebanyak 500 ml dibekukan dengan cairan etanol pada suhu -33°C selama 5-7 menit. Yogurt susu kambing yang beku disublimasi dengan uap panas selama 14 jam hingga terbentuk serbuk yogurt susu kambing (Christ, 2010).

4.4.4 Pemberian Yogurt Susu Kambing sebagai Tindakan Pencegahan (Preventif)

Metode pemberian yogurt (Kartini, 2002) per oral tiap ekor tikus yaitu dari perhitungan dosis yang sudah ditentukan. Dosis 300 mg/kg BB digunakan untuk kelompok C, dosis 600 mg/kg BB untuk tikus kelompok D, dan dosis 900 mg/kg BB untuk tikus kelompok E. Masing-masing kelompok terdapat 4 ekor tikus. Tikus diberi yogurt pada hari ke-1 sampai hari ke-28 dengan dilarutkan dengan 2 ml akuades.

4.4.5 Pemberian Diet Hiperkolesterolemia dan Pencegahan Yogurt Susu Kambing Pada Tikus

Metode pemberian diet hiperkolesterol menurut Gani *et al.*, 2013, yakni dengan pembuatan pakan diet hiperkolesterol yang terdiri dari asam kholat 0,1%, minyak babi 10%, dan kuning telur puyuh rebus 5% yang dicampurkan kemudian dilakukan penambahan akuades hingga volume mencapai 2 ml. Pemberian diet

hiperkolesterol diberikan setiap hari dengan sonde sebanyak 3,02 g/ml per tikus.

Pemberian diet kolesterol ini dilakukan selama 14 hari.

Kelompok yang diberi diet kolesterol adalah kelompok C yang sudah diberi *yogurt* sebelumnya sebagai tindakan pencegahan dengan dosis 300 mg/kg BB, kelompok D dengan dosis 600 mg/kg BB dan kelompok E dosis 900 mg/kg BB.

4.4.6 Pembuatan Preparat Imunohistokimia dan analisis Ekspresi TNF- α pada Aorta

4.4.6.1 Pengambilan Pembuluh Darah Aorta

Tikus terlebih dahulu dieutanasi dengan cara dislokasi leher, selanjutnya dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan dimulai dengan melakukan insisi pada musculus masseter hingga thorak. Selanjutnya jantung dan isi abdomen dikeluarkan lalu aorta diambil dari thorak hingga abdomen dan kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis 0.9 % kemudian di potong dan potongan aorta direndam pada larutan Paraformaldehid (PFA) 4 %. Pengambilan aorta digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dan pengukuran ekspresi TNF- α .

4.4.6.2 Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Menurut Muntiha (2001) proses pembuatan preparat adalah jaringan difiksasi menggunakan formaldehid 10% selama 24 jam. Jaringan aorta kemudian didehidrasi dengan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90% sampai alkohol absolute. Jaringan aorta dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56⁰C sebanyak 2 x 2 jam. Jaringan aorta kemudian diblok menggunakan parafin blok. Jaringan aorta di potong menggunakan *microtome* dengan ketebalan 4-5 μ m dan direndam pada

waterbath. Jaringan aorta selanjutnya diletakkan pada *object glass* dan di keringkan pada suhu 38-40°C sampai kering.

Tahap selanjutnya yakni deparafinisasi yaitu, preparat histologi direndam dengan larutan xylol (2 kali), etanol absolut (2 kali), alkohol 70%, alkohol 30% dan aquades steril. Setelah itu, disimpan selama 24 jam pada suhu 4°C. Preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 lalu direndam dalam 3% Hidrogen Peroksida (H₂O₂) dan PBS pH 7,4, lalu direndam dalam 1% BSA selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya preparat ditetesi dengan antibodi primer, *anti-rat* TNF-α (dalam BSA 1% dalam PBS) 1:100 dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. Selanjutnya ditambahkan antibody sekunder, anti rabbit labelled biotin dan PBS (1:200) selama 1 jam pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4. Selanjutnya, ditambahkan SA-HRP dalam PBS (1:500) selama 40 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4. Setelah itu, ditambahkan kromogen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Selanjutnya dilakukan counter staining dengan pewarna Major hematoxylin secukupnya hingga warna biru terlihat lalu dibilas dengan air kran (2x5 menit) dan aquades steril 1x5 menit lalu dibiarkan semalam dalam suhu ruang. Selanjutnya dilakukan mounting dengan entellean. Hasil akhir diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran sedang (400x). Langkah-Langkah Pewarnaan *Imunohistokimia* dapat dilihat pada **lampiran 8**. Pengamatan *Tumor necrosis factor* (TNF-α) dalam jaringan akan tampak dengan warna coklat dan terdapat diendotel sekitar tunika intima yang menunjukkan adanya reaksi inflamasi. Keberadaan TNF-α pada aorta diamati melalui metode *imunohistokimia*

(IHK) dianalisis secara kualitatif dengan cara membandingkan distribusi TNF- α pada sediaan histologi aorta kontrol dengan perlakuan pada pembesaran rendah (400x) kemudian dibandingkan perhitungan per luas bidang pandang.

4.4.7 Metode Pembuatan Preparat Histopatologi Aorta dan Analisa Hasil

Gambaran Histopatologi

4.4.7.1 Pembuatan Preparat Histopatologi

Preparat histopatologi digunakan untuk melihat berbagai kelainan yang terdapat pada jaringan aorta. Menurut Muntiha (2001) prinsip kerja dari pembuatan histopatologi adalah pemfiksasian jaringan dengan molekul parafin hingga jaringan dapat diwarnai dengan zat warna haematoxilin. Proses pembuatan preparat histopatologi dimulai dengan jaringan difiksasi menggunakan formaldehid 10% selama 24 jam. Jaringan aorta kemudian didehidrasi untuk mengeluarkan air yang berada dalam jaringan dengan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90% sampai alkohol absolute. Jaringan aorta dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56⁰C sebanyak 2 x 2 jam. Jaringan aorta kemudian diblok menggunakan parafin blok. Jaringan aorta di potong menggunakan *microtome* dengan ketebalan 4-5 μ m dan direndam pada *waterbath*. Jaringan aorta selanjutnya diletakkan pada *object glass* dan di keringkan pada suhu 38-40⁰C sampai kering. Selanjutnya preparat siap di warnai dengan pewarnaan Hematoksisilin-Eosin (HE) (Wati dkk, 2013).

4.4.7.1 Pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE)

Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) terdiri zat warna *hematoxylin* dan *eosin*. Proses pewarnaan dilakukan pada bagian awal preparat aorta

dideparafinisasi menggunakan *xylol* yang bertujuan untuk menghilangkan parafin pada jaringan. Selanjutnya dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol untuk mengembalikan kandungan air jaringan. Preparat kemudian dicuci menggunakan aquades. Setelah dilakukan pencucian, preparat dimasukkan kedalam larutan pewarna *hematoxylin*. Preparat yang telah terwarnai dibilas kembali dengan aquades sampai bersih. Tahapan selanjutnya setelah preparat bersih diletakkan kembali di dalam pewarna *eosin*. Proses akhir preparat dicuci dengan aquades hingga bersih kemudian didehidrasi, *clearing*, dan *mounting* (Wati dkk, 2013). Preparat histopatologi aorta kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x dengan pengamatan pada bagian tunika intima, tunika media dan tunika adventisia. Adapun tahapan pewarnaan preparat histopatologi aorta secara terperinci dijelaskan pada **lampiran 7**.

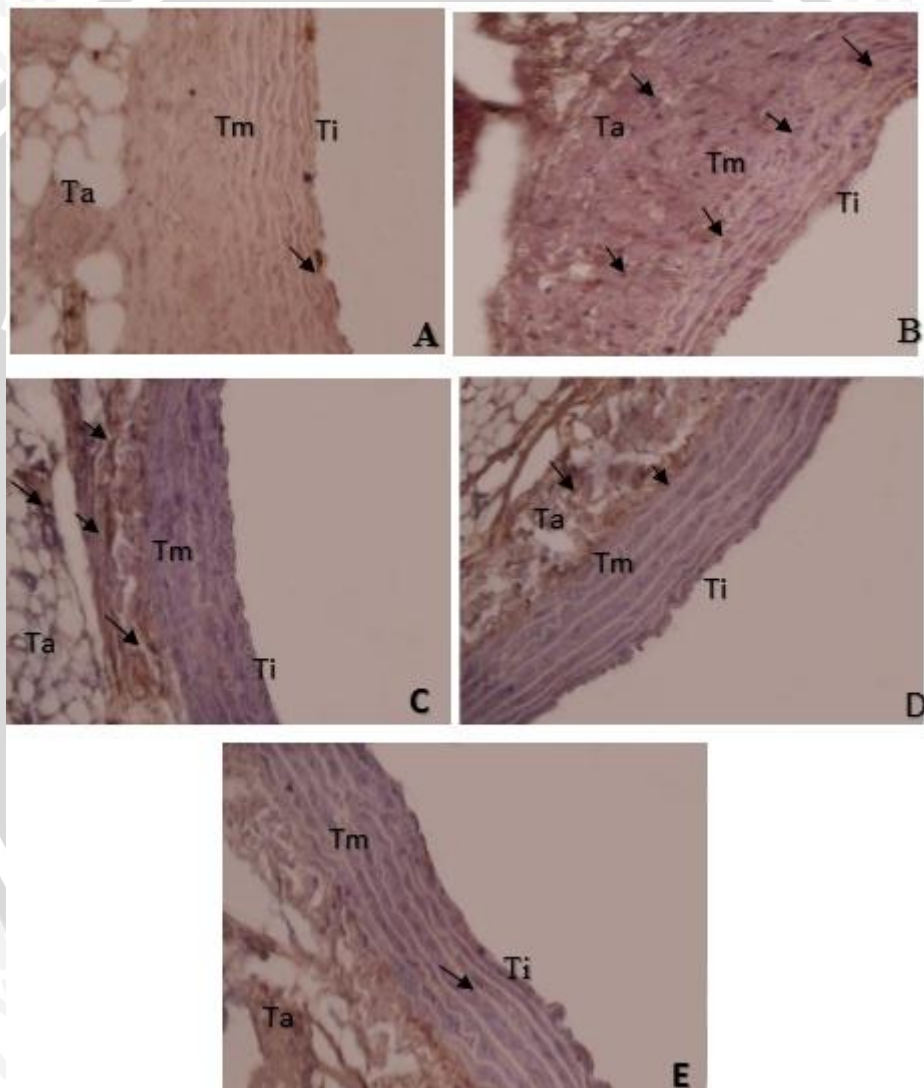
4.4.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan secara kualitatif dengan membandingkan gambaran histopatologi aorta dari masing-masing kelompok dan ekspresi TNF- α disajikan secara deskriptif kuantitatif dengan *one way* ANOVA apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan uji *Tukey* (Beda Nyata Jujur) dengan α 5%.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Efek Pencegahan Yogurt Susu Kambing Terhadap Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) pada aorta Tikus Hiperkolesterolemia.

Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) diamati pada preparat jaringan aorta dengan metode imunohistokimia (**Gambar 5.1**).



Gambar 5.1 Ekspresi *TNF- α* pada Aorta Hewan Model Tikus (*Rattus norvegicus*) (400x). Keterangan = A (tikus normal) ; B (tikus hiperkolesterolemia); C (Dosis pencegahan 300 mg/Kg BB); D (Dosis pencegahan 600 mg/KgBB); E (Dosis pencegahan 900 mg/KgBB). Tunika intima (Ti), Tunika media (Tm), Tunika adventisia (Ta), ekspresi TNF- α .

Ekspresi *TNF- α* ditunjukkan dengan adanya daerah berwarna coklat pada jaringan aorta setelah pewarnaan IHK. Pada kelompok normal terlihat ekspresi *TNF- α* namun dalam intensitas persebaran warna coklat yang rendah, artinya persebaran warna coklat tidak tersebar kesetiap bagian jaringan aorta (**Gambar 5.1 A**), sedangkan pada keadaan hiperkolesterolemia ekspresi *TNF- α* meningkat yang ditunjukkan dengan intensitas persebaran warna coklat pada tunika intima hingga tunika adventisia (**Gambar 5.1 B**). Pada kelompok pencegahan dosis 300 mg/kg BB, dosis 600 kg/BB dan dosis 900 mg/kg BB intensitas persebaran warna coklat pada jaringan aorta lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok hiperkolesterolemia, semakin tinggi dosis yang diberikan semakin sedikit intensitas persebaran warna coklat pada jaringan aorta (**Gambar 5.1 C**, **Gambar 5.1 D** dan **Gambar 5.1 E**). Hasil ekspresi *TNF- α* diukur menggunakan *software axio vision* (**Tabel 5.1**). Ekspresi *TNF- α* pada kelima kelompok perlakuan (normal, hiperkolesterolemia, pencegahan yogurt dosis 300 mg/kg BB, dosis 600 mg/kgBB dan dosis 900 mg/kgBB) menunjukkan adanya perbedaan hasil antar perlakuan.

Tabel 5.1 menunjukkan adanya pengaruh pencegahan yang berbeda nyata terhadap ekspresi *TNF- α* pada tikus dengan perlakuan. Ekspresi *TNF- α* pada tikus hiperkolesterolemia (Kelompok B) berbeda nyata dengan tikus kelompok normal (Kelompok A). Keadaan hiperkolesterol akan membuat produksi radikal bebas berlebihan sehingga mengakibatkan enzim antioksidan dalam tubuh khususnya di organ hati seperti superoksida dismutase (SOD) tidak mampu mengatasinya.

Tabel 5.1 Rata-rata ekspresi *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) pada masing-masing kelompok perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi TNF- α	Penurunan Ekspresi TNF- α terhadap Kontrol Hiperkolesterolemia (%)
Tikus Normal (A)	1,1035 $\pm$ 0,764 ^a	-
Tikus Hiperkolesterolemia (B)	10,919 $\pm$ 0,571 ^d	-
Pencegahan <i>yogurt</i> susu kambing dosis 300 mg/kgBB (C)	6,300 $\pm$ 0,558 ^c	42,3
Pencegahan <i>yogurt</i> susu kambing dosis 600 mg/kgBB (D)	4,428 $\pm$ 0,462 ^b	59,4
Pencegahan <i>yogurt</i> susu kambing dosis 900 mg/kgBB (E)	2,176 $\pm$ 0,482 ^a	80,0

Keterangan : Notasi a,d,c,d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan terhadap ekspresi TNF- α (P<0,05).

Hal ini akan menimbulkan kondisi stres oksidatif dimana oksigen menjadi lebih reaktif dan membuat LDL yang berlebih dalam darah akan berikatan dengan radikal bebas membentuk LDL-oksidasi. LDL-oksidasi dapat mengaktifkan faktor transkripsi NF- κ B yang terlibat dalam sistem imun dan inflamasi gen. Aktivasi NF- κ B menyebabkan peningkatan berbagai macam gen yang memediasi respon imun, antara lain sitokin peradangan (Wakkad *et al.*, 2010). Jika mengalami stimulasi dari luar, seperti ROS akibat LDL-oksidasi, I κ B yang semula berikatan dengan p50 dan p65 terfosforilasi. Hal ini menyebabkan terbebasnya dimer NF- κ B (p50 dan p65) dari kompleks sitoplasmik NF- κ B-I κ B menuju nukleus. NF- κ B kemudian terikat pada gen target dan menginduksi transkripsi dan gen proinflamasi seperti TNF- α dan molekul adhesi (VCAM-1, ICAM-1). Sitokin proinflamasi akan mengaktifkan sel inflamasi salah satunya monosit. Monosit akan

menempel pada endotel pembuluh darah melalui molekul adesi sehingga akan menyebabkan proses inflamasi.

Pada kelompok C menunjukkan beda nyata ekspresi *TNF- α* terhadap kelompok B dengan penurunan ekspresi sebesar 42,3%. Pada kelompok D menunjukkan beda nyata nilai ekspresi *TNF- α* terjadi penurunan ekspresi sebesar 59,4 % terhadap kelompok B, sedangkan pada kelompok E ekspresi *TNF- α* menunjukkan tidak berbeda nyata terhadap kelompok A, penurunan ekspresi *TNF- α* menunjukkan presentase paling tinggi diantara ketiga dosis pencegahan yakni sebesar 80,0 % terhadap kelompok B. Presentase penurunan ekspresi *TNF- α* yang terjadi berbanding lurus dengan pertambahan dosis, hal ini menunjukkan bahwa *yogurt* yang diberikan sebagai dosis pencegahan dapat menghambat peningkatan ekspresi *TNF- α* . Hal ini diakibatkan oleh efek imunomodulator yang berasal dari bakteri asam laktat (BAL) pada *yogurt*. Biopeptida yang terkandung dalam *yogurt* akan memodulasi sistem imun dengan cara memproduksi sitokin antiinflamasi yaitu IL-10 dan IL-22. Sitokin-sitokin antiinflamasi bekerja menghambat aktivitas sel-sel fagosit dan mengurangi defek sel T-regulator yang berasal dari kegagalan mekanisme regulasi (Surono, 2004; Ooi dan Liong, 2010). Pada kondisi hiperkolesterol tubuh akan berusaha menyeimbangkan kadar kolesterol plasma dengan mengubah kolesterol menjadi menjadi asam empedu. Pada proses ini oksigen mudah tereduksi menjadi radikal bebas anion superoksida (O_2^-), semakin banyak oksigen yang diperlukan maka hasil samping radikal bebas juga semakin banyak sehingga memungkinkan radikal bebas berikatan dengan LDL membentuk LDL- oksidasi. *Yogurt* susu kambing mengandung antioksidan

yakni vitamin C dan E yang terkandung dalam *yogurt* susu kambing mampu menekan kemunculan sel inflamasi. Mekanisme kerja vitamin C dan E adalah memutus rantai propagasi, inisiasi sehingga tidak terbentuk radikal bebas. Vitamin C dan E akan menghambat aktivasi NF- κ B dengan penghambatan degradasi I κ B dan terjadinya fosforilasi sehingga dimer dari NF- κ B (p50 dan p65) tidak terlepas dan selanjutnya tidak terjadi translokasi p50 dan p65 ke dalam nukleus. Penurunan aktivasi NF- κ B membuat gen inflamatori dan mediator inflamatori TNF- α , VCAM-1, dan ICAM-1 juga menurun. Hasil uji statistik (*one way ANOVA*) menunjukkan bahwa pemberian *yogurt* susu kambing untuk pencegahan hiperkolesterolemia dengan dosis 300, 600 dan 900 mg/kg BB memberikan pengaruh nyata mempertahankan ekspresi TNF- α jaringan aorta ($p < 0,05$). Dosis pencegahan *yogurt* susu kambing 900 mg/kg BB merupakan dosis yang memberikan efek pencegahan paling baik untuk menghambat peningkatan ekspresi TNF- α ditunjukkan dengan ekspresi TNF- α yang tidak berbeda nyata dengan kelompok tikus normal.

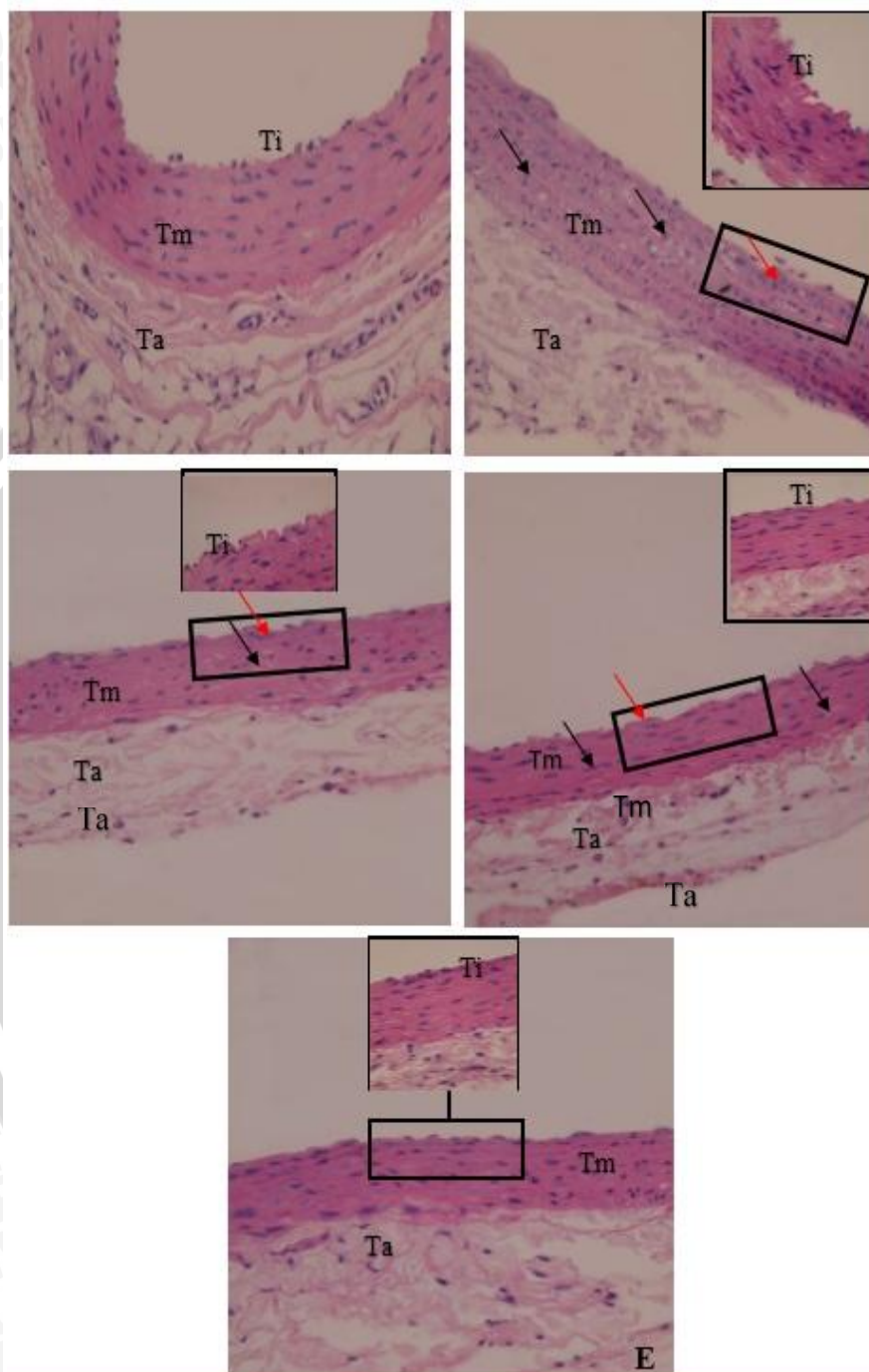
5.2 Efek Pencegahan *Yogurt* Susu Kambing Terhadap Gambaran Histopatologi Aorta Tikus Hiperkolesterolemia.

Gambaran histopatologi aorta ditunjukkan pada Gambar 5.2. Gambaran histologi aorta tikus normal (Gambar 5.2.A) menunjukkan bentuk normal tidak terdapat adanya erosi endotel pada tunika intima dan perlemakan di tunika media dan adventisia. Lapisan endotel tersusun beraturan, berbentuk pipih, dan poligonal. Tunika intima disusun oleh sel endotelial atau *single cell layer*, sedangkan tunika media disusun oleh sel otot polos dan serabut elastis yang

tersusun konsentris. Tunika adventisia tersusun atas serabut elastis dan kolagen (Charlos, 2007).

Pada keadaan hiperkolesterolemia (Gambar 5.2.B), menunjukkan adanya erosi endotel, dimana sel endotel yang tersusun atas epitel simplek terlepas ke lumen. Selain itu juga terdapat akumulasi lipid pada lapisan tunika media. Hal ini terjadi karena pada kondisi hiperkolesterolemia sisa kolesterol yang tinggi di pembuluh darah tidak mampu dibawa kembali ke hepar oleh HDL sehingga dalam kondisi kronis, kolesterol yang terdapat pada LDL menumpuk pada pembuluh darah. Tubuh akan berusaha menyeimbangkan kadar kolesterol dalam tubuh dengan menghidrolisis kolesterol menjadi asam empedu dalam proses 7α -hidrolasi. Pada reaksi ini oksigen mudah tereduksi menjadi anion superoksida. Produksi anion superoksida yang berlebihan akan mengakibatkan enzim antioksidan dalam tubuh khususnya di organ hati seperti superoksida dismutase (SOD) tidak mampu mengatasinya. Hal ini akan menimbulkan kondisi stres oksidatif.

Pada kondisi stres oksidatif, radikal bebas akan berikatan dengan LDL membentuk LDL-oks yang nantinya menempel membran sel dan merusak organisasi membran sel. Oksidasi dari LDL juga akan menginisiasi terjadinya proses inflamasi akut melalui jalur NF- κ B. NF- κ B merupakan faktor transkripsi untuk menginduksi terbentuknya protein pada sistem imun. Sitokin pro inflamasi seperti TNF- α akan aktif sehingga akan menginisiasi sel inflamasi. Leukosit yang berada di endotel yang berfungsi sebagai pertahanan tubuh internal pada kondisi normal akan meningkat.



Gambar 5.2 Struktur Histopatologi Aorta Tikus Pewarnaan Hematoksilin-Eosin.
Keterangan = A (tikus normal) ; B (tikus hiperkolesterolemia); C (tikus hiperkolesterolemia dengan pencegahan 300 mg/Kg BB); D (tikus hiperkolesterolemia dengan pencegahan 600 mg/KgBB); E (tikus hiperkolesterolemia dengan pencegahan 900 mg/KgBB). Perbesaran 400x. Tunika intima (Ti), Tunika media (Tm), Tunika Adventisia (Ta), —→ akumulasi lipid, —→ erosi endotel.

Monosit yang menempel pada endotel ini akan menyebabkan endotel sebagai pertahanan pertama rusak, sehingga memungkinkan sel inflamasi yang telah diaktivasi oleh jalur NF- κ B dan molekul besar seperti lipid pada lumen pembuluh darah menembus endotel dan masuk pada tunika media dari aorta. Gambaran histopatologi aorta dosis pencegahan 300 mg/kg BB (Gambar 5.2C) menunjukkan adanya erosi endotel, lapisan endotel yang masih tidak beraturan serta adanya akumulasi lipid pada tunika media dari aorta. Serabut elastis dan kolagen dari tunika adventisia terlihat tipis dikarenakan desakan dari akumulasi lipid yang berada pada tunika media aorta. Gambaran histopatologi pencegahan *yogurt* dosis 300 mg/kg BB menunjukkan bahwa dosis pencegahan belum optimal untuk mencegah kerusakan dari jaringan aorta akibat hiperkolesterolemia. Pencegahan *yogurt* dosis 600 mg/kg BB (Gambar 5.2D) menunjukkan kondisi sel epitel penyusun endotel mulai beraturan, tetapi masih menunjukkan adanya infiltrasi lipid pada tunika media dan adventisia walaupun intensitasnya tidak sebanyak yang ada pada dosis pencegahan *yogurt* 300 mg/kg BB. Pencegahan dengan *yogurt* dosis 900 mg/kg BB (Gambar 5.2E) tidak ditemukan adanya erosi endotel, epitel pada tunika intima mulai beraturan berbentuk pipih mendekati normal dan akumulasi lipid pada tunika media dan tunika adventisia tidak ada.

Serabut elastis dan otot polos pada tunika media beraturan. ada pencegahan *yogurt* dosis 900 mg/kg BB menunjukkan bahwa *yogurt* susu kambing dapat mencegah kerusakan endotel aorta. *Yogurt* susu kambing mengandung BAL (Bakteri Asam Laktat) yang dapat menghasilkan enzim BSH. Enzim ini berfungsi mendekongugasi garam empedu, dimana glisin atau taurin

dipisahkan dari steroid, sehingga menghasilkan garam empedu bebas atau terdekongjugasi. Enzim BSH menghasilkan garam empedu terdekongjugasi dalam bentuk asam kolat bebas yang kurang diserap oleh usus halus. Dengan demikian garam empedu yang kembali ke hati selama sirkulasi enterohepatik menjadi berkurang, sehingga total kolesterol dalam tubuh menjadi berkurang sehingga proses oksidasi LDL dapat dihambat maka proses inflamasi dan akumulasi lipid dalam pembuluh darah tidak terjadi.

Yogurt susu kambing mengandung BAL ini memiliki dinding sel yang dapat mengikat kolesterol dalam usus halus sebelum kolesterol diserap oleh tubuh (Surono, 2004; Ooi dan Liong, 2010). *Yogurt* juga mengandung biopeptida yang memiliki kerja sebagai anti inflamasi, sehingga proses oksidasi akibat adanya kelebihan LDL akan dihambat. Biopeptida dalam *yogurt* akan memodulasi sistem imun dengan cara memproduksi sitokin antiinflamasi yaitu IL-10 dan IL-22. Sitokin-sitokin antiinflamasi bekerja menghambat aktivitas sel-sel fagosit. Adanya antioksidan dalam *yogurt* dapat menghambat radikal bebas, sehingga jalur NF- κ B tidak teraktivasi dan proses inflamasi akibat LDL oksidasi berkurang. Kandungan antioksidan dalam yogurt yakni vitamin E dan C berperan dalam mengendalikan radikal bebas akibat diet kolesterol, sehingga akan menghambat reaksi dari kolesterol LDL sehingga NF- κ B akan tetap dalam keadaan inaktif didalam sitoplasma. Antioksidan akan melindungi pembentukan LDL teroksidasi sehingga menghasilkan sedikit adhesi monosit, mengurangi kerusakan kimia dan mengurangi toksisitas sel sel pembuluh darah (Collins *et al.*, 2001).

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Pencegahan hiperkolesterolemia pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) menggunakan yogurt susu kambing dosis 300, 600 dan 900 mg/Kg BB mampu menurunkan ekspresi *TNF- α* dan mencegah kerusakan jaringan aorta.
2. Pencegahan hiperkolesterolemia pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) menggunakan yogurt susu kambing dengan dosis 900 mg/Kg BB merupakan dosis yang memberikan efek pencegahan paling baik untuk menurunkan ekspresi *TNF- α* dan mencegah kerusakan jaringan aorta sehingga mendekati keadaan normal.

6.2 Saran

Diperlukan penelitian lanjutan mengenai karakteristik peptida bioaktif pada yogurt susu kambing yang berperan mencegah penyakit hiperkolesterolemia.

DAFTAR PUSTAKA

- Andriani, M and Lia . K. 2012. *Kajian Karakteristik Fisiko Kimia dan Sensori Yogurt Dengan Penambahan Ekstrak Ubi Jalar (Ipomoea Batatas L.)*. Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian. Universitas Sebelas Maret.
- Aulanni'am. 1993. *Effect Des Fibres duriz Sur Le Profil Lipidique Du Rat Comparison Entre Le Riz Cargo Et Les Fibres du Son*. These USTL. Montpellier, France.
- Baigent.C., And R.Clarke. 2008. *Cholesterol And Lipids. International Encyclopedia Of Public Health*. Elsevier Inc, USA.
- Baker.D.E.J., J.R.Lindsey, and S.H.Weisborth. 1980. *The Laboratory Rat Vol 2, Research Applications*. Academic Press Inc. London.
- Bansal, M P., and Sapna J. 2009. Hypercholesterolemia Induced Oxidative Is Stress Reduced In Rats With Diets Enriched With Supplement From Dunaliella Saline Algae. *Am J.Biomed. Sci* 1 (3):196-204.
- Baratawidjaya, K G dan Rengganis, I. 2010. *Imunologi Dasar: Sitokin*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Barriga.C.V And F.E.Fontúrbel. 2011. Cholesterol, Glucose And Triglycerides Role In The Prevalence Of Hyperlipidemia In Dogs At Higher Elevations. *Fcv-Luz* 21(1):22-26.
- Besselsen, D G. 2004. Biology of Laboratory Rodents. Course: *Research Animal Method*. Arizona Health Sciences Center. University of Arizona.
- Budiarti, I. K., Padaga, M. C. dan Fatchiyah, F. 2013. Nutritional Composition and Protein Profile of Goat Yogurt PE with Double Culture Between Streptococcus Thermophilus species. *Cukurova Medical Journal* 38 (4) (in Press).
- Capeyron, M. F. M. 2002. A Diet High Cholesterol And Deficient In Vitamin E Induces Lipid Peroxidation But Does Not Enhance Antioxidant Enzyme Expression In Rat Liver. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 296-301.
- Collins, T., I.C. Myron. 2001. NF- κ B: Pivotal Mediator or Innocent bystander in Atherogenesis? *J Clin Invest*. Vol. 107. No. 3:255-264.
- Coppack, S. W. 2001. Pro- Inflammatory Cytokines And Adipose Tissue. *Proceedings of Nutrition Society* 60: 349-356.
- Davis. 2005. Atherosclerosis An Inflammatory Process. *Journal. Insur Med*. 37:72-5

- Djide, M. N. 2006. Efek Hipokolesterolemia Kultur Bakteri Asam Laktat Dalam Soyghurt Terhadap Tikus Putih. *Journal Sains & Teknologi* 6 (1) : 13-18
- Durum and Muege. 2003. Hamster Fed Diet High Saturated Fat Have Increased Cholesterol Accumulated and Cytokine Production in Aortic Area Compared With Cholesterol Fed Hamster with Moderately Elevated Plasma Non HDL Cholesterol Concentration. *Journal Nutrisi Immunology*. Universitas of Massachusetts.
- Gamal, Y. M. E., O.A. Elmasry, dan D. H. E. Ghoneimy. 2011. Immunomodulatory Effect of Food. *Pediatric Allergy Immunology* 19(2): 3-13.
- Gani.N., L.I.Momuat., dan M.M. Pitoi. 2013. Profil Lipida Plasma Tikus Wistar yang Hiperkolesterolemia pada Pemberian Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* L.). *Jurnal Mipa Unsrat* 2 (1): 44-49
- Halliwel, 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. *Journal Pharmacol.* 142 : 231-255.
- Hariani, M., DA, Okid. 2009. Blood Cholesterol Level of Hypercholesterolemia Rat (*Rattus norvegicus*) After VCO Treatment. *Journal Bioscience Vol 1* No 2 : 53-58.
- Hartanto, O.S. 2009. Peran Sitokin dan Metabolisme Lipid dalam Stroke. *Berkala Neurosains*. 10(2) : 63-67.
- Hayashida, K., T. Kaneko, T. Takeuchi, H.Shimizu, K. Ando, dan E. Harada. 2004. *Oral Administration of Laktoferrin Inhibits Inflammation and Nociception in Rat Adjuvant- Induced Arthritis*. J. Vet. Med. Sci. 66:149-154.
- Ikechukwu. C.F., Eliakim, And E.B.Riman. 2009. The Effect of Aqueous Ethanolic Extract of Alchornea Cordifolia Leaf On The Histology Of The Aorta Of Wistar Rats. *Nigerian Journal of Physiological Sciences* 24 (2): 149-151.
- Johnson, M.C., 2005. Hyperlipidemia Disorders In Dogs. *Compendium on Counting Education For The Practicing Veterinarian* 27: 361-364.
- Junaidi. 2005. *Pencegahan dan Pengobatan Stroke*. Buana Ilmu Populer: Jakarta.
- Junquiera, L. C., and Carneiro. 2007. *Basic Histology*. The Mcgraw-Hill Companies.
- Kartini T. A. 2002. *Potensi Probiotik Lactobacillus acidiphilus dan Mikroflora Kefir Sebagai Anthihiperkolesterolemia*. [Skripsi]. Bogor: jurusan Ilmu Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.

- Kasim, E., Yety, K., Novik, N. 2006. Pemanfaatan Isolat lokal *Monascus purpureus* untuk Menurunkan Kolesterol Darah pada Tikus Galur Sprague-Dawley. *Biodiversitas* (2): 123-126.
- Kontush, A., and Chapman, M. J. 2006. Functionally Deceptive High Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at The Crossroads Of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis. *Parmaicol Rev.* 58 : 342-374.
- Lehninger, A. L., and Nelson, D. L., Cox, M. M. 2005. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publisher.
- Liong, M. T., and Shah N. P. 2005. Bile Salt Deconjugation Ability, Bile Salt Hydrolase Activity and Cholesterol Co-Precipitation Ability of Lactobacilli Strains. *International Dairy Journal*. 15 (4). 391-398.
- Macgill H. C. 2000. Assosiation of Coronay Heart Disease Risk Factors With The Intermediate Lesions Of Atherosclerosis in Youth: The Pathobiological determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY). *Research Group Atheroscler Thromb Vasc Biol* 20 (8).
- Montgomery, D., and S, kowalsky. 2011. Design and Analysis of Experiment. John Willey and Sains Inc. ISBN 978-0-470-16990-2.
- Murray.R.K., Granner, and Rodwell. 2003. *Biokimia Harper*. Penerjemah: Andry Hartono. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Murray.R.K., Granner, and Rodwell. 2006. *Biokimia Harper*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Myer, P. And D. Armitage. 2004. *Rattus norvegicus*. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_novegicus.html. Diakses pada tanggal 25 Maret 2012.
- Ooi, L. And Liong, M. 2010. Cholesterol Lowering Effect of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings, *International Journal of Molecular Sciences*, 11:2499-2522
- Padaga, M. C., Sawitri M.E. & Murwani S. 2009. *Potensi Protein Spesifik Susu Kambing Sebagai Immunomodulator and Immunogen : Upaya Pengembangan Pangan Nutrasetika* : Laporan Penelitian.
- Price.S.A., M.Lorraine, dan Wilson. 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*, edisi 6. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Priyambodo, S. 1995. *Pengendalian Hama Tikus Terpadu*. Penebar Swadaya. Bogor.
- Robbins, S., and Cotran , R. 2002. *Dasar Patologi Penyakit* (Terjemahan). Penerbit Buku Kedokteran. Sumber Agung Podomoro : Jakarta.

- Sargowo, Djanggan. 2001. Peranan Kadar Trigliserida dan Lippoprotein sebagai Faktor Resiko Penyakit Jantung Koroner. *Jurnal Sainika*. Lembaga Penelitian Universitas Brawijaya Malang, 13 (2).
- Schlesinger, D. P. 2011. Raw Food Diet in Companion Animals: Acritical Review. *Canadian Veterinary Journal*. 52 (1): 50-54
- Silbernagl, S and F. Lang. 2003. *Teks Atlas Bewarna Patofisiologi*. Penerbit Buku Kedokteran: Jakarta.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principle and Procedure*. USA. Elsevier Inc.
- Skoog, T., W., Boquist, S., Andersson, S., Karpe, F., Tang, R., Bond, M.G., Faire, U., Nilsson, J., Eriksson, P and Hamsten, A. 2012. Plasma Tumour Necrosis Factor Early Carotid Atherosclerosis in Healthy Middle Aged Men. *Eur Heart J*. 23: 376-383.
- Smith.J.B., dan S.Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakkan, Dan Penggunaan Hewan Percobaan Di Daerah Tropis*. Universitas Indonesia Press, Jakarta
- Soeharto, I. 2001. Pencegahan dan Penyembuhan Penyakit Jantung Koroner Panduan Bagi Masyarakat Umum. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama: Jakarta.
- Surono, I. S. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Yayasan Pengusaha Makanan dan Minuman Seluruh Indonesia (YAPMMI). Jakarta.
- Suryohudoyo. 2000. *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*. CV Sagung Seto Jakarta.
- Tapan, e. 2005. *Penyakit Degeneratif*. Alex Media Komputindo : Jakarta.
- Xenoulis P. G., and J. M. Steiner. 2008. *Lipid Metabolism and Hyperlipidemia In Dogs*. Gastrointestinal Laboratory, Departement of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary medicine and Biomedical Sciences.
- Xenoulis P. G., Suchodolski, J. S., Levinski, m. D., Steiner, J. M. 2007. Investigation of Hypertriglyceridemia in Healthy Miniature Schnauzers. *Journal of Veterinaty Internal Medicine* 6: 1224-1230.