

**TERAPI YOGURT SUSU KAMBING TERHADAP
KADAR *MALONDIALDEHYDE (MDA)* DAN
EKSPRESI *TUMOR NECROSIS FACTOR
ALPHA (TNF α)* PADA GINJAL TIKUS
(*Rattus norvegicus*) MODEL
HIPERKOLESTEROLEMIA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran
Hewan

Oleh:

ANINDYA NURRACHMI KUSUMANINGTYAS

105130101111011



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2015

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

TERAPI YOGHURT SUSU KAMBING TERHADAP KADAR MALONDIALDEHYDE (MDA) DAN EKSPRESI TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF α) PADA GINJAL TIKUS *(Rattus norvegicus)* MODEL HIPERKOLESTEROLEMIA

Oleh:

ANINDYA NURRACHMI KUSUSMANINGTYAS

NIM. 105130101111011

Setelah dipertahankan didepan Majelis Pengaji

pada tanggal 15 Januari 2015

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing 1

Pembimbing 2

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

NIP. 196009031988022001

drh.Dyah Ayu Oktavianie A.P.,M.Biotech

NIP. 198410262008122004

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan

UniversitasBrawijaya

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

NIP 196009031988022001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Anindya Nurrachmi Kusumaningtyas
NIM : 105130101111011
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi Berjudul : Terapi Yoghurt Susu Kambing terhadap Kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha*(TNF α) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipercolesterolemia

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran,

Malang 15 Januari 2015
Yang menyatakan,

(Anindya Nurrachmi K)
105130101111011

**Terapi Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar *Malondialdehid* (MDA) dan
Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α) pada
Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*)
Model Hiperkolesterolemia**

ABSTRAK

Hiperkolesterolemia merupakan kondisi adanya peningkatan kolesterol dalam darah. Keadaan hiperkolesterolemia memicu peningkatan radikal bebas dan stres oksidatif. Yoghurt susu kambing diketahui memiliki kandungan peptida α laktobumin dan α kasein yang berpotensi sebagai antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh yoghurt susu kambing untuk menurunkan kadar MDA dan ekspresi TNF α ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) model hiperkolesterolemia. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini tikus (*Rattus norvegicus*) jantan umur 10-12 minggu, dengan rata-rata bobot badan 100-150 g, dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan: kelompok kontrol, kelompok hiperkolesterolemia, dan 3 kelompok terapi dengan dosis 300mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB. Pemberian diet tinggi kolesterol berupa pakan yang mengandung minyak babi, asam kholat dan kuning telur puyuh rebus diberikan melalui metode sonde lambung dan diberikan selama 2 minggu. Terapi yoghurt susu kambing dalam bentuk *freeze dry* dengan konsentrasi 10^9 cfu/mL diberikan selama 4 minggu. Kadar MDA diukur dengan metode TBA dan ekspresi TNF α diamati dengan metode imunohistokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi yoghurt susu kambing secara signifikan ($p<0,05$) mampu menurunkan kadar MDA dan ekspresi TNF α . Dosis 900 mg/kg BB merupakan dosis efektif dengan persentasi penurunan kadar MDA sebesar 42,02% dan ekspresi TNF α sebesar 71,65 %. Kesimpulan dari penelitian ini terapi yoghurt susu kambing dapat digunakan sebagai alternatif terapi hiperkolesterolemia.

Kata Kunci : Hiperkolesterolemia, Yoghurt Susu Kambing, MDA, TNF α



The Effect of Goat Milk Yogurt Therapy on Malondialdehyde (MDA) Levels and Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) Expression in Kidney of Hypercholesterolemic Rat (*Rattus norvegicus*) Model

ABSTRACT

Hypercholesterolemia is a condition of high cholesterol level in blood. Hypercholesterolemia triggers increasing of free radical and oxidative stress. Goat milk yogurt contains bioactive peptide such as α lactobumin and α casein that used as an antioxidant. The aim of this research was to determine the potency of goat milk yogurt as hypercholesterolemia therapy based on MDA levels and TNF α expression in kidney of hypercholesterolemic rats. This research used male rats (*Rattus norvegicus*) with range of age 10-12 weeks and weight average of 100-150g which divided into 5 groups: control group, hypercholesterolemia group, and goat milk yoghurt therapy of 300 mg/kg BW, 600 mg/kg BW, and 900 mg/kg BW. Hypercholesterolemic condition induced by high fat diet contains of lard, cholid acid, and boiled quail egg yolks during 2 weeks orally. The therapy used goat milk yogurt concentration of 10^9 cfu/mL during 4 weeks at dosage of 300 mg/kg BW, 600 mg/kg BW, and 900 mg/kg BW. The MDA levels were measured by TBA method and TNF α expression observed by immunohistochemistry. The result showed that goat milk yogurt therapy significantly ($p<0.05$) decreased MDA levels and TNF α expression. The dose of 900 mg/kg BW was an effective dose that could decreased MDA levels to 42.02% and expression of TNF α to 71.65% compared to control group. These result provide that goat milk yogurt could be used as an alternative therapy for hypercholesterolemia.

Keywords: Hypercholesterolemia, Goat Milk Yogurt, MDA, TNF α



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul Pengaruh Terapi Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar *Malondialdehid* (MDA) dan Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipercolesterolemia. Penelitian ini merupakan bagian dari payung penelitian yang diketuai oleh Prof.Dr.Ir.Chanif Mahdi, MS.

Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi sebagian syarat memperoleh gelar sarjana kedokteran hewan bagi mahasiswa program S1 pada program studi pendidikan dokter hewan Universitas Brawijaya Malang. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh sebab itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini.

Selesainya skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, sehingga pada kesempatan ini, penulis dengan segala kerendahan hati dan penuh rasa hormat mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan secara langsung maupun tidak langsung kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini hingga selesai, terutama kepada yang penulis hormati:

1. Prof.Dr.Aulanni'am,drh.,DES dan drh.Dyah Ayu Oktavianie A.P.,M.Biotech selaku dosen pembimbing atas bimbingan, kesabaran, waktu serta seluruh motivasi yang telah diberikan selama ini.
2. Dyah Kinasih Wuragil,S.Si.,MP.,MSc dan drh.Ani Setianingrum selaku dosen penguji atas segala saran, kesabaran, bantuan, serta motivasi yang telah diberikan selama ini.
3. Prof.Dr.Ir.Chanif Mahdi, MS dan drh. Masdiana C Padaga, .M.App.Sc atas kesempatan bergabung dalam penelitian ini.



4. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, MS selaku ketua Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas fasilitas dan kemudahan yang diberikan.
5. Ibu Dra. Suparmi, Bapak Sudarno serta adik Bagaskoro Rasyid.W atas doa, kasih sayang, serta pengorbanan baik moril maupun materi yang telah diberikan.
6. Seluruh teman-teman kelompok penelitian yoghurt susu kambing 2010 atas bantuan dan motivasinya.
7. Seluruh staf serta asisten laboratorium Biokimia dan Laboratorium Fisiologi Hewan FMIPA UB yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian.
8. Beanty P.S, Tyas Wahyuli, Rima M.H, Anne H.P, Vivi Shofia, Kertas 58 dan seluruh teman-teman angkatan 2010 PKH UB atas doa dan motivasinya untuk tetap semangat menyelesaikan penulisan penelitian ini.

Saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada semua pihak dan semoga penulisan skripsi ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang 1 Juli 2014

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Definisi dan Etiologi Hiperkolesterolemia.....	6
2.2 Patomekanisme Hiperkolesterolemia	8
2.3 Patomekanisme Hiperkolesterolemia terhadap Ginjal.....	9
2.4 Hewan Model Hiperkolesterolemia.....	11
2.5 Yoghurt Susu Kambing	12
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	16
3.1 Kerangka Koseptual	16
3.2 Hipotesis Penelitian	18
BAB 4 METODOOGI PENELITIAN.....	19
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	19
4.2 Alat dan Bahan.....	19
4.3 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba.....	20
4.4 Tahapan Penelitian.....	21
4.5 Prosedur Kerja Penelitian.....	22
4.5.1 Penentuan Dosis dan Pembuatan Diet Hiperkolesterol.....	22
4.5.2 Penentuan Dosis dan Pembuatan yogurt susu kambing.....	22
4.5.2.1 Pembuatan Starter.....	22
4.5.2.2 Pembuatan Yoghurt.....	23
4.5.2.3 <i>Freeze Dry</i> Yoghurt Susu Kambing.....	23
4.5.2.4 Perhitungan Dosis Yoghurt Susu Kambing.....	24
4.5.3 Induksi Diet Hiperkolesterol dan Terapi Yoghurt Susu Kambing	24
4.5.3.1 Induksi Diet Hiperkolesterol	24



4.5.3.2 Terapi Yoghurt Susu Kambing.....	25
4.5.4 Pengambilan Organ Ginjal.....	25
4.5.5 Pengukuran Kadar Malondialdeida (MDA).....	26
4.5.5.1 Pembuatan kurva standar MDA.....	26
4.5.5.2 Pengukuran Kadar MDA.....	26
4.5.6 Pembuatan Preparat Imunohistokimia dan Pengamatan Ekspresi TNF α	27
4.5.7 Analisa Data.....	28
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
5.1 Pengaruh Terapi Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar <i>Malondialdehid</i> (MDA) pada Ginjal Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Hipercolesterolemia.....	29
5.2 Pengaruh Terapi Yoghurt Susu Kambing Terhadap Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) pada Ginjal Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Hipercolesterolemia.....	32
BAB 6 PENUTUP.....	39
6.1 Kesimpulan.....	39
6.2 Saran.....	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	44



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Perbandingan Komposisi Susu Sapi, Kambing, dan Manusia.....	13
Tabel 4.1 Rancangan Penelitian.....	20
Tabel 5.1 Rata-rata kadar Malondialdehid (MDA) pada hewan.....	29
Tabel 5.2 Rata-rata ekspresi TNF α pada hewan.....	35



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Histologi Ginjal Normal.....	10
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	16
Gambar 5.2 Ekspresi <i>tumor necrosis factor alpha</i> (TNF α) pada ginjal tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) model hipercolesterolemia.....	33



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat laik etik.....	44
2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian.....	45
3. Pembuatan pakan diet hiperkolesterol.....	46
4. Perhitungan Dosis Terapi yoghurt Susu Kambing.....	47
5. Diagram alir pembuatan yoghurt.....	48
6. Koleksi Serum Dan Pengambilan Organ Ginjal.....	49
7. Pembuatan Kurva Standar MDA.....	50
8. Pengukuran Kadar Malondialdehid (MDA) menggunakan uji TBA.....	51
9. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum MDA.....	52
10. Pembuatan Kurva Baku MDA.....	53
11. Data dan Uji Statistika Kadar MDA.....	56
12. Metode Imunohistokimia.....	59
13. Data dan Uji Statistika Ekspresi TNF α	60



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

BAL	:	Bakteri Asam Laktat
MDA	:	<i>Malondialdehid</i>
TNF α	:	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
LDL	:	<i>Low Density Lipoprotein</i>
HDL	:	<i>High Density Lipoprotein</i>
IDL	:	<i>Intermediate Density Lipoprotein</i>
VLDL	:	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
VCAM-1	:	<i>Vascular Cell Adhesion Protein-1</i>
MCP-1	:	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i>
PBS	:	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	:	<i>Paraformaldehyde</i>
PUFA	:	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
MUFA	:	<i>monounsaturated fatty acids</i>
RAL	:	Rancangan Acak Lengkap
BB	:	Berat Badan
MCT	:	<i>Medium Chain Triglycerides</i>
LCT	:	<i>Long Chain Triglycerides</i>
BSH	:	<i>Bile Salt Hydrolase</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hiperkolesterolemia adalah suatu keadaan dimana terjadi peningkatan kadar kolesterol dalam plasma darah. Kejadian hiperkolesterolemia dipicu oleh pola hidup yang tidak baik seperti jarang berolahraga dan mengkonsumsi makanan yang tidak sehat (Tomkin, 2012). Normalnya, batas kadar kolesterol total pada manusia adalah 200 mg/dL (Stapleton, 2010) dan pada tikus 10-54/dL (Hariri, 2009). Peningkatan lipoprotein LDL dan Trigliserida berkorelasi dengan kejadian penyakit mikroalbuminuria. Mikroalbuminuria adalah peningkatan ekskresi albumin dalam urin lebih besar dari kadar normal (Achmad, 2001). Prevalensi kejadian kasus penyakit mikroalbuminuria pada anjing dan kucing adalah 25%. Kejadian mikroalbuminuria meningkat 36% pada anjing 9-11 tahun, 49% pada anjing \geq 12 tahun, 39% pada kucing \geq 12 tahun, dan 65% pada kucing \geq 16 tahun (Littman, 2011).

Pada kasus hiperkolesterolemia, terjadi ganguan metabolisme kolesterol. Tubuh akan mengubah kolesterol menjadi asam empedu yang pada prosesnya akan menghasilkan radikal bebas (Norlin, 2000). Radikal bebas yang berlebihan akan mengoksidasi LDL dan memicu respon inflamasi serta dapat merusak endotel. Peroksidasi lipid oleh radikal bebas akan meningkatkan senyawa aldehid bersifat toksik salah satunya MDA (*Malondialdehid*) (Murray *et al.* dalam Ismawati, 2012). Respon inflamasi

akibat oksidasi LDL yang muncul salah satunya adalah produksi sitokin proinflamasi TNF α (Chapman, 2006). Kerusakan endotel akibat oksidasi LDL dapat terjadi pada glomerulus ginjal yang tersusun dari jaringan vaskuler, sehingga terjadi peningkatan permeabilitas pembuluh kapiler terhadap makromolekul seperti albumin (Achmad, 2001).

Terapi farmakologis dengan menggunakan statin untuk mengatasi hipercolesterolemia, secara rutin dapat menurunkan sintesis kolesterol total dan LDL di hati. Statin bekerja dengan cara menghambat enzim yang mensintesis kolesterol. Penggunaan statin dalam jangka panjang dapat memunculkan efek samping seperti miopati dan keluhan gastrointestinal (Isbandiyah, 2010).

Pemanfaatan kambing peranakan etawah (PE) sebagai sumber air susu kurang dominan di Indonesia dibandingkan dengan pemanfaatannya sebagai sumber daging (Anonymous, 2014). Susu kambing diketahui memiliki beberapa keunggulan dibandingkan susu sapi diantaranya memiliki kadar laktosa yang lebih rendah dibandingkan susu sapi, sehingga baik untuk penderita intoleransi laktosa (Potocnik, 2011). Kandungan peptida susu kambing diketahui memiliki potensi sebagai antioksidan yakni α laktobumin dan α kasein. Kandungan vitamin C dan E pada susu kambing juga berpotensi sebagai sumber antioksidan. Yoghurt yang merupakan salah satu produk olahan susu yang dibuat dengan cara memfermentasikan susu dengan BAL (bakteri asam laktat), memiliki banyak manfaat diantaranya dapat mengeluarkan biopeptida aktif pada susu melalui proteolisis oleh mikroba

(Karhonen, 2006) dan mengurangi kadar kolesterol dalam serum (Hattingh, 2001). Bakteri Asam Laktat (BAL) didalam yoghurt dapat memproduksi enzim BSH (*Bile Salt Hydrolase*) yang dapat mendekonjugasi asam empedu sehingga asam empedu tidak diserap kembali oleh usus. Tidak terjadinya penyerapan kembali asam empedu akan membuat tubuh mengambil kolesterol dari serum sehingga kadar kolesterol dalam serum akan turun (Begley, 2006).

Berdasarkan latar belakang diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi yoghurt susu kambing dalam menurunkan kadar MDA dan ekspresi TNF α pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) model hiperkolesterolemia.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat penurunan kadar MDA pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) model hiperkolesterolemia hasil induksi diet kolesterol pasca terapi yogurt susu kambing?
2. Apakah terdapat penurunan ekspresi TNF α pada jaringan ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) model hiperkolesterolemia hasil induksi diet kolesterol pasca terapi yogurt susu kambing?

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar umur 10-12 minggu dengan berat badan rata-rata 100-150 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan

(UPHP) UGM Yogyakarta yang telah mendapatkan persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 217-KEP-UB (Lampiran 1).

2. Keadaan hiperkolesterolemia didapatkan dengan memberikan diet hiperkolesterol berupa kuning telur puyuh 1 g, minyak babi 2 g, dan asam kholat 0,02 g per ekor tikus dengan penambahan aquadest sampai 2 ml selama 2 minggu berturut-turut secara sonde lambung (Gani, 2013).
3. Yoghurt susu kambing dibuat dari susu kambing peranakan etawah yang diperoleh dari Balai Besar Pelatihan Peternakan Songgoriti Batu dengan starter yoghurt yang mengandung bakteri *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, dan *Streptococcus thermophilus* (Yogourmet, Lyo San Inc, 500 Aeroparc, C.P 598, Lachute, Qc, Canada, J8H 4G4) yang didapat dari laboratorium Kesehatan Masyarakat Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dengan konsentrasi 10^9 cfu/ml.
4. Terapi yoghurt susu kambing pada hewan model hiperkolesterolemia diberikan dalam bentuk *freeze dry* dengan dosis 300 mg/kg BB (Jafari, 2009), 600 mg/kg BB (Tamime and Robbinson, 2007) , dan 900 mg/kg BB sebanyak 1,5 ml yang dilarutkan dengan akuades dan diberikan selama 4 minggu (Hirano *et al.*, 1999) berturut-turut secara sonde lambung.
5. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar MDA dan ekspresi TNF α . Kadar MDA diukur dengan metode TBA menggunakan spektofotometer UV-Vis dengan kurva baku MDA. Ekspresi TNF α diamati dengan metode imunohistokimia pada preparat organ ginjal tikus.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui potensi terapi yogurt susu kambing untuk menurunkan kadar MDA ginjal tikus hiperkolesterolemia.
2. Mengetahui potensi terapi yogurt susu kambing untuk menurunkan ekspresi TNF α ginjal tikus hiperkolesterolemia.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi tentang manfaat yogurt susu kambing sebagai pengobatan alternatif hiperkolesterolemia sehingga dapat menjadi dasar dalam pembuatan obat untuk menurunkan kadar kolesterol dalam darah.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Definisi dan Etiologi Hiperkolesterolemia

Menurut Stapleton (2010), Hiperkolesterolemia adalah suatu keadaan dimana terjadi peningkatan kadar kolesterol dalam plasma darah. Kolesterol adalah salah satu jenis lipid pada plasma yang penting dalam proses sistesis membran sel, hormon steroid dan asam empedu. Lipid tidak dapat larut dalam plasma sehingga untuk dapat larut harus berikatan dengan apoprotein membentuk lipoprotein. Jenis lipoprotein tersebut adalah *high density lipoprotein* (HDL), *low density lipoprotein* (LDL), *intermediate density lipoprotein* (IDL), *very low density lipoprotein* (VLDL), dan kilomikron.

Lemak yang terdapat pada makanan, akan dicerna disaluran pencernaan menjadi trigliserida, kolesterol, asam lemak bebas, dan fosfolipid. Partikel tadi akan berikatan dengan apoprotein membentuk kilomikron. Kilomikron yang diserap, akan beredar menuju hati, sebagian diekskresikan dalam bentuk asam empedu, dan sebagian lainnya membentuk VLDL. Ekskresi asam empedu akan dikeluarkan bersama feses, tetapi sebagian asam empedu diserap kembali dan dibawa ke hati untuk mempertahankan kadar kolesterol tubuh. *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) akan membentuk LDL dengan perantara IDL, dan LDL akan membawa kolesterol ke jaringan perifer. Sisa kolesterol di perifer akan berikatan dengan HDL dan dibawa lagi menuju hati agar tidak terjadi penumpukan di jaringan (Tomkin, 2012).

Low density lipoprotein (LDL) mengandung apolipoprotein B 100 (apo B) yang merupakan protein utama dalam partikel lipoprotein. Apolipoprotein B berfungsi sebagai *receptor interaction* LDL dengan reseptor apo B dan apo E serta berfungsi juga untuk menjaga integritas dari struktur LDL (Pusparini, 2006). Kelainan dalam metabolisme apolipoprotein B berkorelasi dengan peningkatan resiko penyakit jantung koroner dan hiperlipidemia (Packard, 2000).

Kadar HDL yang tinggi berkorelasi dengan penurunan resiko penyakit kardiovaskuler karena terjadi proses *reverse cholesterol transport* yakni HDL membawa kolesterol ke jaringan dan kemudian dibawa kembali ke hati untuk diekskresikan, sehingga tidak terjadi penumpukan kolesterol di jaringan. Sebaliknya, kadar LDL yang tinggi justru berkorelasi dengan peningkatan resiko penyakit kardiovaskuler. Pada kasus hiperkolesterolemia, LDL yang terlalu tinggi di sirkulasi, dapat terjebak di dalam intima dan mengalami proses oksidasi. Proses oksidasi ini akan menyebabkan terbentuknya plak yang akhirnya menyebabkan aterosklerosis. *Intermediate Density Lipoprotein* (IDL), VLDL, dan kilomikron berperan dalam resiko penyakit pembuluh darah perifer dan penyakit arteri koroner (Stapleton, 2010). Kadar HDL dalam plasma darah tikus normalnya ≥ 35 mg/dL (Schaerfer *et al.* dalam Hartoyo *et al.*, 2008), sedangkan kadar LDL dalam plasma darah tikus normalnya 7-27,2 mg/dL (Herwiyarirasanta, 2010).

2.2 Patomekanisme Hiperkolesterolemia

Pada keadaan hiperkolesterolemia, tubuh akan berusaha menyeimbangkan kadar kolesterol dalam plasma dengan mengubah kolesterol menjadi asam empedu. Sintesis asam empedu melibatkan enzim mikrosomal 7α -hidroksilasi yang memerlukan sitokrom P-450, oksigen, dan NADPH. Semakin banyak asam empedu yang disintesis, semakin tinggi pula aktivitas sitokrom P-450 dan oksigen yang diperlukan. Peningkatan sintesis asam empedu akan meningkatkan produksi radikal bebas sebagai hasil sampingan hiperkolesterolemia. Produksi radikal bebas yang berlebihan mengakibatkan enzim antioksidan tidak mampu mengatasi radikal bebas. Radikal bebas akan terus terbentuk dan ikut mengoksidasi LDL (Norlin, 2000).

Radikal bebas adalah molekul yang tidak stabil dan reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Agar dapat stabil, radikal bebas bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Efek radikal bebas dalam tubuh akan dinetralisir oleh antioksidan dengan beberapa mekanisme, salah satunya dengan melengkapi kekurangan elektron radikal bebas (Oka, 1999).

Ketidakseimbangan antara antioksidan dengan radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif. Lipid pada LDL akan mudah dioksidasi oleh radikal bebas, kemudian akan difagositosis oleh makrofag yang akhirnya membentuk sel busa. Stress oksidatif akan meningkat karena pada proses fagositosis ini produksi radikal bebas juga akan meningkat. Peroksidasi lipid oleh radikal bebas pada membran sel yang mengandung

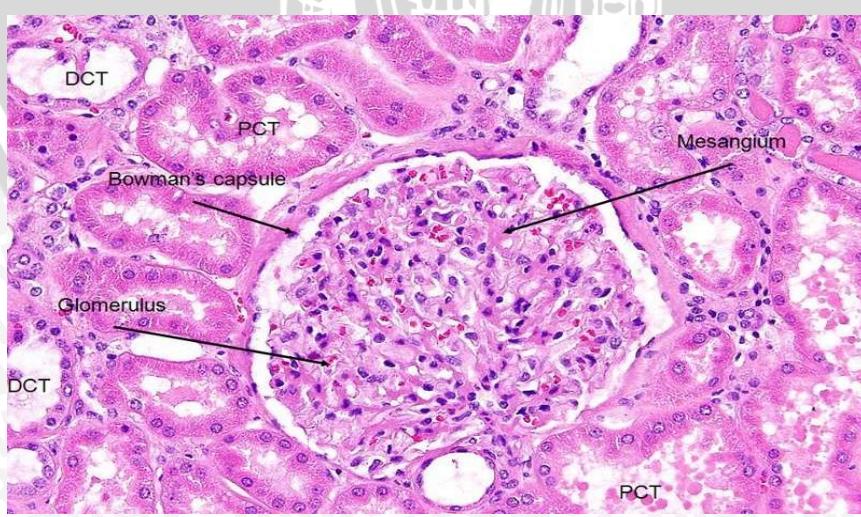
komponen lemak jenuh (PUFA), akan memutuskan rantai asam lemak menjadi senyawa yang bersifat toksik pada sel seperti MDA (Murray *et al.* dalam ismawati, 2012). *Malondialdehid* (MDA) adalah senyawa reaktif hasil akhir peroksidasi lipid sehingga keberadaanya dapat digunakan untuk mengukur stres oksidatif (Arkhaesi, 2008).

Low Density Lipoprotein (LDL) yang teroksidasi oleh radikal bebas memiliki potensi merusak endotel, sehingga endotel jadi lebih permabel terhadap lipoprotein dan makromolekul. *Low Density Lipoprotein* (LDL) dapat berpenetrasi ke dinding vaskuler. Oksidasi LDL merangsang ekspresi molekul adhesi yakni *Vaskuler Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) dan molekul kemokin yakni *Monocyte Chemotactic Protein-1* (MCP-1) yang dapat menarik monosit dan berdiferensiasi jadi makrofag. Fagositosis LDL yang teroksidasi oleh makrofag akan membentuk *foam cell*. Selain memproduksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada proses fagositosis, makrofag juga memicu respon inflamasi dengan memproduksi sitokin proinflamasi seperti TNF α (Chapman, 2006). Sitokin proinflamasi seperti TNF α bertanggung jawab terhadap respon inflamasi akut maupun kronik sehingga kehadirannya dapat digunakan sebagai salah satu marker biologis jika terjadi keradangan.

2.3 Patomekanisme Hiperkolesterolemia Terhadap Ginjal

Peningkatan kadar kolesterol dalam darah pada hiperkolesterolemia, tidak menunjukkan gejala yang spesifik (Jawi, 2011). Namun pada kondisi tersebut, kadar LDL yang tinggi disertai dengan peningkatan radikal bebas

dalam darah akan menyebabkan oksidasi LDL yang akhirnya menyebabkan mikroalbuminurea. Pada keadaan hiperkolesterolemia, akan terjadi infiltrasi LDL melalui endotel pembuluh darah pada kapiler glomerulus ginjal, sehingga terbentuk akumulasi LDL dalam tunika intima, dimana LDL akan mengalami proses oksidasi oleh radikal bebas. *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang teroksidasi bersifat toksik dan akan menimbulkan proses inflamasi. *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang teroksidasi akan difagosit oleh makrofag, kemudian akan diproduksi mediator proinflamasi yang akhirnya akan menyebabkan lesi pada pembuluh kapiler glomerulus. Sel mesangiel yang mengelilingi pembuluh kapiler pada glomerulus akan mengalami gangguan pada sifat kontraktilitasnya, yang menyebabkan gangguan ukuran atau muatan molekul pada saat filtrasi sehingga makromolekul seperti albumin dapat masuk dan dapat ditemukan pada urin dalam jumlah yang besar yakni ≥ 30 mg/24 jam sampai dengan ≤ 300 mg/24 jam pada manusia (Achmad, 2001).



Gambar 2.1 Histologi Ginjal Normal (AUA, 2014)

2.4 Hewan Model Hiperkolesterolemia

Tikus (*Rattus norvegicus*) telah banyak digunakan dalam penelitian medis dan penelitian tentang tingkah laku karena kemampuannya beradaptasi dengan cepat dan pemeliharaannya yang mudah (Armitage, 2004). Struktur anatomi esofagus yang panjang menjadi penyebab tikus tidak dapat muntah, sehingga akan mempermudah pada proses penyondean obat ke lambung (Horn, 2013). Klasifikasi dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) menurut Armitage (2004) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Murinade
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus dewasa memiliki berat badan berkisar antara 140 sampai 500 gram dengan jangka hidup maksimal 4 tahun. Dewasa kelamin pada tikus jantan adalah pada umur 3 bulan, sedangkan pada betina umur 4 bulan. Fase kebuntingan tikus berlangsung selama 22 sampai 24 hari dan disapih mulai dari umur 3 sampai 4 minggu (Armitage, 2004).

Hewan coba hiperkolesterolemia didapatkan dengan melakukan pemberian diet hiperkolesterolemia pada *Rattus norvegicus*. Diet hiperkolesterolemia terdiri dari kuning telur puyuh, minyak babi, dan asam

kholat. Pemberian diet hiperkolesterolemia selama 14 hari akan menyebabkan gangguan metabolisme kolesterol dalam tubuh. Tergangunya metabolisme kolesterol dalam tubuh akan mengakibatkan hiperkolesterolemia (Gani, 2013).

2.5 Yoghurt Susu Kambing

Yoghurt adalah produk yang didapatkan dari proses fermentasi susu dan atau susu rekonstitusi dengan menggunakan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dan atau bateri asam laktat yang sesuai, dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan tambahan pangan yang diizinkan (SNI, 2009). Bakteri Asam Laktat (BAL) yang ditambahkan dalam proses fermentasi, akan mengubah laktosa pada susu menjadi asam laktat, sehingga akan menurunkan pH susu dari 6,8 menjadi 4,6 yang dapat meningkatkan daya simpan susu (Tamime, 2002).

Yoghurt dapat dibuat dari berbagai spesies ternak, salah satunya adalah kambing. Kambing perah yang banyak dikembangkan di Indonesia umumnya adalah kambing peranakan etawah (PE) yang lebih dominan sebagai sumber daging dibandingkan dengan sumber air susu, sehingga pemanfaatan susu kambing PE belum maksimal (Anonimous, 2014). Susu kambing memiliki komposisi kimia yang lebih baik dibandingkan susu sapi yakni protein 34 g/kg dan lemak 41 g/kg pada susu kambing, sedangkan pada susu sapi protein 32,5 g/kg dan lemak 36,1 g/kg.

Walaupun mengandung lemak yang lebih tinggi, lemak pada susu kambing tinggi akan MCT (*medium chain triglycerides*) yang lebih mudah

dicerna dibandingkan LCT (*long chain triglycerides*) pada susu sapi (Haenlein, 2004). Keunggulan susu kambing lainnya adalah kadar laktosa pada susu kambing yang lebih rendah dibandingkan dengan susu sapi. Kadar laktosa yang rendah dapat membantu penderita yang mengalami intoleransi terhadap laktosa karena pada penderita intoleransi laktosa, terjadi gangguan metabolisme laktosa. Perbandingan Komposisi Susu Sapi, Kambing, dan Manusia tertera pada **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1 Perbandingan Komposisi Susu Sapi, Kambing, dan Manusia (Potocnik, 2011)

Komponen	Sapi	Kambing	Manusia
Lemak g/kg	36,1	41	36,4
Protein kasar g/kg	32,5	34	14,2
Laktosa g/kg	48,8	47	67,0

Kandungan peptida α laktobumin dan α kasein serta vitamin E dan C pada susu kambing menambah keunggulan dari susu kambing. Peptida α laktobumin dan α kasein memiliki potensi sebagai antioksidan (Ebringer *et al.*, 2014). Peptida ini bekerja dengan menangkap senyawa ROS (*Reactive Oxygen Species*) seperti superoksida dan radikal hidroksil pada kedaan stres oksidatif (Chakrabarti *et al.*, 2014). Vitamin E dan C diketahui memiliki potensi yang sama sebagai antioksidan yang dapat menetralisir efek dari radikal bebas yang berlebih.

Fermentasi susu dengan bakteri asam laktat merupakan salah satu cara untuk mengeluarkan biopeptida aktif pada susu melalui proteolisis oleh mikroba sehingga biopeptida dapat aktif (Karhonen, 2006). Konsumsi yoghurt yang mengadung probiotik memiliki beberapa manfaat yakni untuk mengontrol infeksi saluran pencernaan dengan produksi substansi yang bersifat antimikroba, menstimulasi sistem imun dengan sifat kompetitif terhadap bakteri patogen, mengurangi intoleransi laktosa dengan produksi β -D-galaktosidase yang dapat menghidrolisis laktosa, dan mengurangi kadar kolesterol dalam serum (Hattingh, 2001). Bakteri asam laktat (BAL) dapat memproduksu enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH), yang dapat mendekonjugasi garam empedu yang menyebabkan asam empedu tidak mudah diserap kembali oleh usus dibandingkan dengan asam empedu konjugasi. Asam empedu dekonjugasi akan terbuang bersama feses sehingga jumlah asam empedu yang kembali ke hati akan berkurang. Tubuh akan menyeimbangkan asam empedu dengan menggunakan kolesterol dalam darah sebagai prekursor, sehingga kadar kolesterol akan turun (Begley, 2006).

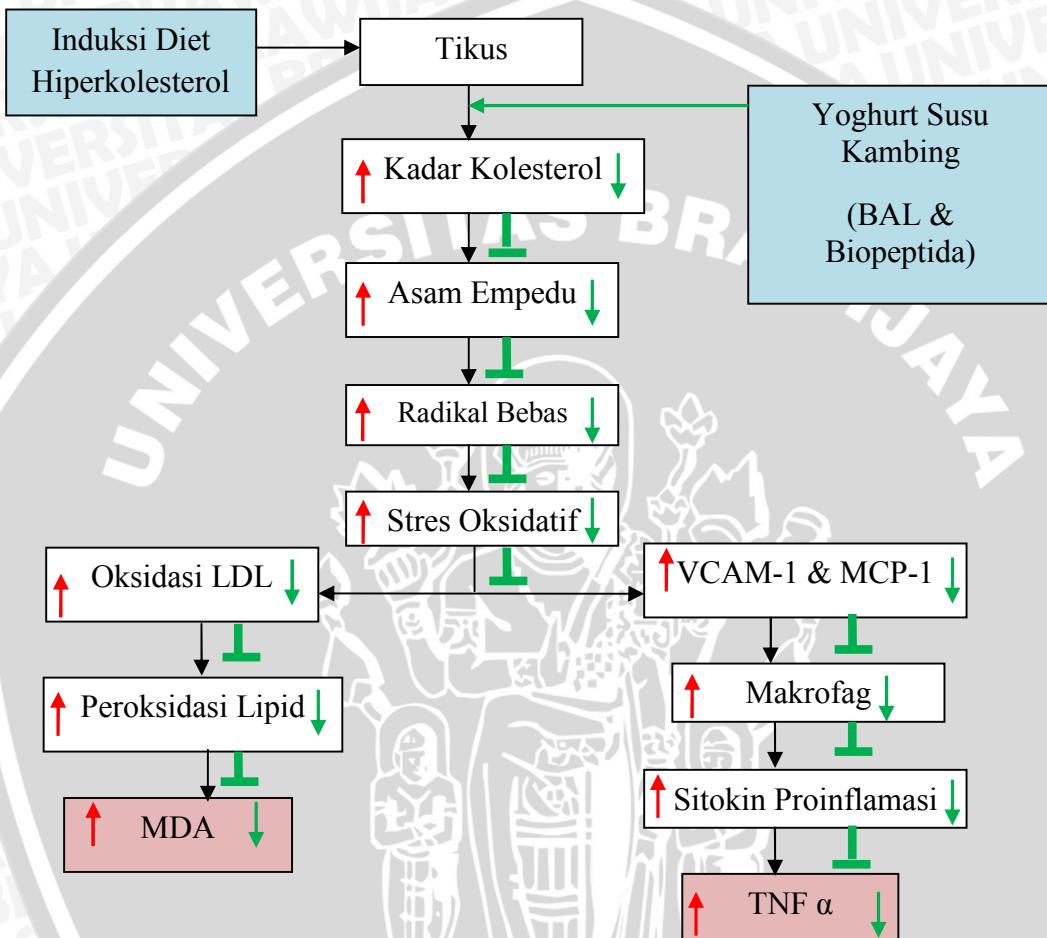
Mekanisme BSH dalam mendekonjugasi asam empedu adalah BSH dapat menghidrolisis ikatan C-24 N-acyl amida yang terbentuk diantara asam empedu dan asam amino pada garam empedu terkonjugasi sehingga garam empedu terdekonjugasi memiliki tingkat kelarutan rendah dan mudah diserap mukosa usus untuk kembali kehati melalui peredaran darah. Kemudian terjadi proses dehidrosilasi 7 alfa yang dapat mengubah garam empedu terdekonjugasi menjadi asam empedu sekunder. Asam empedu sekunder

memiliki tingkat kelarutan yang sangat rendah sehingga hanya sebagian kecil asam empedu sekunder yang diserap mukosa usus dan sebagian besar terbuang bersama feses (Astuti, 2010).

Selain mekanisme dekonjugasi asam empedu, proses asimilasi kolesterol oleh bakteri asam laktat juga berperan dalam menurunkan kadar kolesterol. Aktifitas fermentasi BAL menyebabkan turunnya pH menjadi lebih asam yang menyebabkan terjadinya pemisahan antara LDL dengan reseptornya, kemudian LDL diuraikan menjadi asam amino, kolesterol, dan asam lemak bebas. Kemudian terjadi asimilasi kolesterol, yakni kolesterol berikatan dengan membran seluler BAL dalam bentuk peptidoglikan. Akibatnya, kadar kolesterol dalam tubuh akan berkurang (Pratama, 2012).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan gambar:

: Variabel Bebas

: Variabel Tergantung

→ : Mekanisme Induksi Diet Hiperkolesterol

↓ : Menghambat

↑↓ : Efek pemberian Terapi Yoghurt Susu Kambing

↑↓ : Efek Diet Hiperkolesterol



Pemberian diet tinggi kolesterol selama dua minggu pada hewan model tikus akan menyebabkan hiperkolesterolemia karena terjadi gangguan metabolisme kolesterol. Tubuh akan banyak mengubah kolesterol menjadi asam empedu. Sintesis asam empedu pada prosesnya akan menghasilkan radikal bebas. Pada kondisi hiperkolesterolemia, radikal bebas yang meningkat akan mengoksidasi LDL. *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang teroksidasi bersifat toksik dan menimbulkan inflamasi. Radikal bebas yang meningkat menyebabkan meningkatnya proses peroksidasi lipid pada membran sel yang mengandung *Polyunsaturated fatty acids* (PUFA). Radikal bebas akan memutuskan rantai asam lemak menjadi senyawa yang bersifat toksik pada sel seperti MDA. Oksidasi LDL juga akan mengaktifasi molekul *Nuclear Factor kB* (NF-kB) dengan cara melepaskan ikatan antara NF-kB dengan inhibitornya I κ B. *Nuclear Factor kB* (NF-kB) akan merangsang ekspresi molekul adhesi VCAM-1 dan molekul kemokin MCP-1 yang dapat menarik monosit dan berdiferensiasi menjadi makrofag yang akan memfagositosis LDL yang teroksidasi. Makrofag merangsang produksi sitokin proinflamasi seperti TNF α . *Low Density Lipoprotein* yang teroksidasi oleh radikal bebas akan menyebabkan inflamasi sehingga dapat merusak endotel pembuluh darah di glomerulus, sehingga endotel menjadi lebih permisif terhadap makromolekul. *Low Density Lipoprotein* yang teroksidasi dapat berpenetrasi ke dinding endotel di glomerulus ginjal yang tersusun dari jaringan kapiler sehingga peningkatan kadar MDA dan ekspresi TNF α dapat ditemukan di ginjal.

Salah satu cara untuk terapi hiperkolesterolemia adalah dengan mengurangi kadar kolesterol dalam serum. Bakteri asam laktat (BAL) yang terkandung dalam yoghurt susu kambing dapat memproduksi enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH). Enzim BSH dapat mendekonjugasi garam empedu yang menyebabkan asam empedu tidak mudah diserap kembali oleh usus dibandingkan asam empedu konjugasi. Asam empedu dekonjugasi akan terbuang bersama feses sehingga jumlah asam empedu yang kembali ke hati akan berkurang. Tubuh akan menyeimbangkan asam empedu dengan menggunakan kolesterol dalam darah sebagai prekursor, sehingga kadar kolesterol dalam serum akan turun. Biopeptida dan vitamin pada yoghurt susu kambing menjadi antioksidan dengan menagkap senyawa radikal bebas pada keadaan stres oksidatif sehingga terjadi penurunan radikal bebas. Penurunan kadar kolesterol akan menurunkan sintesis asam empedu dan radikal bebas sebagai produk sampingannya, sehingga akan menurunkan kadar MDA dan ekspresi TNF α .

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah pemberian terapi yoghurt susu kambing pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hiperkolesterolemia dapat menurunkan kadar MDA dan menurunkan ekspresi TNF α pada organ ginjal.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Laboratorium Biokimia dan Laboratorium fisiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, dan Laboratorium Patologi RS dr. Soetomo Surabaya pada bulan Agustus 2013 sampai dengan Juli 2014.

4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba, alat bedah, objek glass, cawan petri, pipet tetes, *microtube, disposable syringe*, tabung reaksi, gelas ukur, *vortex*, sentrifuse, *autoclave*, mortar, tabung polipropilen, penangas air, neraca analitik, mikropipet, pH meter, mikroskop cahaya, spektofotometer, timer, lemari pendingin, inkubator, pengaduk kaca, dan labu takar.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu kambing, starter yoghurt *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, dan *Streptococcus thermophilus*, tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar umur 10-12 minggu dengan berat badan rata-rata 100-150 gram, *anti-rat TNF α (santa cruz biotechnology)*, antibodi sekunder *rabbit anti rat labelled streptavidin biotin (dako)*, *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*



(SA-HRP) (dako), kromagen 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), slide, cover slide, aquades, etanol, PBS, PFA 4%, entellan, asam kholat, minyak babi, telur puyuh rebus, larutan sodium *Thiobarbituric acid* (Na-Thio) 1%, stok kit MDA, HCL, NaCl-fis 0,9%, *Tris Chloro Acetic* (TCA), dan alkohol.

4.3 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan			
	1	2	3	4
Kadar MDA dan Ekspresi TNF α				
Kelompok Kontrol				
Kelompok Hiperkolesterolemia				
Terapi Yoghurt Susu Kambing 300 mg/kg BB				
Terapi Yoghurt Susu Kambing 600 mg/kg BB				
Terapi Yoghurt Susu Kambing 900 mg/kg BB				

Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kelompok kontrol, hiperkolesterolemia, dan 3 kelompok terapi hiperkolesterolemia dengan dosis yoghurt susu kambing 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB yang tertera pada **Tabel 4.1**. Pemberian diet hiperkolesterol dilakukan selama 2 minggu dan terapi yoghurt susu kambing diberikan selama 4 minggu. Estimasi banyaknya sampel yang digunakan, dihitung menggunakan rumus Montgomery and Kowalsky (2011) :



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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan

P = jumlah kelompok (terdiri dari lima macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga diperlukan 20 ekor tikus. Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan penelitian RAL (rancangan acak lengkap). Pada percobaan ini 20 tikus wistar jantan yang sehat, usia 10-12 minggu, dengan berat badan 100-150 gram yang telah diadaptasikan di laboratorium.

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah

Variabel bebas : Terapi yoghurt susu kambing dan diet hiperkolesterol

Variabel terikat : Kadar MDA dan ekspresi TNF α

Variabel kontrol : Jenis kelamin, berat badan, umur, tikus strain wistar
dan pakan standar

4.4 Tahapan Penelitian

1. Penentuan dosis dan pembuatan diet hiperkolesterol
2. Penentuan dosis dan pembuatan yoghurt susu kambing
3. Induksi hiperkolesterolemia dan terapi yogurt susu kambing



4. Pengambilan organ ginjal
5. Pengukuran kadar malondialdehida (MDA)
6. Pembuatan preparat imunohistokimia dan pengamatan ekspresi TNF α

4.5 Prosedur Kerja Penelitian

4.5.1 Penentuan Dosis dan Pembuatan Diet Hiperkolesterol

Dosis dan pembuatan diet hiperkolesterol dibuat sesuai dengan metode Gani (2013). Konsumsi tikus perhari adalah 20 g dengan komposisi asam kholat 0,1% (0,02 g), minyak babi 10% (2 g), dan kuning telur puyuh rebus 5% (1 g), sehingga komsumsi diet hiperkolesterol untuk 1 ekor tikus perhari adalah 3,02 g. Penentuan dosis dan pembuatan diet hiperkolesterol dapat dilihat pada **lampiran 2**. Pakan standar yang digunakan adalah susu pap yang diproduksi oleh PT. Japfa Comfeed, Indonesia sebanyak 16,98 g/ekor tikus perhari.

4.5.2 Penentuan Dosis dan Pembuatan yogurt susu kambing

4.5.2.1 Pembuatan Starter

Pembuatan starter yoghurt susu kambing diawali dengan proses pasteurisasi susu kambing sebanyak 50 ml pada suhu 72 $^{\circ}$ C selama 5 menit, kemudian dilakukan pendinginan hingga suhu mencapai 40-45 $^{\circ}$ C. Proses pasteurisasi bertujuan untuk mematikan bakteri patogen serta menginaktifkan enzim-enzim pada susu. Setelah dingin, dilakukan inokulasi starter yogourmet sebanyak 0,25 gram dalam 50 ml susu kambing, dihomogenkan dengan cara menggoyangkan secara perlahan. Inkubasi susu selama 4-8 jam pada suhu 40-45 $^{\circ}$ C hingga pH starter

mencapai 4,5-5. Starter yoghurt cair disimpan dalam refrigerator suhu 4-5°C dan siap untuk digunakan (www.yogourtmet.com/usage).

4.5.2.2 Pembuatan Yoghurt

Pembuatan yoghurt dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan pasteurisasi susu kambing sebanyak 1,4 L (500 ml, 500 ml, dan 400 ml) pada suhu 72°C selama 5 menit, kemudian didinginkan hingga suhu mencapai 40-45°C. Susu kemudian dilakukan inokulasi dengan starter yoghurt cair 3% (42 ml) dan dihomogenkan dengan cara mengoyangkan secara perlahan. Inkubasikan pada suhu 40-45°C selama 4-8 jam hingga pH yoghurt 4,5-5. Diagram alir pembuatan yoghurt dapat dilihat pada **lampiran 5**. Yoghurt yang dihasilkan kemudian diproses untuk diubah bentuknya menjadi bubuk dengan cara *freeze drying* (Posecion *et al.*, 2005).

4.5.2.3 Freeze Dry Yoghurt Susu Kambing

Prinsip pengeringan beku atau *freeze dry* adalah mengeluarkan sebagian besar air dalam bahan yang terjadi melalui mekanisme sublimasi. Proses pengeringan beku didahului dengan proses pembekuan dengan memasukan yoghurt susu kambing dalam ruang pembeku -40°C selama 5-7 menit. Pada suhu ini, yoghurt akan membeku dengan cepat dan akan dihasilkan produk beku yang tidak merusak tekstur. Proses selanjutnya yakni pengeringan (sublimasi), dilakukan dengan memasukan yoghurt beku kedalam ruang vakum. Uap air yang dihasilkan kemudian disedot

dan dikondensasikan sehingga tidak membasahi yoghurt susu kambing kering (Anonymous, 2013).

4.5.2.4 Dosis Terapi Yoghurt Susu Kambing

Yoghurt susu kambing hanya diberikan pada kelompok tikus terapi dengan dosis 300 mg/kg (Jafari, 2009) untuk kelompok C, 600 mg/kg (Tamime and Robbinson, 2007) untuk kelompok D, dan 900 mg/kg untuk kelompok E. Perhitungan dosis yoghurt susu kambing lengkap dapat dilihat pada **lampiran 4**.

4.5.3 Induksi Diet Hiperkolesterol dan Terapi Yoghurt Susu Kambing

4.5.3.1 Induksi Hiperkolesterolemia

Sebelum diberikan perlakuan diet hiperkolesterol, kadar kolesterol hewan coba diuji untuk memastikan hewan coba dalam keadaan sehat. Diet hiperkolesterol diberikan pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan cara *force feeding* metode sonde lambung. Diet hiperkolesterol diberikan sebanyak 3,02 g/ekor dengan mengencerkan bersama akuades sebanyak 2 ml dan diberikan pada kelompok B,C,D, dan E selama 2 minggu. Setelah diberikan diet hiperkolesterol selama 2 minggu, hewan coba diuji kadar kolesterolnya untuk memastikan hewan coba dalam keadaan hiperkolesterolemia.

4.5.3.2 Terapi Yoghurt Susu Kambing

Terapi yoghurt susu kambing diberikan pada kelompok C dengan dosis 300 mg/kg, kelompok D dosis 600 mg/kg, dan kelompok E dosis 900 mg/kg dengan mengencerkan yoghurt bersama akuades sampai 1,5 ml.

Terapi yoghurt susu kambing diberikan pada hewan coba dengan cara *force feeding* metode sonde lambung selama 4 minggu (Hirano *et al.*, 1999). Setelah diterapi yoghurt susu kambing selama 4 minggu, kadar kolesterol hewan coba diukur kembali untuk mengetahui efek yoghurt susu kambing terhadap kadar kolesterol.

4.5.4 Pengambilan organ ginjal

Sebelum dilakukan pengambilan organ ginjal, terlebih dahulu dilakukan *euthanasia* hewan coba melalui dislokasi cervical. Tikus direbahkan dorsal dan ekstremitas difiksasi dengan jarum. Bagian abdomen diinsisi dan rongga dada dibuka dengan memotong tulang rusuk bagian sternum. Organ ginjal yang terletak disebelah ventral organ hati dan limpa atau dikanan dan kiri tulang belakang, diambil dan dicuci dengan NaCl fisiologis. Organ ginjal disimpan pada larutan PBS untuk pengujian kadar MDA dan PFA 4% untuk pembuatan preparat IHK. Diagram alir proses pengambilan organ ginjal dapat dilihat pada **lampiran 6**.

4.5.5 Pengukuran kadar malondialdehida (MDA)

4.5.5.1 Pembuatan kurva standar MDA

Pembuatan kurva standar MDA dilakukan dengan metode yang digunakan Aulanni'am *et al.*, (2012). Larutan stok kit standar MDA dengan konsentrasi 1,2,3,4,5,6,7, dan 8 mg/mL masing-masing diambil 100 μ L kemudian larutan dimasukan dalam tabung reaksi yang berbeda. Tambahkan 550 μ L aquades dan 100 μ L TCA 100%, lalu dihomogenkan. HCl 1N sebanyak 250 μ L dan Na-Thio 1% sebanyak 100 μ L ditambahkan



kedalam tabung dan dihomogenkan dengan vortex. Rebus selama 20 menit suhu 100°C , lalu setelah dingin disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil kemudian dibaca dengan spektofotometer pada panjang gelombang maksimum. Absorbansi larutan diperoleh dan dibuat kurva standar MDA. Diagram alir pembuatan kurva standar MDA dapat dilihat pada **lampiran 7**.

4.5.5.2 Pengukuran Kadar MDA

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode TBA, sesuai dengan yang digunakan Aulanni'am *et al.*, (2012). Organ ginjal 1 gram dimasukan dalam mortar dingin dan digerus sampai halus, lalu ditambahkan 500 μL NaCl 0,9% dan dihomogenkan. Homogenat diambil dan dipindahkan ke tabung *microtube*. Sentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya. Supernatan sebanyak 100 μL dimasukan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 550 μL aquades lalu dihomogenkan. Ditambahkan 100 μL HCl 1N dan Na-Thio 1% sebanyak 100 μL dan dihomogenkan lagi. Tabung ditutup dengan alumunium foil dan dipanaskan dalam *water bath* 100°C selama 30 menit. Setelah dingin, sentrifuhasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit dan supernatannya diambil untuk dipindahkan ke tabung reaksi baru. Absorbansi sampel diukur dengan spektofotometer pada panjang gelombang maksimum (530 nm). Diagram alir pengukuran kadar MDA dapat dilihat pada **lampiran 8**.



4.5.6 Pembuatan preparat imunohistokimia dan pengamatan ekspresi TNF α

Organ difiksasi dengan cara direndam dalam PFA 4% kemudian didehidrasi dengan alkohol bertingkat dari konsentrasi 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam, etanol 90%, 95%, dan etanol absolut selama 20 menit. Organ dijernihkan dengan cara merendam jaringan dalam larutan xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit. Infiltrasi dan embending jaringan dengan parafin cair pada inkubator suhu 58-60 $^{\circ}$ C. *Trimming* jaringan dengan cara meletakan cetakan dalam mikrotom dan jaringan dipotong dengan ketebalan 5 μ m. Sediaan jaringan disimpan dalam inkubator suhu 38-40 $^{\circ}$ C selama 24 jam dan dilakukan pembuatan preparat imunohistokimia.

Preparat dilakukan deparafinasi dengan cara direndam dalam larutan xylol 2 kali, etanol 70%, alkohol 30%, dan aquades steril selama 2 menit, kemudian disimpan selama 24 jam suhu 4 $^{\circ}$ C. Cuci preparat dalam PBS pH 7,4 (3x5 menit), kemudian direndam dalam hidrogen peroksid (H₂O₂) 3% selama 10 menit (dalam PBS) dan dicuci kembali dalam PBS pH 7,4 (3x5 menit), lalu direndam dalam BSA 1% (dalam PBS) selama 1 jam suhu ruang. Preparat ditetesi dengan antibodi primer, *anti rat* TNF α (dalam BSA 1% dalam PBS) 1:100 dan diinkubasi suhu 4 $^{\circ}$ C selama 24 jam.

Preparat dikeluarkan dari lemari pendingin dan dibiarkan 30 menit, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Preparat ditambahkan antibodi sekunder, *rabbit anti rat labelled streptavidin biotin* dalam PBS (1:200) selama 1 jam pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit).

Preparat ditambahkan SA-HRP dalam PBS (1:500) selama 40 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Kemudian ditambahkan kromogen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) selama 20 menit suhu ruang lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Preparat dilakukan counter staining dengan pewarna Major Hematoxylin secukupnya hingga berwarna biru lalu dibilas dengan air keran (2x5 menit) dan aquades steril (1x5 menit) lalu dibiarkan semalam dalam suhu ruang. Preparat dilakukan mounting dengan entelan dan hasilnya diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Diagram alir metode imunohistokimia dapat dilihat pada **Lampiran 12**.

Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α) dalam jaringan akan muncul dengan warna coklat dan terdapat disekitar glomerulus yang menunjukan adanya reaksi inflamasi. Pengukuran persentase area ekspresi TNF α pada ginjal dilakukan menggunakan *software Axio Vision* dengan cara membandingkan distribusi TNF α pada sediaan histologi kontrol dengan perlakuan pada perbesaran 400 kali, kemudian dibandingkan penghitungan per luas 5 bidang pandang yang diambil secara acak untuk setiap kelompok perlakuan.

4.5.7 Analisa Data

Analisa data kadar MDA dan rata-rata persentase area ekspresi TNF α dilakukan secara kuantitatif statistik dengan metode one-way ANOVA, kemudian dilanjutkan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) (Kusriningrum, 2008).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Terapi Yoghurt Susu Kambing Terhadap Kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hiperkolesterolemia

Hasil analisa statistika dengan *one way ANOVA* menunjukkan bahwa terapi yoghurt susu kambing secara signifikan ($p<0,05$) dapat menurunkan kadar MDA ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dan hasil uji BNJ (Beda Nyata Jujur) menunjukkan notasi yang berbeda antar kelompok perlakuan **Tabel 5.1 (Lampiran 13)**.

Tabel 5.1 Rata-rata kadar MDA ginjal tikus (*Rattus norvegicus*)

Kelompok	Rata-rata kadar MDA ($\mu\text{g/mL}$)	Peningkatan kadar MDA (%) terhadap kelompok kontrol	Penurunan kadar MDA (%) terhadap kelompok hiperkolesterolemia
Kontrol	$1,737 \pm 0,342^{\text{a}}$	-	-
Hiperkolesterol	$7,425 \pm 0,290^{\text{d}}$	76,60%	-
Terapi 300 mg/kg BB	$6,765 \pm 0,378^{\text{d}}$	-	8,88%
Terapi 600 mg/kg BB	$5,597 \pm 0,384^{\text{c}}$	-	24,61%
Terapi 900 mg/kg BB	$4,305 \pm 0,788^{\text{b}}$	-	42,02%

Keterangan : Notasi a,b,c dan d menunjukkan adanya perbedaan antar kelompok perlakuan ($p<0,05$).

Kelompok kontrol menunjukkan kadar MDA yang paling rendah dari semua kelompok yaitu sebesar $1,737 \pm 0,342 \mu\text{g/mL}$. *Malondialdehyde* (MDA) ditemukan pada kondisi normal karena pada keadaan normal, peroksidasi lipid terjadi secara terus menerus pada tingkat yang rendah. Reaksi peroksidasi bersifat toksik bagi sel, namun mekanisme ini dapat

dikendalikan pada kondisi normal (Cetinkaya, 2005). Rata-rata kadar MDA pada kelompok kontrol digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan karena pengaruh perlakuan.

Pada kelompok hiperkolesterolemia terjadi peningkatan kadar MDA dengan presentasi peningkatan MDA terhadap kelompok kontrol sebesar 76,60%, dan secara statistika menunjukkan notasi yang berbeda dengan semua perlakuan. Hal ini sesuai dengan penelitian Mohammadi (2006) bahwa kadar MDA akan meningkat signifikan pada pemberian diet tinggi kolesterol. Hiperkolesterolemia ini terjadi karena pemberian diet tinggi kolesterol menyebabkan hiperkolesterolemia dan meningkatkan keadaan stres oksidatif. Stres oksidatif ditandai dengan meningkatnya produksi radikal bebas dan peroksidasi lipid (Rawi, 2011). Pada keadaan hiperkolesterolemia, akan terjadi peningkatan sintesis asam empedu untuk menyeimbangkan kadar kolesterol tubuh, yang pada prosesnya menghasilkan produk sampingan berupa radikal bebas. Antioksidan yang rendah tidak dapat menetralisir efek dari radikal bebas yang bereaksi dengan molekul disekitarnya, sehingga menyebabkan radikal bebas dapat mengoksidasi LDL. *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang teroksidasi akan difagosit oleh makrofag yang pada proses fagositosis ini, akan diproduksi radikal bebas pula sehingga radikal bebas dalam tubuh akan sangat tinggi. Proses selanjutnya akan terjadi peroksidasi lipid yakni reaksi berantai yang mengakibatkan kerusakan oksidatif dari asam lemak jenuh atau *Polyunsaturated fatty acids* (PUFA) karena sifatnya yang lebih sensitif



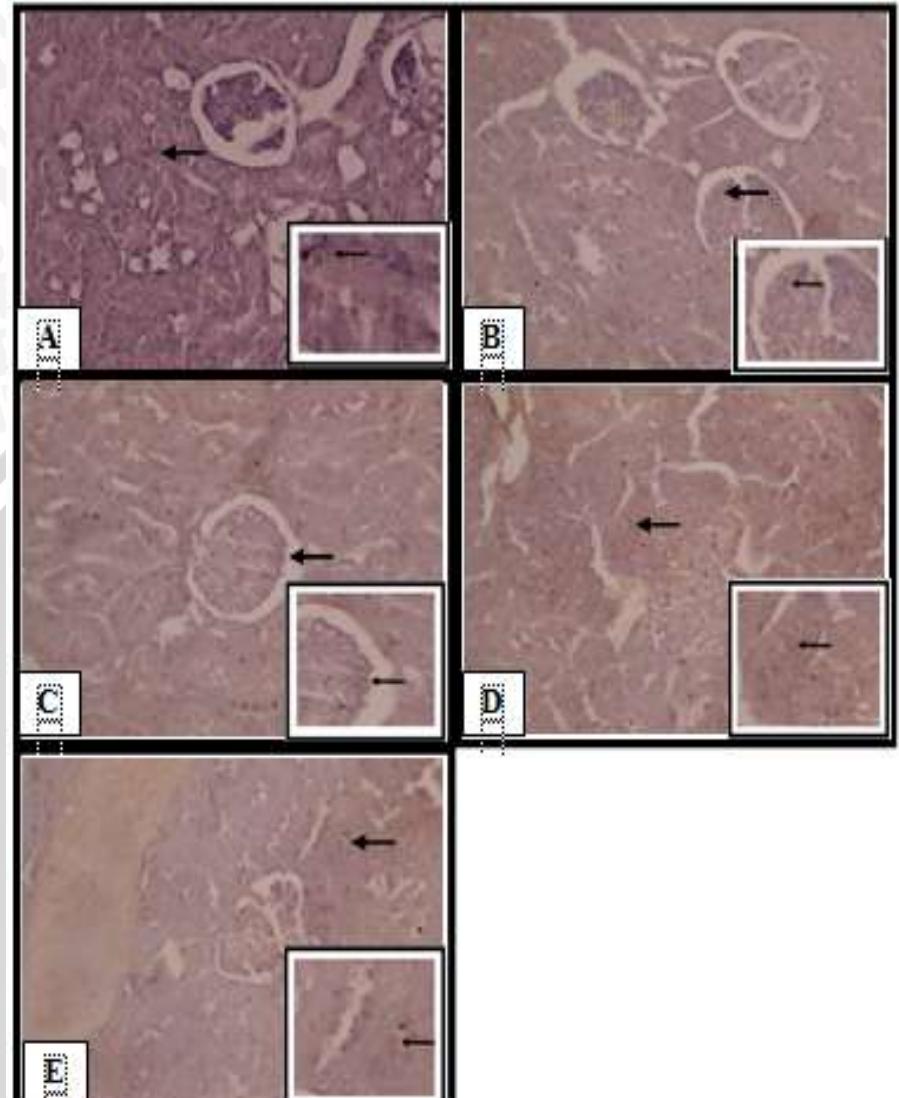
dibandingkan asam lemak tak jenuh atau *monounsaturated fatty acids* (MUFA). Hasil akhir dari proses peroksidasi lipid adalah senyawa toksik salah satunya MDA. *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang berpenetrasi ke dinding endotel kapiler glomerulus akan mengalami oksidasi oleh radikal bebas yang menyebabkan inflamasi pada jaringan tersebut, sehingga mengganggu fungsi endotel dan menyebabkan endotel menjadi lebih permabel terhadap makromolekul.

Pada kelompok terapi yoghurt susu kambing dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB presentasi penurunan kadar MDA berturut-turut sebesar 8,88%, 24,61%, dan 42,02%. Semakin tinggi dosis terapi yoghurt susu kambing, semakin tinggi pula penurunan kadar MDA. Presentase penurunan kadar MDA tertinggi yakni 42,02% pada dosis terapi 900 mg/kg BB, namun pada kelompok terapi ini belum mampu menyamai nilai kadar MDA kelompok kontrol. Penurunan kadar MDA terjadi karena yoghurt susu kambing mengandung komposisi biopeptida aktif yakni α laktobumin dan α kasein (Ebringer *et al.*, 2014) serta vitamin E dan C dan bakteri asam laktat (BAL). Biopeptida aktif pada susu kambing berpotensi sebagai antioksidan yang bekerja dengan cara menangkap senyawa *reactive oxygen species* (ROS) sehingga efek radikal bebas akan hilang. Vitamin E dapat menurunkan kadar MDA karena vitamin E merupakan antioksidan sehingga dapat menekan produksi MDA yang terjadi pada kondisi hiperkolesterolemia. Mekanisme antioksidan dari vitamin E (tokoferol) pada susu kambing dalam menghentikan peroksidasi lemak oleh radikal bebas

adalah dengan memberikan elektron tunggal untuk radikal peroksil membentuk tokoferil kuinon yang stabil dan teroksidasi sempurna (Kumar, 2013). Bakteri asam laktat (BAL) pada yoghurt susu kambing dapat memproduksi enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH) yang dapat mendekonjugasi asam empedu melalui hidrolisis ikatan diantara asam empedu dengan asam amino, sehingga asam empedu yang mengalami proses dekonjugasi tidak terserap kembali di saluran pencernaan dan tubuh akan menggunakan kolesterol dalam darah sebagai prekursor untuk membentuk asam empedu (Begley, 2006). Berkurangnya radikal bebas dalam tubuh akibat senyawa antioksidan dalam yoghurt susu kambing, akan menyebabkan reaksi peroksidasi lipid menurun yang diikuti dengan penurunan kadar MDA.

5.2 Pengaruh Terapi Yoghurt Susu Kambing Terhadap Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) pada Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipercolesterolemia

Ekspresi *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) diamati dengan metode imunohistokimia pada 5 kelompok perlakuan yakni kelompok kontrol, kelompok hipercolesterolemia, kelompok terapi yoghurt susu kambing dosis 300 mg/kg BB, dosis 600 mg/kg BB, dan dosis 900 mg/kg BB (**Gambar 5.2**).



Gambar 5.2 Ekspresi *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) model hipercolesterolemia (perbesaran 400X).

Keterangan: A= Ginjal tikus kontrol, B= ginjal tikus hipercolesterolemia, C= ginjal tikus terapi yoghurt susu kambing dosis 300 mg/kg BB, D= ginjal tikus terapi yoghurt susu kambing dosis 600 mg/kg BB, E= ginjal tikus terapi yoghurt susu kambing dosis 900 mg/kg BB. Tanda panah pada gambar insert (↑) menunjukan ekspresi TNF α .

Ekspresi TNF α ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada jaringan ginjal seperti pada bagian glomerulus ginjal yang ditunjukkan tanda panah pada **Gambar 5.2**. Warna coklat pada preparat disebabkan karena adanya ikatan antara antigen TNF α pada ginjal dengan antibodi primer (*anti rat TNF α*) yang dilabel dengan antibodi sekunder (*Rabbit anti rat labelled biotin*) yang kemudian ditambahkan dengan substrat *diamino benzidine* (DAB). Ekspresi TNF α sebagai respon inflamasi di ginjal dapat ditemukan pada sel mesangial, sel podosit, dan sel epitel tubuler yakni pada bagian sitoplasma (Vielhauer, 2007).

Ekspresi TNF α pada preparat ginjal tikus kontrol menunjukkan adanya ekspresi berwarna coklat namun dalam jumlah yang sedikit (Gambar A). Pada preparat ginjal tikus hiperkolesterolemia, ekspresi berwarna coklat ditemukan paling banyak (Gambar B). Ekspresi TNF α pada preparat ginjal tikus terapi 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB menunjukkan penurunan intensitas ekspresi berwarna coklat dengan penurunan paling rendah pada dosis 300 mg/kg BB (Gambar C), kemudian sedikit meningkat pada dosis 600 mg/kg BB dan penurunan paling tinggi pada dosis 900 mg/kg BB. Peningkatan dan penurunan ekspresi TNF α ditunjukkan melalui presentasi area hasil pengamatan menggunakan software Axio Vision sehingga diperoleh nilai rata-rata pada setiap kelompok (**Tabel 5.2**).

Hasil analisa statistika dengan *one way ANOVA* secara signifikan ($p<0,05$) memperlihatkan bahwa terapi yoghurt susu kambing dapat menurunkan ekspresi TNF α ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dan hasil uji BNJ (Beda Nyata Jujur) menunjukkan notasi yang berbeda antar kelompok

Tabel 5.2 (Lampiran 13).

Tabel 5.2 Rata-rata ekspresi TNF α ginjal tikus (*Rattus norvegicus*)

Kelompok	Rata-rata ekspresi TNF α	Peningkatan ekspresi TNF α (%) terhadap kelompok kontrol	Penurunan ekspresi TNF α (%) terhadap kelompok hipercolesterolemia
Kontrol	$2,176 \pm 0,717^a$	-	-
Hipercolesterol	$17,438 \pm 0,473^e$	87,5%	-
Terapi 300 mg/kg BB	$14,676 \pm 1,735^d$	-	15,8%
Terapi 600 mg/kg BB	$11,359 \pm 1,027^c$	-	34,86%
Terapi 900 mg/kg BB	$4,942 \pm 0,745^b$	-	71,65%

Keterangan : Notasi a,b,c,d dan e menunjukan adanya perbedaan antar kelompok perlakuan ($p<0,05$)

Kelompok kontrol menunjukan rata-rata ekspresi TNF α paling rendah sebesar $2,176 \pm 0,717$ dengan gambaran imunohistokimia ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) hanya ditemukan sedikit warna coklat. Pada keadaan normal, sitokin TNF α ditemukan dalam tubuh dalam jumlah sedikit yang berfungsi sebagai sistem kekelebihan tubuh. Ekspresi TNF α diginjal dapat ditemukan pada sitoplasma dari sel mesangial, sel podosit dan sel epitel tubuler (Vielhauer, 2007). *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) merupakan

salah satu sitokin untuk pertahanan tubuh melawan mikroba menular dan sebagai mediator proinflamasi (Al-Lamki, 2001).

Pada kelompok hiperkolesterolemia, gambaran imunohistokimia ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) ditemukan banyak warna coklat dengan persentase peningkatan TNF α sebesar 87,5% dan secara statistika menunjukkan notasi yang berbeda dengan semua perlakuan. Pada keadaan hiperkolesterolemia, akan terjadi peningkatan pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF α (Wakkad, 2010). Peningkatan sitokin TNF α terjadi karena aktifasi NF-kB (*nuclear factor kB*) yang merupakan kompleks protein yang berfungsi untuk respon seluler akibat stimulasi stres oleh peningkatan radikal bebas dan LDL yang teroksidasi. *Nuclear Factor Kb* (NF-kB) akan terlepas dari ikatan dengan inhibitornya I κ B dan akan bepindah dari sitoplasma menuju nukleus untuk melakukan proses trasnskripsi dan translasi. *Nuclear Factor Kb* (NF-kB) akan merangsang ekspresi molekul adhesi seperti *vasculer cell adhesion molecule* (VCAM) (Porcel, 2001). Molekul adhesi akan menarik monosit pada sirkulasi yang akhirnya berdiferensiasi menjadi makrofag yang akan mefagositosis LDL yang teroksidasi. Makrofag kemudian memproduksi sitokin proinflamasi seperti TNF α (Chapman, 2006).

Low density Lipoprotein (LDL) memiliki ukuran yang lebih kecil dibandingkan lipoprotein lain yang menyebabkan LDL dapat berpenetrasi kedalam dinding endotel pembuluh kapiler glomerulus sehingga terjadi akumulasi lipoprotein plasma dalam intima. *Low density Lipoprotein* (LDL)

dalam intima dapat mengalami oksidasi yang dapat rangsangan endotel untuk mengeluarkan molekul adhesi yang mengakibatkan adhesi monosit pada endotel dan migrasi monosit kedalam subendotel. Monosit akan berdiferensiasi menjadi makrofag, sehingga LDL yang teroksidasi dapat ditangkap oleh reseptor scavenger dari makrofag. Makrofag akan mensekresikan sitokin proinflamasi seperti TNF α yang akan menginisiasi proliferasi sel otot polos dalam intima, sehingga menyebabkan disfungsi endotel. Fungsi endotel sebagai barier untuk mencegah molekul besar masuk menjadi terganggu yang mengakibatkan terjadi peningkatan permeabilitas pada dinding endotel kapiler glomerulus ginjal, sehingga molekul besar seperti albumin dapat ditemukan dalam jumlah yang besar didalam urin (Achmad, 2001).

Pada kelompok terapi yoghurt susu kambing 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB presentase penurunan ekspresi TNF α berturut-turut sebesar 15,8%, 34,86%, dan 71,65%. Semakin tinggi dosis terapi yoghurt suus kambing, semakin tinggi pula penurunan ekspresi TNF α . Persentase penurunan ekspresi TNF α tertinggi adalah 71,65% yakni pada dosis terapi 900 mg/kg BB, namun pada kelompok terapi ini belum mampu menyamai nilai ekspresi TNF α kelompok kontrol.

Kandungan biopeptida aktif, vitamin dan bakteri asam laktat (BAL) pada yoghurt susu kambing berpotensi dalam menurunkan ekspresi TNF α . Biopeptida aktif dan vitamin yang berpotensi sebagai antioksidan dapat menetralisir efek radikal bebas melalui mekanisme *scavenging* radikal bebas

sehingga tidak terjadi oksidasi LDL yang menyebabkan keadaan stres oksidatif. Bakteri asam laktat di usus halus, dapat mendekonjugasi asam empedu agar tidak terserap kembali dan dimetabolisme dihati, sehingga produk sampingan hasil sintesa asam empedu seperti radikal bebas akan berkurang (Begley, 2006). Berkurangnya keadaan stres oksidatif akibat radikal bebas yang berkurang akan menyebabkan molekul NF- κ B tidak banyak teraktifasi sehingga ekspresi sitokin proinflamasi seperti TNF α akan menurun.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

1. Terapi yoghurt susu kambing dapat menurunkan kadar *malondialdehid* (MDA) pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) model hiperkolesterolemia. Semakin tinggi dosis terapi yoghurt susu kambing, semakin rendah kadar MDA. Dosis yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam menurunkan kadar MDA sebesar 42,02%, namun belum ditemukan dosis optimum dalam menurunkan kadar MDA.
2. Terapi yoghurt susu kambing dapat menurunkan ekspresi *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) pada ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) model hiperkolesterolemia. Semakin tinggi dosis terapi yoghurt susu kambing, semakin tinggi pula penurunan ekspresi TNF α . Dosis yoghurt susu kambing 900 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi TNF α sebesar 71,65%, namun belum ditemukan dosis optimum dalam menurunkan ekspresi TNF α .

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang dosis optimum terapi dan kandungan biopeptida spesifik pada yoghurt susu kambing yang berperan sebagai terapi pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hiperkolesterolemia.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, R. 2001. Hubungan Antara Hiperkolesterolemia dengan Mikroalbuminuria. [Tesis] Dokter Spesialis Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- Al-Lamki, R.S., J. Wang., J.N, Skepper., S, Thiru., J.S, Pober and J.R, Bradley. 2001. Expression of Tumor Necrosis Factor Receptors in Normal Kidney and Rejecting Renal Transplant. *Article Lab Invest* 81: 1503-1515.
- Anonymous. 2013. Freeze Dry Technology for Better Quality Flavor of Dried Products. Food Review Indonesia. Vol VIII/No 2.
- Anonymous. 2014. Usaha Peternakan Kambing Peranakan Etawah. Kabupaten Cianjur.
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html> Diakses pada tanggal 3 Maret 2014
- Arkhaesi, N. 2008. Kadar Malondialdehyde (MDA) Serum Sebagai Indikator Prognosis Keluaran Pada Sepsis Neonatorum. (TESIS). Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Kesehatan Anak Universitas Diponegoro Semarang.
- Astuti dan A, Rahmawati. 2010. Asimilasi Kolesterol dan Dekonjugasi Garam Empedu oleh Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Limbah Kotoran Ayam Secara In-Vitro. Prosiding Seminar Nasional Penelitian Fakultas MIPA Universitas Negeri Yogyakarta.
- Badan Standarisasi Nasional (BSN). 2009. *Yogurt*. SNI 2981:2009.
- Begley, M., C, Hill and C.G.M, Gahan. 2006. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Mini Review American Society for Microbiology* 72(3): 1729.
- Centinkaya, A., E.B, Kurutas., M.A, Buyukbese and E, Bulbuloglu. 2005. Levels of Malondialdehyde and Superoxide Dismutase in Subclinical Hypertyroidism. *Article of Mediators Inflamm* 2005(1) : 57-59.
- Chakrabarti, S., F. Jahandideh and J. Wu. 2014. Food Derived Bioactive Peptides on Infamation and Oxidative Stress. Review article *Biomed Research International* University of Alberta Canada.
- Chapman, M.J and A, Kontush. 2006. Functionally defective high – density lipoprotein : a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis.<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968945>> Paris.



- Ebringer, L., M. Ferencik and J.krajovic. 2008. Beneficial Health Effect of Milk and Fermented Dairy Product- Review. Comenius University, Bratislava, Slovakia. *Folia Microbiol* 53(5) 378-394.
- Gani, N., I. Lidya dan P. Mariska. 2013. *Profil Lipida Plasma Tikus Wistar yang Hiperkolesterolemia pada Pemberian Gedi Merah (Abelmoschus manihot L.)*. <<http://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/jmou>>. Manado. Jurusan Kimia FMIPA Unsrat.
- Jafari, A.A., B. Larijani., H.A, Majb and F, Tahbaz. 2009. Cholesterol Lowering Effect of Probiotic Yogurt in Comparison with Ordinary Yogurt in Mildly to Moderately Hypercholesterolemic Subjects. *Journal Animal and Metabolism* 54:22-27.
- Hariri, M dan D.A, Okid. 2009. Blood Cholesterol Level of Hypercholesterolemia Rat (*Rattus norvegicus*) After VCO Treatment. *Journal Bioscience* Vol 1 No 2 : 53-58.
- Hartoyo, A., N. Darulsyah., Sripalupi dan P. Nugroho. 2008. Pengaruh Fraksi Karbohidrat Kacang Komak (*Lablab Purpureus* (L) Sweet). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 19: 25-31.
- Hattingh, A.L and B.C, Viljoen. 2001. Yogurt as Probiotics Carrier Food. Review International Dairy Journal (11) 1-7.
- Herwiyarirasanta and B.A, Eduardus. 2010. Effect of Black Soybean Extract Supplementation in Low Density Lipoprotein Level of Rats (*Rattus norvegicus*) With High Fat Diet. Science Article Universitas Airlangga Surabaya.
- Hirano, R., M. Hirano and M-Ooka. 1999. *Laktoperoxidase Effect On Rheological Properties Of Yogurt*. Hokaido University Press. Japan.
- Horn, C.C., B.A, Kimball., H, Wang., J, Kaus., S, Dienel., A, Nagy., G.R, Gathright., B.J, Yates and P.L.R, Andrews. 2013. Why Can't Rodent Vomit? A Comparative Behavioral, Anatomical, and Physiological Study. *PloS ONE* 8(4): e60537.
- Isbandiyah. 2010. *Uji klinis Terbuka Efek Terapi Statin (Simvastatin) terhadap Kadar High Sensitivity C-Reactive Protein (Hs-CRP) Pada Penderita Diabetes Tipe II*. Universitas Muhamadiyah Malang.
- Ismawati., A. Ermikarmila dan H.M. Yulis. 2012. Pengaruh Perasan Umbi Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) Terhadap Malondialdehid (MDA) Plasma Mencit yang Diinduksi Hiperkolesterolemia. *Jurnal Natur Indonesia* 14(2) 150-154.



- Kumar, S., U.V.S, Teotia and A, Sanghi. 2013. Antioxidative Property of Cow Milk Caseinates Hydrolyzed with Different Proteases. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* Vol 5.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Korhonen, H and A, Pihlanto. 2006. Bioactive Peptides: Production and Functionality. *International Dairy Journal* 16(2006) 945- 960.
- Littman, M.P. 2011. Protein Losing Nephropathy in Small Animals. *Vet Clin Small Anim* 41 (2011) 31-62.
- Mohammadi, M., M, Alipour., M.R, Alipour and A.M, Vatankhah. 2006. Effect of High Cholesterol Diet and Parallel Chronic Exercise on Erythrocyte Primary Antioxidant Enzyme and Plasma total Antioxidant Capacity in Dutch Rabbits. *International Journal Endocrinol Metabolism* 4:30-40.
- Montgomery, D and S. Kowalsky. 2011. *Design and Analysis of Experiment*. John Wiley and Sains Inc. ISBN 978-0-470-16990-2.
- Norlin, M. 2000. Cytochrome P450 Enzyme in the Metabolism of Cholesterol and Cholesterol Derivates. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Disertations from the Faculty of Pharmacy*. 241.55 PP Uppsala. ISBN 91-554-4875-5.
- Oka, J.M., D.V, Simic and T.P, Simic. 1999. Free Radicals in Cardiovasculer Disease. *Journal Medicine and Biology*. Vol 6 No.1 1999p.11-12.
- Packard, C.J., T, Demant., J.P, Stewart., D.Bedford., M.J, Caslake., G, Schwertfeger., A, Bedynek., J, Shepherd and D, Seidel. 2000. Apolipoprotein B Metabolism and the Distribution of VLDL and LDL subfractions. *Journal of Lipid Research* Vol 41.
- Pratama, S.E., dan Probosari, E. 2012. Pengaruh Pemberian Kefir Susu Sapi Terhadap Kadar Kolesterol LDL Tikus Jantan Sprague dawley Hiperkolesterolemia. *Journal of Nutrition College* Vol. 1 No.1 358-364.
- Potocnik, K., V, Gantner., K, Kuterovac and A, Gividini. 2011. Mare's Milk: Composition and Protein Fraction in Comparison with Different Milk Species. Review. 107-113
- Pusparini. 2006. Low Density Lipoprotein Padat Kecil Sebagai Faktor Resiko Aterosklerosis. *Universa Medicina* Vol 25 No 1.
- Rawi, N.H.A. 2011. Oxidative Stress, Antioxidant Status and Lipid Profile in the Saliva of Type 2 Diabetics. *Diabetes and Vascular Disease Research* 8(1) 22-28.

Tomkin, G.H and D. Owens. 2012. LDL as a Cause of Atherosclerosis. *The Open Atherosclerosis & Thrombosis Journal* 13-21.

Stapleton P.A., A.G, Goodwill., M.E, James., R.W, Brock and J.C, Frisbee. 2010. Hypercholesterolemia and Microvascular dysfunction: interventional strategies. *Journal of Inflammation* 7:54.

Vielhauer, V and T.N, Mayadas. 2007. Functions of TNF and its Receptors in Renal Disease: Distinct Roles in Inflammatory Tissue Injury and Immune Regulation. *Seminars in Nephrology* Vol 27 No 3 286-308.

Wakkad, A.I., N.E, Hassan., L.Sherif, A.A, El-Shaheed., H.Sibaii and S. El-Zayat. 2010. Hypercholesterolemia Enhances the Release of Proinflammatory Cytokines in Obese Egyptian Adolescents. *Journal of American Science* 6(8).

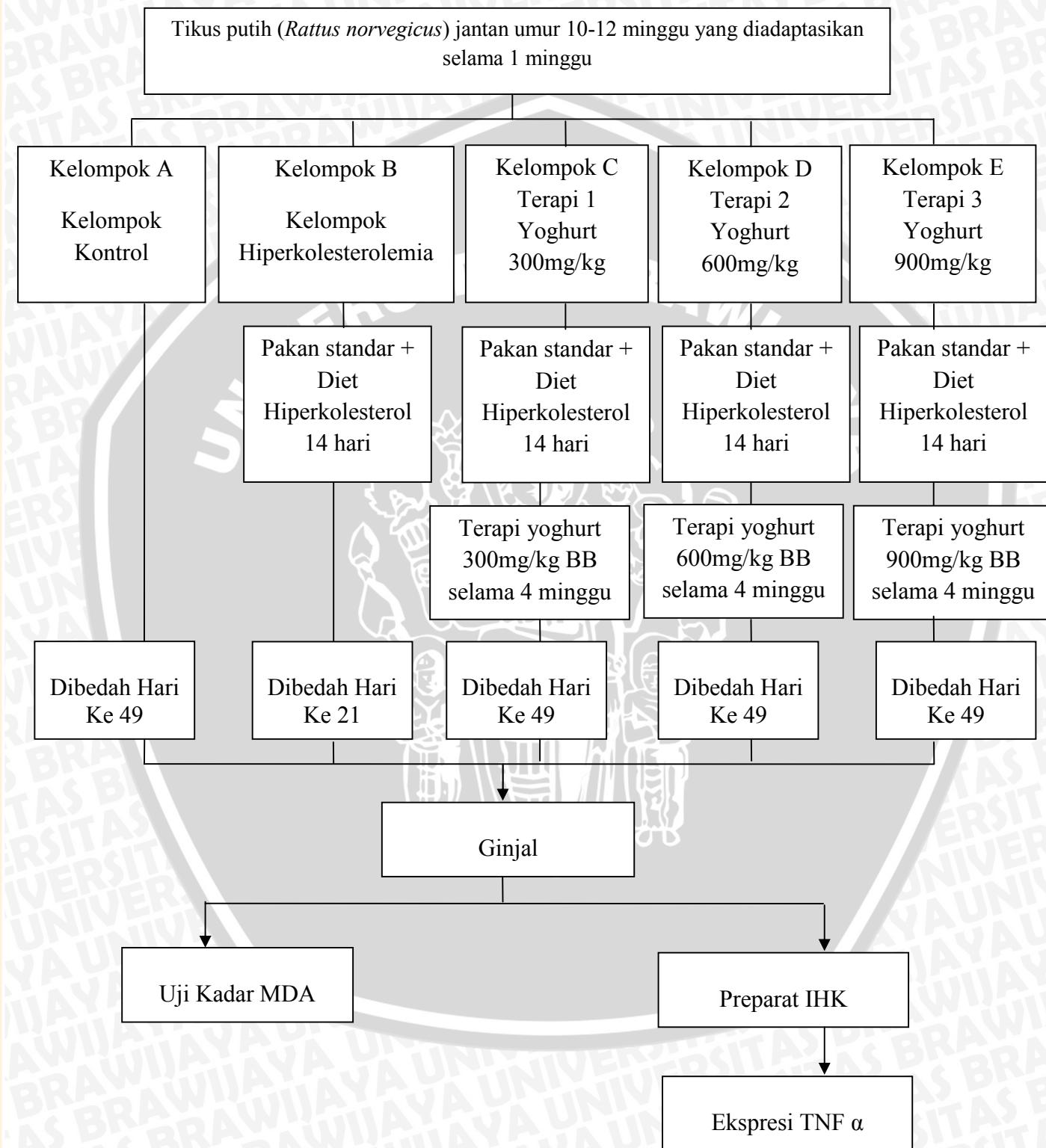


Lampiran 1. Lampiran Laik Etik

 <p>KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA</p> <p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"</p> <p>No:217-KEP-UB</p> <p>KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE) UNIVERSITAS BRAWIJAYA</p> <p>TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:</p> <p>PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH TERAPI DAN PENCEGAHAN YOGURT SUSU KAMBING PERANAKAN ETAWA TERHADAP HEWAN TIKUS (<i>Rattus norvegicus</i>) MODEL HIPERKOLESTEROLEMIA</p> <p>PENELITI : HENDRA SATRIAWAN</p> <p>UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITASBRAWIJAYA</p> <p>DINYATAKAN : LAIK ETIK</p> <p>Malang, 24 Maret 2014 Ketua Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya</p> <p>Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES. NIP. 19600903 198802 2 001</p>	
---	--



Lampiran 2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian



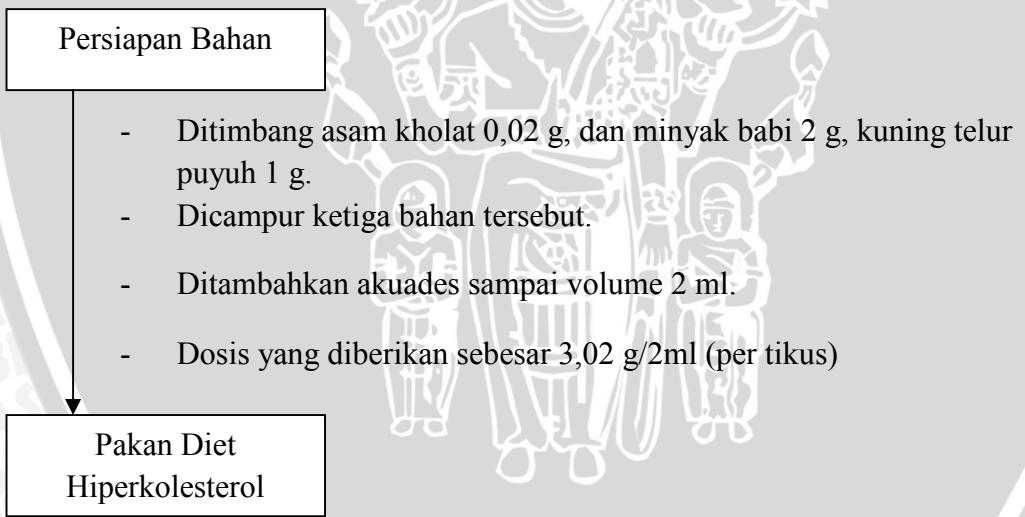
Lampiran 3. Pembuatan pakan diet hiperkolesterol (Gani, 2013)

Komposisi pakan : Asam Kholat 0,1 %, minyak babi 10 %, kuning telur puyuh rebus 5%

Pembuatan pakan per tikus 20 gr/hari dengan susunan komposisi pakan:

- Asam Kholat = $0,1\% \times 20\text{ g} = 0,02\text{ g}$
- Minyak babi = $10\% \times 20\text{ g} = 2\text{ g}$
- Kuning telur puyuh rebus = $5\% \times 20\text{ g} = 1\text{ g}$
- Dilakukan sonde lambung setiap hari sebesar 3,02 g yang ditambahkan air sampai volume 2 ml.

Diagram:



Lampiran 4. Perhitungan Dosis Terapi yoghurt Susu Kambing (Tamime and Robinson, 2007)

Terdapat 3 dosis yang digunakan dalam terapi yoghurt susu kambing yakni 300 mg/kg BB (Kelompok C), 600 mg/kg BB (Kelompok D), dan 900 mg/kg BB (Kelompok E), kemudian mengubah berat badan tikus setelah pemberian diet hiperkolesterol dalam gram ke kilogram dan mengalikan dengan dosis yoghurt. Yoghurt kemudian dilarutkan dalam 1,5 ml aquades dan diberikan secara sonde lambung. Perhitungan banyaknya yoghurt yang digunakan untuk 4 ekor tikus adalah sebagai berikut:

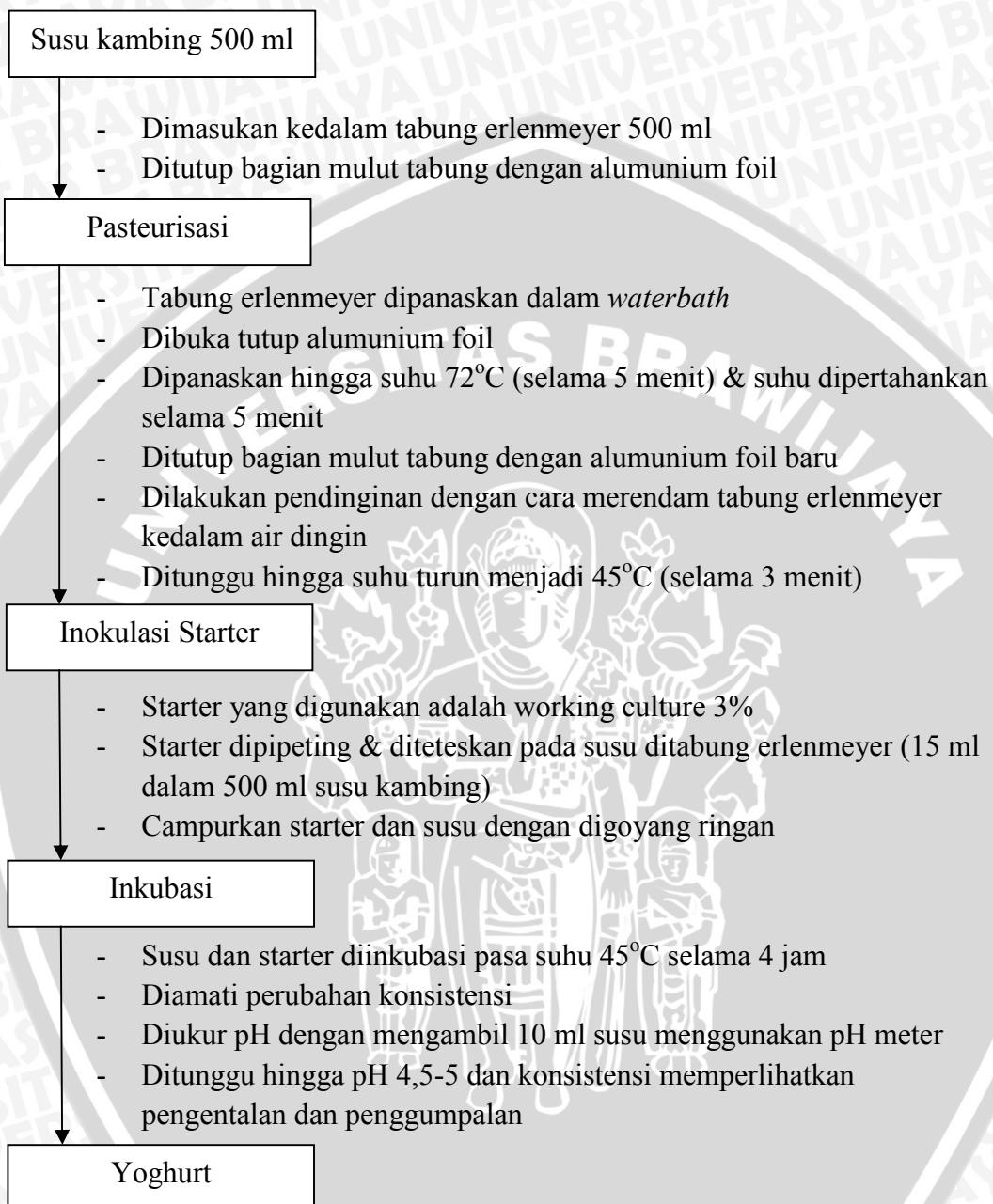
$$\text{Dosis 300 mg/kg BB: } \frac{200 \text{ g} \times 300 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = 60 \text{ mg} \times 4 \text{ tikus} = 240 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis 600 mg/kg BB: } \frac{200 \text{ g} \times 600 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = 120 \text{ mg} \times 4 \text{ tikus} = 480 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis 900 mg/kg BB: } \frac{200 \text{ g} \times 900 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = 180 \text{ mg} \times 4 \text{ tikus} = 720 \text{ mg}$$

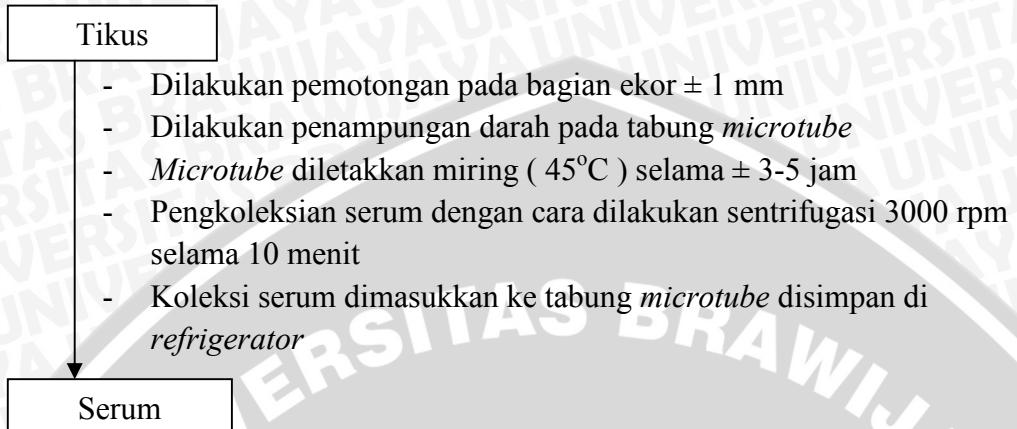
Yoghurt kemudian diencerkan dalam 1,5 ml akuades, perhitungan :

$$1,5 \text{ ml} \times 4 \text{ tikus} = 6 \text{ ml}$$

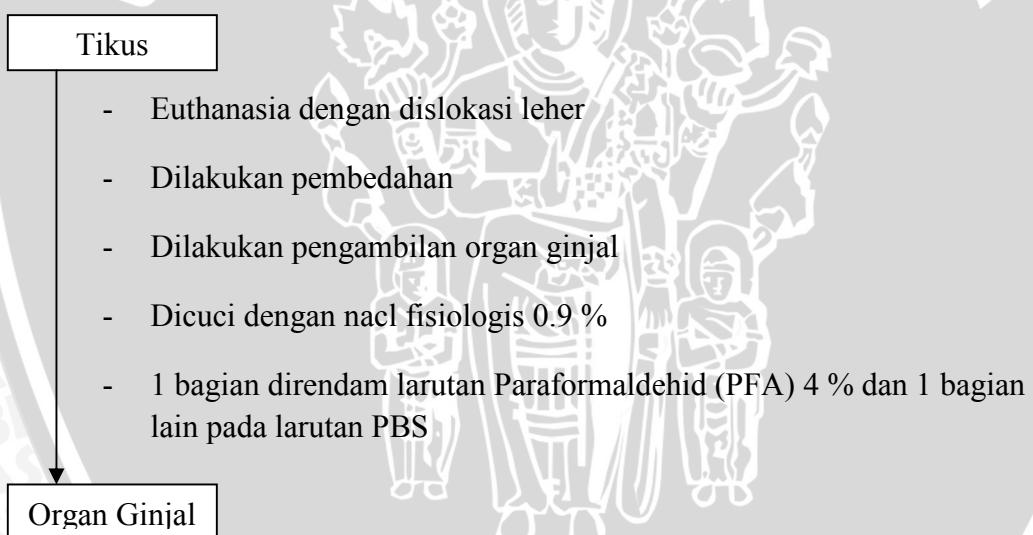
Lampiran 5. Diagram alir pembuatan yoghurt (Posecione et al., 2005)

Lampiran 6. Koleksi Serum Dan Pengambilan Organ Ginjal

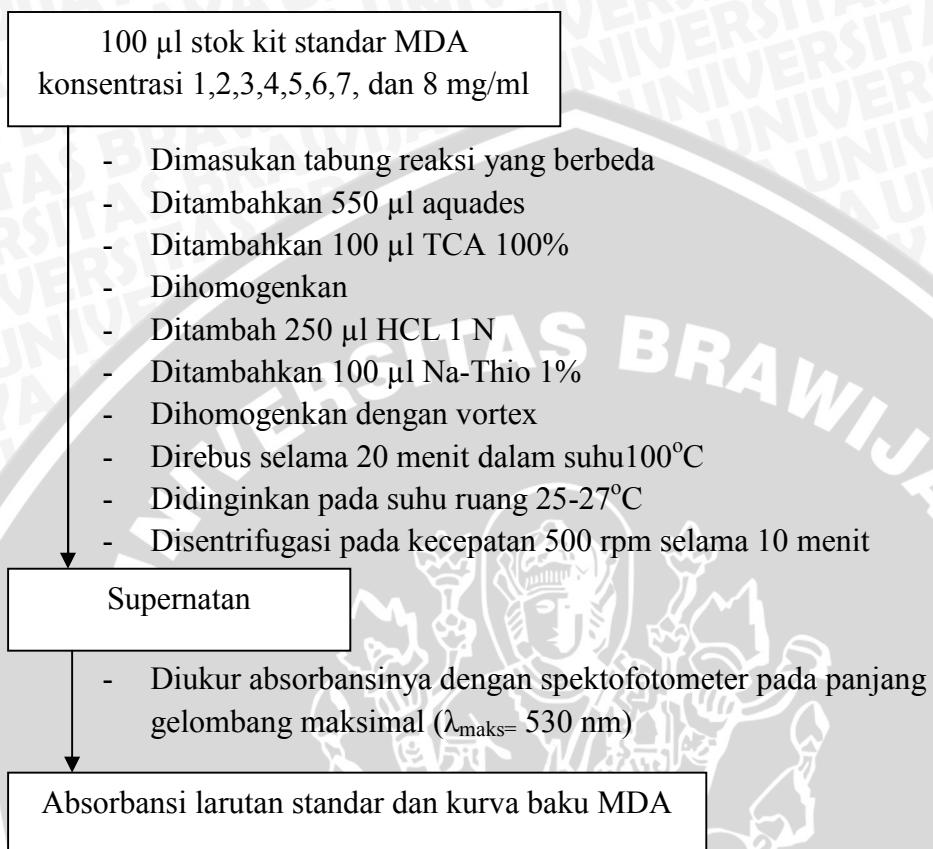
Koleksi serum (Ramadani, 2013)



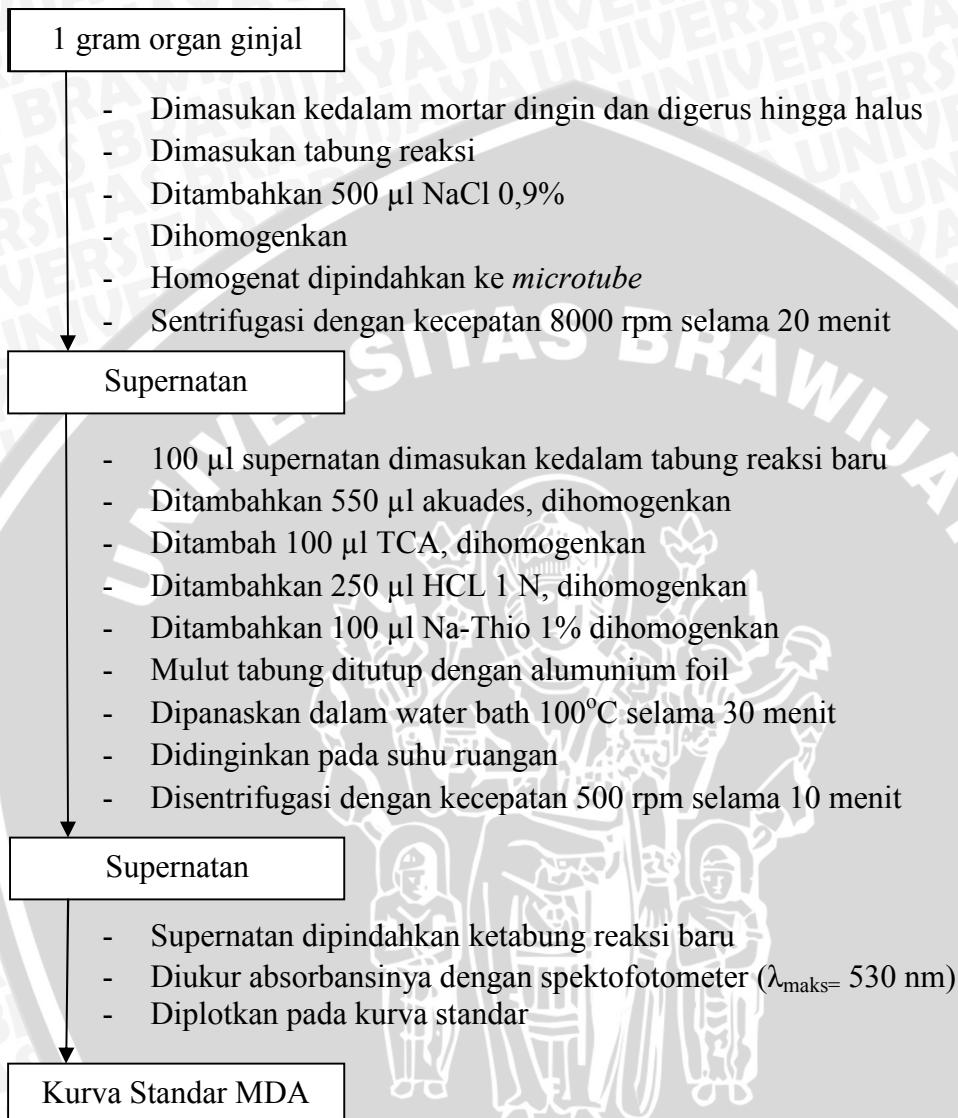
Pengambilan Organ Ginjal (Shofia, 2013)



Lampiran 7. Pembuatan Kurva Standar MDA (Aulanni'am *et al.*, 2012)

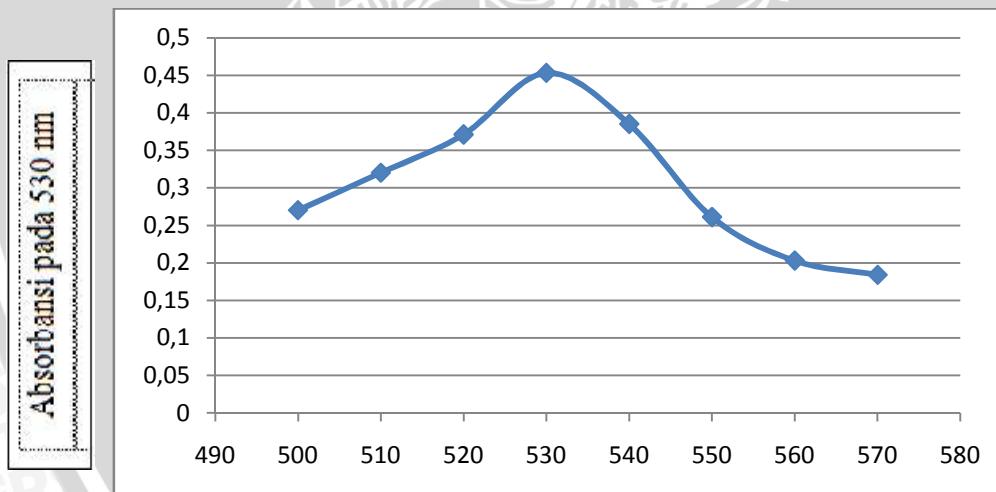


Lampiran 8. Pengukuran Kadar Malondialdehid (MDA) menggunakan uji TBA (Aulanni'am *et al.*, 2012)



Lampiran 9. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum MDA**Tabel 9.1.** Absorbansi larutan baku MDA 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$

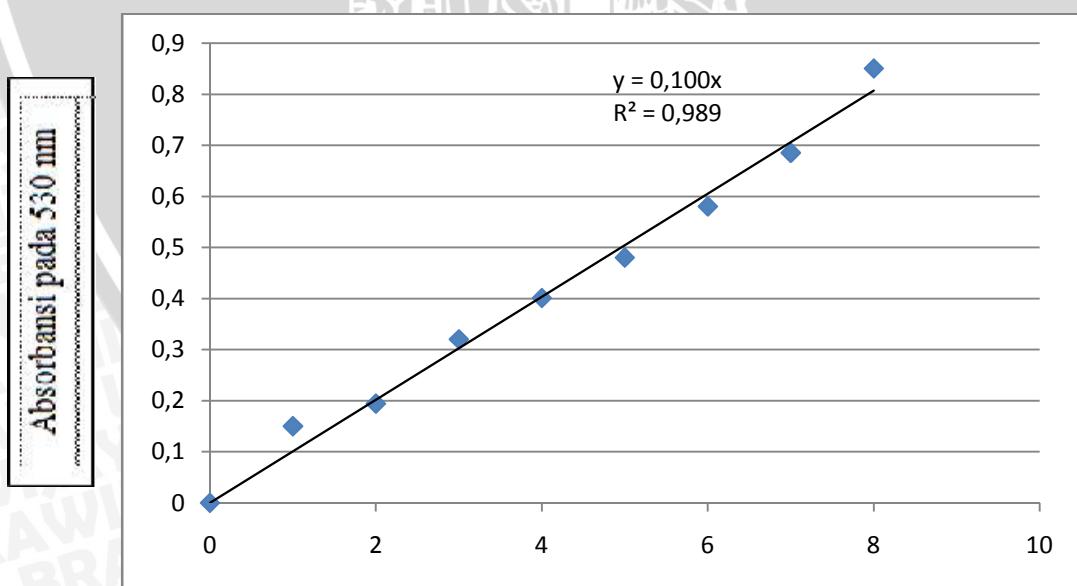
$\lambda (\text{nm})$	Absorbansi
500	0,27
510	0,32
520	0,371
530	0,453
540	0,385
550	0,261
560	0,203
570	0,184

**Gambar 9.1** Penentuan Panjang Gelombang Maksimum MDA

Absorbansi larutan standar MDA terbesar didapatkan pada panjang gelombang 530 nm, dengan menggunakan larutan standar MDA 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dengan variasi panjang gelombang. Panjang gelombang maksimum digunakan untuk pengukuran absorbansi larutan standar MDA dan sampel.

Lampiran 10. Pembuatan Kurva Baku MDA**Tabel 10.1.** Absorbansi larutan baku MDA λ 530 nm

Konsentrasi MDA ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
0	0
1	0,15
2	0,194
3	0,32
4	0,401
5	0,48
6	0,58
7	0,685
8	0,85

Kurva Baku MDA**Gambar 10.1.** Kurva Baku MDA

Tabel 10.2 Data Absorbansi MDA

Perlakuan	U1	U2	U3	U4
Kontrol Negatif	0,172	0,197	0,126	0,2
Kontrol Positif	0,768	0,726	0,766	0,71
Terapi Dosis 300 mg/kg	0,723	0,682	0,67	0,631
Terapi Dosis 600 mg/kg	0,566	0,543	0,61	0,52
Terapi Dosis 900 mg/kg	0,355	0,495	0,502	0,37

Tabel 10.3 Data MDA

Perlakuan	U1	U2	U3	U4	Rata-rata
Kontrol Negatif	1,72	1,97	1,26	2	1,7375
Kontrol Positif	7,68	7,26	7,66	7,1	7,425
Terapi Dosis 300 mg/kg	7,23	6,82	6,7	6,31	6,765
Terapi Dosis 600 mg/kg	5,66	5,43	6,1	5,2	5,5975
Terapi Dosis 900 mg/kg	3,55	4,95	5,02	3,7	4,305

Presentasi penurunan dan kenaikan kadar MDA pada ginjal setiap kelompok hewan coba yang diberikan keadaan hipercolesterolemia dan diterapi dengan yoghurt susu kambing sebagai berikut:

Kontrol Positif

Kadar MDA (%)

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Negatif}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\
 &= \frac{7,425 - 1,737}{7,425} \times 100\% \\
 &= 76,60\%
 \end{aligned}$$

**Terapi Dosis 300 mg/kg
Kadar MDA (%)**

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Dosis } 300\text{mg/kg}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\ &= \frac{7,425 - 6,765}{7,425} \times 100\% \\ &= 8,88\% \end{aligned}$$

**Terapi Dosis 600 mg/kg
Kadar MDA (%)**

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Dosis } 600\text{mg/kg}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\ &= \frac{7,425 - 5,597}{7,425} \times 100\% \\ &= 24,61\% \end{aligned}$$

**Terapi Dosis 900 mg/kg
Kadar MDA (%)**

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Dosis } 900\text{mg/kg}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\ &= \frac{7,425 - 4,305}{7,425} \times 100\% \\ &= 42,02\% \end{aligned}$$



Lampiran 11. Data dan Uji Statistik Kadar MDA

11.1 Uji Normalitas Data

Tests of Normality

perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
kadar MDA	kontrol negatif	.252	4	.	.862	4	.266
	kontrol positif	.291	4	.	.855	4	.242
	terapi 300 mg/kg	.192	4	.	.988	4	.948
	terapi 600 mg/kg	.185	4	.	.975	4	.872
	terapi 900 mg/kg	.293	4	.	.796	4	.096

11.2 Uji Homogenisitas

Test of Homogeneity of Variances

Kadar MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.147	4	15	.008

11.3 Uji One Way Anova

ANOVA

Kadar MDA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	81.368	4	20.342	91.339	.000
Within Groups	3.341	15	.223		
Total	84.709	19			



Multiple Comparisons

kadar MDA

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol negatif	kontrol positif	-5.68750*	.33370	.000	-6.7179	-4.6571
	terapi 300 mg/kg	-5.02750*	.33370	.000	-6.0579	-3.9971
	terapi 600 mg/kg	-3.86000*	.33370	.000	-4.8904	-2.8296
	terapi 900 mg/kg	-2.56750*	.33370	.000	-3.5979	-1.5371
kontrol positif	kontrol negatif	5.68750*	.33370	.000	4.6571	6.7179
	terapi 300 mg/kg	.66000	.33370	.322	-.3704	1.6904
	terapi 600 mg/kg	1.82750*	.33370	.001	.7971	2.8579
	terapi 900 mg/kg	3.12000*	.33370	.000	2.0896	4.1504
terapi 300 mg/kg	kontrol negatif	5.02750*	.33370	.000	3.9971	6.0579
	kontrol positif	-.66000	.33370	.322	-1.6904	.3704
	terapi 600 mg/kg	1.16750*	.33370	.023	.1371	2.1979
	terapi 900 mg/kg	2.46000*	.33370	.000	1.4296	3.4904
terapi 600 mg/kg	kontrol negatif	3.86000*	.33370	.000	2.8296	4.8904
	kontrol positif	-1.82750*	.33370	.001	-2.8579	-.7971
	terapi 300 mg/kg	-1.16750*	.33370	.023	-2.1979	-.1371
	terapi 900 mg/kg	1.29250*	.33370	.011	.2621	2.3229
terapi 900 mg/kg	kontrol negatif	2.56750*	.33370	.000	1.5371	3.5979
	kontrol positif	-3.12000*	.33370	.000	-4.1504	-2.0896
	terapi 300 mg/kg	-2.46000*	.33370	.000	-3.4904	-1.4296
	terapi 600 mg/kg	-1.29250*	.33370	.011	-2.3229	-.2621

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

Tukey HSD

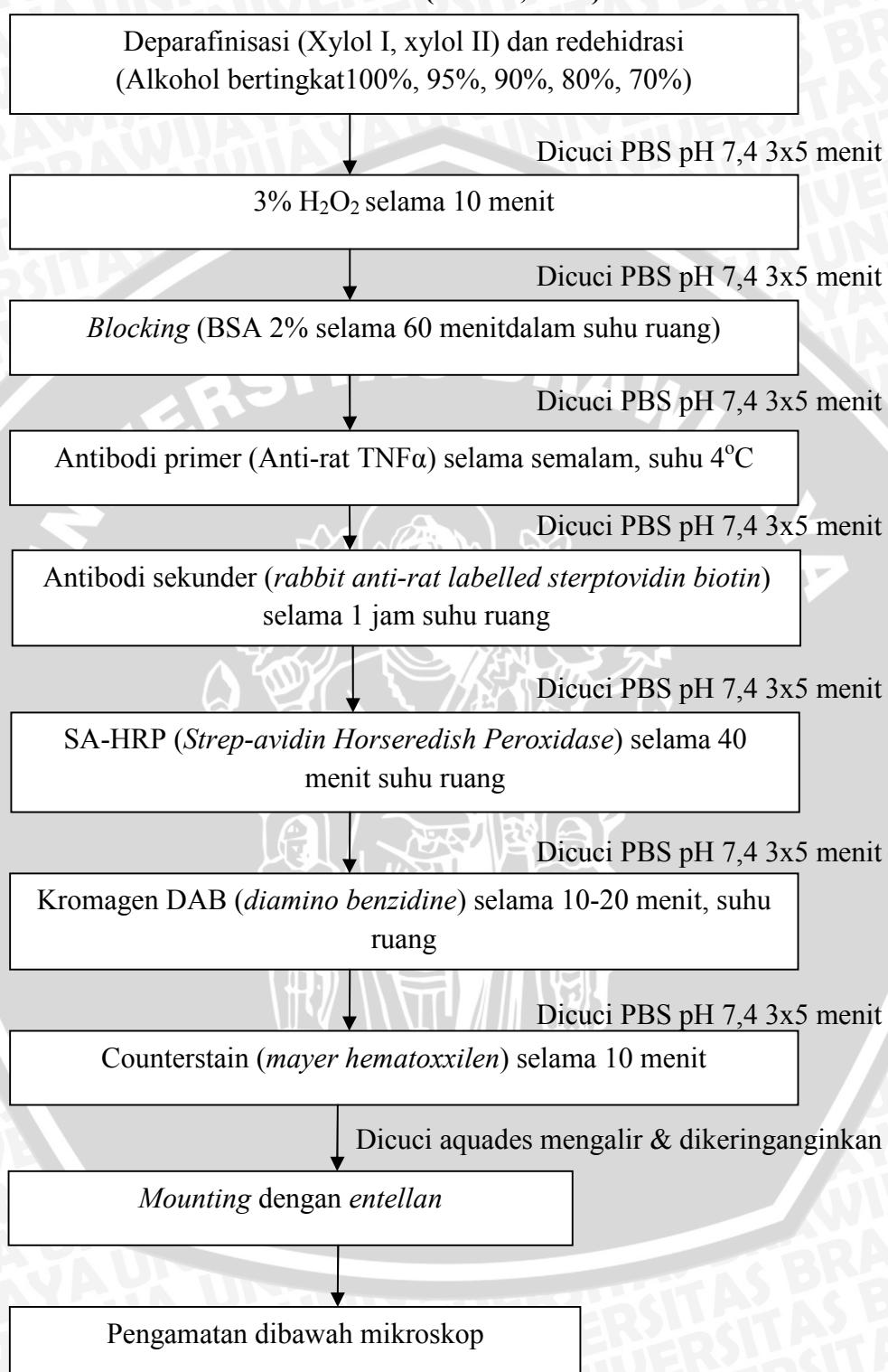
kadar MDA

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
kontrol negatif	4	1.7375			
terapi 900 mg/kg	4		4.3050		
terapi 600 mg/kg	4			5.5975	
terapi 300 mg/kg	4				6.7650
kontrol positif	4				7.4250
Sig.		1.000	1.000	1.000	.322

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



Lampiran 12. Metode Imunohistokimia (Ramos, 2005)



Lampiran 13. Data dan Uji Statistik Ekspresi TNF α **Tabel 13.1** Data Ekspresi TNF α

Perlakuan	U1	U2	U3	U4	Rata-rata
Kontrol Negatif	1,213	2,070	2,584	2,838	2,176
Kontrol Positif	17,358	16,956	18,091	17,346	17,438
Terapi Dosis 300 mg/kg	15,173	16,752	17,154	12,626	14,676
Terapi Dosis 600 mg/kg	11,859	12,551	10,689	10,336	11,359
Terapi Dosis 900 mg/kg	5,593	4,376	5,577	4,222	4,942

Presentasi penurunan dan kenaikan ekspresi TNF α pada ginjal setiap kelompok hewan coba yang diberikan keadaan hiperkolesterolemia dan diterapi dengan yoghurt susu kambing sebagai berikut:

Kontrol PositifEkspresi TNF α (%)

$$= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Negatif}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\%$$

$$= \frac{17,438 - 2,176}{17,438} \times 100\% \\ = 87,5\%$$

Terapi Dosis 300 mg/kgEkspresi TNF α (%)

$$= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Dosis 300mg/kg}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\%$$

$$= \frac{17,438 - 14,676}{17,438} \times 100\% \\ = 15,8\%$$

Terapi Dosis 600 mg/kgEkspresi TNF α (%)

$$= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Dosis 600mg/kg}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\%$$

$$= \frac{17,438 - 11,359}{17,438} \times 100\% \\ = 34,86\%$$

Terapi Dosis 900 mg/kgEkspresi TNF α (%)

$$= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Dosis 900mg/kg}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\%$$

$$= \frac{17,438 - 4,942}{17,438} \times 100\% \\ = 71,65\%$$

13.1 Uji Normalitas Data

Tests of Normality

perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ekpresi TNF	kontrol negatif	.215	4	.937	4	.634
	kontrol positif	.317	4	.908	4	.472
	dosis 300	.137	4	1.000	4	1.000
	dosis 600	.243	4	.931	4	.600
	dosis 900	.303	4	.783	4	.075

13.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

ekpresi TNF

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.362	4	15	.100

13.3 Uji One Way Anova

ANOVA

ekpresi TNF					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	663.033	4	165.758	154.618	.000
Within Groups	16.081	15	1.072		
Total	679.114	19			



Multiple Comparisons

ekpresi TNF

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol negatif	kontrol positif	-15.26150*	.73214	.000	-17.5223	-13.0007
	dosis 300	-12.50000*	.73214	.000	-14.7608	-10.2392
	dosis 600	-9.18250*	.73214	.000	-11.4433	-6.9217
	dosis 900	-2.76575*	.73214	.013	-5.0265	-.5050
kontrol positif	kontrol negatif	15.26150*	.73214	.000	13.0007	17.5223
	dosis 300	2.76150*	.73214	.014	.5007	5.0223
	dosis 600	6.07900*	.73214	.000	3.8182	8.3398
	dosis 900	12.49575*	.73214	.000	10.2350	14.7565
dosis 300	kontrol negatif	12.50000*	.73214	.000	10.2392	14.7608
	kontrol positif	-2.76150*	.73214	.014	-5.0223	-.5007
	dosis 600	3.31750*	.73214	.003	1.0567	5.5783
	dosis 900	9.73425*	.73214	.000	7.4735	11.9950
dosis 600	kontrol negatif	9.18250*	.73214	.000	6.9217	11.4433
	kontrol positif	-6.07900*	.73214	.000	-8.3398	-3.8182
	dosis 300	-3.31750*	.73214	.003	-5.5783	-1.0567
	dosis 900	6.41675*	.73214	.000	4.1560	8.6775
dosis 900	kontrol negatif	2.76575*	.73214	.013	.5050	5.0265
	kontrol positif	-12.49575*	.73214	.000	-14.7565	-10.2350
	dosis 300	-9.73425*	.73214	.000	-11.9950	-7.4735
	dosis 600	-6.41675*	.73214	.000	-8.6775	-4.1560

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



ekspresi TNF

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
kontrol negatif	4	2.1762				
dosis 900	4		4.9420			
dosis 600	4			11.3588		
dosis 300	4				14.6762	
kontrol positif	4					17.4378
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.