

**PENGARUH PEMBERIAN YOGHURT SUSU KAMBING  
SEBAGAI UPAYA PREVENTIF PADA TIKUS MODEL  
HIPERKOLESTEROLEMIA TERHADAP KADAR  
MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN EKSPRESI  
TUMOR NEKROSIS FAKTOR-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )  
DUODENUM**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**GIGIHSETYO HARI GUSTAMI**  
**105130107111006**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
POGRAM KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2015**

**PENGARUH PEMBERIAN YOGHURT SUSU KAMBING  
SEBAGAI UPAYA PREVENTIF PADA TIKUS MODEL  
HIPERKOLESTEROLEMIA TERHADAP KADAR  
MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN EKSPRESI  
TUMOR NEKROSIS FAKTOR-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )  
DUODENUM**

Sebagai salah satu syarat memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:  
**GIGIHSETYO HARI GUSTAMI**  
105130107111006



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
POGRAM KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2015**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI  
PENGARUH PEMBERIAN YOGHURT SUSU KAMBING  
SEBAGAI UPAYA PREVENTIF PADA TIKUS MODEL  
HIPERKOLESTEROLEMIA TERHADAP KADAR  
MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN EKSPRESI  
TUMOR NEKROSIS FAKTOR-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )  
DUODENUM**

**GIGIHSETYO HARI GUSTAMI  
105130107111006**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 27 Juli 2015  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc**  
NIP. 19560210 198403 2 001

**Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc**  
NIP. 19820914 200912 2 004

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran Hewan  
Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

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



**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Gihsetyo Hari Gustami  
NIM : 105130107111006  
Program Studi : Program Kedokteran Hewan  
Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Yoghurt Susu Kambing Sebagai Upaya Preventif Pada Tikus Model Hiperkolesterolemia Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Duodenum

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 24 agustus 2015

Yang menyatakan,

( Gihsetyo Hari Gustami )  
NIM.105130107111006

repository.ub.ac.id

## Pengaruh Pemberian Yoghurt Susu Kambing Sebagai Upaya Preventif Pada Tikus Model Hiperkolesterolemia Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) Duodenum

### ABSTRAK

Pola konsumsi masyarakat yang tidak sehat mengakibatkan terjadinya gangguan metabolisme, salah satunya hiperkolesterolemia. Upaya mempertahankan tingkat kolesterol dalam tubuh yaitu dengan konsumsi yoghurt susu kambing yang mengandung bakteri asam laktat (BAL), dan peptida bioaktif, yang berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan imunomodulator. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh preventif yoghurt susu kambing terhadap ekspresi tumor nekrosis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) dan kadar malondialdehida (MDA) duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet hiperkolesterol. Penelitian ini menggunakan *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol, kelompok hiperkolesterolemia, kelompok pencegahan hiperkolesterolemia dosis 300mg/kg BB, 600mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB. Diet hiperkolesterol dibuat dari campuran asam kolat, minyak babi, dan kuning telur puyuh rebus. Pencegahan hiperkolesterolemia dilakukan dengan pemberian yoghurt susu kambing selama 28 hari dan di lanjutkan dengan pemberian yoghurt susu kambing dan diet hiperkolesterol selama 14 hari. Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini secara kuantitatif berupa hasil pengukuran kadar MDA dan presentase area TNF- $\alpha$  yang dianalisa menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (*Tukey*) dengan  $\alpha = 5\%$ . Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) pada kadar MDA dan ekspresi TNF- $\alpha$  antar perlakuan. Pencegahan hiperkolesterolemia dengan yoghurt susu kambing dosis 900 mg/kg BB mampu menekan peningkatan kadar MDA sebesar 5,28%, serta menekan peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  hingga 8,861% pada duodenum tikus model hiperkolesterolemia. Kesimpulan dari penelitian ini, yoghurt susu kambing dapat dijadikan salah satu alternatif pencegahan hiperkolesterolemia.

Kata Kunci : Pencegahan, Hiperkolesterolemia, Yoghurt susu kambing, TNF- $\alpha$ , MDA



## The Effect of Goat Milk Yogurt as a Preventive agent of Hypercholesterolemia toward Malondialdehyde (MDA) Levels and Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) Expression on Rat Duodenum

### ABSTRACT

The people's habit consuming non healthy foods caused metabolism disorder, such as hypercholesterolemia. The efforts to endure cholesterol level is consuming goat milk yogurt which contains of Lactic Acid Bacteria (LAB) and active biopeptide which has function as a antioxidant, antiinflammation and immunomodulator. The aim of this research was to study the preventive effect of goat milk yogurt on the MDA level and TNF- $\alpha$  expression in rat's duodenum which given hypercholesterol diet. This research used male *Rattus norvegicus* Wistar strain which divided into 5 groups; control group, hypercholesterolemia group, hypercholesterolemia preventive group dose of 300 mg/kg BW, 600 mg/kg BW and 900 mg/kg BW. Preventive of goat milk yogurt was conducted on 1<sup>st</sup> - 28<sup>th</sup> days. Hypercholesterol diet made from cholic acid, lard and boiled egg yolk quail and administered for 14 days on 29<sup>th</sup> - 42<sup>th</sup> days. MDA levels was measured with TBA assay and TNF- $\alpha$  expression was measured with axio vision then analysed using ANOVA continued by tukey test ( $\alpha=5\%$ ). The results showed that MDA level and TNF- $\alpha$  expression significantly ( $p<0.05$ ) between treatments. Preventive of goat milk yogurt dose of 900 mg/kg BW could maintain MDA level (5.28%) and TNF- $\alpha$  expression (8.861%) on hypercholesterolemic animal model's duodenum. The result showed that goat milk yogurt could be used as hypercholesterolemia preventive alternative.

**Keywords:** Prevention, Hypercholesterolemia, Goat Milk Yogurt, TNF- $\alpha$ , MDA

## KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa karena atas limpahan rahmat, hidayah dan pertolongan-Nya lah sehingga penulis mampu menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **"Pengaruh Pemberian Yoghurt Susu Kambing Sebagai Upaya Preventif Pada Tikus Model Hiperkolesterolemia Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Duodenum"** dengan lancar.

Selama pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc dan Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc selaku dosen pembimbing atas bimbingan, saran, kesabaran, fasilitas serta waktu yang telah diberikan selama ini.
2. Drh. Handayu Untari dan Drh. Ani Setianingrum selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan kritik yang sangat membangun.
3. Seluruh Jajaran Dekanat, Dosen dan Staff Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas dorongan semangat dan fasilitas yang diberikan.
4. Seluruh staf serta asisten Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu yang telah diberikan.
5. Ayah Agus Dwi Purwanto, Ibu Hariningsih serta adik-adikku Hajar Alfian Gustami, Imawan Pandu Gustami untuk doa, kasih sayang, dukungan serta pengorbanan baik moril maupun materi selama ini.
6. Sahabat almarhum Haryadi Saptono, teman-teman hiperkolesterolemia project 2014: Hendra, Adin, Serena, Tika, Ratri, Aman, Anggun, Sugi, Bondan, Sukarno, Fahmi, Ida, Ivan, Wahyuni, Lala, Sultan, Rahmad, Maya, Desy, Anin dan Yusvani terimakasih atas cinta, persahabatan, pengalaman, motivasi, semangat, inspirasi, dan telah berjuang bersama dalam penelitian ini

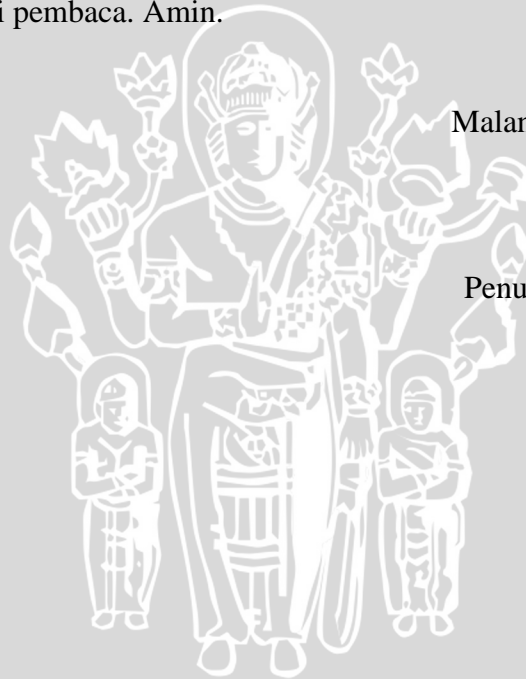
7. Keluarga besar Fakultas Kedokteran Hewan angkatan 2010 atas cinta dan persahabatan yang selalu terjaga
8. Serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan laporan ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari kata sempurna, maka 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 penulis dan semoga Laporan Praktek Kerja Lapangan ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca. Amin.

Malang, Agustus 2015

Penulis

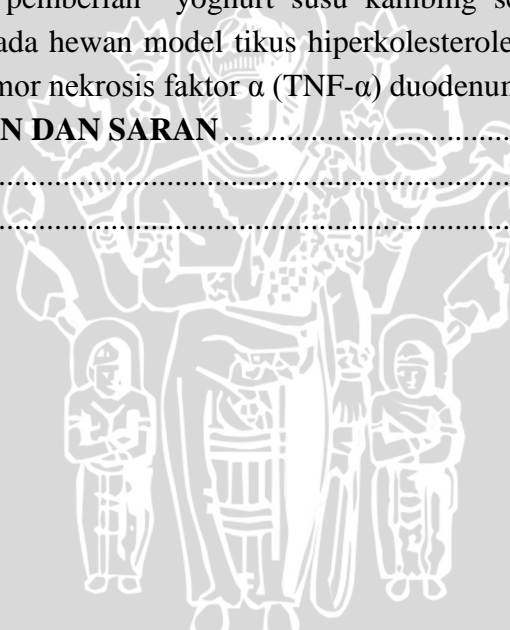




## DAFTAR ISI

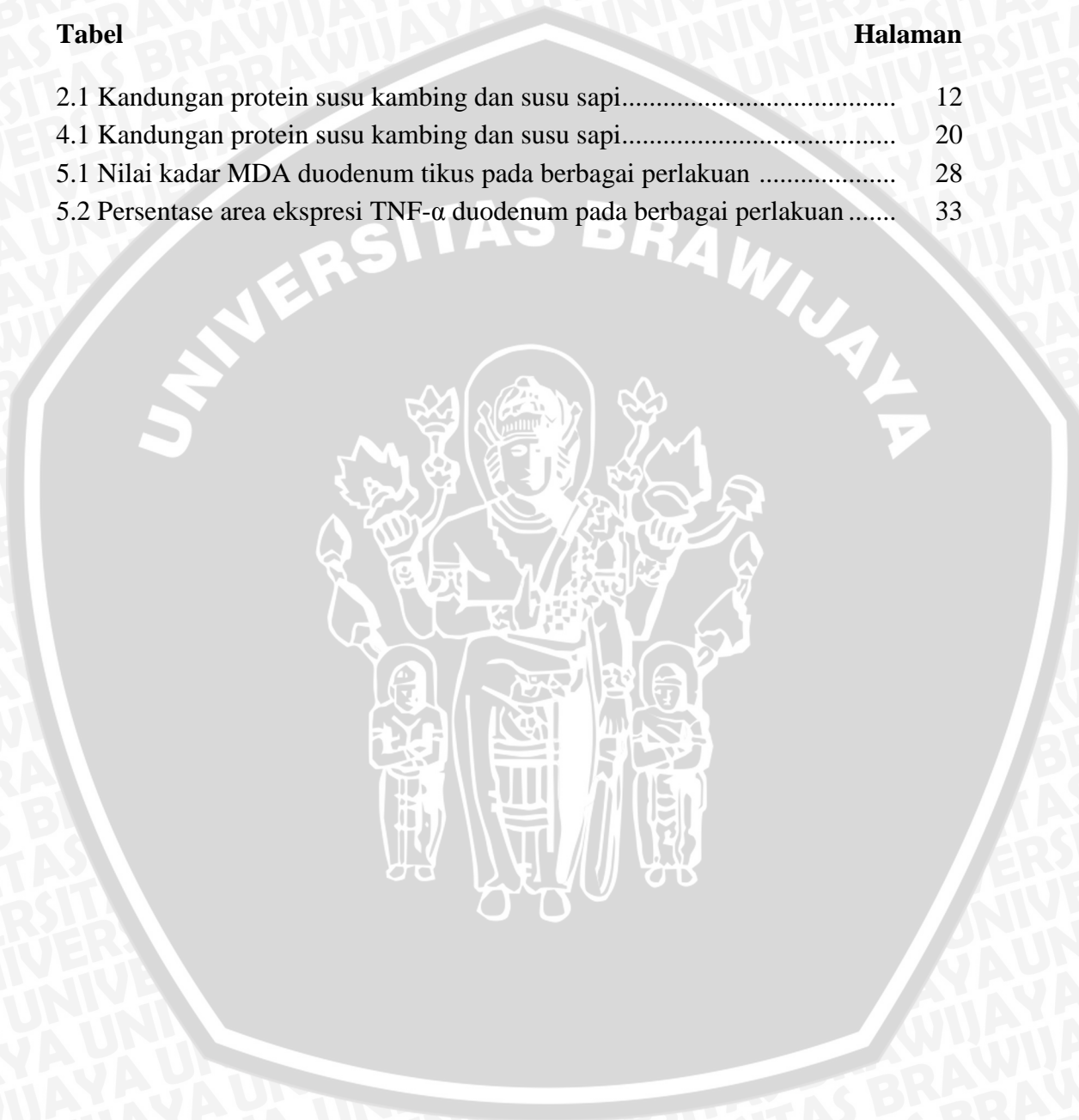
	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iii</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>iv</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG.....</b>	<b>xi</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan .....	5
1.5 Manfaat .....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Hiperkolesterolemia .....	6
2.2 Persiapan hewan model hiperkoleserolemia .....	8
2.3 Malondialdehida (MDA).....	9
2.4 Tumor nekrosis faktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	10
2.5 Yoghurt susu kambing .....	11
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS .....</b>	<b>15</b>
3.1 Kerangka Konseptual .....	15
3.2 Hipotesis.....	17
<b>BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>18</b>
4.1 Tempat Dan Waktu Penelitian .....	18
4.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	18
4.3 Tahap penelitian .....	19
4.4 Prosedur kerja.....	19
4.4.1 Kerangka Penelitian dan Preparasi Hewan Model Tikus.....	19
4.4.2 Preparasi yoghurt susu kambing .....	21
4.4.2.1 Persiapan starter.....	21
4.4.2.2 Pembuatan yoghurt .....	22
4.4.2.3 Penentuan dosis .....	22

4.4.3 Pemberian yoghurt sebagai upaya pencegahan.....	22
4.4.4 Pemberian Diet Hiperkolesterol Pada Tikus .....	23
4.4.5 Pengukuran kadar MDA duodenum.....	23
4.4.5.1 Persiapan organ.....	23
4.4.5.2 Pembuatan kurva standar MDA .....	24
4.4.5.3 Pengukuran Kadar MDA Menggunakan Uji <i>Thiobarbituric Acid (TBA)</i> .....	24
4.4.6 Analisis ekspresi TNF $\alpha$ .....	25
4.5 Analisa Data .....	27
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	28
5.1 Pengaruh pemberian yoghurt susu kambing sebagai upaya preventif pada hewan model tikus hiperkolesterolemia terhadap kadar malondialdehida (MDA) duodenum Analisa Data.....	28
5.2 Pengaruh pemberian yoghurt susu kambing sebagai upaya preventif pada hewan model tikus hiperkolesterolemia terhadap ekspresi tumor nekrosis faktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) duodenum.....	31
<b>BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	37
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	38
<b>LAMPIRAN</b> .....	41



**DAFTAR TABEL**

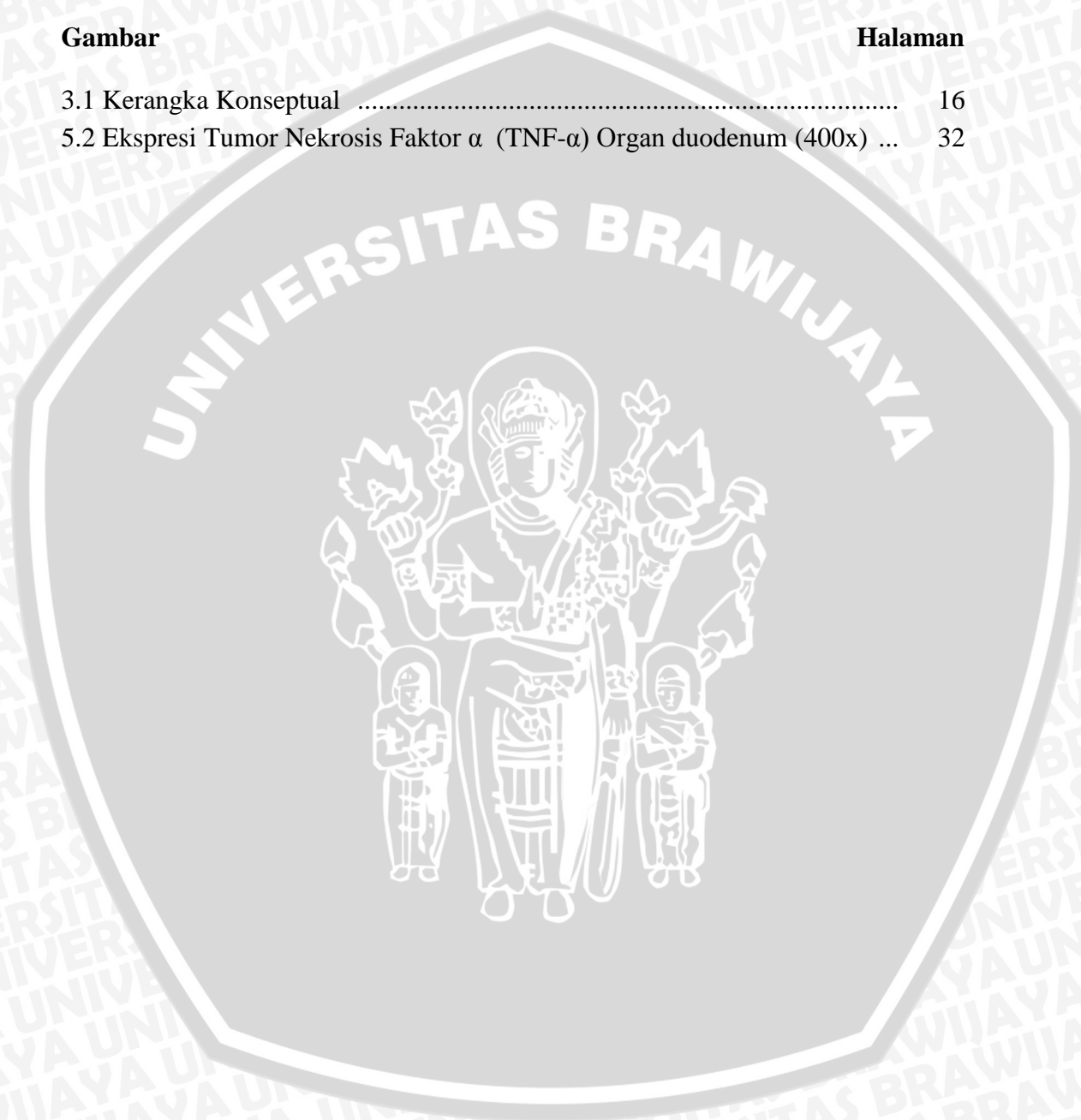
<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Kandungan protein susu kambing dan susu sapi.....	12
4.1 Kandungan protein susu kambing dan susu sapi.....	20
5.1 Nilai kadar MDA duodenum tikus pada berbagai perlakuan .....	28
5.2 Persentase area ekspresi TNF- $\alpha$ duodenum pada berbagai perlakuan .....	33





## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
3.1 Kerangka Konseptual .....	16
5.2 Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) Organ duodenum (400x) ...	32



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Keterangan Kelaikan Etik .....	41
2. Kerangka operasional rancangan penelitian .....	42
3. Pembuatan Dosis Yoghurt Susu Kambing .....	43
4. Pembuatan Diet Hiperkolesterol .....	45
5. Pengambilan organ dudenum .....	46
6. Persiapan larutan sebelum bedah .....	47
7. Pembuatan Kurva Standar MDA .....	48
8. Kurva Standar MDA .....	49
9. Pengukuran Kadar Malondialdehida (MDA).....	50
10. Data Absorbansi dan Perhitungan Kadar MDA.....	51
11. Presentasi Peningkatan dan Penurunan Kadar MDA .....	52
12. Hasil Uji Statistik MDA.....	53
13. Metode Imunohistokimia .....	56
14. Ekspresi TNF- $\alpha$ .....	57
15. Presentasi Peningkatan dan Penurunan Ekspresi TNF- $\alpha$ .....	58
16. Hasil Uji Statistik TNF- $\alpha$ .....	59

## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BB	Berat Badan
°C	Derajat celcius
G	Gram
Kg	Kilogram
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MDA	<i>Malondialdehyde</i>
Mg	Milligram
Mm	Millimeter
ml	Mililiter
NaCl	Natrium Clorida
O <sub>2</sub>	Oksigen
PFA	Paraformaldehid
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pH	Power of Hidrogen
RAL	Rancangan acak lengkap
ROS	<i>Reactive ocygen spesies</i>
TBA	<i>Thiobarbituric acid</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pola konsumsi masyarakat yang tidak sehat mengakibatkan terjadinya gangguan metabolisme di dalam tubuh. Hiperkolesterolemia merupakan salah satu gangguan metabolisme yang disebabkan oleh pola konsumsi yang tidak baik. Jumlah penderita hiperkolesterolemia semakin meningkat setiap tahunnya. Hiperkolesterolemia dapat terjadi pada hewan kesayangan, seperti kucing. Kejadian hiperkolesterolemia pada kucing di dunia mencapai 13%. Tingginya hiperkolesterolemia pada kucing disebabkan pemberian pakan pabrikan, yang mengandung kadar kolesterol yang tinggi (Tapan, 2005).

Hiperkolesterolemia terjadi karena banyak faktor, diantaranya adalah asupan kolesterol dan lemak jenuh yang melebihi kebutuhan, bobot badan, usia, kurang olahraga, stres emosional, gangguan metabolisme, dan kelainan genetik. Asupan kolesterol dan lemak jenuh yang tinggi mampu menekan pembentukan reseptor *Low Density Lipoprotein* (LDL). Penurunan pembentukan reseptor LDL menyebabkan jumlah kolesterol yang beredar di dalam darah akan melebihi normalnya (Kasim, *et al.*, 2006).

Tingginya kolesterol didalam tubuh mengakibatkan peningkatan perombakan kolesterol menjadi asam empedu. Sintesis asam empedu terdapat proses 7 $\alpha$ -hidroksilasi yang merupakan tahapan awal biosintesis asam empedu. Oksigen pada reaksi 7 $\alpha$ -hidroksilasi sangat mudah tereduksi menjadi radikal bebas (Mayes, 1996). Hasil akhir dari peroksidasi lipid ini merupakan suatu golongan aldehida yaitu malondialdehida (MDA). Duodenum merupakan bagian

dari usus halus yang langsung berhubungan dengan hati sehingga erat terjadi kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas dari asam empedu. Peroksidasi lipid dalam duodenum juga mengakibatkan kerusakan sel meningkat sehingga menginisiasi sekresi TNF- $\alpha$  sebagai awal terjadinya inflamasi.

Indonesia merupakan negara dengan konsumsi susu yang tinggi, terbukti dari sejumlah produsen susu di Indonesia masih kekurangan kebutuhan susu. Kebutuhan susu nasional sebanyak 1,5 miliar liter per tahun, sebanyak 67% masih harus impor (Setiawan, 2008). Susu banyak mengandung protein, enzim, mineral, vitamin A, dan vitamin B (riboflavin), terutama pada susu kambing. Susu kambing mengandung protein spesifik yang berbeda dengan susu sapi. Protein spesifik ini berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan imunomodulator (Padaga dkk, 2009). Protein pada susu tidak selalu aktif karena globular protein yang besar, salah satu cara untuk mengaktifkan protein melalui fermentasi. Salah satu produk olahan fermentasi susu di Indonesia adalah yoghurt yang pembuatannya menggunakan bakteri *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* dan *Streptococcus thermophilus* dalam proses fermentasi.

Bakteri hidup yang ada pada yoghurt susu kambing menghasilkan enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH) yang mampu menghambat penyerapan kolesterol. *Bile Salt Hydrolase* (BSH) dapat mendekongugasi asam empedu, sehingga menurunkan kadar kolesterol. Bakteri Asam Laktat (BAL) dalam yoghurt juga dapat memodulasi sistem imun (Grajek *et al.*,2005). Biopeptida dalam yoghurt sebagai antioksidan yang dapat menekan reaksi radikal bebas salah satunya peroksidasi lipid dan sebagai anti inflamasi.



Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui yoghurt susu kambing sebagai upaya preventif terhadap hiperkolesterolemia. Kandungan biopeptida pada yoghurt susu kambing diyakini dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan endogen sehingga akan mempertahankan kadar malondialdehida (MDA) dan ekspresi tumor nekrosis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pada duodenum.

### 1.2 Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana pengaruh preventif yoghurt susu kambing dapat mempertahankan ekspresi *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) pada tikus (*Rattus norvegicus*) setelah diinduksi hiperkolesterolemia?
2. Bagaimana pengaruh preventif yoghurt susu kambing dapat mempertahankan kadar malondialdehida (MDA) tikus (*Rattus norvegicus*) setelah diinduksi diet hiperkolesterolemia?

### 1.3 Batasan Masalah

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

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan 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 no:217-KEP-UB (Lampiran 1).



- 2) Hewan model hiperkolesterolemia adalah hewan model yang diinduksi diet hiperkolesterolemia yang dilakukan selama 14 hari dengan komposisi diet hiperkolesterolemia antara lain asam kholat 0,02 g, minyak babi 2 g, kuning telur puyuh rebus 1 g (Gani dkk, 2013).
- 3) Yoghurt susu kambing disiapkan dengan susu kambing yang diperoleh dari BPPP dan diinokulasikan starter *yougertmet* (LYO-SAN INC : 500 Aeroparc, C:P598, Lachute, QC. Canada J8H.464) yang mengandung BAL (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, dan *S. thermophilus*) sebesar 10<sup>8</sup> CFU/ml.
- 4) Dosis pencegahan yang digunakan adalah 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB yang dilarutkan dalam 1,5 ml aquades dan diberikan dengan cara disonde selama 28 hari dilanjutkan pada hari 29-42 diberikan yoghurt susu kambing dengan dosis tersebut bersamaan dengan diet hiperkolesterolemia.
- 5) Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- $\alpha$  dengan metode imunohistokimia dan kadar malondialdehida (MDA) melalui uji *Thiobarbituric Acid* (TBA) organ duodenum

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Sesuai rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui manfaat yoghurt susu kambing dalam mempertahankan ekspresi TNF- $\alpha$  duodenum sebagai tindakan preventif hiperkolestrol pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet hiperkolesterolemia.

2. Mengetahui manfaat yoghurt susu kambing dalam mempertahankan kadar malondialdehida (MDA) duodenum sebagai tindakan preventif hiperkolestrol pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet hiperkolesterolemia.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk meningkatkan khasanah ilmu pengetahuan masyarakat dalam memberikan informasi akan manfaat yoghurt susu kambing sebagai salah satu produk alternatif mencegah penyakit hiperkolesterolemia pada manusia maupun hewan.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Hiperkolesterolemia

Hiperkolesterol merupakan suatu keadaan dimana kolesterol yang beredar di dalam darah melebihi normalnya (Kasim *et al.*, 2006). Kolesterol pada keadaan normal terdapat pada dinding dan membran setiap sel. Kadar kolesterol normal dalam darah pada manusia adalah 120-240 mg/dl, pada tikus putih yaitu sekitar 40-130 mg/dl (Murray *et al.*, 2003). Salah satu hal yang dapat memicu terjadinya hiperkolesterolemia adalah diet yang kaya akan kolesterol dan lemak jenuh, hal ini dikarenakan diet yang kaya akan kolesterol dan lemak jenuh dapat menekan pembentukan reseptor *Low Density Lipoprotein* sehingga meningkatkan jumlah kolesterol yang beredar di dalam darah. Reseptor LDL berperan dalam proses endositosis LDL yang kaya kolesterol. Reseptor LDL terdapat di seluruh permukaan sel yang memiliki nukleus, terutama sel hati yang menyingkirkan hampir 70% LDL pada sirkulasi darah. Jika pembentukan reseptor LDL menurun, maka jumlah kolesterol yang beredar dalam tubuh akan melebihi normal (Kasim *et al.*, 2006).

Kolesterol merupakan lipid amfipatik dan termasuk komponen penting penyusun membran dan lapisan luar lipoprotein. Kolesterol berada dalam bentuk bebas dan ester dengan asam lemak. Kolesterol terdapat di dalam jaringan dan plasma. Kolesterol bebas dan kolesterol ester yang ada di dalam plasma diangkut ke dalam lipoprotein. *Low Density Lipoprotein* (LDL) plasma adalah kendaraan untuk mengangkut kolesterol ke berbagai jaringan, sedangkan *High Density*



*Lipoprotein* (HDL) mengangkut kolesterol bebas dari jaringan ke hati untuk disingkirkan dari tubuh atau diubah menjadi asam empedu melalui mekanisme yang dikenal sebagai transport balik kolesterol (Murray *et al.*, 2003).

Patomekanisme terjadinya hiperkolesterolemia adalah lemak yang berasal dari makanan akan mengalami proses pencernaan didalam usus menjadi asam lemak bebas, trigliserid, fosfolipid dan kolesterol, yang diserap ke dalam bentuk kilomikron. Sisa pemecahan kilomikron beredar menuju hati dan digolong-golongkan menjadi kolesterol. Sebagian kolesterol ini dibuang ke empedu sebagai asam empedu dan sebagian lagi bersama-sama dengan trigliserida akan berikatan dengan protein tertentu (apoprotein) dan membentuk *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL), yang selanjutnya dipecah oleh enzim lipoprotein menjadi *Intermediet Density Lipoprotein* (IDL) yang tidak bisa bertahan 2-6 jam karena langsung akan diubah menjadi *Low Density Lipoprotein* (LDL) (Kasim dkk, 2006). Pakan yang mengandung kolesterol tinggi menyebabkan penekanan pembentukan reseptor LDL, sedangkan reseptor LDL tersebut sangatlah berperan dalam endositosis LDL dalam darah, sehingga menyebabkan tingginya kadar LDL dalam darah sehingga menyebabkan hiperkolesterolemia.

Duodenum merupakan tempat penyerapan kolesterol. Pada saat kondisi hiperkolesterolemia duodenum mengalami inflamasi akibat gangguan sintesa asam empedu sehingga terjadi lipid teroksidasi. Duodenum merupakan bagian dari usus halus yang berperan dalam sistem pencernaan. Fungsi utama saluran pencernaan yaitu mencerna dan memecah makanan di dalam lumennya menjadi molekul yang lebih kecil dan sederhana yang bisa diserap oleh sirkulasi tubuh

untuk menunjang kehidupan organisme. Duodenum merupakan organ tubular yang terbentang dari pilorus ke usus besar. Lapisan-lapisan penyusun dinding duodenum dilihat secara makroskopis mulai dari dalam ke luar lumen usus terdiri atas tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa (Frappier, 2006).

## 2.2 Hewan Model Hiperkolesterolemia

Hewan coba hiperkolesterol merupakan hewan coba yang diberi diet hiperkolesterolemia sehingga memiliki kolesterol darah melebihi batas normal (Murray *et al.*, 2003). Tikus (*Rattus norvegicus*) dipilih dikarenakan tikus memiliki karakteristik genetik yang unik yaitu memiliki kemiripan terhadap manusia, mudah berkembang biak, serta mudah untuk mendapatkannya. Selain itu, tikus tidak dapat muntah karena struktur anatomi tidak lazim pada tempat bermuara esofagus ke dalam lambung sehingga mempermudah proses pencekukan perlakuan menggunakan sonde lambung. Ciri-ciri morfologi tikus (*Rattus Norvegicus*) yaitu memiliki kepala besar, ekor pendek, memiliki berat 150-200 gram, panjang tubuh 18-20 cm, kepala dan telinga berukuran 20-23.

Klasifikasi tikus putih menurut Myres dan 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>



Hewan coba hiperkolesterol dapat dibuat salah satu caranya adalah dengan menggunakan diet hiperkolesterolemia. Diet hiperkolesterol merupakan suatu komposisi pakan yang terdiri dari kuning telur puyuh rebus, minyak babi dan asam kholat. Pemberian diet kolesterol tersebut diberikan selama 14 hari dan akan mengakibatkan terganggunya metabolisme kolesterol dalam tubuh (Gani dkk, 2013).

### 2.3 Malondialdehida (MDA)

Malondialdehida (MDA) merupakan salah satu produk dari peroksidasi lipid. Pengukuran MDA memberikan perkiraan aktifitas radikal bebas dan kadar MDA yang tinggi dapat menunjukkan sel dalam keadaan stres oksidatif (Allen and Tressini, 2000).

Kolesterol dan radikal bebas erat hubungannya pada proses sintesis asam empedu. Kolesterol dieliminasi dari tubuh setelah terlebih dahulu diubah menjadi asam empedu. Asam empedu primer, yakni asam kolat dan asam kenodeoksikolat, disintesis dari prekursor yang berasal dari kolesterol. Reaksi  $7\alpha$ -hidroksilasi merupakan tahap pertama yang wajib pada biosintesis asam empedu, sekaligus membatasi laju reaksi tersebut. Reaksi tersebut dikatalisis oleh  $7\alpha$ -hidroksilase, suatu enzim mikrosomal. Reaksi  $7\alpha$ -hidroksilasi ini memerlukan oksigen, NADPH, serta sitokrom P-450 oksidase (Mayes, 1996).

Di dalam reaksi hidroksilasi kolesterol, oksigen mudah tereduksi menjadi radikal bebas anion superoksida ( $O_2 \cdot^-$ ). Efek kimiawi  $O_2 \cdot^-$  dalam jaringan diperkuat oleh sifatnya yang menimbulkan reaksi rantai radikal bebas. Dikemukakan bahwa  $O_2 \cdot^-$  yang terikat pada sitokrom P-450 merupakan



intermediet dalam pengaktifan oksigen pada berbagai reaksi hidroksilasi (Mayes, 1996). Peningkatan aktivitas sitokrom P-450 dalam memperantarai reaksi hidroksilasi membuat radikal bebas yang terbentuk semakin banyak.

Radikal bebas yang tinggi sangat reaktif, karena radikal bebas merupakan suatu gugus yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Peroksidasi lipid merupakan salah satu contoh dari kerusakan komponen sel hidup (Hasanah, 2008). Radikal bebas juga dapat merusak gugus lain selain lipid yaitu protein, gugus etiol enzim, karbohidrat dan nukleotida.

Peroksidasi lipid merupakan penyatuan molekul oksigen ke dalam PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) pada membran biologis. Oksidasi PUFA oleh radikal bebas terjadi pada atom H yang bersifat labil, terutama terikat oleh atom C yang berikatan rangkap, sehingga terbentuk radikal baru yang peka terhadap oksigen (Radikal Peroksi). Malonaldehida (MDA) merupakan hasil akhir dari peroksidasi lipid (Hasanah, 2008).

#### **2.4 Tumor nekrosis faktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Sitokin merupakan mediator (protein atau glikoprotein) yang dihasilkan oleh sel dalam reaksi radang atau imunologik yang berfungsi sebagai isyarat antara sel-sel untuk membentuk jaringan komunikasi dalam respon imun. Tumor necrosis faktor merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah yang besar yang menimbulkan reaksi sisitemik (Baratawidjaja, 2006).

Tumor nekrosis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) bersumber utama dari fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK dan sel mast. Tumor

nekrosis faktor  $\alpha$  berfungsi membuat permukaan sel endotel menjadi adesif melalui ekspresi reseptor permukaan baru (molekul adesif) pada konsentrasi yang rendah. Tumor nekrosis faktor  $\alpha$  juga menyebabkan peningkatan kemampuan adesif netrofil terhadap endotel. Jika produksi TNF- $\alpha$  berlebihan maka akan menyebabkan terganggunya keseimbangan aktivitas prokoagulan dan antikoagulan. Tumor nekrosis faktor pada kadar rendah bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. Tumor nekrosis faktor pada kadar sedang berperan dalam inflamasi sistemik, dan saat tinggi menimbulkan patologi *shock* septik (Karnen dan Iris, 2009).

### 2.5 Yoghurt susu kambing

Susu kambing merupakan sumber protein hewani yang memiliki gizi yang sangat baik (Sarwono, 2007). Padaga dkk (2009) meneliti terdapat manfaat dari kasein dan whey dari susu kambing. Susu kambing memiliki protein spesifik pada berat molekul 36-55 kDa yang berbeda dengan susu lainnya. Protein spesifik tersebut memiliki fungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan imunomodulator dalam perbaikan jaringan (Padaga dkk, 2009).

Salah satu protein yang menyebabkan alergi adalah  $\alpha_{s1}$ -CN. Susu kambing memiliki  $\alpha_{s1}$ -CN yang lebih rendah dibandingkan susu sapi.  $\alpha_{s1}$ -CN yang rendah pada susu kambing dapat menghindarkan alergi dibandingkan dengan susu sapi yang memiliki  $\alpha_{s1}$ -CN yang lebih tinggi. Susu kambing juga memiliki globulula lemak yang lebih kecil sehingga mudah untuk dicerna dibandingkan dengan susu sapi. Penyerapan asam amino susu kambing lebih efisien dibandingkan dengan susu sapi (Ceballos *et al.*, 2009).

**Tabel 2.1** Kandungan protein susu kambing dan susu sapi

No	Kandungan	Susu Kambing (g/100 g protein)	Susu Sapi (g/100g protein)
1.	<i>Casein</i> (CN)	82.70	82.65
2.	$\alpha_{s1}$ -CN	18.92	30.80
3.	$\alpha_{s2}$ -CN	8.52	7.50
4.	$\beta$ + k-CN	55.26	44.50
5.	<i>Whey Protein</i>	17.30	17.35

(Ceballos *et al.*, 2009)

Protein susu tidak selalu aktif dan bermanfaat namun akan aktif ketika ada aktifitas proteolitik yang mengubah protein tersebut menjadi molekul yang lebih kecil lagi. Salah satu cara untuk mengaktifkan protein tersebut melalui proses fermentasi. Yoghurt merupakan produk susu fermentasi. Yoghurt menurut SNI 2981 Tahun 2009 adalah produk yang diperoleh dari fermentasi susu dan atau susu rekonstitusi dengan menggunakan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dan atau bakteri asam laktat lain yang sesuai, dan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan. Komposisi yoghurt menurut SNI 2981 tahun 2009 harus memenuhi beberapa kriteria nutrisi yang meliputi lemak, protein, abu, keasaman dan bahan kering tanpa lemak (BSN, 2009). Yoghurt susu kambing mengandung vitamin diantaranya A, C dan E (Sclanac *et al.*, 2010).



Yoghurt dibuat dengan menggunakan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat yang biasa digunakan dalam pembuatan yoghurt adalah *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus*. Kedua jenis bakteri asam laktat ini merupakan kultur yang diutamakan oleh standar *United States Food and Drug Administration* (USFDA) untuk produk yoghurt di Amerika Serikat (Water, 2003). Yoghurt merupakan minuman kesehatan yang baik untuk *diet* atau *dietetic purpose* dan pengobatan atau *therapeutic purpose* (Tamime dan Robinson, 2007). Yoghurt baik dikonsumsi oleh penderita intoleransi laktosa karena memiliki kadar laktosa yang lebih rendah yaitu 2 – 3% dibanding dengan susu segar sebesar 4,8% (Robinson, 2002).

Bakteri asam laktat mampu menghasilkan biopeptida yang diinisiasi melalui enzim yang dimiliki bakteri asam laktat tersebut. Biopeptida yang dapat dihasilkan oleh bakteri asam laktat yaitu endopeptidase, aminopeptidase, tripeptidase dan dipeptidase yang dikuatkan oleh Gobbeti (2000) dan Pihlanto (2002). Penelitian Gartner *et al* (2002) juga menjelaskan Senyawa antioksidan yang dimiliki yoghurt susu kambing antara lain *selenium*, *glutathione peroxidase* dan *thioredoxin reduktase*.

Bakteri asam laktat (BAL) juga dapat menurunkan kadar kolesterol dengan cara mengasimilasi dan mendekongjugasi garam empedu (Gilliland *et al*,1985). Asimilasi adalah proses pengambilan molekul-molekul sederhana dari makanan yang telah dicerna, kemudian diserap ke dalam sel hidup dan dikonversi menjadi molekul kompleks yang menyusun suatu organisme (Noh *et al*,1997). Mekanisme asimilasi bakteri asam laktat terhadap kolesterol yaitu dengan cara

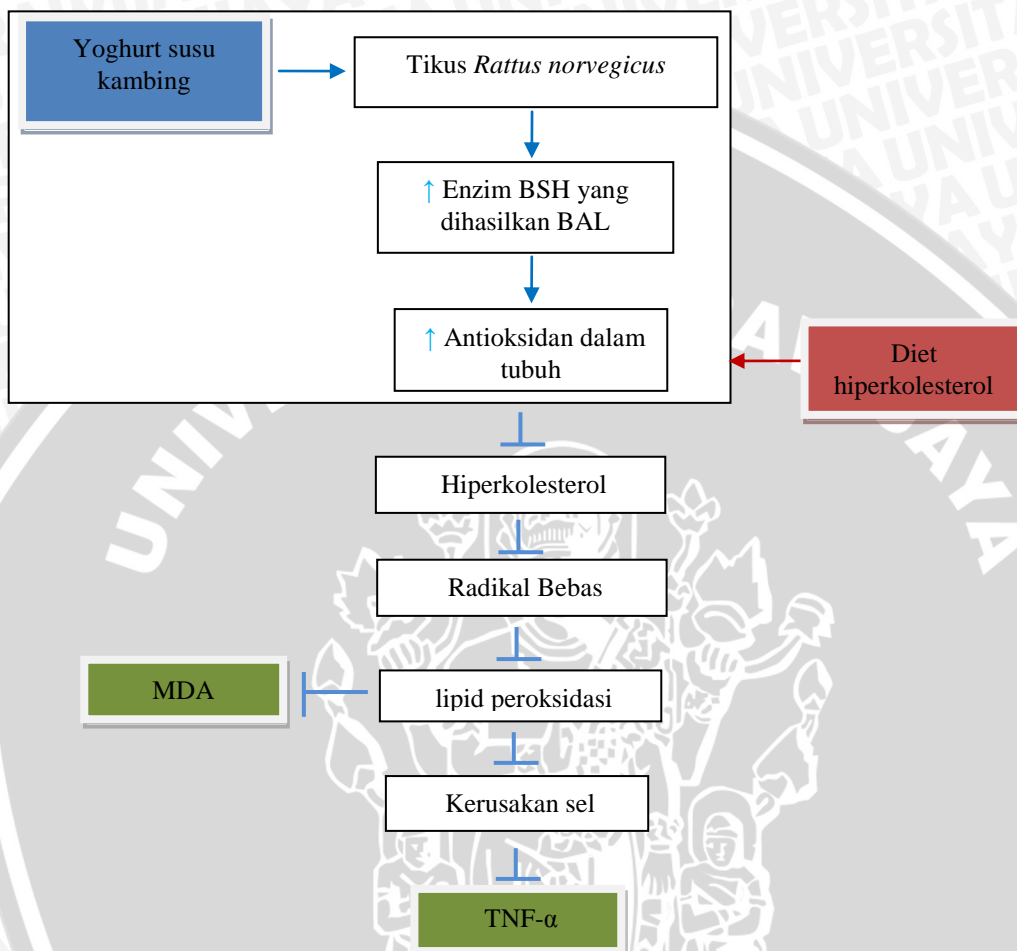
mengambil atau mengabsorpsi kolesterol karena diduga membran seluler bakteri asam laktat mengandung asam amino yang mampu mengikat kolesterol (Nuraidi dkk, 2011).

Dekonjugasi asam empedu yang terjadi pada duodenum diproses oleh enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH). Enzim ini akan memisahkan glisin atau taurin dari garam empedu terkonjugasi sehingga menghasilkan garam empedu bebas atau terdekonjugasi. Enzim BSH akan berpengaruh terhadap bakteri probiotik dengan memberikan daya tahan yang lebih baik terhadap garam empedu, serta membantu dalam menurunkan kadar kolesterol darah (Begley *et al*, 2006).

Dekonjugasi garam empedu dapat menurunkan kadar kolesterol darah karena asam empedu yang terpisah dari glisin dan taurin memiliki kelarutan yang rendah sehingga sukar diserap usus dan dieksresikan lebih cepat dibanding asam empedu terkonjugasi. Asam empedu terdekonjugasi memiliki fungsi tidak sebaik asam empedu terkonjugasi dalam penyerapan kolesterol di duodenum karena asam empedu terdekonjugasi lebih mudah menempel pada sel bakteri atau serat makanan (Usman dan Hosono, 1999).

## BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual



**Gambar 3.1.** Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan Gambar :

: Variabel bebas

: Variabel tergantung

: Pemberian yoghurt susu kambing

: Pemberian diet hiperkolesterol

↑↓ : Upaya preventif yoghurt susu kambing

↑↓ : Akibat pemberian diet hiperkolesterol (peningkatan pada MDA dan TNF- $\alpha$  tidak melebihi batas normal)



Yoghurt susu kambing memiliki fungsi sebagai sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Padaga dkk, 2009) selain itu yoghurt susu kambing memiliki bakteri asam laktat yang dapat mengasimilasi kolesterol dan medekonjugasi garam empedu. Pemberian yoghurt susu kambing dalam tubuh berpengaruh terhadap peningkatan antioksidan dalam tubuh serta peningkatan bakteri asam laktat dalam duodenum sehingga keadaan antioksidan didalam tubuh tikus stabil dan cenderung meningkat.

Pemberian yoghurt sebagai upaya prefentif yaitu dengan menekan peningkatan kolesterol dalam tubuh dengan cara dekonjugasi garam empedu. Dekonjugasi garam empedu adalah proses pemisahan glisin dan taurin dari garam empedu sehingga garam empedu memiliki kelarutan yang rendah sehingga sukar diserap oleh usus dan dieksresikan lebih cepat dibandingkan garam empedu terkonjugasi. Proses dekonjugasi garam empedu tersebut yang dapat menekan penyerapan kolesterol dikarenakan garam empedu berperan penting dalam penyerapan kolesterol.

Penyerapan kolesterol yang dapat ditekan peningkatannya berakibat rendahnya kolesterol dalam tubuh sehingga perombakan kolesterol menjadi garam empedu sebagai upaya membuang kelebihan kolesterol dalam tubuh dapat ditekan pula peningkatannya. Garam empedu yang dapat ditekan peningkatannya berakibat radikal bebas dapat ditekan pula peningkatannya yang dihasilkan dari perombakan kolesterol menjadi garam empedu tersebut. Peningkatan radikal bebas yang dapat ditekan akan berefek pada penekanan peningkatan peroksidasi lipid pada

duodenum dikarenakan pada duodenum merupakan tempat bermuaranya garam empedu.

Peroksidasi lipid yang dapat ditekan peningkatannya pada duodenum dapat dilihat pada terbentuknya MDA pada duodenum. Peroksidasi lipid merupakan reaksi berantai radikal bebas, radikal yang sangat reaktif dengan lipid membran, yaitu *Poly Unsaturated Fatty acid* (PUFA) sehingga terbentuk Malondialdehida (MDA) sebagai hasil akhir dari proses peroksidasi lipid tersebut.

Peroksidasi lipid yang ditekan peningkatannya juga mengakibatkan sel dapat dipertahankan dari kerusakan sehingga sekresi TNF- $\alpha$  sebagai penanda terjadinya kerusakan sel dan penanda terjadinya inflamasi tidak disekresikan seperti yang ditegaskan oleh Padaga dkk. (2009) yoghurt susu kambing berfungsi sebagai anti inflamasi.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

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

1. Upaya preventif yoghurt susu kambing dapat menekan peningkatan kadar malondialdehida (MDA) pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hiperkolesterolemia.
2. Upaya preventif yoghurt susu kambing dapat menekan kenaikan ekspresi *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hiperkolesterolemia.

## 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 mulai bulan Agustus 2013 sampai dengan Agustus 2014

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Kandang tikus, botol minum tikus, *restrain tube*, alat sonde lambung, timbangan, gelas ukur, labu ukur, botol penyimpan (*schott*), corong kaca, tabung erlenmeyer, spuit, tabung mikro tube, pipet ukur, bulb, aluminium foil, scalpel, pinset, cawan petri, sarung tangan, masker, Bunsen, alat sentrifuge, kompor, spatula, auto mikro pipet, gunting, pH meter (*Eutech Instrument Cyberscan pH 310*), pH indikator, *objek glass*, *bekker glass*, mesin *freeze dry* (*Christ Beta 1-8 K*), thermometer, micropipet ukuran 10-100 $\mu$ l, *blue type*, *yellow type*, spektrofotometer (*Genesys 20*), mikroskop cahaya (*Olympus BX51*), kamera (*Olympus DP71*) pengaduk, tabung mikro, tabung polipropilen, vortex, autoclave, *disposable syringe*, tabung reaksi, *timer*, dan lemari pendingin.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan (usia 8-12 minggu berat 150-200 gram), susu kambing, kuning



telur puyuh, asam kholat (Catalog No: M5M5306), minyak babi, PBS, PFA 4%, starter yoghurtmet, alcohol, spirtus,water steril, akuades dan NACL fisiologis 0,9%, larutan sodium Thiobarbituric acid (Na-Thio) 1 %, stok kit MDA, HCl, Tri Chloro Acetic (TCA). antibodi primer (antiRat TNF –  $\alpha$ ), antibodi sekunder berlabel biotin (Goat Anti Rat biotin labeled), *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), *diamino benzidine* (DAB), *Hematoxilen*, *Eosin*, *Entellan*, *Parafin* dan *xylol*.

### 4.3 Tahapan Penelitian

Adapun tahapan penelitian sebagai berikut:

1. Kerangka penelitian dan preparasi hewan model tikus.
2. Preparasi yoghurt susu kambing dan penentuan dosis yoghurt susu kambing
3. Pemberian yoghurt susu kambing sebagai pencegahan hiperkolesterolemia pada tikus.
4. Pemberian diet hiperkolesterolemia.
5. Analisis kadar Malondialdehida (MDA) pada duodenum.
6. Analisis ekspresi TNF- $\alpha$ .
7. Analisis data.

### 4.4 Prosedur Kerja

#### 4.4.1 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, kelompok Hiperkolesterolemia, kelompok pencegahan dosis 300 mg/kg BB, pencegahan dosis 600 mg/kg BB dan pencegahan dosis 900 mg/kg BB

**Tabel 4.1 Rancangan perlakuan.**

Variabel yang diamati	Perlakuan
Kadar MDA dan Ekspresi TNF- $\alpha$	
Kelompok A	Kontrol (tanpa perlakuan)
Kelompok B	Hiperkolesterolemia
Kelompok C	Dosis Pencegahan 300 mg/kg BB
Kelompok D	Dosis pencegahan 600 mg/Kg BB
Kelompok E	Dosis pencegahan 900 mg/kg BB

Diagram alir kerangka operasional dapat dilihat pada **Lampiran 2**. Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini

Variabel bebas : Dosis yoghurt susu kambing, diet hiperkolesterolemia

Variabel terikat : Kadar malondialdehida (MDA) dan ekspresi TNF- $\alpha$  duodenum

Variabel kontrol : Umur, berat badan, strain, jenis kelamin, pakan, kandang, minum, suhu

Estimasi hewan coba yang dibutuhkan dapat dihitung berdasarkan rumus (Montgomery *and* Kowalsky, 2011):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

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

Keterangan

P = jumlah kelompok (terdiri dari empat macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan



Berdasarkan perhitungan di atas, jika menginginkan adanya 5 kelompok perlakuan dalam penelitian maka diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 ekor dalam setiap kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

Proses aklimatisasi tikus perlu dilakukan untuk menyesuaikan keadaan tikus dengan lingkungan laboratorium. Proses aklimatisasi dilakukan agar saat dilakukan pemeliharaan tikus tersebut tikus sudah beradaptasi dengan lingkungannya. 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. Kandang ditempatkan di lokasi yang bebas dari keributan serta asap dan polutan lainnya.

#### **4.4.2 Preparasi yoghurt susu kambing**

##### **4.4.2.1 Persiapan starter**

Starter yoghurt (Catalog No:J8J4H4) ditimbang terlebih dahulu sebanyak 0,5 gram. Susu kambing sebanyak 100 ml dituangkan ke erlenmeyer 250 ml steril lalu ditutup dengan alumunium foil untuk mencegah kontaminasi. Susu dalam erlenmeyer tersebut kemudian dipasteurisasi pada suhu 72°C selama 5 menit, kemudian didinginkan hingga suhu mencapai 40°C-45°C. Starter yang telah ditimbang dicampur sedikit demi sedikit dengan susu kambing yang telah di pasteurisasi lalu dihomogenkan. Setelah homogen, inokulasikan starter yang telah diencerkan kedalam susu kambing



100 ml (w/v), homogenasikan dengan cara menggoyang secara perlahan. Selanjutnya, diinkubasikan pada suhu 40°C-45°C selama 4-8 jam dan sampai pH rata-rata yoghurt sekitar 4,5-5 (Tamime and Robinson, 2007)

#### 4.4.2.2 Pembuatan yoghurt susu kambing

Susu kambing 500 ml dituangkan kedalam botol penampungan 1000 ml lalu ditutup dengan aluminium foil untuk menghindari kontaminasi. Susu dalam botol penampungan dipasteurisasi pada suhu 72°C selama 5 menit kemudian didinginkan hingga suhu mencapai 40°C-45°C. Susu yang telah dipasteurisasi diinokulasikan starter yang telah dibuat sebanyak 3% dari 500 ml yang akan dibuat menjadi yoghurt susu kambing (15 ml) lalu homogenasikan 15 ml starter dan 500 ml susu kambing yang telah dipasteurisasi secara perlahan. Selanjutnya, inkubasikan pada suhu 40°C-45°C selama 4-8 jam dan pH mencapai 4,5-5 (Tamime and Robinson, 2007). Setelah itu, yoghurt susu kambing di *Freeze dry* dan disimpan pada suhu 4-5°C

#### 4.4.2.3 Penentuan dosis

Perhitungan dosis yoghurt susu kambing terdiri dari tiga dosis yaitu untuk dosis pencegahan 300 mg/kg BB, dosis pencegahan 600 mg/kg BB, dan dosis pencegahan 900 mg/kg BB dapat dilihat pada **lampiran 3**.

#### 4.4.3 Pemberian yoghurt susu kambing sebagai upaya pencegahan

Metode pemberian yoghurt (Kartini, 2002) per oral tiap ekor tikus yaitu dari perhitungan dosis yang ditentukan. Dosis pencegahan 300 mg/kg BB digunakan untuk kelompok C, dosis pencegahan 600 mg/kg BB untuk

kelompok D, dosis pencegahan 900 mg/kg BB untuk kelompok E. Masing masing kelompok terdiri dari 4 tikus. Tikus diberi yoghurt pada hari ke-1 sampai hari ke-28. Pemberian juga diteruskan bersamaan dengan hari pemberian diet hiperkolesterol yaitu hari ke-29 sampai hari ke-42 dengan dosis yang sama sesuai perhitungan dan dicampur 1 ml air. Sehingga pada hari ke-29 sampai ke-42 dilakukan 2 kali sonde lambung secara berurutan yaitu sonde labung yoghurt susu kambing dan sonde lambung diet hiperkolesterol.

#### **4.4.4 Pemberian Diet Hiperkolesterol Pada Tikus**

Komposisi pakan diet hiperkolesterol menurut Gani *et al* (2013), terdiri dari asam kholat 0,1%, minyak babi 10%, dan kuning telur puyuh rebus 5% yang dicampurkan. Diet hiperkolesterol diberikan setiap hari dengan sonde lambung sebanyak 3,02 g/tikus. Pemberian diet kolesterol ini dilakukan selama 14 hari.

Kelompok yang diberi diet hiperkolesterol adalah kelompok yang sudah diberi yoghurt susu kambing sebelumnya sebagai upaya preventif dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, 900 mg/kg BB.

#### **4.4.5 Pengukuran kadar MDA duodenum**

##### **4.4.5.1 Persiapan organ**

Tikus dieuthanasi dengan cara dislokasi leher, selanjutnya dilakukan pembedahan. Organ yang diambil kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis 0.9 % kemudian dibagi menjadi 2, sebagian dari potongan duodenum direndam pada larutan Paraformaldehid (PFA) 4 % dan sebagian lagi di rendam pada Phospat Buffer Saline (PBS).



#### 4.4.5.2 Pembuatan Kurva Standart MDA

Pembuatan kurva standar MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8  $\mu\text{g/ml}$  masing-masing diambil 100 $\mu\text{L}$ , dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda. Setelah itu ditambahkan 550  $\mu\text{l}$  aquades. Masing-masing tabung yang berisi 650  $\mu\text{l}$  larutan standar ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  TCA 100%, 250  $\mu\text{L}$  HCl 1 N dan 100  $\mu\text{L}$  Na-Thio 1 %. Kemudian dihomogenkan dengan vortex mixer, tabung ditutup dengan plastik dan diberi lubang. Diinkubasi dengan penangas air dengan suhu 100°C selama 30 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya MDA dengan konsentrasi 4  $\mu\text{g/ml}$  diukur absorbansinya pada range panjang gelombang 500-600 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum MDA. Kemudian dibuat kurva standar MDA dengan dibaca absorbansinya pada variasi konsentrasi (1,2,3,4,5,6,7 dan 8  $\mu\text{g/ml}$ ) pada panjang gelombang maksimumnya (Shofia, 2012).

#### 4.4.5.3 Pengukuran Kadar MDA Menggunakan Uji *Thiobarbiburic Acid* (TBA)

Jaringan duodenum dari setiap kelompok, masing-masing diambil sebanyak 0,1 gram dipotong kecil-kecil lalu digerus dalam mortar dingin yang diletakkan diatas balok es. Selanjutnya ditambahkan 1 ml NaCl 0,9%. Kemudian homogenat dipindah kedalam tabung mikro tube dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya. Setelah itu diambil 100  $\mu\text{L}$  supernatan duodenum ditambah 550  $\mu\text{L}$  akuades. Lalu ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  TCA, 250  $\mu\text{L}$  HCl 1N, dan 100  $\mu\text{L}$  Na-Thio. Pada



setiap penambahan reagen, larutan campuran tersebut dihomogenkan dengan vortex. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Setelah itu supernatan dipisahkan dan dipindahkan pada tabung mikro tube baru. Kemudian larutan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 100°C selama 30 menit. Lalu dibiarkan pada suhu ruang. Sampel diukur absorbansinya pada  $\lambda$  max untuk uji TBA dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel (Shofia, 2012).

#### 4.4.6 Analisis Ekspresi TNF- $\alpha$ duodenum

Persiapan organ untuk uji TNF- $\alpha$  yaitu organ difiksasi dengan cara dimasukkan ke dalam kemudian didehidrasi alkohol bertingkat dari konsentrasi 70% selama 24jam, etanol 80% selama 2 jam, etanol 90%, 95% dan etanol absolut selama 20 menit. Kemudian dilakukan penjernihan dengan cara merendam jaringan dalam larutan xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit. Infiltrasi dan embedding dengan menggunakan parafin cair pada inkubator bersuhu 58-60°. Lalu dilakukan *trimming* dengan cara cetakan dijepit dalam mikrotom dan jaringan dipotong dengan ketebalan 5 $\mu$ m. Sediaan disimpan dalam inkubator suhu 38-40°C.

Tahapan awal melakukan imunohistokimia adalah dengan melakukan tahap deparafinisasi yaitu, preparat direndam dalam larutan xylol (2 kali), etanol absolut (2 kali), alkohol 70%, alkohol 30% dan aquades steril masing-masing selama 2 menit. Setelah itu di simpan selama 24 jam pada suhu 4°C. Preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 (3x5 menit), lalu di rendam dalam 3% hidrogen peroksida selama 10 menit (dalam PBS) dan di cuci kembali

dalam PBS pH 7,4 (3x5 menit), lalu di rendam dalam 1% BSA (dalam PBS) selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya preparat ditetesi dengan antibodi primer, *anti-rat* TNF- $\alpha$  (dalam BSA 1% dalam PBS) 1:100 dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 24jam.

Setelah itu, preparat dikeluarkan dari refrigenator dan dibiarkan selama 30 menit dalam suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Selanjutnya ditambahkan antibody sekunder, *anti rabbit labelled* biotin dalam PBS (1:200) selama 1 jam pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Selanjutnya, ditambahkan SA-HRP dalam PBS (1:500) selama 40 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Setelah itu, ditambahkan kromogen DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) selama 20 menit pada suhu ruang 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 keran (2x5 menit) dan aquades steril 1x5 menit lalu dibiarkan semalaman dalam suhu ruang. Selanjutnya dilakukan *mounting* dengan entellan.

Eksresi *Tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ) dalam jaringan akan tampak dengan warna coklat dan terdapat disekitar pembuluh darah duodenum yang menunjukkan adanya reaksi inflamasi. Keberadaan TNF- $\alpha$  pada duodenum yang diamati melalui metode imunohistokimia (IHK) dianalisis secara kualitatif dengan cara membandingkan distribusi TNF- $\alpha$  pada sediaan histologi duodenum kontrol dengan perlakuan pada perbesaran rendah (400x) kemudian

dibandingkan presentase area TNF- $\alpha$  pada 5 seri sayatan yang diambil secara acak untuk setiap kelompok perlakuan menggunakan software *Axio Vision*.

#### 4.5 Analisa data

Data penelitian ini berupa data kuantitatif dan kualitatif. Data kuantitatif berupa hasil penghitungan kadar MDA dan presentase area TNF- $\alpha$  yang ditabulasi menggunakan *Microsoft Office Exel* kemudian dianalisa menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) dengan *software SPSS 16 for Windows*. Apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan uji Beda Nyata Jujur (*Tukey*) dengan  $\alpha = 5\%$ . Selain itu TNF- $\alpha$  juga dianalisis secara kualitatif deskriptif.





## Bab 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh Pemberian Yoghurt Susu Kambing Sebagai Upaya Preventif Pada Hewan Model Tikus Hiperkolesterolemia Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Duodenum

Hasil analisa statistik menggunakan SPSS menunjukkan kadar MDA (*Malondialdehyde*) duodenum pada kelima kelompok perlakuan tikus (kontrol negatif, hiperkolesterolemia, dosis preventif 300 mg/kg BB, dosis preventif 600 mg/kg BB dan dosis preventif 900 mg/kg BB) menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan (**Tabel 5.1**). Hasil analisa statistik kadar MDA dari lima perlakuan tikus menggunakan *one-Way* ANOVA yang dilanjutkan dengan uji *Tukey* dapat dilihat pada **Lampiran.11**.

**Tabel 5.1** Nilai kadar MDA duodenum tikus pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Rata-rata kadar MDA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Peningkatan (%)
Kontrol negatif	0,284 $\pm$ 0,0418 <sup>a</sup>	
Hiperkolesterolemia	0,698 $\pm$ 0,0377 <sup>d</sup>	142,61
Dosis preventif 300 mg/kg BB	0,502 $\pm$ 0,0350 <sup>c</sup>	76,76
Dosis preventif 600 mg/kg BB	0,372 $\pm$ 0,0204 <sup>b</sup>	30,98
Dosis preventif 900 mg/kg BB	0,299 $\pm$ 0,0240 <sup>a</sup>	5,28

Keterangan : - Notasi yang berbeda (a, b, c, d) menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

Upaya preventif yoghurt susu kambing pada hewan model hiperkolesterolemia, memberikan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap kadar malondialdehida organ duodenum. Preventif yoghurt susu kambing bekerja optimal dalam mempertahankan kadar malondialdehida hal ini ditunjukkan dengan pemberian dosis yoghurt susu kambing yang semakin meningkat menunjukkan peningkatan kadar malondialdehida yang semakin rendah.

Tabel 5.1 menunjukkan pada kelompok hiperkolesterolemia memiliki perbedaan nyata dengan kelompok kontrol negatif yang ditunjukkan dengan peningkatan kadar MDA sebesar 142,61% dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kelompok kontrol negatif memiliki kadar MDA terendah karena hanya diberikan pakan normal sehingga kadar kolesterol dalam darah masih di dalam batas normal yaitu 10-54 mg/dl. Kolesterol akan memicu terbentuknya radikal bebas, namun jumlah radikal bebas pada kelompok kontrol negatif tidak melebihi jumlah antioksidan yang terdapat dalam tubuh sehingga antioksidan mampu menangkap radikal bebas yang ada dan menghambat terjadinya peroksidasi lipid. Kadar MDA yang meningkat pada kelompok hiperkolesterolemia dikarenakan diet hiperkolesterolemia dapat meningkatkan kadar kolesterol di dalam tubuh, dimana hiperkolesterolemia yang meningkat di dalam tubuh dapat meningkatkan radikal bebas yang ditandai dengan peningkatan kadar MDA pada organ duodenum. Hal ini sesuai dengan penelitian Bradly *et al.* (2012) bahwa pemberian pakan diet hiperkolesterol dapat meningkatkan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan reaksi berantai radikal bebas radikal yang sangat reaktif dengan lipid membran, yaitu *Poly Unsaturated Fatty acid* (PUFA) sehingga terbentuk Malondialdehida (MDA), yang digunakan sebagai penanda adanya stress oksidatif (Nielsen,1997)

Reaksi tubuh pada saat kondisi hiperkolesterolemia adalah dengan cara menyeimbangkan kadar kolesterol darah dengan cara mengubah kolesterol menjadi garam empedu yang disintesis di hati. Sintesis garam empedu



dikatalisis oleh reaksi  $7\alpha$ -hidroksilasi yang melibatkan oksigen, NADPH, dan sitokrom P-450 dalam prosesnya. Oksigen pada proses sintesis garam empedu berubah menjadi senyawa yang sangat reaktif dan mudah tereduksi oleh NADPH menjadi radikal bebas anion superoksida ( $O_2^-$ ). Anion superoksida akan terikat pada sitokrom P-450, menyebabkan peningkatan aktivitas sitokrom P-450 dalam reaksi hidroksil sehingga radikal bebas yang terbentuk semakin meningkat. Sitokrom P-450 juga berperan untuk memperantarai retikulum endoplasma dalam mereduksi oksigen menjadi radikal bebas anion superoksida ( $O_2^-$ ) (Mayes,1996).

Tabel 5.1 juga menunjukkan pada kelompok preventif yoghurt susu kambing dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, 900 mg/kg BB memiliki perbedaan nyata dengan kelompok kontrol yang ditunjukkan dengan peningkatan sebesar 76,76% pada dosis 300 mg/kg BB, sebesar 30,98% pada dosis 600 mg/kg BB, dan sebesar 5,28% pada dosis 900 mg/kg BB. Upaya preventif kadar MDA mampu ditekan peningkatannya dikarenakan dalam yoghurt susu kambing memiliki antioksidan yang mampu mencegah terjadinya peroksidasi lipid. Senyawa antioksidan yang dimiliki yoghurt susu kambing antara lain selenium, glutathione peroxidase dan thioredoxin reduktase (Gartner *et al.*,2002)

Selenium merupakan antioksidan yang mampu menghambat proses oksidasi yang dapat menghasilkan radikal bebas, dengan cara memberikan atom hidrogen sehingga menjadi senyawa yang stabil serta dapat memecah rantai oksidasi pembentuk radikal bebas (Eszenyi *et al.*, 2011). Yoghurt susu



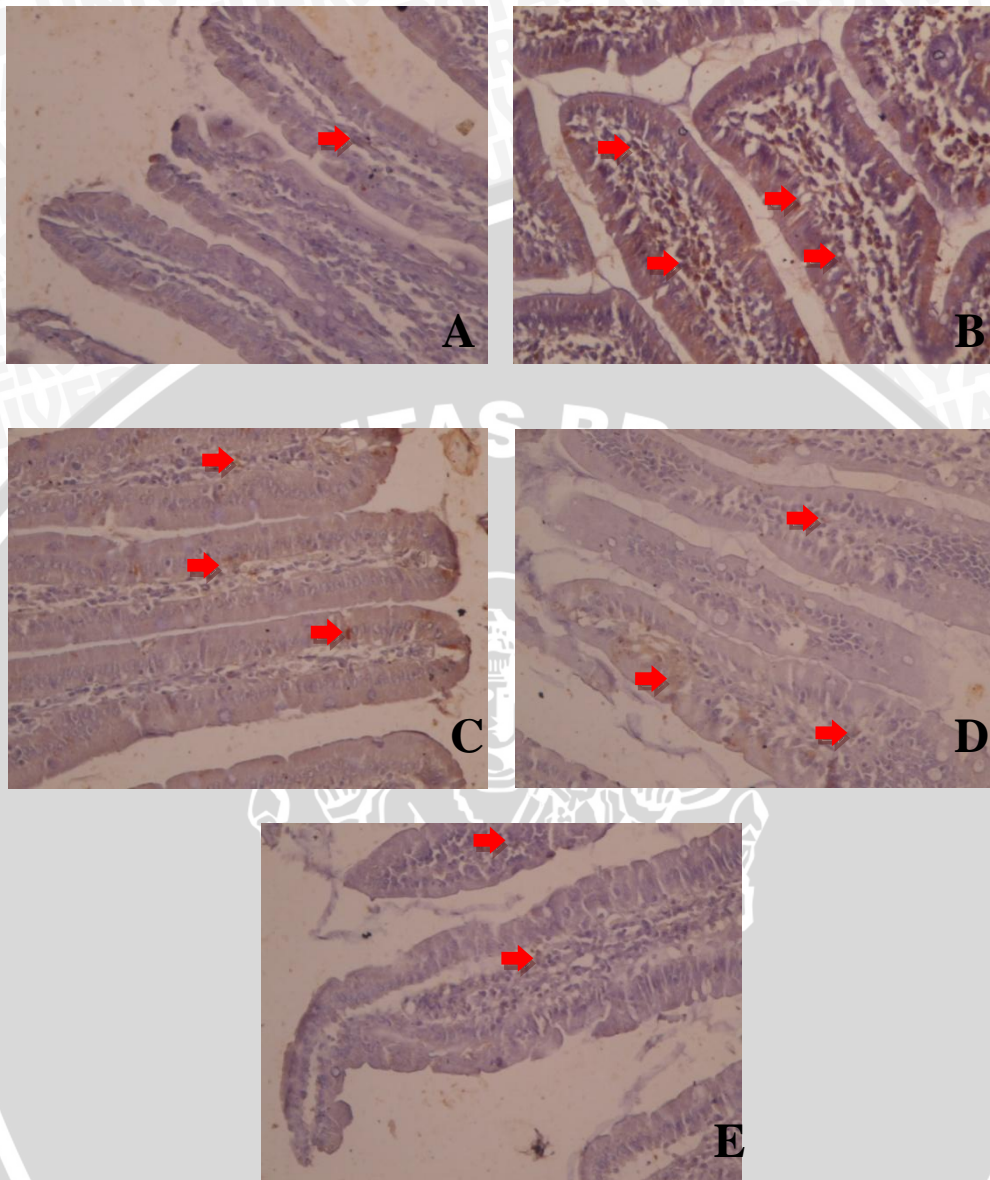
kambing juga mengandung vitamin diantaranya A, C dan E yang merupakan antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas dan menghalangi terbentuknya rantai inisiasi dan rantai propagasi yang merupakan komponen utama peroksidasi lipid (Sclanac *et al.*, 2010).

Kadar Malondialdehida pada kelompok preventif 900 mg/kg BB tidak memiliki perbedaan nyata terhadap kelompok kontrol, hal ini dapat disimpulkan bahwa kelompok preventif 900 mg/kg BB merupakan dosis terbaik yang mampu menekan radikal bebas hampir sama dengan kelompok tikus kontrol.

## **5.2 Pengaruh Pemberian Yoghurt Susu Kambing Sebagai Upaya Preventif Pada Hewan Model Tikus Hiperkolesterolemia Terhadap Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) Duodenum**

Pewarnaan imunohistokimia dilakukan pada preparat jaringan duodenum tikus untuk mengetahui ekspresi tumor nekrosis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

Kerusakan jaringan ditunjukkan dengan peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$



Gambar 5.1 Ekspresi TNF- $\alpha$  pada duodenum pewarnaan IHC perbesaran 400 X

Keterangan : (A) duodenum tikus kontrol/normal; (B) duodenum tikus hiperkolesterolemia; (C) duodenum tikus hiperkolesterolemia dengan dosis preventif 300 mg/Kg BB; (D) duodenum tikus hiperkolesterol dengan dosis preventif 600 mg/Kg BB; (E) duodenum tikus hiperkolesterolemia dengan dosis preventif 900 mg/kg BB. Panah merah menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$



Berdasarkan pengamatan deskriptif pada **Gambar 5.1**, pada kelompok hiperkolesterolemia (B) terdapat peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  ( $7,095\pm 0,640$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol (A) ( $1,580\pm 0,217$ ) yang ditandai dengan banyaknya warna coklat pada preparat duodenum yang dihasilkan oleh interaksi antara TNF- $\alpha$  pada jaringan duodenum dengan antibodi yang ditambahkan (antibodi primer anti rat TNF- $\alpha$  dan goat *anti rat labeled biotin*). Peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  sesuai dengan penelitian yang dilakukan Qiang *et al.* (2005) diet tinggi kolesterol menginduksi terjadinya inflamasi, yang ditandai dengan peningkatan sitokin proinflamasi salah satunya TNF- $\alpha$ .

Tikus kelompok preventif 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB mampu menekan peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  yang dibuktikan dengan rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok tikus Hiperkolesterolemia (B). Berkurangnya ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok tikus preventif 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB dikarenakan pada upaya preventif yoghurt susu kambing memiliki enzim *bile salt hydrolase* (BSH) yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL) yang mampu mendekongugasi garam empedu sehingga dapat menurunkan kadar kolesterol duodenum (Begley *et al.*, 2006).

Ekspresi TNF- $\alpha$  selain diamati dengan deskriptif juga diamati dengan menggunakan *software axio vision* yang ditandai dengan adanya warna coklat pada preparat duodenum dan didapatkan jumlah rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  lalu



diamati menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji *tukey* menunjukkan perbedaan nyata seperti pada **Tabel 5.2**.

**Tabel 5.2** Presentase area ekspresi TNF- $\alpha$  duodenum pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$	Peningkatan (%)
A Kontrol negatif	1,580 $\pm$ 0,217 <sup>a</sup>	
B Hiperkolesterolemia	7,095 $\pm$ 0,640 <sup>d</sup>	349,051
C Dosis preventif 300 mg/kg BB	5,250 $\pm$ 0,695 <sup>c</sup>	232,278
D Dosis preventif 600 mg/kg BB	3,075 $\pm$ 0,340 <sup>b</sup>	94,620
E Dosis preventif 900 mg/kg BB	1,440 $\pm$ 0,304 <sup>a</sup>	8,861

Keterangan : - Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

Upaya preventif yoghurt susu kambing pada hewan model hiperkolesterolemia, memberikan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  organ duodenum. Preventif yoghurt susu kambing bekerja optimal dalam mempertahankan ekspresi TNF- $\alpha$  hal ini ditunjukkan dengan pemberian dosis yoghurt susu kambing yang semakin meningkat menunjukkan peningkatan ekspresi yang semakin rendah

Tabel 5.2 menunjukkan pada kelompok hiperkolesterolemia memiliki perbedaan nyata dengan kelompok kontrol negatif yang di tunjukkan dengan peningkatan sebesar 349,051% dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kelompok kontrol negatif mempunyai ekspresi sebesar (1,580 $\pm$ 0,217) karena kadar kolesterol di dalam darah masih dalam batas normal sehingga radikal bebas yang dihasilkan masih bisa ditangkap oleh antioksidan di dalam tubuh. Peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok hiperkolesterolemia disebabkan oleh diet tinggi kolesterol menginduksi terjadinya inflamasi, yang ditandai dengan peningkatan sitokin proinflamasi salah satunya TNF- $\alpha$  (Qiang, *et al.*, 2005). Peningkatan kadar kolesterol melalui diet hiperkolesterol akan meningkatkan

jumlah radikal bebas yang dihasilkan dari sintesa garam empedu (Bradly *et al*, 2012). Secara anatomi duodenum memiliki *ductus coledocus* dan *sfincter oddi* yang merupakan muara dari *ductus hepaticus*. *Ductus coledocus* merupakan saluran yang menghubungkan hati dengan duodenum yang berfungsi sebagai saluran ekskresi garam empedu dan radikal bebas yang berasal dari hati (Junquera, *et al*, 1995). Radikal bebas yang keluar bersama garam empedu pada duodenum memungkinkan terjadinya proses inflamasi pada organ duodenum. Inflamasi yang terjadi pada duodenum ditandai dengan adanya infiltrasi sel-sel radang seperti makrofag, neutrofil dan leukosit. Aktifasi makrofag pada duodenum akan menghasilkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada duodenum.

Tabel 5.1 juga menunjukkan pada kelompok preventif yoghurt susu kambing dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, 900 mg/kg BB memiliki perbedaan nyata terhadap kelompok kontrol yang ditunjukkan dengan peningkatan sebesar 232,278% pada dosis 300 mg/kg BB, sebesar 94,620% pada dosis 600 mg/kg BB, dan sebesar 8,861% pada dosis 900 mg/kg BB ini dikarenakan pemberian yoghurt susu kambing bertujuan sebagai upaya preventif terhadap hiperkolesterolemia. Mekanisme preventif ini dikarenakan efek dari aktivitas BAL dan enzim yang dihasilkan serta kandungan bioaktif yang terkandung didalam yoghurt. Bakteri asam laktat diketahui mampu menghasilkan enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH) yang mampu mendekongjugasi garam empedu. Enzim BSH mampu memisahkan glisin dan taurin dari garam empedu terkonjugasi sehingga menjadi garam empedu bebas atau terdekonjugasi (Marie *et al*, 2000). Pemisahan glisin dan taurin terjadi melalui proses dehidroksilasi-7 alfa



yaitu terjadi perubahan pada gugus hidroksil garam empedu yang mengakibatkan pengurangan tingkat toksisitas dari garam empedu. Proses dehidroksilasi-7  $\alpha$  akan mengakibatkan garam empedu menjadi sulit diabsorpsi kembali sehingga garam empedu akan disekresikan melalui feses.

Yoghurt juga memiliki pertahanan selain dari enzim BSH yaitu antioksidan. Antioksidan mampu mencegah proses oksidasi yang dapat menghasilkan radikal bebas, dengan cara memberikan atom hidrogen sehingga menjadi senyawa yang stabil serta dapat memecah rantai oksidasi pembentuk radikal bebas (Eszenyi *et al.*, 2011). Yoghurt susu kambing mengandung selenium, glutathione peroxidase, thioredoxin reduktase, vitamin diantaranya A, C dan E yang merupakan antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas dan menghalangi terbentuknya rantai inisiasi dan rantai propagasi yang merupakan komponen utama peroksidasi lipid (Sclanac *et al.*, 2010).

Ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok preventif 900 mg/kg BB tidak memiliki perbedaan nyata terhadap kelompok kontrol, hal ini dapat disimpulkan bahwa kelompok preventif dosis 900 mg/kg BB merupakan dosis terbaik yang mampu menekan radikal bebas hampir sama dengan kelompok tikus kontrol.



## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Upaya preventif yoghurt susu kambing dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB dan dosis 900 mg/kg BB dapat mempertahankan kadar malondialdehida (MDA) pada duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) hiperkolesterolemia. Dosis 900 mg/kg BB merupakan dosis terbaik yang mampu mempertahankan kadar MDA sebesar 5,28%.
2. Upaya preventif yoghurt susu kambing dengan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB dan dosis 900 mg/kg BB dapat mempertahankan ekspresi tumor nekrosis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) hiperkolesterolemia. Dosis 900 mg/kg BB merupakan dosis terbaik yang mampu mempertahankan ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 8,861%.

### 6.2. Saran

Diperlukan penelitian lanjutan terhadap kandungan biopeptida yoghurt susu kambing yang berpotensi sebagai anti hiperkolesterolemia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Baratawijaya, K.G dan I. Rengganis. 2010. *Sitokin: Imunologi Dasar*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia., Jakarta
- Begley, M., C. Hill, CGM, Graham. 2006. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Appl Environ Microbiol* 72: 1729-1738.
- Bradley, G., O. S. Ulorunnisola and A. J. Afolayan. 2012. Protective Effect of *T. Violaacea Rhizome* Extract Against Hypercholesterolemia Induced Oxydative Stress In Wistar Rat. *Molecules* 17: 6033-6045
- Ceballos, L.S., E.R. Morales, G.T. Adarve, J.D. Castro, L.P. Martinez and M.R.S. Sampelayo. 2009. Composition og Goat and Cow Produced Under Similar Condition and Analyzed by Identical Methology. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 322-329
- Christensen, J.E., E.G Dudley., J.A. Pederson and J.L. Steele. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 217-246.
- Frappier, B.L. 2006. *Digestive System: Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. Oxford: Blakwell Publishing. 6, 170-211.
- 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>. [16 agustus 2014]
- Gilliland, S. E, C. R. Nelson dan Maxwell. 1985. Assimilation of Cholesterol by *Lactobasillus Acidophilus*. *App Environ Microbial*. 49: 377-381.
- Gobbetti M., P. Ferranti., E. Smacchi., F. Goffredi., and F. Addeo. 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis subsp. cremoris* FT4. *Appl Environ Microbiol*. 66: 3898-3904.
- Hasanah, S.N.R. 2008. Aktivitas ekstrak etil asetat daun dewandaru (*Eugenia uniflora L*) sebagai agen pengkelat logam Fe dan penangkap malonaldehid (MDA). Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Junquera L. Carlos, Carnerio Jose., Robert O. Kelley. 1995. Basic Histologi 8th Edition. The university of New Mexico.



- Karnen, G dan R. Iris. 2009. *Imunologi Dasar Edisi ke -8*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia : Jakarta.
- Kasim, E., Y. Kurniawati dan N. Nurhidayat. 2006. Pemanfaatan Isolat Lokal *Monascus purpureus* untuk Menurunkan Kolesterol Darah pada Tikus Putih galur *Sprangue Dawley*. *Biodiversitas* 7(2): 122-124.
- Kusriningrum. 2008. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Marie P, Edward RF, Peter JH. 2000. *Consumption of fermented and non fermented dairy product: Effect on cholesterol concentrations and metabolism*. *Journal Clinical nutrition* 71: 81-674.
- Matar, C., J. Amiot., L. Savoie and J. Goulet. 1996. The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during in vitro digestion. *J Dairy Sci* 79: 971-979.
- Mayes, P.A., P.A. Botham. 1996. *Cholesterol Synthesis, Transport, and Excretion*: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Illustrated Biochemistry Twenty-Sixth Edition. McGraw-Hill., New York. 26: 219- 230.
- Murray, R.K., D.K. Granner., P.A. Mayes and V.W. Rodwell. 2003. Harper's Illustrated Biochemistry Twenty-sixth Edition., McGraw-Hill. New York.
- Myers, P. and D. Armitage. 2004. *Rattus norvegicus*. [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus\\_norvegicus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html). [25 Maret 2014]
- Noh,D.O., S. H. Kim dan S. E. Gilliland. 1997. Incorporation Cholestrol Into the Celluler Membrans of *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 43121. *J Dairy Sci*, 80 : 3107-3113
- Padaga, M. C., M.E. Sawitri dan S. Murwani. 2009. Potensi Protein Spesifik Susu Kambing Sebagai Immunomodulator And Immunogen : *Upaya Pengembangan Pangan Nutrasetika*.
- Pihlanto-Leppala, A., T. Rokka and H. 1998. Korhonen. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int Dairy J*; 8: 325- 331.
- Qiang Shi., Jane Vanderberg. 2005. Arterial endothelial dysfunction in baboon fed a high-kolesterol fat diet. *Am J Clin Nutr* 82:751-9

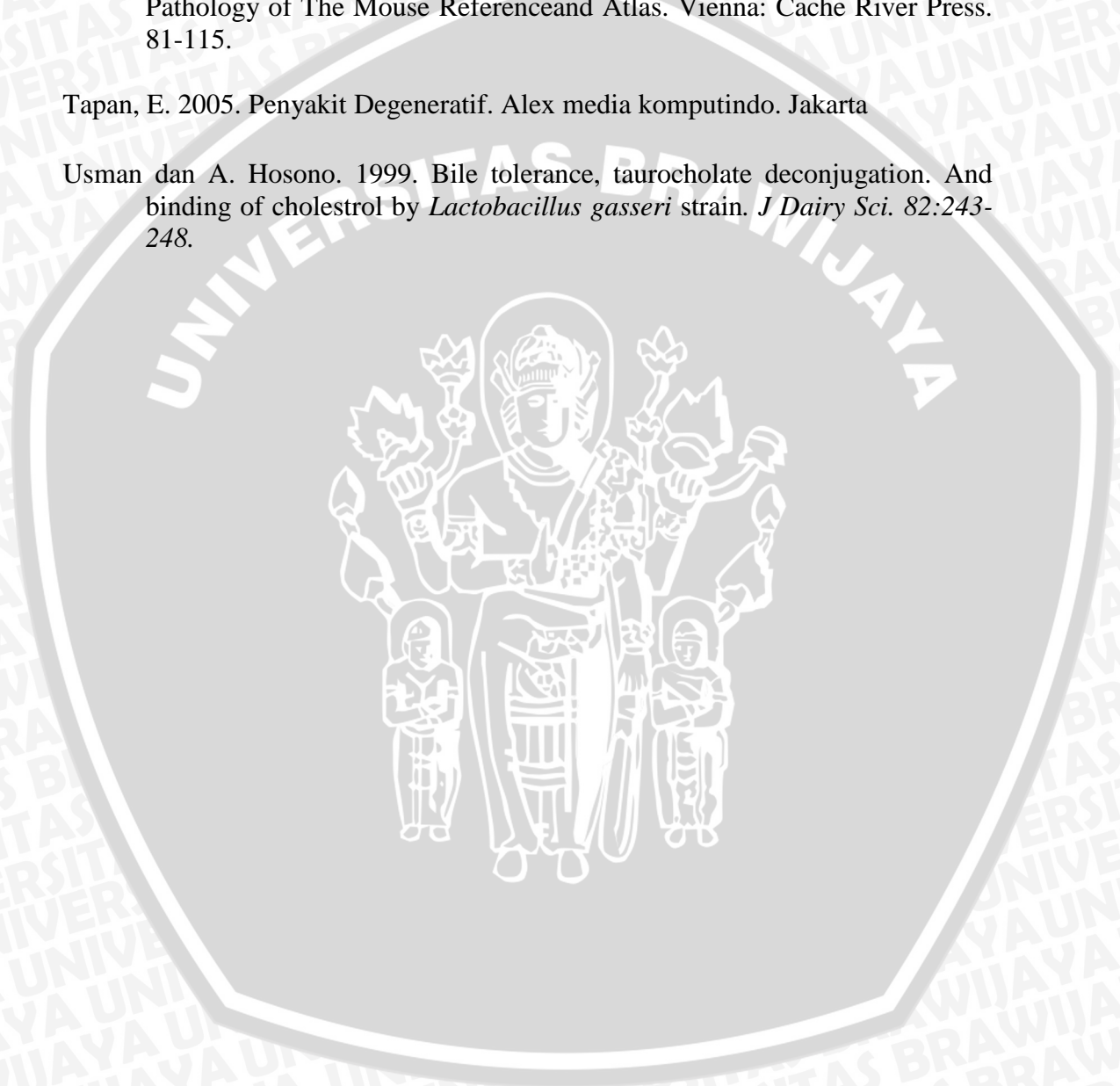


Setiawan, B. 2008. Loyalitas Pengenceran sebagai Kinerja Value Drivers. *Jurnal Bisnis dan Manajemen* 10(1): 18-27

Scackelford, C.C. and M.R. Elwell. 1999. *Small and Large Intestine and Mesentary*: Maronpot, R.R., G.A. Boarman and B.W. Gaul, editor. Pathology of The Mouse Reference and Atlas. Vienna: Cache River Press. 81-115.

Tapan, E. 2005. Penyakit Degeneratif. Alex media komputindo. Jakarta

Usman dan A. Hosono. 1999. Bile tolerance, taurocholate deconjugation. And binding of cholestrol by *Lactobacillus gasseri* strain. *J Dairy Sci.* 82:243-248.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LAMPIRAN



**Lampiran 1. Keterangan Kelaikan Etik**



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"**

No:217-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

**PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH TERAPI DAN PENCEGAHAN YOGURT  
SUSU KAMBING PERANAKAN ETAWA TERHADAP  
HEWAN TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL  
HIPERKOLESTEROLEMIA**

**PENELITI : HENDRA SATRIAWAN**

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITASBRAWIJAYA**

**DINYATAKAN : LAIK ETIK**

Malang, 24 Maret 2014  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya

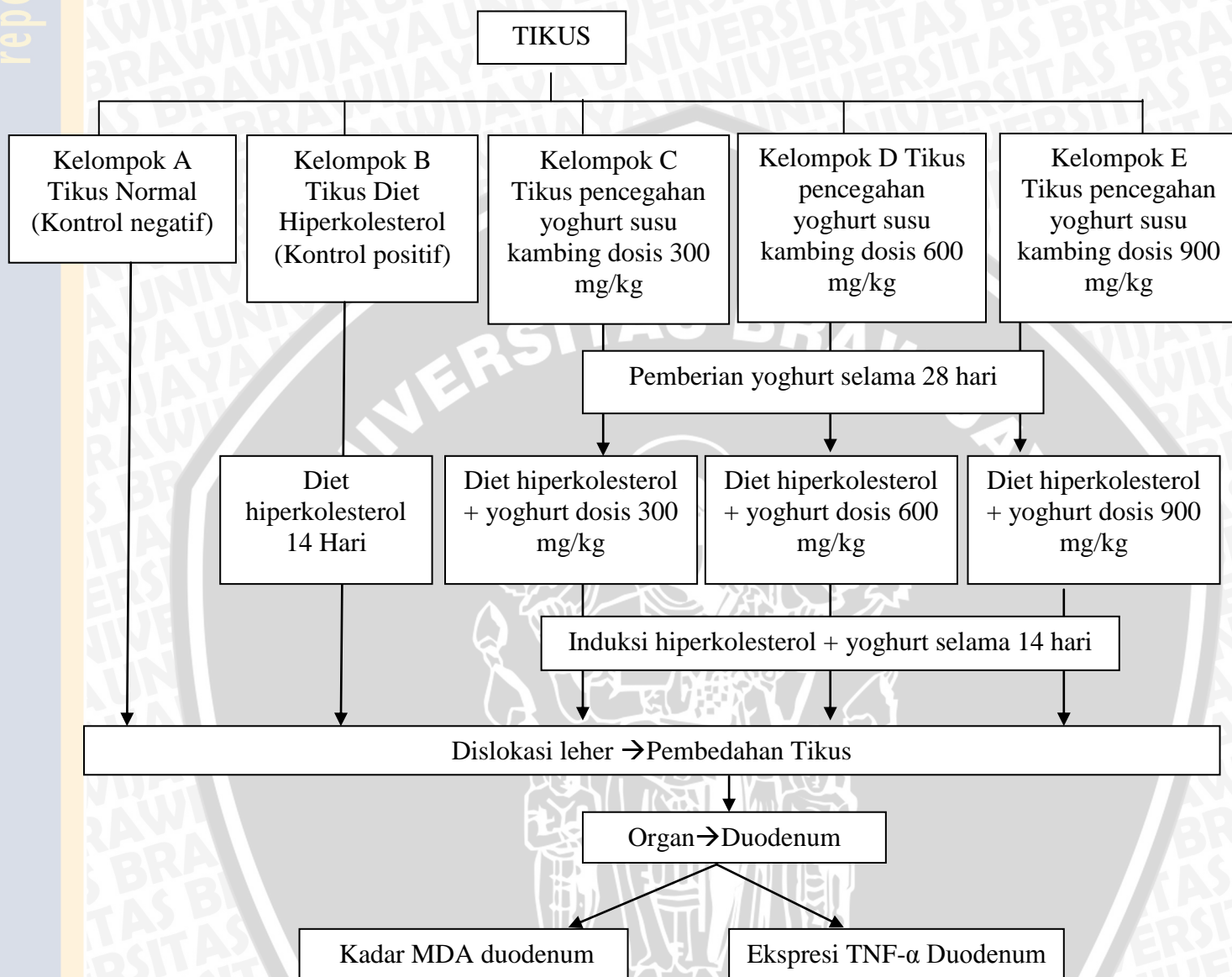


**Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.**  
NIP. 19600903 198802 2 001





**Lampiran 1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian**



**Lampiran 2. Yogurt Susu Kambing**

**4.1 Perhitungan dosis yogurt susu kambing**

**Kelompok C ( Dosis pencegahan = 300 mg/kg BB )**

Dengan pemisalan rata-rata BB tikus 150 g.

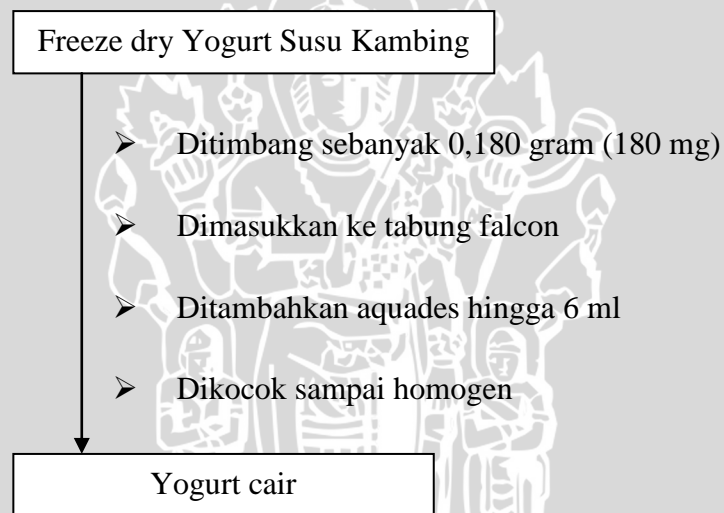
Berat freeze dry yogurt = Dosis pemberian x Berat badan x Jumlah tikus

$$= \frac{300 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g} \times 1}{1000} \\ = 180 \text{ mg/g}$$

Dosis pencegahan = 180 mg, untuk tikus berat 150 g = 45 mg/ekor

Volume pemberian = 1,5 ml

Diagram :



**Kelompok D ( Dosis pencegahan = 600 mg/kg BB )**

Dengan pemisilaan rata-rata BB tikus 150 g.

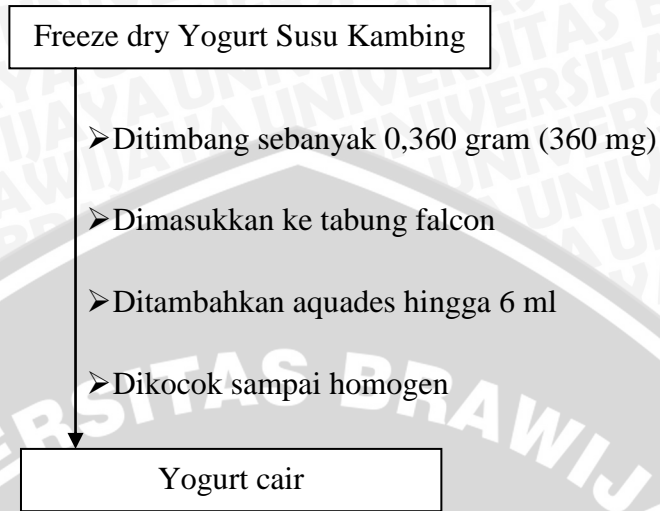
Berat freeze dry yogurt = Dosis pemberian x Berat badan x Jumlah tikus

$$= \frac{600 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g} \times 1}{1000} \\ = 360 \text{ mg/g}$$

Dosis pencegahan = 360 mg, untuk tikus berat 150 g = 90 mg/ekor

Volume pemberian = 1,5 ml

Diagram :



**Kelompok E ( Dosis pencegahan = 900 mg/kg BB )**

Dengan pemisilaan rata-rata BB tikus 150 g.

Berat freeze dry yogurt = Dosis pemberian x Berat badan x Jumlah tikus

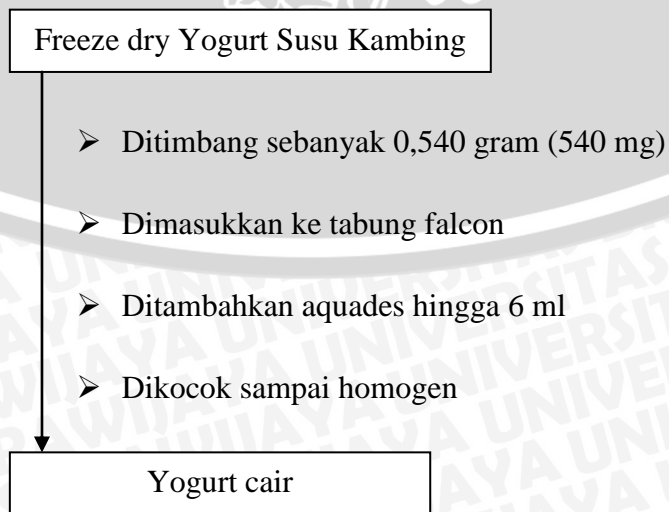
$$= \frac{900 \text{ mg/kg} \times 150 \text{ g} \times 4}{150 \text{ g}}$$

$$= 540 \text{ mg/g}$$

Dosis pencegahan = 540 mg, untuk tikus berat 150 g = 135 mg/ekor

Volume pemberian = 1,5 ml

Diagram :





### Lampiran 3. Diet Hiperkolesterol

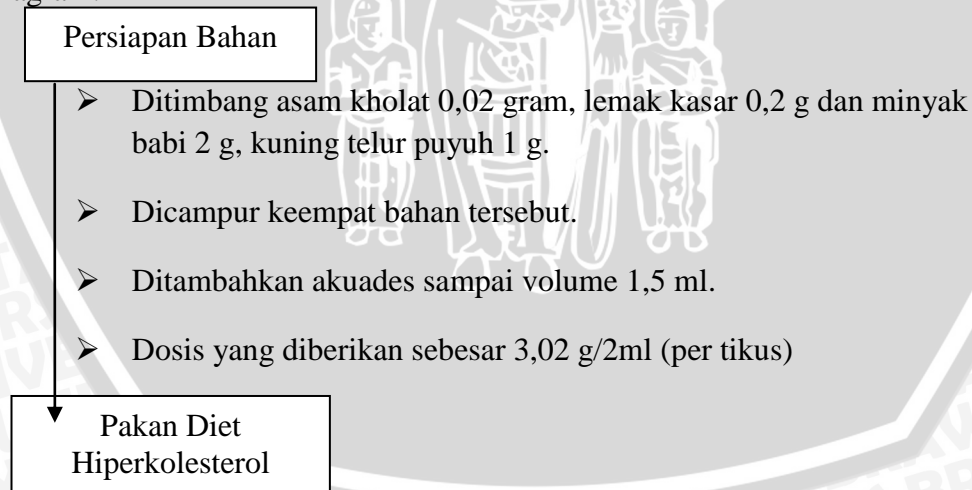
#### 5.1 Pembuatan pakan diet hiperkolesterol

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

Untuk pembuatan pakan per tikus (20 g/hari) → susunan komposisi pakan:

- Asam Kholat =  $0,1 \% \times 20 \text{ gr} = 0,02 \text{ g}$
- Minyak babi =  $10 \% \times 20 \text{ gr} = 2 \text{ g}$
- Kuning telur puyuh rebus =  $5\% \times 20 \text{ gr} = 1 \text{ g}$
- Dilakukan penyondean setiap hari sebesar 3,02 g yang ditambahkan air sampai volume 1,5 ml.
- Pembuatan pakan diet hiperkolesterol dilakukan setiap hari agar pakan tidak tengik dan berjamur.

Diagram:



#### Lampiran 4. Pengambilan Organ Duodenum

##### Pengambilan organ duodenum

Tikus

- Dikorbankan dengan dislokasi leher
- Dilakukan pembedahan
- Dilakukan pengambilan organ duodenum
- Dicuci dengan nacl fisiologis 0.9 %
- Direndam larutan Paraformaldehid (PFA) 4 %

Organ Duodenum



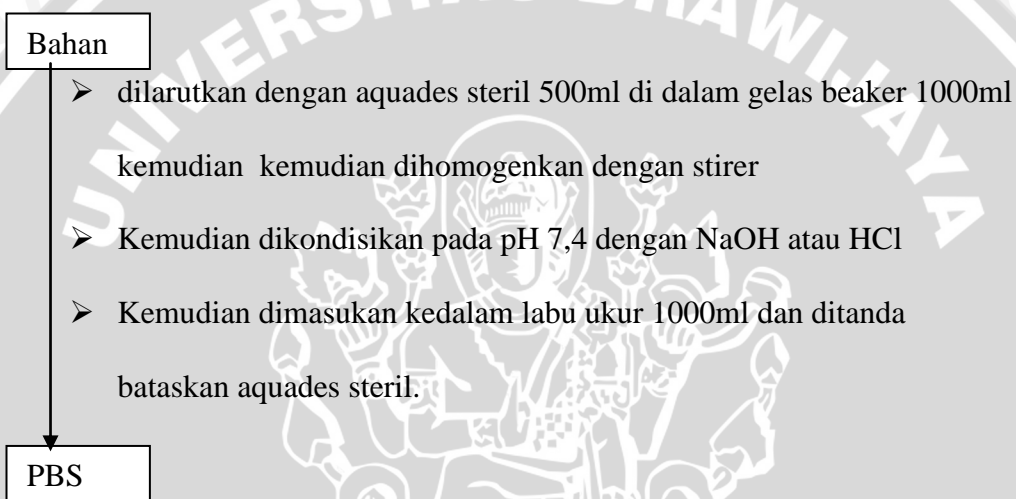
**Lampiran 5. Persiapan Larutan Sebelum Bedah**

**7.1 Pembuatan PBS**

Bahan

- KCl → 0,2 gram
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> → 0,2 gram
- NaCl → 8 gram
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> → 2,16 gram

Prosedur



**7.2 Pembuatan PFA 4%**

Bahan

- Formalin 4%
- NaCl fisiologis

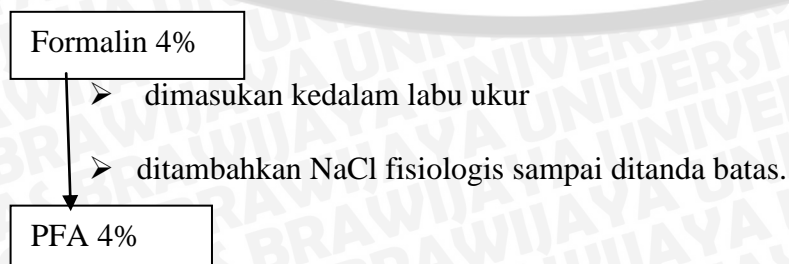
Rumus

$$M1.V1 = M2.V2$$

Keterangan :

M = Molaritas                      V = Volume

Prosedur





### Lampiran6. PembuatanKurvaStandar MDA

Pembuatankurvastandar MDA dilakukanmenurutAulanni'am *et al*( 2012).

100  $\mu$ Lstok kitstandar MDA konsentrasi  
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 mg/mL

- Dimasukkan tabung reaksi yang berbeda
- Ditambahkan 550  $\mu$ L akuades steril
- Ditambah 100  $\mu$ L TCA 100%
- Dihomogenkan dengan *vortex*
- Ditambah 250  $\mu$ L HCl 1N dan dihomogenkan dengan vortex
- Ditambah 100  $\mu$ L Na-Thio 1% dan dihomogenkan dengan vortex
- Disentrifugasipadakecepatan 500 rpm selama 10 menit
- Dipanaskan dalam *waterbath* 100°C selama 30 menit
- Didiamkan padasuhur ruang 25- 27 °C

Supernatan

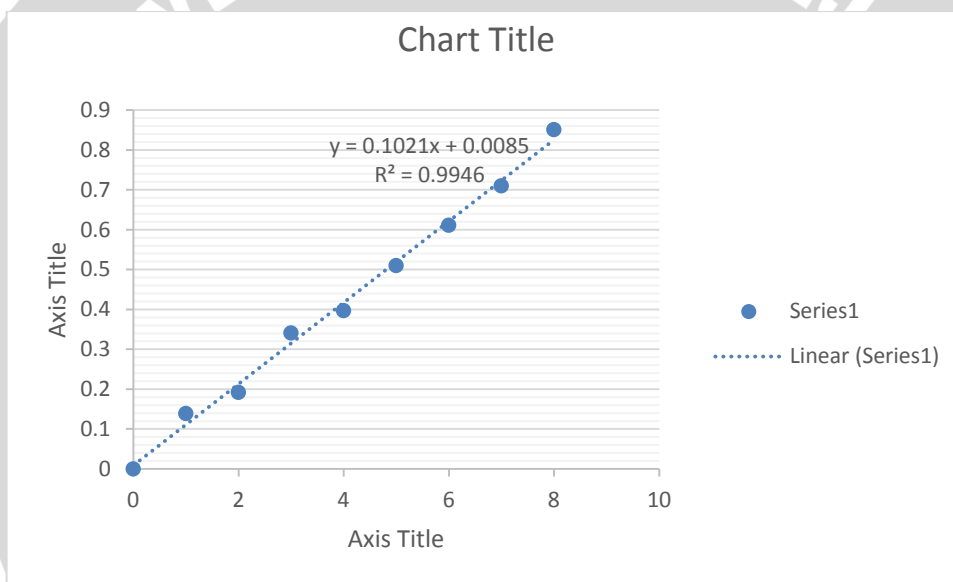
- Diukur  $\lambda_{maks}$  menggunakan spektrofometer UV-Vis pada  $\lambda = 500-600$  nm
- Diukur absorbansi tiap-tiap larutan standar menggunakan  $\lambda_{maks}$

AbsorbansiMDA larutan baku dan kurva

**Lampiran 7. Kurva Standar MDA**

**Tabel L7.1 Hasil Pengukuran Absorbansi Kurva Standar MDA**

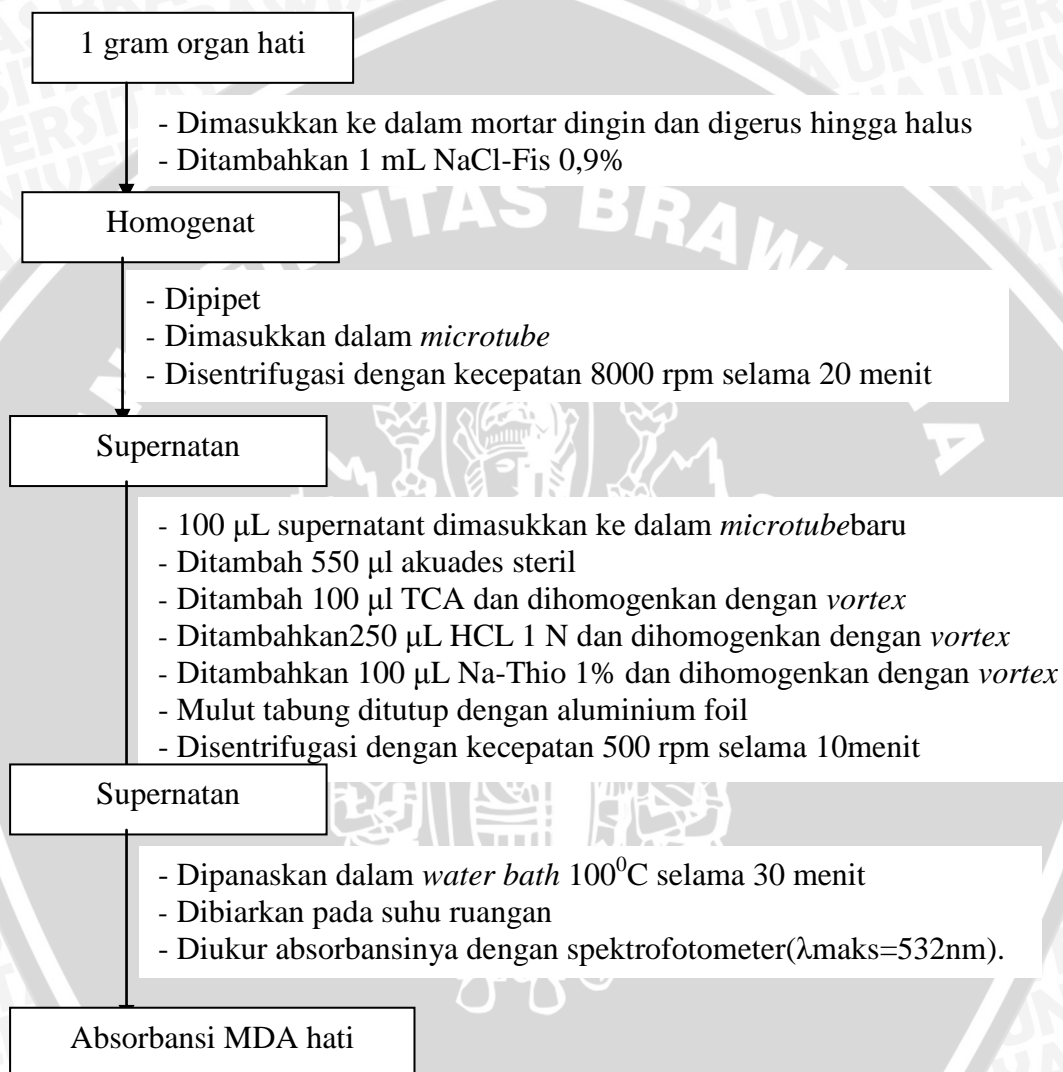
Konsentrasi mg/mL	Absorbansi
0	0.000
1	0,139
2	0,192
3	0,341
4	0,397
5	0,51
6	0,6112
7	0,71
8	0,851



**Gambar L7.1 Kurva standar MDA pada panjang gelombang 532**

**Lampiran 8.** Pengukuran Kadar Malondialdehida (MDA)

Pengukuran kadar malondialdehida (MDA) menggunakan uji TBA menurut Aulanni'am *et al* (2012).





**Lampiran 9.** Data Absorbansi dan Perhitungan Kadar MDA**Tabel L9.1** Data Absorbansi MDA

Tikus ke-	Kontrol	Hiperkolesterol	Upaya preventif 300 mg/kg BB + Hiperkolesterol	Upaya preventif 600 mg/kg BB + Hiperkolesterol	Upaya preventif 900 mg/kg BB + Hiperkolesterol
1	0,034	0,085	0,065	0,049	0,042
2	0,042	0,08	0,059	0,044	0,037
3	0,04	0,076	0,058	0,046	0,04
4	0,034	0,078	0,057	0,047	0,037

**Tabel L9.2** Data Kadar MDA

Tikus ke-	Kontrol	Hiperkolesterol	Upaya preventif 300 mg/kg BB + Hiperkolesterol	Upaya preventif 600 mg/kg BB + Hiperkolesterol	Upaya preventif 900 mg/kg BB + Hiperkolesterol
1	0,245	0,749	0,553	0,397	0,328
2	0,328	0,700	0,495	0,348	0,279
3	0,309	0,661	0,485	0,367	0,309
4	0,250	0,681	0,475	0,377	0,279
Rata-rata	0,284	0,698	0,502	0,372	0,299

Perhitungan kadar MDA dilakukan untuk semua nilai absorbansi dengan menggunakan persamaan kurva standar MDA  $y = 0,1021x + 0,0085$ , sehingga dapat dihitung kadar MDA sebagai nilai  $x$ . Contoh perhitungan konsentrasi MDA pada kelompok tikus sehat dengan nilai absorbansi 0,267.

$$y = 0,1021x + 0,0085$$

$$0,034 = 0,1021x + 0,0085$$

$$x = (0,034 - 0,0085) / 0,1021$$

$$x = 0,245$$

**Lampiran 10.** Presentasi Peningkatan dan Upaya menekan peningkatan Kadar MDA

1. Presentasi peningkatan kadar MDA pada kelompok Hiperkolesterolemia

$$\% \text{ kadar MDA} = \frac{\text{Rataan Hiperkolesterol} - \text{Rataan kontrol}}{\text{Rataan kontrol}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kadar MDA} = \frac{\quad}{\quad}$$

$$\% \text{ kadar MDA} = 145,77\%$$

2. Presentasi upaya menekan peningkatan kadar MDA pada dosis 300 mg/kg BB

$$\frac{\text{Rataan 300 mg/kg BB} - \text{Rataan kontrol}}{\quad} \times 100\%$$

$$\% \text{ kadar MDA} = \frac{\quad}{\text{Rataan kontrol}}$$

$$\% \text{ kadar MDA} = \frac{\quad}{\quad}$$

$$\% \text{ kadar MDA} = 76,76\%$$

3. Presentasi upaya menekan peningkatan kadar MDA pada dosis 600 mg/kg BB

$$\frac{\text{Rataan 600 mg/kg BB} - \text{Rataan kontrol}}{\quad} \times 100\%$$

$$\% \text{ kadar MDA} = \frac{\quad}{\text{Rataan kontrol}}$$

$$\% \text{ kadar MDA} = \frac{\quad}{\quad}$$

$$\% \text{ kadar MDA} = 30,98\%$$

4. Presentasi upaya menekan peningkatan kadar MDA pada dosis 900 mg/kg BB

$$\frac{\text{Rataan 900 mg/kg BB} - \text{Rataan kontrol}}{\quad} \times 100\%$$

$$\% \text{ kadar MDA} = \frac{\quad}{\text{Rataan kontrol}}$$

$$\% \text{ kadar MDA} = \frac{\quad}{\quad}$$

$$\% \text{ kadar MDA} = 5,28\%$$



**Lampiran 11.** Hasil Uji Statistik MDA

**Tabel L11.1** Uji Normalitas Data

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		MDA
N		20
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	.43075
	Std. Deviation	.160971
Most Extreme Differences	Absolute	.183
	Positive	.183
	Negative	-.124
Kolmogorov-Smirnov Z		.819
Asymp. Sig. (2-tailed)		.514

a. Test distribution is Normal.

**Tabel L11.2** Uji Homogenitas Data

**Test of Homogeneity of Variances**

MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.139	4	15	.376

**Tabel L11.3** Uji ANOVA

**ANOVA**

MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.476	4	.119	110.522	.000
Within Groups	.016	15	.001		
Total	.492	19			



Tabel L11.4 Uji Tukey

## Multiple Comparisons

MDA

Tukey HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
SEHAT	HIPERKOLESTEROL	-.414750*	.023207	.000	-.48641	-.34309
	PENCEGAHAN 300	-.219000*	.023207	.000	-.29066	-.14734
	PENCEGAHAN 600	-.089250*	.023207	.012	-.16091	-.01759
	PENCEGAHAN 900	-.015750	.023207	.958	-.08741	.05591
HIPERKOLESTEROL	SEHAT	.414750*	.023207	.000	.34309	.48641
	PENCEGAHAN 300	.195750*	.023207	.000	.12409	.26741
	PENCEGAHAN 600	.325500*	.023207	.000	.25384	.39716
	PENCEGAHAN 900	.399000*	.023207	.000	.32734	.47066
PENCEGAHAN 300	SEHAT	.219000*	.023207	.000	.14734	.29066
	HIPERKOLESTEROL	-.195750*	.023207	.000	-.26741	-.12409
	PENCEGAHAN 600	.129750*	.023207	.000	.05809	.20141
	PENCEGAHAN 900	.203250*	.023207	.000	.13159	.27491
PENCEGAHAN 600	SEHAT	.089250*	.023207	.012	.01759	.16091
	HIPERKOLESTEROL	-.325500*	.023207	.000	-.39716	-.25384
	PENCEGAHAN 300	-.129750*	.023207	.000	-.20141	-.05809
	PENCEGAHAN 900	.073500*	.023207	.043	.00184	.14516
PENCEGAHAN 900	SEHAT	.015750	.023207	.958	-.05591	.08741
	HIPERKOLESTEROL	-.399000*	.023207	.000	-.47066	-.32734
	PENCEGAHAN 300	-.203250*	.023207	.000	-.27491	-.13159
	PENCEGAHAN 600	-.073500*	.023207	.043	-.14516	-.00184

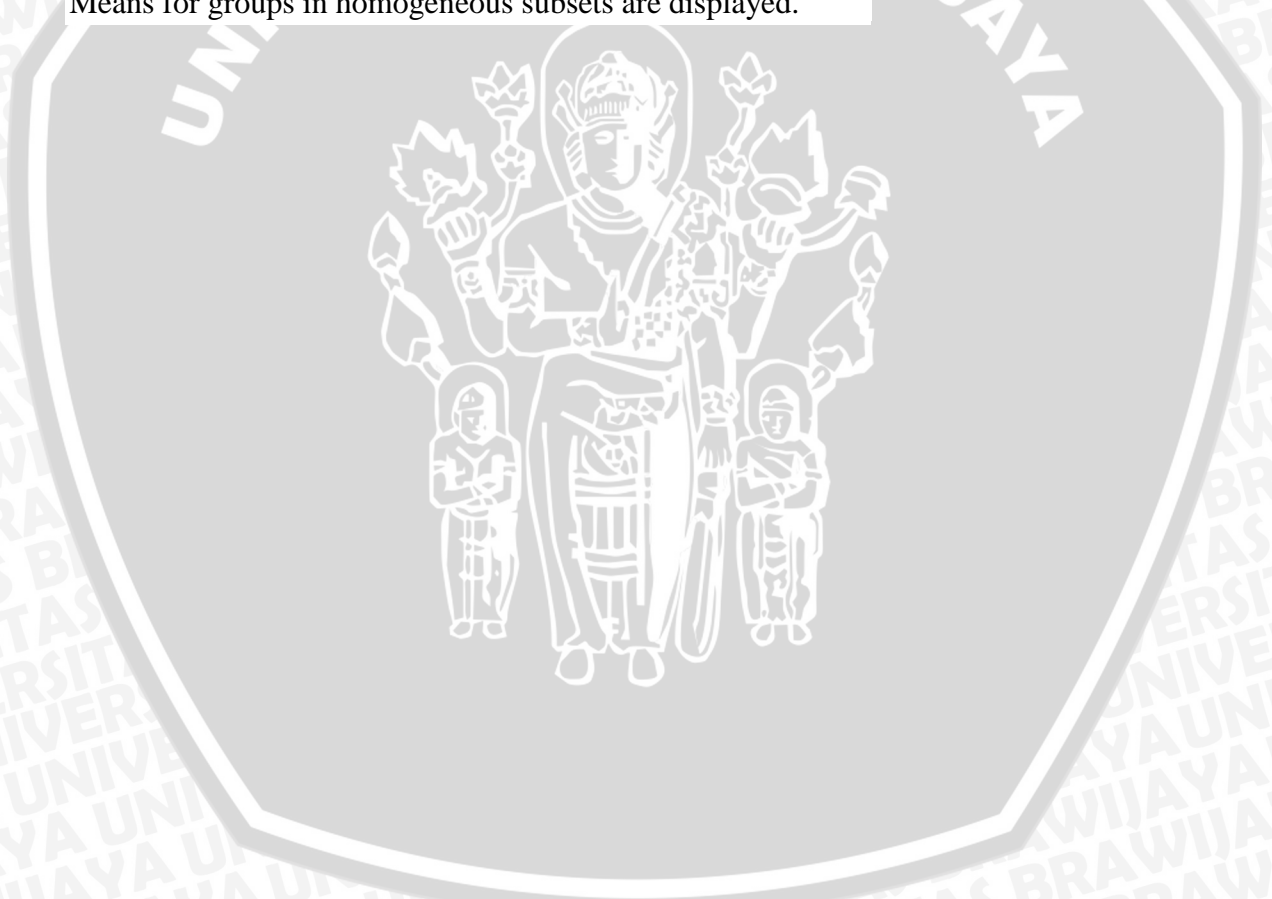
\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**MDA**

Tukey HSD

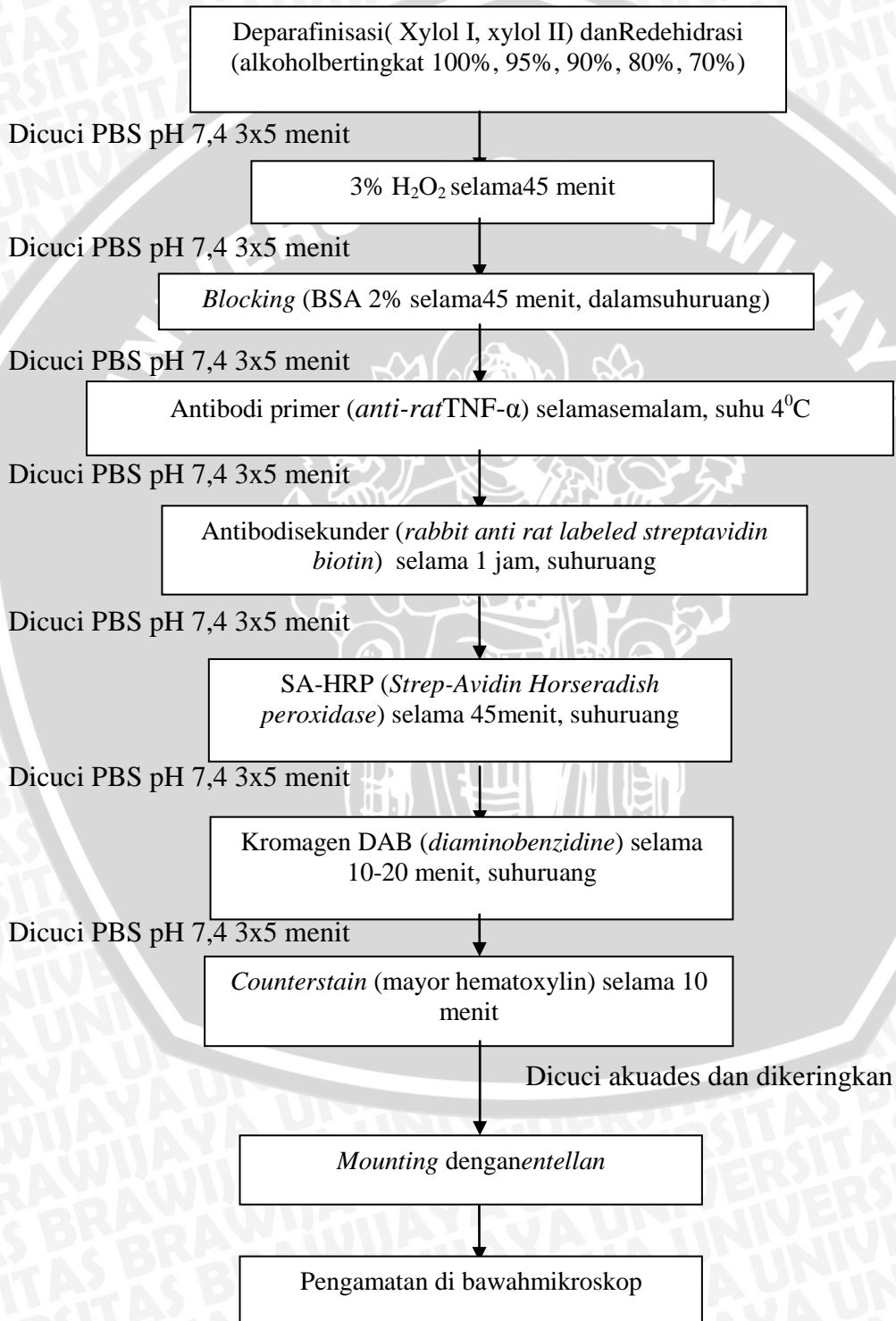
Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
SEHAT	4	.28300			
PENCEGAHAN 900	4	.29875			
PENCEGAHAN 600	4		.37225		
PENCEGAHAN 300	4			.50200	
HIPERKOLESTEROL	4				.69775
Sig.		.958	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



**Lampiran 13. Metode Imunohistokimia**

Metode imunohistokimia dilakukan menurut Ramos (2005)





**Lampiran14.**Ekspresi TNF- $\alpha$ **Tabel L14.1** Ekspresi TNF-  $\alpha$  dalam *Percent Area*

Tikus ke-	Kontrol	Hiperkolesterol	Hiperkolesterol + terapi 300 mg/kg BB	Hiperkolesterol + terapi 600 mg/kg BB	Hiperkolesterol + terapi 900 mg/kg BB
1	1,5	7,0	5,9	3,4	1,89
2	1,9	6,88	4,6	3,1	1,27
3	1,5	8,00	5,8	2,6	1,24
4	1,42	6,5	4,7	3,2	1,36
Rata - Rata	1,58	7,095	5,25	3,075	1,44



**Lampiran 15.** Presentasi Peningkatan dan Upaya menekan peningkatan Ekspresi TNF- $\alpha$

1. Presentasi peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok hiperkolesterolemia

$$\% \text{ ekspresi TNF-}\alpha = \frac{\text{Rataan Hiperkolesterolemia} - \text{Rataan kontrol}}{\text{Rataan kontrol}} \times 100\%$$

$$\% \text{ ekspresi TNF-}\alpha = \frac{7,095 - 1,58}{1,58} \times 100\%$$

$$\% \text{ ekspresi TNF-}\alpha = 349,051\%$$

2. Presentasi upaya menekan peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada dosis 300 mg/kg

$$\text{BB} \quad \frac{\text{Rataan preventif 300 mg/kg BB} - \text{Rataan kontrol}}{\text{Rataan kontrol}} \times 100\%$$

$$\% \text{ ekspresi TNF-}\alpha = \frac{\text{Rataan preventif 300 mg/kg BB} - \text{Rataan kontrol}}{\text{Rataan kontrol}} \times 100\%$$

$$\% \text{ ekspresi TNF-}\alpha = \frac{5,25 - 1,58}{1,58} \times 100\%$$

$$\% \text{ ekspresi TNF-}\alpha = 232,278 \%$$

3. Presentasi upaya menekan peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada dosis 600 mg/kg

$$\text{BB} \quad \frac{\text{Rataan preventif 600 mg/kg BB} - \text{Rataan kontrol}}{\text{Rataan kontrol}} \times 100\%$$

$$\% \text{ ekspresi TNF-}\alpha = \frac{\text{Rataan preventif 600 mg/kg BB} - \text{Rataan kontrol}}{\text{Rataan kontrol}} \times 100\%$$

$$\% \text{ ekspresi TNF-}\alpha = \frac{3,075 - 1,58}{1,58} \times 100\%$$

$$\% \text{ ekspresi TNF-}\alpha = 94,621\%$$

4. Presentasi upaya menekan peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada dosis 900 mg/kg

$$\text{BB} \quad \frac{\text{Rataan preventif 900 mg/kg BB} - \text{Rataan kontrol}}{\text{Rataan kontrol}} \times 100\%$$

$$\% \text{ ekspresi TNF-}\alpha = \frac{1,44 - 1,58}{1,58} \times 100\%$$

$$\% \text{ ekspresi TNF-}\alpha = 8,86\%$$

**Lampiran 16.** Hasil Uji Statistik TNF- $\alpha$

**Tabel L16.1** Uji Normalitas Data

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		TNF
N		20
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	3.6880
	Std. Deviation	2.28411
Most Extreme Differences	Absolute	.183
	Positive	.183
	Negative	-.142
Kolmogorov-Smirnov Z		.819
Asymp. Sig. (2-tailed)		.514

a. Test distribution is Normal.

**Tabel L16.2** Uji Homogenitas Data

**Test of Homogeneity of Variances**

TNF

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.121	4	15	.057

**Tabel L16.3** Uji ANOVA

**ANOVA**

TNF	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	95.682	4	23.920	104.171	.000
Within Groups	3.444	15	.230		
Total	99.126	19			



**Tabel L16.4 Uji Tukey**

**Multiple Comparisons**

TNF

Tukey HSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
SEHAT	SAKIT	-5.51500*	.33884	.000	-6.5613	-4.4687
	DOSIS 300	-3.67000*	.33884	.000	-4.7163	-2.6237
	DOSIS 600	-1.49500*	.33884	.004	-2.5413	-.4487
	DOSIS 900	.14000	.33884	.993	-.9063	1.1863
SAKIT	SEHAT	5.51500*	.33884	.000	4.4687	6.5613
	DOSIS 300	1.84500*	.33884	.001	.7987	2.8913
	DOSIS 600	4.02000*	.33884	.000	2.9737	5.0663
	DOSIS 900	5.65500*	.33884	.000	4.6087	6.7013
DOSIS 300	SEHAT	3.67000*	.33884	.000	2.6237	4.7163
	SAKIT	-1.84500*	.33884	.001	-2.8913	-.7987
	DOSIS 600	2.17500*	.33884	.000	1.1287	3.2213
	DOSIS 900	3.81000*	.33884	.000	2.7637	4.8563
DOSIS 600	SEHAT	1.49500*	.33884	.004	.4487	2.5413
	SAKIT	-4.02000*	.33884	.000	-5.0663	-2.9737
	DOSIS 300	-2.17500*	.33884	.000	-3.2213	-1.1287
	DOSIS 900	1.63500*	.33884	.002	.5887	2.6813
DOSIS 900	SEHAT	-.14000	.33884	.993	-1.1863	.9063
	SAKIT	-5.65500*	.33884	.000	-6.7013	-4.6087
	DOSIS 300	-3.81000*	.33884	.000	-4.8563	-2.7637
	DOSIS 600	-1.63500*	.33884	.002	-2.6813	-.5887

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



**TNF**

Tukey HSD

KELOMPOK	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
DOSIS 900	4	1.4400			
SEHAT	4	1.5800			
DOSIS 600	4		3.0750		
DOSIS 300	4			5.2500	
SAKIT	4				7.0950
Sig.		.993	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

