

**EFEK PENGIKATAN KOLESTEROL OLEH ISOLAT
BAKTERI ASAM LAKTAT DARI KOLOSTRUM
KAMBING SECARA IN VITRO**



**SRI WAHYUNI
H511 04 040**



1-08-08
farmasi
1 sks
Husni
233

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2008**

**EFEK PENGIKATAN KOLESTEROL OLEH ISOLAT BAKTERI ASAM
LAKTAT DARI KOLOSTRUM KAMBING SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**SRI WAHYUNI
H511 04 040**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2008**

LEMBAR PENGESAHAN

**EFEK PENGIKATAN KOLESTEROL OLEH ISOLAT BAKTERI ASAM
LAKTAT DARI KOLOSTRUM KAMBING SECARA IN VITRO**

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama



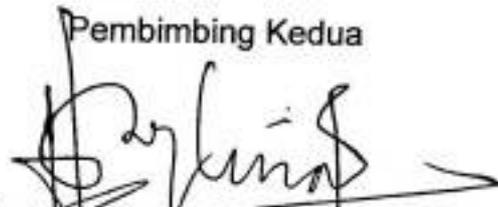
Dr. M. Natsir Djide, MS., Apt
NIP. 130 785 083

Pembimbing Pertama



Drs. Abd. Muzakkir Rewa, M.Si., Apt.
NIP. 130 937 013

Pembimbing Kedua



Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 132 301 322

Pada Tanggal : Juli 2008

UCAPAN TERIMA KASIH

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Alhamdulillah, tiada kata yang patut diucapkan oleh seorang hamba selain puji syukur ke hadirat Allah subhanahuwata'ala, karena atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini sebagai salah satu syarat agar dapat memperoleh gelar sarjana.

Begitu banyak kendala dan hambatan yang penulis hadapi dalam penyusunan skripsi ini, sejak dari merencanakan penelitian hingga penyusunan skripsi. Namun berkat banyaknya dukungan dan bantuan dari berbagai pihak sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Oleh karena itu, penulis dengan tulus menghaturkan banyak terima kasih kepada Bapak Dr. M. Natsir Djide, MS., Apt sebagai pembimbing utama, Bapak Drs. Abd. Muzakkir Rewa, M.Si., Apt. sebagai pembimbing pertama, serta Ibu Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. sebagai pembimbing kedua atas waktu dan tenaga yang diluangkan oleh ketiga beliau dalam memberikan arahan, bimbingan dan masukan yang positif untuk penulis dalam penyusunan skripsi ini.

Untuk kedua orang tua tercinta, Ibunda dr. Hj. Amna Himran dan Ayahanda H. Baharuddin Djaba, terima kasih yang tak terhingga atas semua doa, dukungan moril dan materil, serta pengorbanan yang telah kalian berikan dengan tulus dan ikhlas. Dan terima kasih pula untuk kakakku tersayang Fatmawaty Baharuddin, S.Ked serta adik angkatku tercinta Fachri dan seluruh keluarga besarku yang tidak dapat kusebut

satu persatu atas motivasi yang telah diberikan kepada penulis selama ini. Penulis tidak akan pernah sanggup membalas semua bantuan yang telah kalian berikan. Hanya doa tulus yang selalu terkirim di setiap akhir shalatku.

Demikian pula penulis menyampaikan terima kasih kepada Drs. H. Hasyim Bariun, M.Si., Apt. sebagai penasehat akademik yang telah banyak memberikan nasehat dan bimbingan kepada penulis. Kepada Dekan, Ketua Jurusan, Bapak/Ibu Dosen Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi, beserta seluruh staf pegawai Fakultas Farmasi terima kasih atas segala bantuan dan dukungan yang diberikan selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1).

Terima kasih penulis sampaikan kepada ketiga sahabatku tersayang Arnisakti, Nur Ima Fatima M dan terkhusus Kak Srimarjayani atas segala bantuan dan dukungannya sampai penulis dapat menyelesaikan penelitian ini. Kepada teman-teman seperjuangan selama penelitian serta teman-teman angkatan 2004 yang tidak bisa disebut satu persatu, jazakumullah khair telah memberikan arti kebersamaan dalam hidup penulis baik suka maupun duka.

Terkhusus buat semua ustadz salafy, jazakumullah khair untuk semua nasehat yang telah diberikan. Tak lupa pula buat semua akhwat salafy, syukran katsiran untuk semuanya. Semoga penulis tetap istiqamah di atas manhaj ahlu sunnah wal jama'ah. Menjadi hamba yang selalu mensyukuri segala nikmat yang telah Allah berikan selama ini.

Kepada para laboran di laboratorium Mikrobiologi Farmasi, terima kasih banyak atas semua bantuan yang telah diberikan kepada penulis selama ini.

Besar harapan penulis agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapa saja yang membacanya dan bisa menjadi inspirasi untuk dikembangkan lebih bagus lagi. Penulis sadar bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, apabila terdapat kekhilafan dan kekeliruan di dalamnya harap dimaklumi dan diharapkan kritik dan saran yang membangun dari pembaca agar di kemudian hari dapat lebih baik lagi.

Akhirnya semoga karya kecil ini berguna bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Amin ya Rabbal 'alamin...

Makassar, Juli 2008

Sri Wahyuni

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang efek pengikatan kolesterol oleh bakteri asam laktat dari kolostrum kambing secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri asam laktat isolat kolostrum kambing dalam mengikat kolesterol secara *in vitro*. Digunakan variasi massa sel bakteri asam laktat kolostrum kambing yaitu 10 mg, 30 mg, dan 50 mg. Kemampuan pengikatan kolesterol didasarkan pada pengukuran kolesterol dalam larutan kolesterol-etanol setelah penambahan sel bakteri yang telah diliofilisasi dengan masa inkubasi 1 jam pada suhu 37°C, dimana kolesterol yang tidak terikat akan ditentukan dengan menggunakan metode Rudel-Morris. Hasil analisis statistik (berdasarkan analisis sidik ragam dan uji lanjutan dengan metode Duncan) menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat dari kolostrum kambing mampu mengikat kolesterol secara *in vitro*, dimana perbedaan massa sel berpengaruh sangat nyata ($\alpha = 0,01$) terhadap pengikatan kolesterol. Massa sel yang memperlihatkan persentase pengikatan kolesterol yang optimal adalah 50 mg dengan pengikatan kolesterol 45,591%.

Kata kunci: kolesterol, bakteri asam laktat, kolostrum kambing

ABSTRACT

Research about the effect of cholesterol binding by lactic acid bacteria from goat colostrum in vitro has been done. This research was aimed to see the capability of lactic acid bacteria isolated from goat colostrum in binding cholesterol. This study used variation of cell mass at 10 mg, 30 mg and 50 mg. Capability in binding cholesterol based on total cholesterol in the cholesterol-ethanol solution after liofilitation cell added to it, on the 1 hour incubation periode 37°C, where the cholesterol wasn't binding decided with Rudel-Morris method. Data analysis of cholesterol binding effect indicate that lactic acid bacteria isolated from goat colostrum was able to binding cholesterol in vitro, where difference of mass cell was very significant ($\alpha = 0.01$). The greatest persentation of cholesterol binding was cell mass 50 mg with cholesterol binding 45.591%.

Key word: cholesterol, lactic acid bacteria, goat colostrum

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	i
UCAPAN TERIMA KASIH.....	ii
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Probiotik.....	4
II.1.1 Manfaat Probiotik Bagi Kesehatan.....	4
II.1.2 Penggolongan Probiotik.....	6
II.2 Bakteri Asam Laktat.....	6
II.2.1 Karakteristik Bakteri Asam Laktat.....	7
II.2.2 Pengelompokan Bakteri Asam Laktat.....	8
II.2.3 Metabolisme Bakteri Asam Laktat.....	9
II.3 Kolesterol.....	11
II.3.1 Kegunaan Kolesterol.....	12
II.3.2 Sintesa kolesterol.....	12
II.3.3 Lipoprotein.....	15
II.3.4 Pengangkutan Kolesterol.....	17

II.3.5 Konsep Dasar Pengaturan Kadar Lipid	18
II.3.6 Ekskresi Kolesterol	18
II.4 Hubungan Hiperkolesterolemia dan Aterosklerosis	19
II.5 Faktor-faktor Risiko Terjadinya Aterosklerosis	20
II.6 Mekanisme Penurunan Kolesterol	22
II.7 Analisis Kolesterol	23
BAB III METODE PENELITIAN	26
III.1 Alat dan Bahan	26
III.1.1 Alat-alat yang digunakan	26
III.1.2 Bahan-bahan yang digunakan	26
III.2 Penyiapan Sampel Penelitian	26
III.2.1 Pengambilan Sampel	26
III.2.2 Peremajaan Mikroba	26
III.2.3 Penyiapan Sel Terliofilisasi	27
III.3 Pengujian Pengikatan Kolesterol secara in Vitro	27
III.3.1 Pembuatan Kurva Standar	27
III.3.2 Penentuan Kondisi Penurunan Kolesterol	28
III.3.3 Pengukuran Sampel	28
III.3.4 Penentuan Persentase Pengikatan Kolesterol	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	30
IV.1 Hasil Penelitian	30
IV.2 Pembahasan	31
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	34
V.1 Kesimpulan	34

V.2 Saran 34

DAFTAR PUSTAKA 35

LAMPIRAN



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
I Skema Kerja Penyiapan Sel Terliofilisasi	38
II Skema Kerja Uji Pengikatan Kolesterol	39
III Persamaan Regresi dari Kurva Standar Berdasarkan Konsentrasi Kolesterol dan Nilai Serapan	40
IV Perhitungan Persentase Pengikatan Kolesterol oleh Bakteri Asam Laktat Kolostrum Kambing	41
V Analisis Statistik Data Efek Pengikatan Kolesterol oleh Isolat Bakteri Asam Laktat Kolostrum Kambing Berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan Analisis Sidik Ragam (ASR)	42
VI Gambar Isolat Bakteri Asam Laktat dari Kolostrum Kambing	46

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Penggolongan mikroba probiotik	6
2. Karakteristik Bakteri Asam Laktat asal tanaman & susu	8
3. Kemampuan pengikatan kolesterol isolat bakteri asam laktat dari kolostrum kambing	30
4. Hasil perhitungan kurva standar analisis kolesterol dengan menggunakan persamaan kurva baku	40
5. Hasil perhitungan persentase pengikatan kolesterol	41
6. Perhitungan statistik jumlah kolesterol ($\mu\text{g/ml}$) yang terikat oleh isolat bakteri asam laktat dari kolostrum kambing pada berbagai variasi massa sel	42
7. Tabel Anava	44
8. Tabel Selisih Uji Duncan Pengikatan Kolesterol	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kolesterol (kolest-5-en-3- β -ol)	11
2. Kurva standar analisis kolesterol	40
3. Kurva hubungan antara massa sel isolat bakteri asam laktat dari kolstrum kambing dengan kemampuan pengikatan kolesterol	44
4. Foto kultur isolat bakteri asam laktat dari kolostrum kambing dengan menggunakan medium MRSA	46
5. Foto isolat bakteri asam laktat dari kolostrum kambing setelah diliofilisasi	46

BAB I

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat adalah salah satu organisme yang dapat memfermentasikan gula untuk menghasilkan asam laktat. Mengonsumsi produk hasil fermentasi asam laktat dalam jumlah tertentu dapat memberi keuntungan bagi manusia. Beberapa penelitian melaporkan bahwa mengonsumsi produk fermentasi susu yang mengandung bakteri asam laktat, dapat menurunkan kadar kolesterol darah (1).

Kolesterol merupakan bahan bangun esensial bagi tubuh untuk sintesa zat-zat penting, seperti membran sel dan lain-lain. Kelebihan kolesterol adalah faktor resiko bagi aterosklerosis dan akhirnya pada penyakit jantung dan pembuluh darah (PJP), khususnya angina dan infark jantung (2).

Bakteri asam laktat adalah jenis mikroba yang paling umum digunakan sebagai probiotik (3). Istilah probiotik diartikan sebagai kultur mikroorganisme tunggal atau campuran yang dikonsumsi manusia dalam jumlah yang cukup dan memiliki efek menguntungkan dengan cara menjaga keseimbangan mikro flora saluran pencernaan (4). Strain *Lactobacillus* dan *bifidobacterium* adalah bakteri probiotik yang paling luas penggunaannya (3).

Probiotik mempunyai kemampuan menurunkan kolesterol darah. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *Lactobacillus sp*, dapat menyerang kolesterol di dalam saluran pencernaan hewan percobaan.

Sebuah laporan menunjukkan bahwa penurunan kolesterol oleh strain bakteri *Lactobacillus* secara anaerobik dapat mencapai sekitar 27-38 persen (5).

Pada tahun 1988 telah dilakukan isolasi bakteri yang ada dalam dadih oleh Akiyoshi Hosono dkk. dan diperoleh jumlah rata-rata $4,1 \times 10^8$ bakteri/gram dan yang paling dominan adalah bakteri asam laktat yaitu sebanyak 36 strain (6,7).

Hasil penelitian Mufida (2000) menunjukkan hasil bahwa *Lactobacillus casei subsp casei R-35* yang diisolasi dari dadih fermentasi susu memperlihatkan kemampuan mengikat kolesterol sebesar 28,37% (7).

Penelitian yang lain dilakukan oleh Eni H. berhasil mengisolasi bakteri asam laktat (BAL) dari dadih. Bakteri tersebut dinamakan *Lactobacillus sp. Dad 13*. Selanjutnya berdasarkan uji *in vitro* dan *in vivo* ternyata BAL dari dadih terbukti ampuh menurunkan kolesterol. Percobaan pada hewan menunjukkan bahwa dadih efektif menurunkan kolesterol 39,8% pada hewan coba yang diberi pakan tanpa kolesterol dan 13,4% pada hewan yang diberi pakan tinggi kolesterol. Sedangkan pemberian susu fermentasi oleh probiotik dari dadih yang dipasteurisasi dan disterilisasi mampu menurunkan kolesterol sebanyak 42-45% pada pakan tinggi kolesterol dan 50-53% pada pakan tanpa kolesterol (8).

Berdasarkan hal tersebut maka timbul suatu masalah yaitu apakah bakteri asam laktat dari kolostrum kambing mampu mengikat kolesterol. Oleh karena itu, dilakukan pengukuran pengikatan kolesterol dari bakteri

asam laktat kolostrum kambing yang telah diliofilisasi secara in vitro. Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk menentukan kemampuan isolat bakteri asam laktat dari kolostrum kambing terhadap penurunan kadar kolesterol.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Probiotik

Istilah probiotik didefinisikan sebagai sediaan sel mikroba atau komponen dari sel mikroba yang mempunyai pengaruh menguntungkan bagi kesehatan dan kehidupan inangnya. Seleksi kultur probiotik yang perlu dipertimbangkan diantaranya ialah ketahanannya terhadap asam dan garam empedu. Di dalam saluran pencernaan, bakteri probiotik harus tahan selama melewati rintangan keasaman lambung yang sangat tinggi dan sekresi garam empedu di usus. Selain itu bakteri probiotik juga harus terbukti memiliki pengaruh positif terhadap kesehatan (9). Pada umumnya yang termasuk bakteri probiotik yaitu kelompok bakteri asam laktat dan bifidobakteria (10).

Kriteria suatu mikroorganisme yang termasuk ke dalam bakteri probiotik antara lain yaitu merupakan strain yang berasal dari manusia, aman untuk penggunaan pada manusia, stabil dalam kondisi asam, dan mampu melekat atau hidup dalam mukosa usus, memproduksi senyawa antimikroba, dapat melawan bakteri patogenik dan kariogenik, telah teruji secara klinis aman dikonsumsi, serta tetap hidup selama pengolahan dan penyimpanan (11,12).

II.1.1 Manfaat Probiotik Bagi Kesehatan

Probiotik memberikan banyak manfaat bagi penggunaan terapi klinik, diantaranya sebagai berikut :

1. Mengganti bakteri "baik" usus yang dihancurkan oleh antibiotik (10).
2. Membantu pencernaan dan menekan bakteri penyebab penyakit (10,11,13).
3. Mencegah dan mengobati diare, mencakup diare akibat infeksi rotavirus (suatu virus yang biasanya menyebabkan diare pada anak-anak) (10).
4. Mencegah pertumbuhan yang berlebihan dari organisme "jahat" dalam saluran pencernaan (suatu kondisi yang cenderung menyebabkan diare (10,11,13) dan dapat timbul akibat penggunaan suatu antibiotik (10)
5. Mengurangi sindrom iritasi usus besar dan radang usus besar (seperti penyakit Crohn dan "Colitis ulcerative") (10).
6. Mencegah atau mengurangi infeksi vagina akibat jamur, infeksi saluran kencing, dan Cystitis (inflamasi kandung kemih) (10)
7. Meningkatkan pencernaan dan absorpsi laktosa pada orang yang menderita intoleransi laktosa (10,11,13).
8. Meningkatkan respons imun alami (10,11,13)
9. Membantu pengobatan infeksi saluran pernafasan seperti sinusitis, bronkitis, dan pneumonia (10).
10. Menurunkan resiko alergi. Contohnya asma, hay-fever, alergi makanan, dan alergi kulit seperti ekzema (10).
11. Mengurangi resiko kanker (10,11,13).

II.1.2 Penggolongan Probiotik (10)

Mikroba probiotik dapat diperoleh dari berbagai genus mikroba. Spesies mikroba ini dapat digunakan dalam produk susu fermentasi. Beberapa contoh spesies dan genus bakteri probiotik disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Penggolongan mikroba probiotik

No	Genus	Spesies
1	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. Acidophilus</i> <i>Lb. acidophilus</i> strains LC1, La5, La1, La7, Gilliland <i>Lb. casei</i> strains Shirota <i>Lb.rhamnosus</i> strain GG <i>Lb.johnsonii</i> <i>Lb.helveticus</i> <i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lb.gasseri</i> <i>Lb.plantarum</i> <i>Lb.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> dan subsp. <i>tolerans</i> <i>Lb reuteri</i>
2	<i>Pediococcus</i>	<i>P acidilactici</i>
3	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.bifidum, breve, longum, adolescentis, infantis, latis, animalis</i>
4	<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactic</i> subsp <i>lactis</i>
5	<i>Enterococcus</i>	<i>E.faecium, faecalis</i>
5	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i>

Sumber : Surono,I,S.,2004, *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*, PT.Tri Cipta Karya; Jakarta.Hal 204.

II.2 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat ditemukan pertama kali oleh Pasteur, seorang professor kimia di Universitas of Lille, di tahun 1878. Lister melaporkan isolasi bakteri asam laktat asal susu yang tengik. Beberapa bakteri asam laktat dapat ditemukan juga pada saluran pencernaan manusia dan hewan (10).

Bakteri asam laktat dan Bifidobakteria termasuk dalam kelompok bakteri "baik" bagi manusia, dan umumnya memenuhi status GRAS (*Generally Recognized As Safe*), yaitu aman bagi manusia. Kelompok bakteri ini tidak membusukkan protein, dan dapat memetabolisme berbagai jenis karbohidrat secara fermentatif menjadi asam laktat sehingga disebut bakteri asam laktat. Jadi, makanan yang tercemar oleh bakteri asam laktat menjadi rusak karena asam, dan akan menjadi busuk jika dicemari oleh bakteri pembusuk (10).

II.2.1 Karakteristik Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat secara metabolik dan fisiologi merupakan kelompok gram positif, katalase negatif, dengan bentuk coccus dan basil. Ciri-ciri bakteri asam laktat adalah tidak membentuk spora dan anaerobik hingga mikroaerofilik, aerotoleran, asam toleran, serta fastidious. Bakteri asam laktat tidak mempunyai cytochrome serta membutuhkan nutrisi yang kompleks seperti asam-asam amino, vitamin (B₁, B₆, B₁₂ dan biotin), purin, pyrimidin. Secara umum niasin dan asam pantothenat esensial bagi pertumbuhan bakteri asam laktat (10).

Istilah bakteri asam laktat (BAL) mulanya ditujukan hanya untuk sekelompok bakteri yang menyebabkan keasaman pada susu (*milk-souring organisms*). Secara umum BAL dapat memproduksi asam laktat sebagai produk akhir metabolik utama selama fermentasi karbohidrat. BAL dikelompokkan ke dalam beberapa genus antara lain *Streptococcus* (termasuk *Lactococcus*), *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* (14).

II.2.2 Pengelompokan Bakteri Asam Laktat (10)

Bakteri asam laktat terdiri atas dua kelompok besar yaitu

1. Berdasarkan habitat bakteri asam laktat

Pada era abad ke 15, penduduk di Asia Timur dan Asia Tenggara lebih banyak mengonsumsi makanan dan minuman hasil fermentasi nabati, sedangkan di negara Barat, banyak mengonsumsi makanan hasil fermentasi susu (*Dairy product*). Dengan demikian bakteri asam laktat yang terlibat dalam fermentasi juga terdiri dari kelompok besar yaitu:

- a. Bakteri asam laktat yang habitatnya pada tanaman seperti pickel buah dan sayuran, kimchi, minuman beralkohol, produk fermentasi kedelai seperti tauco, miso, tempe dan roti.
- b. Bakteri asam laktat dengan habitat susu seperti yoghurt, keju, yakult, kefir, dadih, dan lain-lain.

Tabel 2. Karakteristik bakteri asam laktat asal tanaman dan susu

	BAL asal tanaman	BAL asal hewan
Habitat sumber gula	Tanaman Glucose, Fructose, Sucrose, maltose, cellobiose	Susu laktosa
Konsentrasi gula	Tinggi atau rendah	Stabil
Asam amino / vitamin	Sedikit	Banyak, seimbang
Senyawa penghambat	Asam tanat, alkaloid, tiosianat	Tidak ada
Ko-eksistensi	Khamir, bakteri anaerobik	Tidak ada

2. Berdasarkan perbedaan metabolisme

Secara fisiologis dan berdasarkan aktivitas metabolismenya, bakteri asam laktat dikelompokkan ke dalam dua sub grup, yaitu:

a. Bakteri asam laktat homofermentatif

Bakteri asam laktat homofermentatif melibatkan jalur Embden Meyerhof, yaitu glikolisis, menghasilkan asam laktat, 2 mol ATP dari 1 molekul glukosa/heksosa dalam kondisi normal, tidak menghasilkan CO₂ dan menghasilkan biomassa sel dua kali lebih banyak dari pada bakteri asam laktat heterofermentatif.

Secara umum, bakteri asam laktat homofermentatif digunakan dalam fermentasi susu menjadi yoghurt, dan juga untuk menghasilkan asam laktat sebagai asidulan dalam industri makanan dan industri polilaktat suatu industri polimer atau plastik ramah lingkungan.

b. Bakteri asam laktat heterofermentatif

Bakteri asam laktat heterofermentatif melalui jalur 6-fosfoglukonat/fosfoketolase selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan etanol, CO₂, asam asetat, senyawa citarasa, dan mannitol serta 1 mol ATP dari heksosa dan tidak mempunyai enzim aldolase.

Bakteri asam laktat heterofermentatif banyak dimanfaatkan dalam industri susu untuk menghasilkan keju dan senyawa flavour, senyawa citarasa maupun pengental, yaitu eksopolisakarida.

II.2.3 Metabolisme Bakteri Asam Laktat (10)

Berbagai monosakarida dimetabolisme oleh bakteri asam laktat menjadi glucose-6-phosphate atau fructose-6-phosphate dan kemudian

terjadi metabolisme melalui jalur EMP. Jalur EMP (*Embden Meyerhoff Parnas*) merupakan urutan reaksi oksidasi glukosa menjadi piruvat yang paling umum terjadi pada kebanyakan bakteri, tanaman, hewan, bahkan manusia pada reaksi katabolismenya. Bakteri asam laktat homofermentatif menggunakan jalur EMP untuk menghasilkan piruvat untuk kemudian direduksi menjadi asam *lactate dehidrogenase* menggunakan kelebihan NADH.

Jalur EMP terbagi menjadi tiga tahapan, yaitu sebagai berikut:

1. Aktivasi glukosa

Sebagaimana diketahui glukosa merupakan molekul yang relatif stabil, sehingga untuk mendegradasinya perlu ditambahkan fosfat energi tinggi agar tidak stabil. Pada tahap awal fosfat diseimbangkan dari ATP atau fosfoenol piruvat pada glukosa sehingga terbentuk glukosa-6-fosfat, untuk selanjutnya diisomerisasi menjadi fruktosa-6-fosfat, dan fosfat kedua ditambahkan sehingga terbentuk fruktosa 1,6-difosfat, yang lebih mudah diuraikan dibanding glukosa.

2. Penguraian glukosa

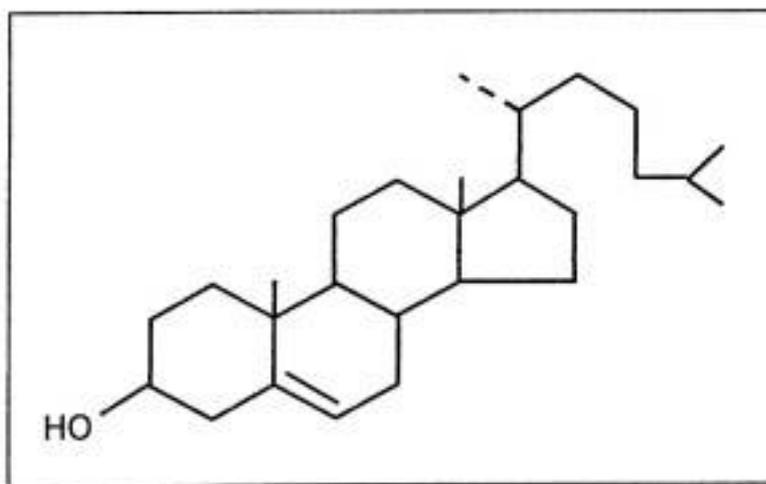
Fruktosa 1,6-difosfat selanjutnya diuraikan oleh enzim fruktosa bifosfat aldolase menjadi dua senyawa berkarbonat 3, yaitu glyceraldehida 3 fosfat (GAP) dan dihydroxyacetonfosfat (DAP). Ini merupakan tahap penting dalam jalur EMP, yaitu mengubah glukosa berkarbon 6 menjadi 2 molekul senyawa berkarbon 3 yaitu menjadi cikal bakal piruvat.

3. Ekstraksi energi

Pada tahap reaksi selanjutnya, DAP diubah menjadi GAP, yang akan berperan dalam jalur AMP selanjutnya. Fosfat anorganik ditambahkan pada GAP untuk membentuk 1,2-biphosphoglycerate (BPG).

II.3 Kolesterol

Kolesterol (Yun.: chole = empedu, stereos = padat) adalah zat alamiah dengan sifat fisik serupa lemak tetapi berumus steroida, seperti banyak senyawa alamiah lainnya. Kolesterol merupakan bahan bangun esensial bagi tubuh untuk sintesa zat-zat penting, seperti membran sel dan bahan isolasi sekitar serat saraf. Kolesterol praktis tidak larut dalam air, larut dalam kloroform P, dalam eter P, dalam dioksan P, dalam etil asetat P, heksan P, dan dalam minyak nabati; agak sukar larut dan perlahan-lahan dalam etanol (2,15).



Gambar 1 Struktur kolesterol (Kolest-5-en-3-β-ol)

Kolesterol terdapat hampir pada semua sel hewan dan semua manusia. Pada tubuh manusia kolesterol terdapat dalam darah, empedu, kelenjar adrenal bagian luar (adrenal cortex) dan jaringan syaraf. Dalam

makanan kolesterol terdapat pada daging, susu, kuning telur, keju, mentega, dan lemak binatang (16).

Kolesterol sangat larut dalam lemak dan ia mampu membentuk ester dengan asam lemak. Kira-kira 70 persen kolesterol plasma berada dalam bentuk ester kolesterol (17).

II.3.1 Kegunaan kolesterol

Kolesterol merupakan salah satu komponen lemak. Fungsi lemak bagi tubuh berguna untuk melindungi tubuh terhadap dingin atau yang lebih penting adalah untuk persediaan kalori. Seseorang dapat berpuasa sampai beberapa minggu karena adanya persediaan lemak. Sedangkan karbohidrat sebagai persediaan kalori akan habis dalam beberapa jam saja. Disamping itu, kalori yang dihasilkan lemak, 2 kali lebih banyak daripada yang dihasilkan protein atau karbohidrat (18).

Kolesterol berfungsi untuk membangun dinding sel dan membuat hormon-hormon tertentu seperti hormon adrenokortikoid, estrogen, androgen, dan progesteron. Pada mukosa intestinal kolesterol diubah menjadi 7-dehidrokolesterol yaitu suatu provitamin D. Apabila provitamin diradiasi oleh sinar ultraviolet, biasanya dengan cara berjemur di bawah sinar matahari akan terbentuk vitamin D₃ yang aktif (16).

Kolesterol dan lipid yang lain melindungi kulit dari bahan-bahan kimia serta mencegah penguapan air yang berlebihan dari tubuh (16).

II.3.2 Sintesa Kolesterol

Dalam keadaan normal, hati melepaskan kolesterol ke darah sesuai kebutuhan. Tetapi bila diet mengandung terlampau banyak

kolesterol atau lemak hewani jenuh, maka kadar kolesterol darah akan meningkat. Setelah diserap oleh tubuh, sebagian lemak dan minyak dalam bahan pangan digunakan sebagai sumber energi, melalui reaksi penguraian: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Kalori}$. Zat-zat perombakan lainnya digunakan lagi untuk sintesa kolesterol dan lemak lain. Sintesa endogen ini disesuaikan dengan kebutuhan, misalnya selama berpuasa atau bila terdapat banyak kolesterol dalam pangan, maka pembentukannya berkurang. Sebaliknya bila kadar asam empedu menurun, sintesanya meningkat untuk dibiotransformasikan menjadi asam empedu lagi (2).

Sintesis kolesterol dalam tubuh berlangsung dalam sitoplasma dan sitokrom, dibentuk dari Asetil-koenzim A. Proses ini terdiri atas 5 tahap utama yaitu (19) :

1. Sintesis mevalonat, yang merupakan senyawa enam karbon, disintesis dari Asetil-koenzim A.
2. Mevalonat membentuk unit isoprenoid yang aktif yaitu isopentenil pirofosfat melalui pelepasan CO_2 .
3. Enam unit isopentenil berkondensasi membentuk senyawa antara, skualena
4. Skualena mengalami siklisasi untuk menghasilkan senyawa steroid induk, yaitu lanosterol.
5. Lanosterol diubah menjadi kolesterol setelah melewati beberapa tahap selanjutnya, termasuk pelepasan tiga gugus metil.

Faktor-faktor yang mempengaruhi konsentrasi kolesterol plasma adalah (7):

- a. Kenaikan jumlah kolesterol yang dicerna tiap hari sedikit meningkatkan kolesterol plasma, karena bila kolesterol dicerna maka konsentrasi kolesterol akan menghambat salah satu enzim penting untuk pembentukan kolesterol endogen, dengan demikian menimbulkan sistem pengaturan umpan balik intrinsik untuk mengatur konsentrasi kolesterol plasma. Akibatnya konsentrasi kolesterol plasma biasanya tidak berubah lebih dari 15%.
- b. Diet lemak jenuh meningkatkan konsentrasi kolesterol darah sebesar 15-25% akibat peningkatan penimbunan lemak dalam hati yang meningkatkan jumlah asetil-koA dalam sel hati untuk menghasilkan kolesterol.
- c. Pencernaan lemak yang mengandung asam lemak tidak jenuh yang tinggi biasanya menekan konsentrasi kolesterol darah cukup banyak.
- d. Kekurangan hormon tiroid meningkatkan konsentrasi kolesterol darah, dan sebaliknya. Pengaruh ini diduga berkaitan dengan peningkatan metabolisme semua zat lemak yang dipengaruhi oleh tiroksin.
- e. Kolesterol darah sangat meningkat pada diabetes mellitus yang diduga akibat peningkatan umum metabolisme lemak pada keadaan ini.
- f. Hormon estrogen menurunkan kolesterol darah, sehingga androgen meningkatkan kolesterol. Sayangnya, mekanisme pengaruh ini tidak diketahui.

II.3.3 Lipoprotein

Lipid darah terutama terdiri atas kolesterol, trigliserida (minyak), asam lemak bebas, dan fosfolipida, yang semuanya tidak dapat larut dalam darah. Lemak pada umumnya tidak dapat larut dalam air, agar lemak itu dapat diangkut dalam peredaran darah, maka lemak itu dibuat menjadi larut dengan mengikatkannya pada protein yang larut dalam air. Ikatan ini disebut lipoprotein (2,20).

Lipoprotein adalah suatu ikatan yang larut dalam air dengan berat molekul yang tinggi, terdiri dari lemak (kolesterol, trigliserida dan fosfolipid) dan protein yang khusus dapat mengikat protein (apo-protein). Didalam peredaran darah lipoprotein ini merupakan suatu kompleks yang disebut *lipoprotein particle* yang terdiri dari dua bagian yaitu bagian dalam (inti) yang tidak larut, terdiri dari trigliserida dan ester kolesterol, dan bagian luar, yang tidak larut, terdiri dari kolesterol bebas, fosfolipid dan apo-protein (20).

Apolipoprotein terletak dibagian luar partikel lipoprotein dan mempunyai 2 fungsi yaitu mengikat lipoprotein kepada reseptor sel dan mengaktifkan atau menghambat enzim-enzim plasma yang terlibat dalam penghancuran, pembentukan dan pengangkutan lipid (20).

Lipoprotein dibagi menjadi 5 golongan besar (20, 21):

1. Kilomikron

Lipoprotein dengan berat molekul terbesar ini lebih dari 80% komponennya terdiri dari trigliserida yang berasal dari makanan dan

kurang dari 5% kolesterol ester. Partikel ini terutama trigliserida diameternya berkisar 750-12000 Å

2. *Very Low Density Lipoprotein (VLDL)*

Lipoprotein ini terdiri dari 60% trigliserid (endogen) dan 10-15% kolesterol. Diameter VLDL berkisar 300-800 Å. Lipoprotein ini dibentuk dari asam lemak bebas di hati. Sintesis VLDL dirangsang oleh konsumsi kalori atau alkohol berlebihan, serta pada individu yang rentan oleh gula atau karbohidrat.

3. *Intermediate Density Lipoprotein (IDL)*

IDL ini kurang mengandung trigliserida (30%), lebih banyak kolesterol (20%) dan relatif lebih banyak mengandung apoprotein B dan E. IDL adalah zat perantara yang terjadi sewaktu VLDL dikatabolisme menjadi LDL, tidak terdapat dalam kadar yang besar kecuali bila terjadi hambatan konversi lebih lanjut.

4. *Low Density Lipoprotein (LDL)*

LDL merupakan lipoprotein pengangkut kolesterol terbesar pada manusia (70% total). Partikel LDL mengandung trigliserida sebanyak 10% dan kolesterol 50%. Partikel ini relative simetris dalam ukuran dan penampilan serta berdiameter kira-kira 220 Å. LDL berfungsi membawa kolesterol ke jaringan perifer (untuk sintesis membran plasma dan hormon steroid).

5. *High Density Lipoprotein (HDL)*

Komponen HDL adalah 13% kolesterol, kurang dari 5% trigliserid dan 50% protein. Diameter molekulnya bervariasi dari 55-120 Å. HDL

berfungsi mengangkut kolesterol dari jaringan perifer ke hati, sehingga penimbunan kolesterol di perifer berkurang.

II.3.4 Pengangkutan Kolesterol

Dua jalur pengangkutan kolesterol dalam darah yaitu (2):

a. Jalur Eksogen

Trigliserida dan kolesterol yang berasal dari makanan dalam usus dikemas sebagai kilomikron. Kilomikron ini akan diangkut dalam saluran limfe lalu diangkut dalam darah via duktus torasikus. Di dalam jaringan lemak. Triglisericid dalam kilomikron mengalami hidrolisis oleh lipoprotein lipase yang terdapat pada permukaan sel endotel. Akibat hidrolisis ini maka akan terbentuk asam lemak dan kilomikron remnan. Asam lemak bebas akan menembus endotel dan masuk ke dalam jaringan lemak atau sel otot untuk diubah menjadi triglisericid kembali (cadangan) atau dioksidasi (energi). Kilomikron remnan akan dibersihkan oleh hati dari sirkulasi dengan mekanisme endositosis oleh lisosom. Hasil metabolisme ini berupa kolesterol bebas yang digunakan untuk sintesis berbagai struktur (membran plasma, mielin, hormon steroid, dsb), disimpan ke dalam hati sebagai kolesterol ester lagi atau diekskresi ke dalam empedu (sebagai kolesterol atau asam empedu), atau diubah menjadi lipoprotein endogen yang dikeluarkan ke dalam plasma.

b. Jalur Endogen

Triglisericid dan kolesterol yang disintesis oleh hati diangkut secara endogen dalam bentuk VLDL kaya triglisericid dan mengalami hidrolisis dalam sirkulasi oleh lipoprotein lipase yang juga menghidrolisis kilomikron

menjadi partikel lipoprotein yang lebih kecil yaitu IDL dan LDL. LDL mengalami katabolisme melalui reseptor dan jalur non-reseptor.

II.3.5 Konsep Dasar Pengaturan Kadar Lipid

Kadar lipid dalam plasma setiap saat tergantung pada kecepatan transport lipoprotein ke dalam sirkulasi dan kecepatan bersihannya dari sirkulasi. Jumlah dan kecepatan kolesterol atau TG dari hepar atau usus halus masuk ke dalam sirkulasi tergantung pada suplai lipid dan apoprotein masing-masing dalam membentuk kompleks lipoprotein (23).

Sekresi lipoprotein ini juga ditentukan oleh aktifitas enzim lipoprotein lipase (LPL). Perangsangan LPL dapat meningkatkan bersihan kilomikron dan trigliserida-VLDL dari sirkulasi. Faktor-faktor yang meningkatkan katabolisme dan ekskresi kolesterol dari tubuh atau mempercepat bersihan partikel LDL dari sirkulasi akan menurunkan kadar kolesterol dalam plasma karena menurunnya kandungan kolesterol dalam hepar dapat merangsang pembentukan reptor LDL hepatosit yang berujung pada peningkatan bersihan LDL plasma ke dalam hepar (22).

II.3.6 Ekskresi Kolesterol

Sekitar 1 gram kolesterol dikeluarkan dari dalam tubuh setiap harinya. Kurang lebih separuhnya diekskresikan ke dalam feses setelah sebelumnya diubah menjadi asam empedu. Sisanya akan diekskresikan sebagai kolesterol. Sebagian besar kolesterol yang diekskresikan ke dalam empedu akan diserap kembali dan diyakini bahwa sekurang-kurangnya sebagian kolesterol merupakan bagian senyawa sterol feses yang berasal dari mukosa intestinal. Koprostanol merupakan sterol utama

di dalam feses, senyawa ini dibentuk dari kolesterol oleh flora bakteri yang ada dalam usus besar. Sejumlah besar ekskresi asam empedu akan diserap kembali ke dalam sirkulasi porta, diambil oleh hati, dan diekskresikan kembali ke dalam empedu. Garam empedu yang tidak diserap kembali, ataupun derivatnya diekskresikan ke dalam feses (19).

II.4 Hubungan Hiperkolesterolemia dengan Ateroskeloris

Hiperlipidemia adalah suatu keadaan patologis akibat kelainan metabolisme lemak darah yang ditandai dengan meningkatnya kadar kolesterol darah (hiperkolesterolemia), trigliserida (hipertrigliseridemia) atau kombinasi keduanya. Hiperkolesterolemia dan hipertrigliseridemia merupakan faktor resiko bagi aterosklerosis dan akhirnya penyakit jantung dan pembuluh darah (PJP) (2,22).

Aterosklerosis adalah bentuk arteriosklerosis yang paling umum ditemukan, ditandai dengan terdapatnya aterom pada bagian intima arteri yang berisi kolesterol, zat lipoid dan lipofag. Arteriosklerosis adalah suatu penyakit yang ditandai dengan penebalan dan hilangnya elastisitas dinding arteri (21).

Ciri aterosklerosis adalah pembentukan lesi jaringan ikat-lemak pada intima, yang disebut bercak aterosklerosis, yang menyempitkan lumen pembuluh disertai perubahan degenerasi lapis media dan adventisia. Pusat bagian tengah bercak tersebut sering mengandung gumpalan kaya lemak sebagai kolesterol dan ester kolesterol (23).

Pengurangan jumlah kolesterol dalam makanan, sampai tingkat tertentu telah berhasil memperlambat proses penggumpalan kolesterol di

bagian arteri (aterosklerosis). Namun keberhasilan ini terbatas, karena pada kenyataannya bahwa sebagian besar kolesterol tubuh berasal dari sintesis yang terjadi dalam tubuh sendiri, bukan dari makanan (24).

Aterosklerosis dan penyakit jantung aterosklerotik bersifat sangat hereditas pada beberapa keluarga. Dalam beberapa keadaan hal ini dihubungkan dengan hiperkolesterolemia yang diturunkan. Kelebihan kolesterol yang hampir seluruhnya dalam low density lipoprotein. Hati tak sanggup menyingkirkan kolesterol dari lipoprotein ini. Sehingga banyak kolesterol yang kelebihan diendapkan dalam dinding arteri (17).

II.5 Faktor-faktor Risiko Terjadinya Aterosklerosis

Perkembangan aterosklerosis dipengaruhi oleh beberapa faktor konstitusi dan faktor-faktor yang menjadi kebiasaan hidup. Faktor-faktor tersebut dikenal dengan faktor risiko yang meningkatkan kerentanan terhadap terjadinya aterosklerosis koroner pada individu tertentu. Ada empat faktor risiko biologis yang tak dapat diubah, yaitu (25):

1. Usia

Kerentanan terhadap aterosklerosis koroner meningkat dengan bertambahnya usia. Penyakit yang serius jarang terjadi sebelum usia 40 tahun. Tetapi hubungan antara usia dan timbulnya penyakit mungkin hanya mencerminkan lama paparan yang lebih panjang terhadap faktor-faktor atero-genik.

2. Jenis kelamin

Wanita agaknya relatif kebal terhadap penyakit ini sampai setelah menopause, dan kemudian menjadi sama rentannya seperti pria. Efek

perlindungan estrogen dianggap sebagai penjelasan adanya imunitas wanita pada usia sebelum menopause.

3. Ras

Orang Amerika-Afrika lebih rentan terhadap aterosklerosis daripada orang kulit putih.

4. Riwayat keluarga

Riwayat keluarga yang positif terhadap penyakit jantung koroner (yaitu, saudara atau orang tua yang menderita penyakit ini sebelum usia 50 tahun) meningkatkan kemungkinan timbulnya aterosklerosis prematur.

Faktor-faktor risiko lainnya yang masih dapat diubah, faktor-faktor mayor yaitu peningkatan kadar lipid serum, hipertensi, merokok, gangguan toleransi glukosa, dan diet tinggi lemak jenuh, kolesterol dan kalori. Faktor-faktor minor seperti gaya hidup yang kurang bergerak, stres psikologi dan tipe kepribadian (25).

Diet tinggi lemak, khususnya yang mengandung kolesterol dan lemak jenuh, umumnya meningkatkan kemungkinan seseorang menderita aterosklerosis. Oleh karena itu, penurunan lemak dapat sangat membantu melindungi terhadap aterosklerosis, dan beberapa percobaan menunjukkan bahwa hal ini dapat bermanfaat walaupun penderita telah mendapatkan serangan jantung koroner (17).

Pada masa anak diabetes dan hipertensi dapat dikendalikan, sedangkan obesitas dapat dicegah. Umumnya aktifitas fisik sampai umur 20 tahun masih baik. Terdapat juga faktor-faktor yang dapat menyebabkan aterosklerosis tetapi pada masa anak belum berperan aktif

misalnya : faktor genetik dinding arteri; perubahan dinding pembuluh darah dengan bertambahnya umur; efek testosteron; hipotiroidisme; penyakit hati obstruktif; obat-obat tertentu; stres psikis; pekerjaan (26).

II.6 Mekanisme Penurunan Kolesterol

Salah satu penyebab utama risiko penyakit jantung koroner adalah hiperkolesterolemia, yaitu tingginya kadar kolesterol dalam darah. Kolesterol dan garam empedu sangat berkaitan erat. Garam empedu merupakan produk akhir dari metabolisme kolesterol larut air dibuang, sehingga digunakan kolesterol yang ada untuk membentuk garam empedu lagi, sehingga kandungan kolesterol berkurang. Garam empedu terkonjugasi bisa ditransformasi oleh aktivitas enzimatik beberapa bakteri usus selama sirkulasi enterohepatik (10).

Berbagai mekanisme terjadinya penurunan kolesterol oleh bakteri asam laktat telah banyak dibuktikan dalam riset. Enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH) bertanggung jawab terhadap dekonjugasi asam empedu, di mana glisin atau taurin dipisahkan dari steroid, sehingga menghasilkan garam empedu bebas atau terdekonjugasi. *Bile Salt Hydrolase* (BSH) dimiliki oleh beberapa strain bakteri saluran pencernaan seperti *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* dan *Bacteroides* (10).

Riset *in vitro* menunjukkan bahwa bakteri asam laktat asal dadih memperlihatkan potensi pengikatan kolesterol (Hosono and Tono-oka, 1995; Surono, 2002; Usman, 2003). Hipotesa para peneliti bahwa dekonjugasi garam empedu membantu menurunkan kadar kolesterol karena garam empedu tidak terikat (dekonjugasi) akan lebih mudah

terbuang dari saluran pencernaan dibanding garam empedu yang terkonjugasi. Penelitian yang lain juga membuktikan bahwa garam empedu yang terdekonjugasi tidak diserap oleh usus. Garam empedu terbuang melalui feses dan mengakibatkan semakin banyak kolesterol yang dibutuhkan untuk mensintesis garam empedu lagi sehingga menurunkan kadar kolesterol (10).

Mekanisme penurunan kolesterol yang lain dari bakteri asam laktat adalah bakteri asam laktat dapat mendegradasi kolesterol menjadi "coprostanol", yaitu sebuah sterol yang tidak dapat diserap oleh usus. Selanjutnya "coprostanol" dan sisa kolesterol dikeluarkan bersama-sama tinja hewan atau manusia. Dengan demikian jumlah kolesterol yang diserap tubuh menjadi rendah. Sebuah laporan menunjukkan bahwa penurunan kolesterol oleh strain bakteri *Lactobacillus* secara anaerobik dapat mencapai sekitar 27-38 persen (5).

Beberapa jenis bakteri asam laktat bahkan dinding selnya mampu mengikat kolesterol dalam usus halus sebelum kolesterol diserap oleh tubuh. Dari penelitian yang dilakukan Usman dan Hosono menunjukkan bahwa terjadi pengikatan kolesterol oleh peptidoglikan yang terdapat dalam dinding sel bakteri, dimana 28-34% kolesterol terikat pada peptidoglikan yang diisolasi dari dinding sel *Lactobacillus gasseri* (27).

II.7 Analisis Kolesterol

Kolesterol dan sterol-sterol yang lain dalam jaringan terdapat sebagai campuran alkohol bebas dan ester asam lemak rantai panjangnya. Prosedur penentuan kandungan kolesterol dalam suatu

sampel meliputi pengukuran kedua fraksi tersebut secara terpisah atau kolesterol total. Umumnya dilakukan ekstraksi dengan pelarut organik seperti petroleum eter, heksan, kloroform, atau isopropil alkohol, dapat pula dilakukan pengendapan kolesterol bebas dengan penambahan volume yang sama digitonin (1 g/l dalam etanol 96%), endapan dapat dicuci dengan aseton sebelum kolesterol dipecah dari kompleks dengan penambahan asam asetat glasial, asam asetat anhidrat atau piridin (29).

Meskipun metode kuantitatif penentuan kolesterol akan mengukur kolesterol total dan dapat dilakukan secara langsung terhadap ekstraksi pelarut organik, diperlukan tahap hidrolisis ester baik dengan cara merefluks dengan 1,0 mol/l KOH dalam etanol 96% atau dengan pemutusan enzimatik menggunakan kolesterol ester hidrolisa, tetapi tidak semua tahap tersebut dilakukan dalam semua prosedur. Penentuan kolesterol total dan kolesterol bebas dengan reagen besi (III) klorida dilakukan dengan mereaksikan kolesterol dalam alikuot pelarut ekstraksi. Reagen O-ftalatdehid untuk pemeriksaan kolesterol dapat pula digunakan untuk sampel-sampel biologi dan mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan pemakaian besi (III) klorida yaitu lebih mudah dibuat, pembentukan warnanya cepat dan sempurna, serta warna tersebut lebih stabil dan tidak sensitif terhadap cahaya. Keuntungan lainnya adalah reagen tersebut relatif spesifik untuk kolesterol, tidak terdapat absorban pada 550 nm dengan adanya kolesterol dan sterol non kolesterol (28).

Pengukuran kolesterol dapat pula dilakukan dengan reaksi enzimatik. Prinsip penentuannya adalah hidrolisa terhadap kolesterol

dalam bentuk ester dengan bantuan enzim kolesterolesterase membentuk kolesterol bebas dan asam lemak bebas. Selanjutnya oksidasi kolesterol bebas yang dikatalisis oleh enzim kolesterol oksidase membentuk 4-kolestan-3-on dan hidrogen peroksida, dan dengan adanya indikator akan membentuk senyawa berwarna yang dapat ditentukan secara fotometri (29).

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan

III.1.1 Alat-alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah alat sentrifuge (Digystem Laboratory Instrument), cawan petri, fresh drier, gelas piala, gelas ukur, inkubator, kompor gas, labu erlenmeyer, lampu spritus, LAF (Laminar Air Flow), lemari pendingin, mikropipet (Socoret), ose bulat, otoklaf, oven, penangas air, pipet volume 1ml, 2ml, 3 ml, 5 ml, spektrofotometer UV-VIS, tabung reaksi biasa, tabung reaksi bertutup, tabung sentrifuge, timbangan analitik, timbangan kasar dan vibrator.

III.1.2 Bahan-bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan adalah air suling steril, asam asetat glasial p.a, biakan isolat bakteri asam laktat kolostrum kambing, medium MRS broth, etanol p.a, glukosa (Pronadisa), heksan p.a, kalium hidroksida, kertas pH universal, kolesterol, o-ftalaldehid, dan pepton.

III.2 Penyiapan Sampel Penelitian

III.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel biakan murni bakteri asam laktat isolat kolostrum kambing diperoleh dari koleksi laboratorium Mikrobiologi Farmasi UnHas

III.2.2 Peremajaan Mikroba

Ditimbang 23,4 gram medium MRS broth dan kemudian dilarutkan dalam 450 ml aquadest. Selanjutnya medium tersebut disterilkan terlebih

dahulu di dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit kemudian didinginkan. Diambil kultur awal bakteri yang telah disuspensikan dan dimasukkan 50 ml suspensi bakteri ke dalam 450 ml MRS broth yang telah disterilkan (10%), diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam.

III.2.4 Penyiapan Sel Terliofilisasi (7)

Setelah masa inkubasi, sel dipanen dengan cara sentrifuge pada 5000 rpm selama 30 menit. Dipisahkan bagian endapan (sel bakteri) dengan supernatannya (mediumnya). Sel bakteri kemudian dicuci dengan air suling steril 2 kali, selanjutnya dibekukeringkan dengan alat liofilisasi.

III.3 Pengujian Pengikatan Kolesterol secara in Vitro

III.3.1 Pembuatan Kurva Standar (7)

Dibuat larutan stok standar dengan cara memipet 0,1 ml larutan kolesterol yang dibuat dengan cara memasukkan 0,0015 g kolesterol dalam 10 ml etanol 96%. Larutan yang dipipet tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup, kemudian ditambahkan campuran 0,3 ml KOH 33 % dan 3 ml etanol 96 % sempurna. Tabung ditutup, disimpan dalam tangas air suhu 60°C selama 15 menit.

Setelah didinginkan ditambahkan 5 ml heksan p.a ke dalam tabung dan dikocok dengan vibrator. Setelah penambahan 3 ml air suling tabung ditutup dan dikocok kembali dengan vibrator selama 2 menit sampai tercampur sempurna. Setelah itu, didiamkan beberapa saat hingga terbentuk 2 fase yaitu lapisan heksan dan lapisan air. Lapisan heksan yang diperoleh digunakan sebagai larutan standar. Dipipet masing-masing 25, 50, 75, 100, 125 μl lapisan heksan dan dimasukkan ke dalam tabung

uji, pelarut diuapkan. Setelah menguap ditambahkan 2 ml pereaksi o-ftalaldehid (larutan 0,05 % o-ftalaldehid dalam asam asetat glasial), larutan dikocok dengan vibrator tabung, setelah 10 menit penambahan H_2SO_4 pekat. Absorbansi dibaca pada 560 nm 90 menit setelah penambahan H_2SO_4 pekat. Dibuat kurva standar, absis adalah μg kolesterol dan ordinat adalah nilai absorbansi.

III.3.2 Penentuan Kondisi Penurunan Kolesterol (7)

Sel bakteri yang telah diliofilisasi ditambahkan ke dalam 1 ml larutan kolesterol-etanol (dibuat dengan malarutkan 100 μg kolesterol dalam 1 ml etanol 60%). Campuran tersebut dikocok dan diinkubasikan pada suhu $37^{\circ}C$ selama 1 jam. Massa sel yang digunakan untuk pengujian divariasikan yaitu 10, 30, dan 50 mg sel. Pengukuran kolesterol yang tidak terikat sama dengan metode yang telah diuraikan.

III.3.3 Pengukuran Sampel (7)

Sel terliofilisasi yang telah ditimbang dengan beberapa variasi massa sel, disuspensikan dalam 1 ml larutan kolesterol-etanol (dibuat dengan malarutkan 100 μg kolesterol dalam 1 ml etanol 60 %). Campuran tersebut dikocok dan diinkubasikan pada suhu $37^{\circ}C$ selama 1 jam. Setelah masa inkubasi, campuran tersebut disentrifuge pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Kolesterol yang tidak terikat oleh bakteri dalam supernatan ditentukan berdasarkan metode Rudell dan Morris, yaitu : Dicampur 0,1 ml supernatan dengan 0.3 ml KOH 33 % dan 3 ml etanol 95% dalam tabung tertutup dan dicampur sempurna. Tabung ditutup kemudian disimpan dalam tangas air suhu $60^{\circ}C$ selama 15 menit.

Setelah didinginkan, ditambahkan 5 ml heksan p.a ke dalam tabung dan dikocok. Setelah penambahan 3 ml air suling, tabung ditutup dan dikocok kembali selama 2 menit sampai tercampur sempurna.

1 ml lapisan heksan p.a dipipet kedalam tabung uji, pelarut diuapkan, ditambahkan 2 ml reagen o-ftalaldehid (0,05 % larutan dalam asam asetat glasial), larutan dikocok hingga tercampur sempurna. Sekitar 10 menit setelah penambahan reagen o-ftalaldehid, ditambahkan 1 ml H₂SO₄ pekat dan larutan dikocok dengan vibrator tabung. Absorbansi dibaca pada 560 nm 90 menit setelah penambahan H₂SO₄ P. Digunakan kurva standar untuk menentukan kolesterol yang tidak terikat. Analisis pengikatan kolesterol dilakukan dengan 3 replikasi. Kadar rata-rata kolesterol yang terikat kemudian dipersentasikan. Larutan kontrol diuji dengan prosedur yang sama tetapi tanpa sel terliofilisasi.

III.3.4 Penentuan Persentase Pengikatan Kolesterol

Dapat ditentukan dengan rumus :

$$A = \frac{C - B}{C} \times 100 \%$$

Keterangan :

A = % Pengikatan Kolesterol

B = Jumlah Kolesterol dalam supernatan setelah perlakuan

C = Jumlah kolesterol awal (dalam supernatan pada kontrol)

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Pada penelitian ini kemampuan pengikatan kolesterol didasarkan pada pengukuran kadar kolesterol dalam larutan setelah penambahan bakteri asam laktat tersebut.

Dari hasil pengukuran pengikatan kolesterol setelah penambahan bakteri asam laktat isolat kolostrum kambing dalam bentuk sel yang telah teriofilisasi, dimana dilakukan variasi massa sel yang direaksikan dengan larutan kolesterol, diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 3. Kemampuan pengikatan kolesterol bakteri asam laktat isolat kolostrum kambing

Massa sel bakteri teriofilisasi (mg)	Jumlah kolesterol yang terikat (μg)	% pengikatan
10	5,505	13,905
30	11,396	27,526
50	18,786	45,591

IV.2 Pembahasan

Salah satu penyebab yang paling utama terjadinya aterosklerosis yaitu peningkatan kolesterol serum dalam darah. Oleh karena itu dilakukanlah usaha-usaha untuk menurunkan kadar kolesterol, dimana salah satu metode yang dapat digunakan untuk menurunkan kolesterol yaitu dengan mengkonsumsi makanan atau minuman yang mengandung bakteri asam laktat probiotik.

Pada penelitian ini kemampuan pengikatan kolesterol didasarkan pada pengukuran kadar kolesterol dalam larutan setelah penambahan bakteri asam laktat isolat kolostrum kambing .

Penentuan pengikatan kolesterol oleh bakteri asam laktat isolat kolostrum kambing ini dilakukan dengan menggunakan tiga variasi massa sel, yaitu 10 mg, 30 mg, dan 50 mg.

Sebelum dilakukan pengujian terhadap bakteri asam laktat, terlebih dahulu bakteri diliofilisasi. Tujuan dilakukan liofilisasi yaitu untuk memperoleh sel yang kering, dimana kondisi yang kering memudahkannya untuk digunakan dalam berbagai kondisi. Pertimbangan lain dilakukan liofilisasi karena bakteri asam laktat tersebut ingin diuji pengikatan kolesterol dengan menambahkan bakteri asam laktat pada larutan kolesterol. Jika sel bakteri masih bercampur dengan air, maka kurang bisa homogen (tercampur sempurna) dengan larutan kolesterol.

Dalam prosedur pengikatan kolesterol, pengukuran sampel dilakukan sedikit berbeda dari pembuatan kurva standar yaitu pelarut yang digunakan untuk melarutkan kolesterol, dimana pada penentuan kurva

standar digunakan alkohol 96%, sedangkan untuk sampel digunakan alkohol 60%. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kematian bakteri pada sampel sehingga konsentrasi alkohol yang digunakan agak rendah.

Dari hasil pengukuran nilai kurva standar kolesterol, maka diperoleh kurva standar analisis kolesterol (gambar 2). Selanjutnya dari hasil pengukuran penentuan persentase kolesterol, diperoleh kurva hubungan antara massa sel dengan persentase pengikatan kolesterol, yang dapat ditunjukkan pada gambar 3.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa bakteri asam laktat isolat kolostrum kambing mempunyai kemampuan untuk mengikat kolesterol. Dari kurva tersebut dapat dilihat bahwa semakin meningkatnya massa sel dari bakteri asam laktat, maka semakin tinggi persentase pengikatan kolesterolnya. Massa sel berpengaruh terhadap penurunan kolesterol, dimana peningkatan jumlah kolesterol yang dapat diikat sesuai dengan peningkatan massa sel yang ditambahkan dan dapat mencapai 45,591% jika digunakan bakteri 50 mg.

Mekanisme penurunan kolesterol yaitu bakteri asam laktat memiliki enzim *Bile Salt Hidrolase* yang dapat mendekongugasi garam empedu, sehingga garam empedu terbuang melalui feses dan mengakibatkan semakin banyak kolesterol yang dibutuhkan untuk mensintesis garam empedu lagi yang pada akhirnya dapat menurunkan kadar kolesterol (10). Beberapa jenis bakteri asam laktat dapat mengikat kolesterol dalam usus halus sebelum kolesterol diserap ke dalam tubuh yaitu melalui

peptidoglikan yang terdapat pada dinding sel bakteri (10,27). Berdasarkan hal tersebut maka jumlah kolesterol yang terdapat dalam larutan sampel uji menjadi lebih rendah daripada kontrol (larutan kolesterol tanpa sampel). Sisa kolesterol yang terdapat pada larutan akhir (hasil penguapan larutan heksan sampel dalam larutan o-ftalaldehid dan asam sulfat pekat), kemudian terukur pada spektrofotometer UV-Vis dengan bantuan pereaksi o-ftalaldehid dan asam sulfat.

Berdasarkan analisis statistik dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan analisis sidik ragam menunjukkan bahwa pengikatan kolesterol pada variasi jumlah sel memberikan pengaruh berbeda sangat nyata, yaitu pada taraf 1%, dimana F hitung (14,355) lebih besar daripada F tabel (pada taraf 5% = 5,14 dan taraf 1% = 10,92).

Analisis lanjutan secara statistik menggunakan uji Duncan (KK = 25,177%), menunjukkan berbeda sangat nyata antara jumlah sel 50 mg dengan 10 mg, dan jumlah sel 50 mg dan 30 mg. Sedangkan jumlah sel 10 mg dengan 30 mg menunjukkan tidak berbeda nyata atau non signifikan. Dengan demikian dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa jumlah sel yang optimal terhadap pengikatan kolesterol yaitu 50 mg sebesar 45,591%.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik, maka dapat disimpulkan:

1. Massa sel bakteri asam laktat isolat kolostrum kambing berpengaruh sangat nyata terhadap pengikatan kolesterol secara in vitro.
2. Massa sel yang memperlihatkan persentase pengikatan kolesterol yang optimal adalah 50 mg sebesar 45,591%.

V.2 Saran

Disarankan dilakukan pengujian efek pengikatan kolesterol oleh isolat bakteri asam laktat dari kolostrum kambing secara in vivo untuk melihat secara langsung penurunan kolesterol dalam darah.

DAFTAR PUSTAKA

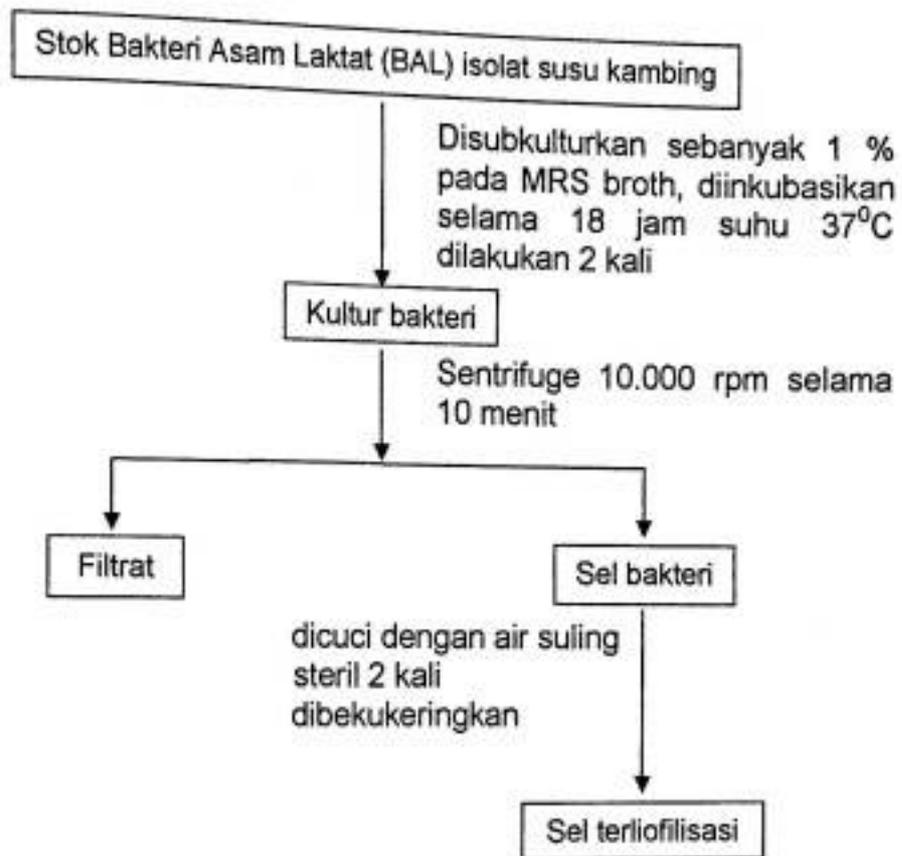
1. Gilland, S.E., Nelson, C.R., and Maxwell, C. 1984. *Assimilation of Cholesterol of Lactobacillus acidophilus*. APP 1. Environ Mikrobial. 33
2. Tjay, T. H., K. Rahardja. 2002. *Obat-obat Penting Khasiat, Penggunaan, dan Efek-efek Sampingnya*, Edisi V. PT Gramedia. Jakarta. 536, 539
3. Tannock G (editor). (2005). *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects*, 1st ed., Caister Academic Press. Available as compiled HTML file.
4. Rahayu, E. S. 2004. Probiotik dari Tapai Ketan. <http://www.republika.co.id>, diakses 25 Januari 2008
5. Legowo, A. M. 2006. Yoghurt Untuk Kesehatan. FP Universitas Diponegoro. <http://www.anandamarga.or.id>, diakses 25 Januari 2008
6. Darnys, R (Ed.). 1991. *Makanan: Wujud, Variasi, dan Fungsinya serta Cara Penyajiannya di Daerah Sumatra Barat*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Dirjen Kebudayaan Direktorat Sejarah dan Nilai Tradisional. Jakarta. 154-157
7. Mufida. 2000. *Pengikatan Kolesterol oleh Beberapa Strain Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Dadih*. Tesis Program Pascasarjana. Universitas Hasanuddin. Makassar. 3, 8-9, 32-37, 50
8. Rusfidra, A. 2005. Dadih Mampu Menurunkan Kolesterol. <http://www.bung-hatta.info/content.php?article.115>. diakses 25 Januari 2008
9. Jenie, B.S.R., Kusumawati, N., Setyahadi, S., dan Dewanti, R., 2003, Seleksi Bakteri Asam Laktat Indigenus Sebagai Galur Probiotik Dengan Kemampuan Menurunkan Kolesterol, *Jurnal Mikrobiologi Indonesia, media komunikasi Mikrobiologi & Bioteknologi Vol 8*. available as compiled HTML file.
10. Surono, I.S., 2004, *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*, PT.Tri Cipta Karya; Jakarta. 4, 12, 15, 24-27, 135, 137, 138, 204
11. Roberfroid, M.B. 2000. Prebiotics and Probiotics: Are they Functional Foods?. *American Journal of Clinical Nutrition Vol 71*. available as compiled HTML file.

12. Prangdimurti, E. 2001. *Probiotik dan Efek Perlindungan terhadap Kanker Kolon*. Makalah Falsafah SAINS (PPs 702) Program Pasca Sarjana / S₃. IPB. Bogor. 3
13. Isolauri, E., Sutas, Y., Arvilommi, H., and Salminen, S. 2001. Probiotics: Effects on Immunity. *American Journal of Clinical Nutrition* Vol 73. available as compiled HTML file.
14. Pato, Usman. 2003. Potensi Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Dadih untuk Menurunkan Risiko Penyakit Kanker. *Jurnal Natur Indonesia*. 5 (2). 162-166
15. Departemen Kesehatan RI. 1979. *Farmakope Indonesia*, edisi III, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta. 697
16. Poedjiadi, A., dan Supriyanti, F.M.T. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. Edisi revisi. UI-Press. Jakarta. 74,388,389
17. Guyton, A.C. 1987. *Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit*. Terjemahan dari *Human physiology and mechanism of disease* oleh Andrianto, P. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 628-630
18. Huda, M.S. 2006. Seluk Beluk Kolesterol. <http://www.kafka.web.id>. Diakses 13 April 2008
19. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. 1999. *Biokimia Harper*, Edisi 24. Terjemahan dari *Harper's Biochemistry*, oleh Hartono, A. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 277, 284.
20. Noer, H.M.S., S. Waspadji, A.M. Rachman, LA Lesmana, H. Isbagio, I. Alwi, U.B Husodo (Eds). 1996. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi III. Jilid I. Balai Penerbit FKUI. Jakarta. 714, 718
21. Ganiswarna, S.G., R. Setiabudy, F.D. Suyatna, Purwastyastuti, Nafrialdi (Eds.). 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.364-366
22. Kamaluddin, M.T. 1993. Farmakologi Obat Anti Hiperlipidemia. *Cermin Dunia Kedokteran*. No.85. 26-32
23. Robbins, S.L., Kumar, V.1995. *Buku Ajar Patologi II*. Edisi 4. Terjemahan dari *Basic Pathology Part II*, oleh Staf Pengajar Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2

24. Schumm, E. D. 1992. *Intisari Biokimia*. Terjemahan dari *Essentials of Biochemistry*, oleh Sadikin, M. Penerbit Bina Aksara. Jakarta. 279
25. Price, S.A., Lorraine, M.W. 1994. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-proses Penyakit*. Edisi 4. Jilid I. Terjemahan dari *Pathophysiology. Clinical Concepts of Disease processes*, oleh Anugerah, P. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 530-531
26. Salim, E. J. M.Ch.P. 1992. Perkembangan Penyakit Jantung Koroner pada Anak. *Cermin Dunia Kedokteran*. No.78. 43-46
27. Usman dan Hosono, A. 2003. *Binding of Cholesterol to the cells and peptidoglycan of Lactobacillus gasseri*. Faculty of Agriculture, Shinshu University. Japan. 8
28. Rudel, L.L and Morris, M.D. 1973. Determination of Cholesterol Using o-phthalaldehyd. *Journal of Lipid Research*. Vol 14. 364-366
29. Baginski, E.S. and Zak, B. 1970. Blood Lipids. In *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*. Vol.I. Edited by Frankel, S., Reitman, S., and Sonnenwirth, A.C. The C.V. Mosby Company. St. Louis. 234-244

LAMPIRAN I

Skema Kerja Penyiapan Sel Terliofilisasi



LAMPIRAN II

Skema Kerja Uji Pengikatan Kolesterol



LAMPIRAN III

Persamaan regresi dari kurva standar berdasarkan konsentrasi kolesterol dan nilai serapan

Tabel 4. Hasil Perhitungan Kurva Standar Analisis Kolesterol dengan Menggunakan Persamaan Kurva Baku

Konsentrasi (bpj)	Serapan (A)
8	0,588
17	0,636
25	0,659
33	0,696
41	0,711

Persamaan regresi:

$$Y = a + bx$$

Keterangan:

Y = Serapan (absorban)

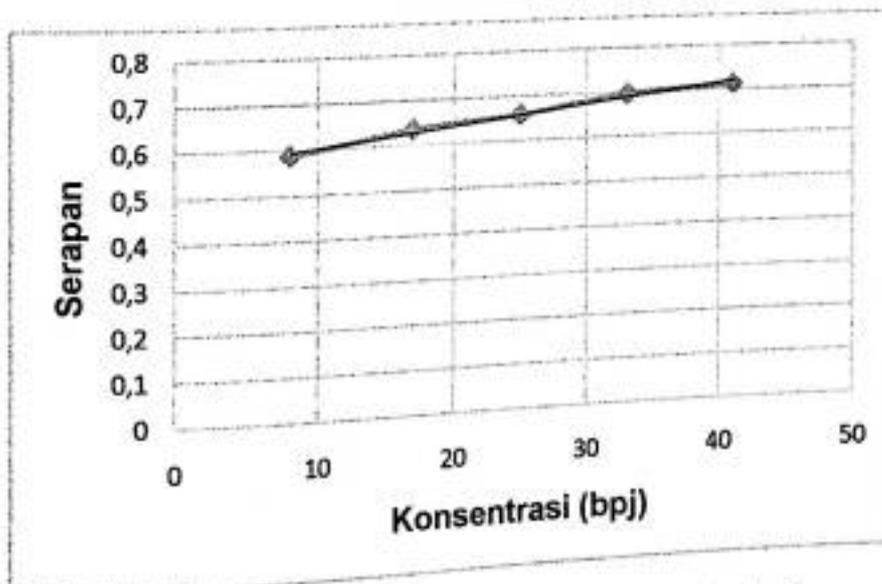
a = Perpotongan garis dengan sumbu Y r^2 = Koefisien determinasi

b = Kemiringan garis r = Koefisien korelasi

Persamaan yang diperoleh:

$$Y = a + bx \quad r = 0,989$$

$$Y = 0,5658 + 0,01227x \quad r^2 = 0,978$$



Gambar 2. Kurva standar analisis kolesterol

LAMPIRAN IV

Perhitungan persentase pengikatan kolesterol oleh bakteri asam laktat kolostrum kambing

Tabel 5. Hasil Perhitungan Persentase pengikatan kolesterol

Massa sel (mg)	Absorban (A)		X_A (B)	X_K (C)	C - B ($\mu\text{g/ml}$)	A (%)	Rata-rata (%)
	Sampel (A)	Kontrol (K)					
10	0,9272	1,0270	29,455	37,588	8,133	21,637	13,905
	0,9922	1,0582	34,755	40,130	5,375	13,393	
	1,0811	1,1180	41,996	45,004	3,008	6,684	
30	0,8993	1,0270	27,180	37,588	10,408	27,689	27,526
	0,9650	1,0582	32,755	40,130	7,596	18,928	
	0,9195	1,1180	28,824	45,004	16,184	35,961	
50	0,8368	1,0270	22,084	37,588	15,504	41,247	45,591
	0,8423	1,0582	22,537	40,130	17,593	43,840	
	0,8326	1,1180	21,743	45,004	23,261	51,686	

$$A = \frac{C - B}{C} \times 100\%$$

Keterangan:

A = % pengikatan kolesterol

B = Jumlah kolesterol dalam supernatan setelah perlakuan

C = Jumlah Kolesterol (pada kontrol)

Contoh perhitungan % pengikatan kolesterol

$$Y = a + bx$$

$$0,9272 = 0,5658 + 0,01227x$$

$$0,01227x = 0,3614$$

$$X = 29,455$$

$$A = \frac{37,588 - 29,455}{37,588} \times 100\%$$

$$= 21,637 \%$$

LAMPIRAN V

Analisis statistik data Efek Pengikatan Kolesterol oleh Isolat Bakteri Asam Laktat Kolostrum Kambing berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan Analisis Sidik Ragam (ASR)

Tabel 6. Perhitungan statistik jumlah kolesterol ($\mu\text{g/ml}$) yang terikat oleh isolat bakteri asam laktat kolostrum kambing pada berbagai variasi massa sel.

Massa Sel (mg)	Replikasi			Total	Rata-rata
	I	II	III		
10	21,637	13,393	6,684	41,714	13,905
30	27,689	18,928	35,961	82,576	27,526
50	41,247	43,840	51,686	136,773	45,591
Jumlah	90,573	76,161	94,331	260,736	87,022
Rata-rata	30,191	25,387	31,444	86,912	29,007

Analisis Sidik Ragam

A. Sumber Keragaman (SK) adalah:

1. Perlakuan (P)
2. Kesalahan atau Galat (G)
3. Total Percobaan (T)

B. Perhitungan Derajat Bebas

1. DB Perlakuan = Jumlah replikasi perlakuan - 1 = 3 - 1 = 2
2. DB Total = jumlah keseluruhan replikasi perlakuan - 1 = 9 - 1 = 8
3. DB Galat = DB Total - DB Perlakuan = 8 - 2 = 6

C. Perhitungan Jumlah Kuadrat

$$FK = \frac{T_j^2}{r.t} = \frac{260,736^2}{3.3} = 7553,696$$

1. JK Perlakuan

$$JKP = \frac{41,714^2 + 82,578^2 + 136,773^2}{3} - 7553,696 = 1531,336$$

2. JK Total

$$\begin{aligned} JKT &= T (Y_{ij}^2) - FK \\ &= (21,637^2 + 13,393^2 + 6,684^2 + \dots + 51,686^2) - 7553,696 \\ &= 9405,055 - 7553,696 \\ &= 1851,359 \end{aligned}$$

3. JK Galat

$$\begin{aligned} JKG &= JKT - JKP \\ &= 1851,359 - 1531,336 \\ &= 320,023 \end{aligned}$$

D. Perhitungan Kuadrat Rata-rata

$$\begin{aligned} 1. \text{ KR Perlakuan} &= \frac{JKP}{DbP} = \frac{1531,336}{2} = 765,668 \\ 2. \text{ KR Galat} &= \frac{JKG}{DbG} = \frac{320,023}{6} = 53,337 \end{aligned}$$

E. Perhitungan Koefisien Keragaman

$$KK = \frac{\sqrt{\text{KR Galat}}}{\text{Jumlah rata-rata}} \times 100\% = \frac{\sqrt{53,337}}{29,007} = 25,177\%$$

F. Perhitungan F Hitung

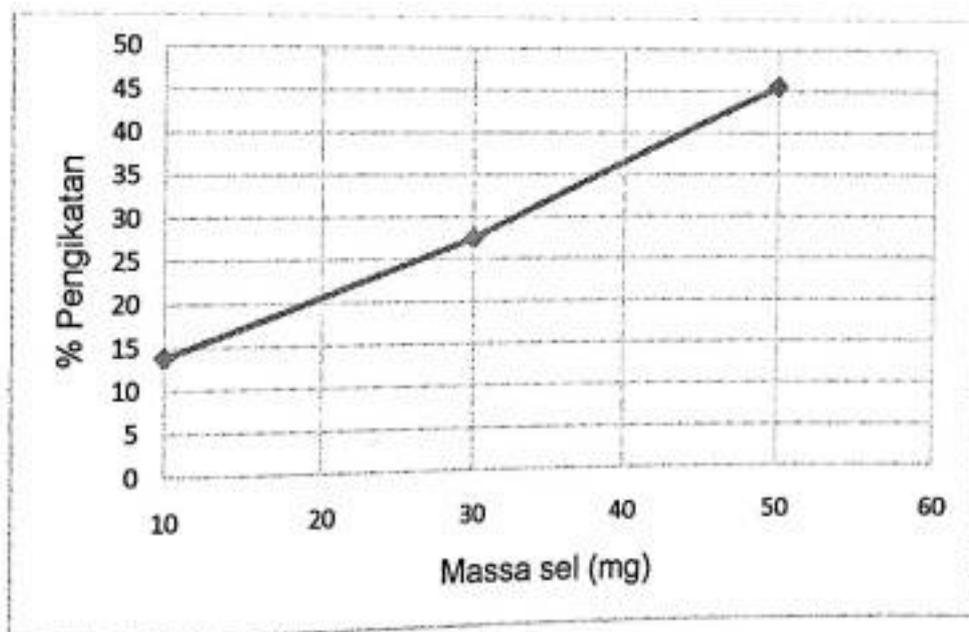
$$F \text{ Hitung} = \frac{\text{KR Perlakuan}}{\text{KR Galat}} = \frac{765,668}{53,337} = 14,355$$

Tabel Anava

SK	DB	JK	KR	F hitung	F tabel
Perlakuan	2	1531,336	765,668	14,355**	5% = 5,14
Galat	6	320,023	53,337		1% = 10,92
Total	8	1851,359			

Keterangan:

1. (**) berarti sangat signifikan atau sangat berbeda nyata karena $F_{hitung} > F_{tabel}$ yaitu ada pengaruh massa sel bakteri asam laktat isolat kolostrum kambing terhadap pengikatan kolesterol.
2. Karena hasil $KK > 10\%$ maka uji lanjutan yang sesuai adalah uji Duncan (Syarat uji Duncan adalah $> 10\%$ untuk homogen)



Gambar 3. Kurva Hubungan antara massa sel bakteri asam laktat isolat kolostrum kambing dengan kemampuan pengikatan kolesterol

Analisis Lanjutan dengan Uji Duncan

$$R_p = r_p \cdot S_d$$

Keterangan: p = perlakuan (p = 3)

Sd = Standar deviasi = Simpangan Baku

$$S_d = \sqrt{\frac{KTG}{r}} = \sqrt{\frac{53,337}{3}} = 4,22$$

Nilai rentang student untuk taraf 5%	Nilai r_p	$R_p = r_p \cdot S_d$
2	3,46	14,60
3	4,34	18,31

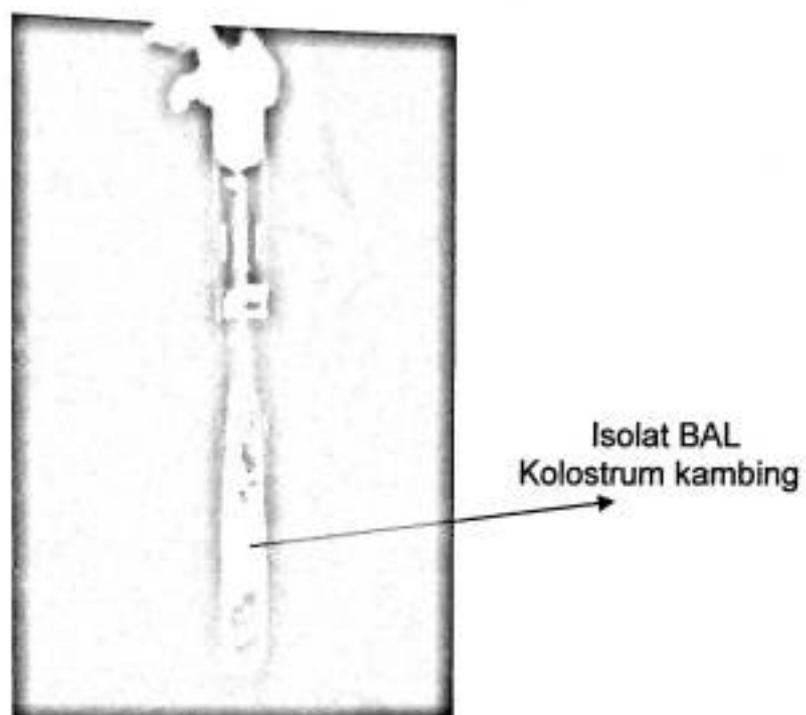
Tabel Selisih

Perlakuan (Massa sel)	Rata-rata	Selisih		
		10 mg	30 mg	50 mg
10 mg	13,905	-	-	-
30 mg	27,526	13,621 (ns)	-	-
50 mg	45,591	31,686**	18,656**	-

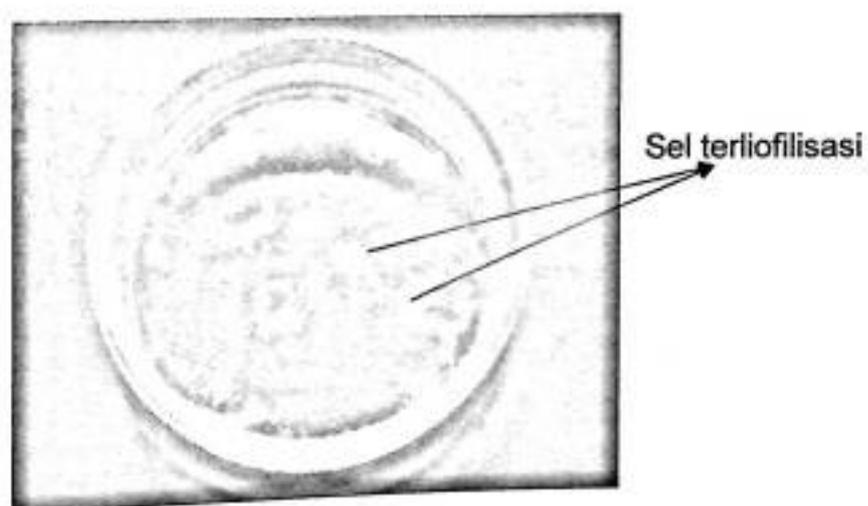
Keterangan: NS = Non signifikan

(**) = Sangat signifikan

LAMPIRAN VI



Gambar 4. Foto kultur bakteri asam laktat isolat kolostrum kambing dengan menggunakan medium MRSA



Gambar 5. Foto isolat bakteri asam laktat dari kolostrum kambing setelah diliofilisasi