

599.011
Yun
p a

**PENGARUH PEMBERIAN SUSU FERMENTASI *LACTOBACILLUS CASEI*
STRAIN SHIROTA TERHADAP PERUBAHAN KADAR FRAKSI LIPID
SERUM TIKUS HIPERKOLESTEROLEMI**

**(Effect of administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota fermented milk
on the alteration of serum lipid fraction of Hypercholesterolemic Rats)**



**Tesis
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**Ari Yuniastuti
G4A001001**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
JANUARI
2004**

Tesis

**PENGARUH PEMBERIAN SUSU FERMENTASI *LACTOBACILLUS CASEI*
STRAIN SHIROTA TERHADAP PERUBAHAN KADAR FRAKSI LIPID
SERUM TIKUS HIPERKOLESTEROLEMI**

**(Effect of administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota fermented milk
on the alteration of serum lipid fraction of Hypercholesterolemic Rats)**

Disusun oleh

**Ari Yuniastuti
G4A001001**

**Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 20 Januari 2004
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima**

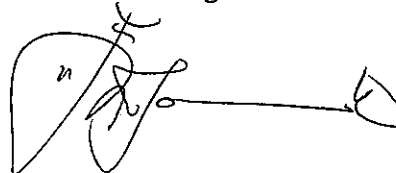
**Menyetujui,
Komisi Pembimbing**

Pembimbing Utama




**dr. Pudjadi, SU
NIP. 130 530 278**

Pembimbing Kedua



**Dr. dr. Endang Purwaningsih, MPH
NIP. 131 124 830**

**Mengetahui,
Ketua Program Magister Ilmu Biomedik
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro**



(Prof. Dr. H. Soebowo, Sp. PA)
NIP. 130 352 549

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan Lembaga Pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Januari 2004

Ari Yuniastuti

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

1. Nama Lengkap : Ari Yuniastuti, S.Pt
2. Jenis kelamin/Agama : Perempuan/Islam
3. Tempat/Tanggal lahir : Semarang, 02 Juni 1968
4. Alamat : Jl. Dewi Sartika Timur V/2 Semarang.
Telp. (024) 8502783

B. Riwayat Pendidikan

1. SD. Karang Kumpul II (sekarang SD Petompon 6) Lulus Tahun 1980
2. SMP Negeri 5 Semarang Lulus Tahun 1983
3. SMA Negeri 1 Semarang Lulus Tahun 1986
4. Fakultas Ekonomi, Universitas Islam Indonesia Tahun 1986-1987
5. Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada Lulus Tahun 1993

C. Riwayat Pekerjaan

1. Asisten dosen pada jurusan Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan, UGM (Tahun 1989-1992).
2. Staf Pengajar pada Lembaga Pendidikan Primagama (Tahun 1993-1996).
3. Staf Pengajar pada Jurusan Biologi Universitas Negeri Semarang (Tahun 1997 s.d sekarang).

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Suami : Ahmad H. Mifta, SH
2. Tempat/Tanggal lahir : Yogyakarta, 26 Juli 1959
3. Nama Anak/Tanggal lahir: Rifqi Fauzan Hakim, 9 November 1995
Ilham Fadhilah Rahman, 22 Februari 1997

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami sampaikan kepada Allah SWT penguasa dan sumber segala ilmu, berkat rahmat dan hidayahNya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis dengan judul **Pengaruh pemberian susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota terhadap perubahan kadar fraksi lipid serum tikus hiperkolesterolemi.**

Pada kesempatan ini pula kami ingin ingin menyampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia melalui program BPPS yang telah memberikan biaya studi bagi kami pada program studi Ilmu Biomedik.
2. Rektor Universitas Negeri Semarang dan Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang telah memberi ijin dan kesempatan untuk melanjutkan studi pada program studi Ilmu Biomedik.
3. Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang yang telah memberi ijin dan kesempatan untuk melanjutkan studi pada program studi Ilmu Biomedik.
4. Direktur Program Pascasarjan dan Pengelola Program Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro yang telah memberi kesempatan untuk menimba ilmu pada program studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro
5. dr. Pudjadi, SU selaku Pembimbing Utama yang senantiasa memberi masukan materi yang berhubungan dengan tesis, demi kelancaran penulisan tesis ini.

6. Dr. dr Endang Purwaningsih, MPH selaku Pembimbing Kedua yang meluangkan waktu membimbing, memberikan saran, masukan dan tata cara penulisan tesis, serta dorongan semangat dalam penyelesaian tesis ini.
7. Prof. Dr. dr. Ag. Soemantri, Sp.A (K), dr. H. M. Sulchan, M.Sc, dan Dr. dr. Hertanto WS, MS selaku Tim penguji tesis yang bersedia meluangkan waktu untuk hadir memberi masukan bagi kesempurnaan tesis ini.
8. Dr. Winarto, DMM, Sp.M, Sp.MK dan dr. Kusmiyati DK, Mkes selaku nara sumber yang telah banyak memberikan saran untuk penyelesaian tesis ini.
9. Seluruh Staf Pengajar Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro yang telah banyak memberikan ilmu yang bermanfaat bagi penulis di saat menempuh pendidikan pada program studi tersebut.
10. Mbak Nata Sulastri dan Mas Abdul yang telah banyak membantu keperluan administrasi bagi penulis.
11. dr Tri Indah Winarni, dr. Endang Sawitri dan drh. R. Susanti, MP, teman-teman S-2 Program Studi Ilmu Biomedik serta teman-teman jurusan Biologi FMIPA Unnes yang telah banyak membantu penulis dalam menimba ilmu.
12. Pak Dukut selaku teknisi Laboratorium Biokimia Universitas Diponegoro dan segenap teknisi Laboratorium Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada serta Pak Yuli dari PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada yang telah banyak membantu kelancaran pelaksanaan penelitian.
13. Suamiku AH. Mifta, SH dan anak-anakku Rifqi serta Ilham yang dapat mengerti dan memahami sehingga penulis dalam menyelesaikan pendidikan pada Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro.

14. Berbagai pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu yang membantu penyelesaian tesis ini.

Semoga kebaikan dan bantuan dari pihak-pihak tersebut di atas akan mendapat imbalan yang berlipat dari Allah SWT. Amin.

Kami menyadari adanya kekurangan dalam melaksanakan penelitian ini, sehingga masukan dan saran yang sifatnya membangun sangat kami harapkan dan kami terima dengan tangan terbuka demi penyempurnaan penelitian sejenis di masa mendatang.

Akhirnya kami berharap agar hasil penelitian ini benar-benar dapat memberikan manfaat.

Ari Yuniastuti

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRACT/INTISARI	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	4
1.3. Keaslian Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.5. Tujuan Penelitian	5
1.5.1. Tujuan umum	5
1.5.2. Tujuan khusus	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Lipid	7
2.2. Kolesterol	7
2.2.1. Kimia dan sintesis kolesterol	7
2.2.2. Transport Kolesterol oleh Lipoprotein darah	12
2.2.3. Pencernaan dan penyerapan lemak (kolesterol) dari makanan	16
2.2.4. Penyakit yang ditimbulkan oleh lemak (kolesterol)	17
2.3. Garam Empedu	18
2.3.1. Pembentukan garam empedu	18
2.3.2. Metabolisme garam empedu	20
2.4. Bakteri Asam Laktat	23
2.4.1. Peran bakteri asam laktat terhadap penurunan serum kolesterol	24

2.4.2. <i>Lactobacillus casei</i> strain Shirota	28
III. KERANGKA TEORI DAN KONSEP	30
3.1. Kerangka Teori	30
3.2. Kerangka Konseptual	31
3.3. Hipotesis	31
IV. MATERI DAN METODE	32
4.1. Subyek dan Sampel Penelitian	32
4.1.1 Subyek	32
4.1.2 Sampel	32
4.1.3 Besar sampel	33
4.2. Variabel Penelitian	33
4.2.1. Klasifikasi Variabel	33
4.2.2. Definisi operasional variabel	34
4.3. Bahan	35
4.3.1 Bahan Utama	35
4.3.2 Bahan untuk penetapan kadar kolesterol	36
4.3.3. Bahan untuk penetapan jumlah bakteri feses	36
4.4. Peralatan Penelitian	36
4.4.1. Alat untuk pengambilan serum	36
4.4.2. Alat untuk penetapan kadar kolesterol	36
4.4.3. Alat untuk penetapan jumlah bakteri feses	36
4.5. Rancangan Penelitian	37
4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian	38
4.7. Prosedur Perlakuan	38
4.8. Prosedur Pengumpulan data	40
4.8.1. Aklimatisasi	40
4.8.2. Kadar fraksi lipid	
4.8.2.1. Kolesterol total	41
4.8.2.2. Kolesterol LDL	41
4.8.2.3. Kolesterol HDL	42
4.8.2.4. Trigliserida	42
4.8.3. Jumlah bakteri coliform dan lactobacilli	42

4.9. Analisis Data	45
4.9.1. Analisis Statistik	45
4.10. Keterbatasan Penelitian	46
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	47
5.1. Hasil	47
5.1.1. Fraksi lipid awal pada tikus percobaan	47
5.1.2. Fraksi lipid setelah pemberian susu fermentasi	48
5.1.2.1. Kadar kolesterol total setelah pemberian susu fermentasi	49
5.1.2.2. Kadar Trigliserida setelah pemberian susu fermentasi	51
5.1.2.3. Kadar kolesterol HDL setelah pemberian susu fermentasi	53
5.1.2.4. Kadar kolesterol LDL setelah pemberian susu fermentasi	56
5.1.3. Angka E. coli dan lactobacilli pada feses tikus	58
5.2. Pembahasan	60
5.2.1. Fraksi lipid awal	60
5.2.2. Angka bakteri E. coli dan lactobacilli	61
5.2.3. Fraksi lipid setelah pemberian susu fermentasi	63
5.2.3.1. Kadar kolesterol total	63
5.2.3.2. Kadar trigliserida	65
5.2.3.3. Kadar kolesterol HDL	66
5.2.3.4. Kadar kolesterol LDL	68
5.2.4. Angka E. coli dan lactobacilli setelah pemberian susu	68
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	70
6.1. Kesimpulan	70
6.2. Saran	71
VII. RINGKASAN	72
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN	82

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1. Fraksi lipid darah tikus sebelum dan setelah pemberian Pakan tinggi lemak tinggi kolesterol	47
Tabel 5.2. Fraksi lipid darah tikus sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi	49
Tabel 5.3. Perbedaan kadar kolesterol total antara masing-masing kelompok perlakuan	51
Tabel 5.4. Rerata kadar kolesterol total sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan	51
Tabel 5.5. Perbedaan kadar trigliserida antara masing-masing kelompok perlakuan	53
Tabel 5.6. Rerata kadar trigliserida sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan	53
Tabel 5.7. Perbedaan kadar kolesterol HDL antara masing-masing kelompok perlakuan	55
Tabel 5.8. Rerata kadar kolesterol HDL sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan	55
Tabel 5.9. Perbedaan kadar kolesterol LDL antara masing-masing kelompok perlakuan	57
Tabel 5.10. Rerata kadar kolesterol LDL sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan	58
Tabel 5.11. Angka coli dan lactobacilli pada awal percobaan, sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi	58

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Struktur kimia kolesterol	8
Gambar 2.2. Ringkasan pembentukan kolesterol	10
Gambar 2.3. Pembentukan kolesterol secara keseluruhan	11
Gambar 2.4. Metabolisme sisa kilomikron	13
Gambar 2.5. Metabolisme Very Low Density Lipoprotein	14
Gambar 2.6. Struktur suatu triasilgliserol	16
Gambar 2.7. Biosintesis dan penguraian asam empedu	21
Gambar 2.8. Gambaran ringkas metabolisme garam empedu	22
Gambar 4.1. Diagram alur penelitian	44
Gambar 5.1. Grafik kadar kolesterol total sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi	50
Gambar 5.2. Grafik kadar trigliserida sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi	52
Gambar 5.3. Grafik kadar kolesterol HDL sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi	54
Gambar 5.4. Grafik kadar kolesterol LDL sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi	56
Gambar 5.5. Grafik angka coli dan lactobacilli sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi	59

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Dokumentasi penelitian	82
Lampiran 2. Peranan Bakteri Asam Laktat dalam menurunkan Kolesterol	84
Lampiran 3. Aktivitas Asimilasi kolesterol oleh beberapa bakteri Asam laktat	86
Lampiran 4. Aktivitas dekonjugasi garam empedu oleh beberapa strain Bakteri asam laktat	88
Lampiran 5. Komposisi ransum pakan standar dan pakan tinggi lemak	90
Lampiran 6. Prosedur pemeriksaan fraksi lipid serum	91
Lampiran 7. Analisis Fraksi lipid	93
Lampiran 8. Analisis statistik fraksi lipid	96
Lampiran 9. Data pemeriksaan angka E.coli dan angka Lactobacilli	103

ABSTRACT

The study was conducted to determine the alteration of serum lipid fraction includes the concentration of total cholesterol, trygliceride, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol after the administration of fermented milk product *Lactobacillus casei* strain Shirota to the hypercholesterolemic rats.

The design of this laboratory experimental research was randomized pre test-post test control group design. Twenty eight of 15 weeks healthy male rats strain Wistar with normal body weight obtained from the "Unit Pengembangan Hewan Percobaan" Gadjah Mada of University, Yogyakarta divided into 4 groups : control group (SF-0) not received fermented milk *Lactobacillus casei* strain Shirota, group I (SF-1) received fermented milk 2 ml/day, group II (SF-2) received fermented milk 2.25 ml/day, group III (SF-3) received fermented milk 2.5 ml/day. The fermented milk administered for 14 days. After 14 days, a blood sample collection was done for cholesterol analysis. Enzymatic method was used for determining the cholesterol serum. Data collected were then analyzed by using the paired t-test and one way anova, folowed by Least Significant Difference (LSD) at 95% confidence level.

The result showed that administration fermented milk to the treatment groups was afford significantly decreased of serum total cholesterol, LDL-cholesterol, and increased HDL-cholesterol. The lowest significant decrease trygliceride occurred only in the group III.

It can conducted that the administration of fermented milk product *Lactobacillus casei* strain Shirota of 2.5 ml/day succeed significantly reduce the concentration of total cholesterol, trygliceride, LDL-cholesterol and increased HDL-cholesterol.

Key words : lipid fraction, fermented milk product *Lactobacillus casei* strain Shirota

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan fraksi lipid serum darah tikus meliputi kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL akibat pemberian susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota pada tikus hiperkolesterolemi.

Desain penelitian eksperimental laboratorium ini adalah rancangan acak dengan pre test-post test. Duapuluh delapan tikus putih jantan galur Wistar umur 15 minggu dengan berat badan normal, diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dibagi dalam 4 kelompok yaitu : kelompok kontrol (SF-0) tanpa diberi susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota, kelompok I (SF-1) diberi susu fermentasi dosis 2 ml/ekor/hari, kelompok II (SF-2) diberi susu fermentasi dosis 2,25 ml/ekor/hari dan kelompok III (SF-3) diberi susu fermentasi dosis 2,5 ml/ekor/hari. Pada akhir perlakuan diambil serum darah untuk mengetahui fraksi lipid menggunakan metode enzimatik. Uji t berpasangan dilakukan pada analisis lanjut untuk mengetahui perbedaan mean dan perbedaan keempat kelompok perlakuan dengan uji Anova pada tingkat kepercayaan 95%

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian susu fermentasi pada kelompok perlakuan menyebabkan penurunan kadar kolesterol total, kolesterol LDL dan peningkatan kolesterol HDL secara bermakna. Penurunan trigliserida secara bermakna terjadi hanya pada pemberian susu fermentasi 2,5ml/ekor/hari.

Kesimpulan menunjukkan bahwa pemberian susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota pada dosis 2,5 ml/ekor/hari menurunkan kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol LDL dan meningkatkan kolesterol HDL secara bermakna.

Kata kunci : fraksi lipid, susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit kardiovaskuler merupakan salah satu penyebab kematian penduduk di negara berkembang usia di atas 40 tahun yang akhir-akhir ini kedudukannya bergerak ke peringkat teratas.¹ Proporsi penderita kardiovaskuler yang dirawat di RS Jantung Harapan Kita, Jakarta dari tahun 1990-1995 meningkat dari 2,1% menjadi 3,8%, sedangkan prevalensi kematian karena jantung koroner meningkat dari 16,5% menjadi 24,5%.² Banyak penelitian epidemiologi, laboratorium dan klinis yang memperlihatkan adanya hubungan antara tingginya kolesterol total dan kolesterol LDL dengan terjadinya penyakit kardiovaskuler.³ Adanya kenyataan meningkatnya penyakit-penyakit kardiovaskuler yang berhubungan dengan tingginya kolesterol total dan kolesterol LDL tersebut menyebabkan manusia sebagai konsumen berusaha mengurangi masukan kolesterol dalam dietnya. Penggunaan obat-obatan dari bahan sintesis serta produk makanan yang berpotensi menurunkan kolesterol pada manusia telah banyak dikembangkan, tetapi penggunaan obat hipokolesterolemi dari bahan-bahan sintesis dalam jangka waktu lama diketahui menimbulkan efek samping yang tidak diharapkan.⁴

Salah satu pendekatan lain yang potensial untuk menurunkan kolesterol adalah melalui penggunaan bakteri asam laktat (BAL) sebagai probiotik. Bakteri asam laktat secara alami terdapat dalam saluran pencernaan manusia dan hewan, dalam makanan fermentasi seperti yakult, yoghurt, keju, produk salami, pickel buah

dan sayuran dan dikenal aman (status GRAS, Generally Recognized as Safe). Probiotik adalah bakteri hidup yang diberikan sebagai suplemen makanan yang mempunyai pengaruh menguntungkan pada kesehatan baik pada manusia maupun hewan dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal.⁵

Keseimbangan mikroflora intestinal (bakteri usus) dapat sebagai petunjuk kondisi kesehatan seseorang, dengan kata lain kesehatan tubuh dapat diperbaiki dengan mendorong keseimbangan bakteri usus ke arah yang menguntungkan dengan bantuan bakteri probiotik. Pada kondisi tubuh yang sehat, jumlah *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* banyak. Sedangkan *Enterobacterium*, *Clostridium* dan *Staphylococcus* sedikit. *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* merupakan golongan bakteri yang menguntungkan bagi manusia, sedangkan *Enterobacterium*, *Clostridium* dan *Staphylococcus* merupakan bakteri yang merugikan. Oleh karena suatu sebab seperti pemberian antibiotika, keasaman lambung, stress, perubahan gaya hidup dan perubahan pola makan maka keseimbangan populasi bakteri ini dapat berubah. Jumlah bakteri menguntungkan yang seharusnya banyak menjadi turun dan bakteri merugikan jumlahnya meningkat menjadi banyak. Pembusukan (putrefaksi) oleh bakteri dalam kolon menghasilkan senyawa-senyawa beracun yang ikut terserap melalui dinding usus ke pembuluh darah dan racun ini akan berada di dalam peredaran darah, yang disebut sebagai proses "Autointoksikasi". Proses autointoksikasi ini ikut menyebabkan penuaan dan beberapa penyakit degeneratif. Pemberian bakteri probiotik akan membantu memulihkan keseimbangan populasi bakteri dalam usus, memperkaya usus dengan *Lactobacillus*, merangsang pertumbuhan bakteri alami dalam tubuh dan menekan populasi bakteri merugikan.⁶

Penelitian Fuller (1991)⁷ membuktikan bahwa bakteri probiotik bertahan hidup dalam saluran pencernaan setelah dikonsumsi. Bakteri ini tahan terhadap lisozim, enzim air liur, pemecah dinding sel bakteri, dan tahan terhadap asam lambung serta asam empedu untuk sampai di usus dalam keadaan hidup. Ia mampu melekat pada sel epitel dan menjaga keharmonisan komposisi bakteri saluran pencernaan.

Berdasarkan hasil-hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa mengkonsumsi produk susu fermentasi yang mengandung bakteri asam laktat dapat menurunkan kadar kolesterol baik pada hewan maupun manusia^{3, 8-21}. Pengaruh bakteri probiotik terhadap penurunan kadar kolesterol karena kemampuannya dalam mengasimilasi kolesterol dan mendekongugasi garam empedu^{15,22}. Bakteri asam laktat yang memiliki efek probiotik, yaitu berperan dalam penurunan kolesterol serum pada binatang percobaan antara lain *Lactobacillus acidophilus*^{18, 19}, *Lactobacillus reuteri*²⁰, *Lactobacillus gasseri*²¹ telah banyak diteliti, tetapi Grunewald dan Mitchel (1983) dan Thompson *et al* (1982) yang dikutip oleh Usman dan Hosono (2000)²¹ melaporkan bahwa konsumsi susu acidophilus tidak memiliki efek hipokolesterolemi pada tikus dan manusia. Hasil penelitian yang berbeda diduga karena medium probiotik yang tidak cocok²⁰ atau perbedaan galur bakteri yang digunakan dalam penelitian.¹⁹

Oleh karena kemampuan dan sifat yang dimiliki oleh masing-masing galur bervariasi, yang dipengaruhi berbagai faktor diantaranya kondisi lingkungan pertumbuhan maka dilakukan penelitian dengan menggunakan galur bakteri asam laktat yang lain yaitu *Lactobacillus casei* strain Shirota. Berdasarkan hasil penelitian Gilliland dan Speck (1977)²² secara *in vitro* dengan kultur bakteri *Lactobacillus casei*

yang ditumbuhkan pada medium Man Rogosa and Sharp broth (MRS broth), yaitu media untuk tempat tumbuh bakteri lactobacilli dan ditambah garam empedu menunjukkan bahwa terjadi dekonjugasi glikokolat, dan asimilasi kolesterol dengan adanya aktivitas 7α -dehidroxylase.²³

1.2. Perumusan Masalah

Bakteri asam laktat probiotik merupakan bahan alami telah dinyatakan dapat menurunkan kolesterol²⁴ dan produk susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota telah banyak dijual di pasaran, maka perlu dilakukan penelitian penggunaan susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota hidup sebagai probiotik untuk hipokolesterolemik.

Berdasarkan pemahaman bahwa berbagai galur bakteri lactobacillis memiliki efek terhadap penurunan kolesterol pada manusia dan hewan coba, maka muncul permasalahan : Apakah pemberian susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota berpengaruh terhadap kadar fraksi lipid serum tikus hiperkolesterolemi ?

1.3. Keaslian Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh probiotik terhadap penurunan kolesterol. Telah banyak penelitian sejenis yang dilakukan oleh peneliti-peneliti pendahulu namun penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya dalam hal penggunaan spesies dan strain bakteri asam laktat. Para peneliti sebelumnya menggunakan spesies dan strain antara lain bakteri *Lactobacillus acidophilus* strain ATCC 43121 , *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus reuteri* CRL 1098,

Lactobacillus gasseri SBT 0270 dan SBT 0274, *Streptococcus thermophilus*, dan *Enterococcus faecium* sedangkan penelitian ini menggunakan *Lactobacillus casei* strain Shirota. Belum banyak dilakukan penelitian menggunakan susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota untuk menurunkan kolesterol secara in vivo pada tikus percobaan.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi bahan informasi tentang pengaruh susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota terhadap perubahan kadar fraksi lipid serum darah tikus dan peranannya pada penurunan kolesterol serum tikus hiperkolesterolemi serta dapat digunakan sebagai bahan informasi bagi peneliti yang akan melakukan penelitian sejenis di masa mendatang.

1.5. Tujuan Penelitian

1.5.1. Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengetahui perubahan kadar fraksi lipid serum darah tikus, meliputi kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL akibat pemberian susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain shirota pada tikus hiperkolesterolemi.

1.5.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisa pengaruh susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota terhadap penurunan kadar kolesterol total.

2. Menganalisa pengaruh susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota terhadap penurunan kadar trigliserida
3. Menganalisa pengaruh susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota terhadap penurunan kadar kolesterol LDL
4. Menganalisa pengaruh susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota terhadap peningkatan kadar kolesterol HDL
5. Menganalisa keberadaan bakteri lactobacilli dan coliform pada feses tikus
6. Menganalisa perbedaan pemberian dosis susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota pada keempat kelompok tikus percobaan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. LIPID

Lipid adalah suatu kelompok besar substansi biologik yang dapat larut dengan baik dalam zat pelarut organik seperti metanol, aseton, kloroform dan benzena/benzol, sebaliknya lipid tidak atau sukar larut di dalam air. Kelarutannya dalam air yang kecil disebabkan karena kekurangan atom-atom yang berpolarisasi seperti atom O, N, S dan P.

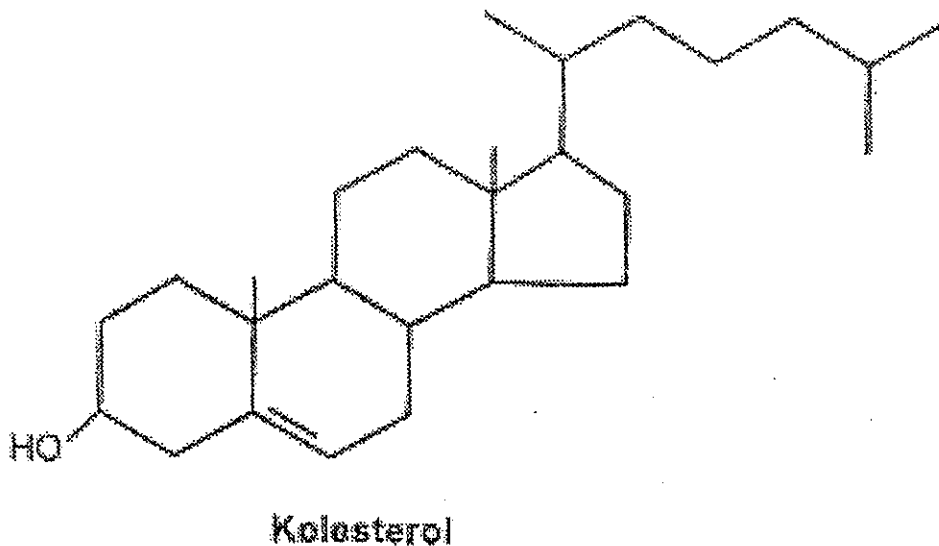
Lipid dapat digolongkan menjadi dua, yaitu lipid yang dapat terhidrolisasi, artinya di dalam air mudah dipecahkan, seperti : lemak, lilin, ester sterol, fosfolipid, sfingolipid, fosfatidil, serebrosida dan gangliosida, dan lipid yang tidak terhidrolisasi antara lain alkan dan karotenoid, alkanol berantai panjang, atau sterol siklik misalnya kolesterol, serta steroid misalnya estradiol atau testosteron.²⁵

2.2. KOLESTEROL

2.2.1. Kimia dan Sintesis Kolesterol

Kolesterol merupakan sterol utama dalam jaringan tubuh manusia sebagai hasil metabolisme. Oleh karena itu kolesterol banyak terdapat dalam makanan yang berasal dari hewan seperti daging, hati, otak dan kuning telur. Jika dipandang dari sudut biokimiawi, kolesterol mempunyai makna penting karena menjadi prekursor sejumlah besar senyawa steroid seperti asam empedu, hormon korteks adrenal,

hormon seks, vitamin D, glikosida kardiaksisterol dalam tumbuhan dan beberapa alkaloid.²⁶ Kolesterol mempunyai rantai samping hidrokarbon dengan delapan atom karbon yang diberi nomor 20 sampai 27 sebagai lanjutan nomor pada inti steroid.²⁷ Inti steroid kolesterol memiliki sebuah ikatan rangkap antara karbon 5 dan 6, serta sebuah gugus hidroksil diposisi 3, dimana gugus hidroksil ini teresterifikasi dengan asam lemak, sehingga menghasilkan ester kolesterol. Esterifikasi kolesterol menyebabkan molekul menjadi lebih hidrofobik sehingga lebih mudah dikemas dalam partikel lipoprotein atau dalam butir lemak dalam sitosol sel untuk selanjutnya ditranspor dalam sirkulasi darah.²⁸ Struktur kimia kolesterol adalah sebagai berikut :



Gambar 2.1. Struktur kimia kolesterol²⁸

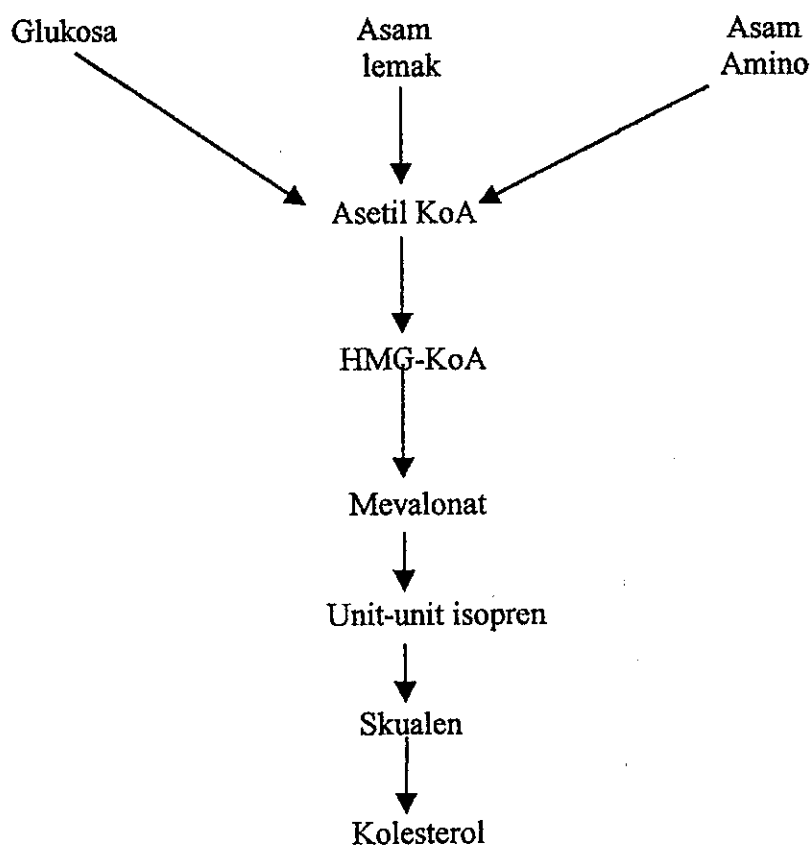
Esterifikasi kolesterol dilakukan oleh enzim Lesitin kolesterol asiltransferase (LCAT) dan Asil kolesterol asiltransferase (ACAT). Lesitin kolesterol asiltransferase terdapat di dalam darah dan mengesterifikasi kolesterol yang berkaitan dengan partikel HDL, sedangkan asil kolesterol transferase terdapat di dalam sel terutama sel yang perlu menyimpan kolesterol untuk membentuk hormon steroid.

Kolesterol di dalam darah terdapat bersama dengan trigliserida, fosfolipid dan apoprotein membentuk lipoprotein. Dalam plasma darah terdapat lima golongan lipoprotein yaitu kilomikron, *very low density lipoprotein* (VLDL), *Intermediate density lipoprotein* (IDL), *low density lipoprotein* (LDL) dan *high density lipoprotein* (HDL).²⁹ Biosintesis kolesterol yang paling utama berlangsung dalam jaringan hati, kulit, kelenjar anak ginjal, dan kelenjar kelamin, sedangkan dalam jaringan lemak, otot, pembuluh darah, dan otak dewasa kegiatan sintesis berada pada tingkat yang rendah.²⁶ HDL dan LDL diduga berperan dalam pengangkutan kolesterol. HDL berperan dalam mengeliminir kolesterol dalam tubuh dan tidak mengendap dalam intima aorta, sedangkan kolesterol LDL ada pada sirkulasi darah dan dapat menimbulkan plak yang terdeposit dalam dinding aorta sehingga membentuk ateroma bila LDL mengalami oksidasi yang timbul akibat adanya jejas.²⁸

Prekursor untuk sintesis kolesterol adalah asetil KoA sitosol, sedangkan sintesis asetil KoA dari prekursor utamanya glukosa, asam lemak dan katabolisme asam amino terjadi di mitokondria, dengan demikian jalur sintesis asetil KoA sitosol dari glukosa berawal dari glikolisis yang merubah glukosa menjadi piruvat dan dibawa ke sitosol.²⁸ Piruvat selanjutnya masuk ke dalam mitokondria dan diubah menjadi asetil KoA oleh *piruvat dehidrogenase* serta menjadi oksaloasetat oleh *piruvat karboksilase*. Asetil KoA dan oksaloasetat bergabung membentuk sitrat, yang kemudian menembus membran mitokondria bagian dalam menuju sitosol. Di dalam sitosol, sitrat diurai oleh *sitrat liase* menjadi asetil KoA kembali dan oksaloasetat. Hal demikian terjadi karena *piruvat dehidrogenase*, yaitu enzim yang mengubah piruvat menjadi asetil KoA, hanya terdapat di dalam mitokondria dan karena asetil KoA tidak

dapat secara langsung menembus membran mitokondria.²⁸ Jalur untuk pembentukan kolesterol berlangsung dalam tiga fase. Pada fase pertama, unit-unit asetil KoA berkondensasi membentuk mevalonat. Pada fase kedua, mevalonat diubah menjadi unit-unit isopren 5 karbon, yang mengalami fosforilasi dan berkondensasi membentuk senyawa 30 karbon yaitu skualen.

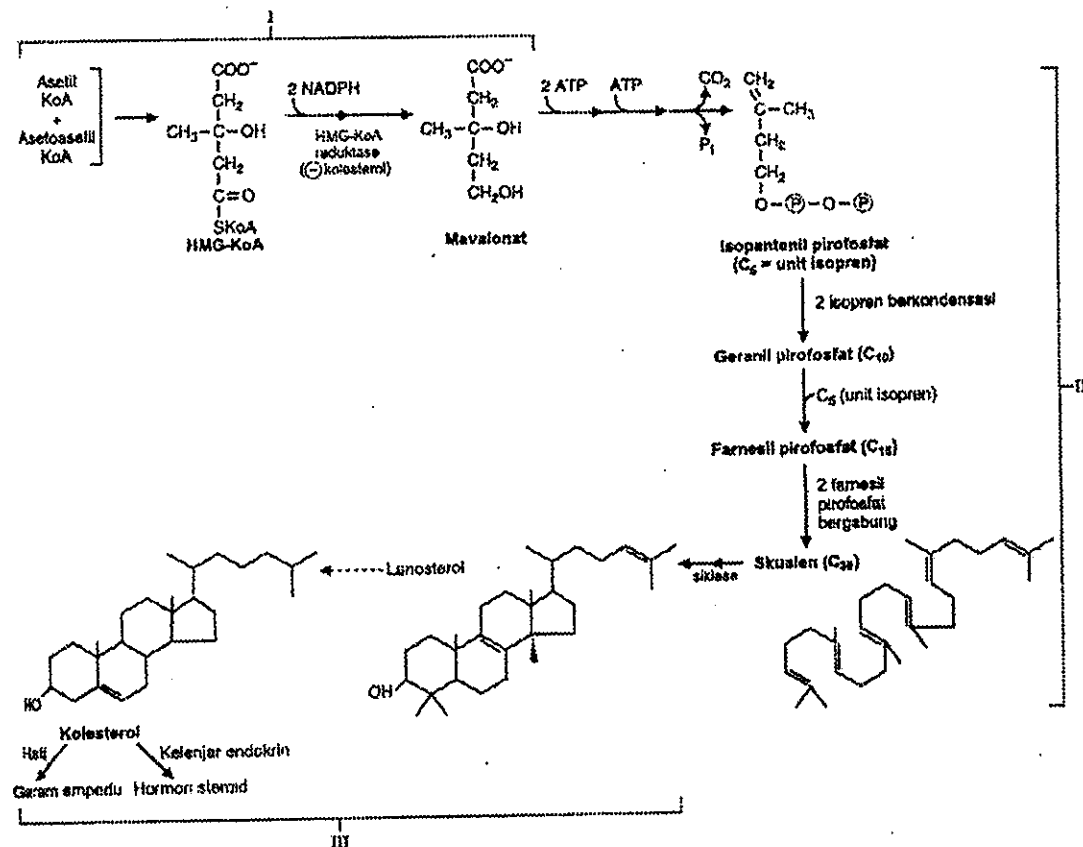
Adapun ringkasan pembentukan kolesterol disajikan pada gambar 2.2.



Gambar 2.2. Ringkasan pembentukan kolesterol²⁸

Pada fase ketiga, skualen mengalami siklisasi membentuk lanosterol, yang memiliki cincin-cincin inti steroid. Lanosterol mengalami modifikasi melalui serangkaian reaksi untuk membentuk kolesterol. Diagram pembentukan kolesterol secara keseluruhan disajikan pada gambar 2.3. Pada fase awal pembentukan kolesterol, dua molekul asetil KoA sitosol berkondensasi membentuk asetoasetil KoA. Molekul

asetil KoA lain berikatan dengan asetoasetil KoA membentuk HMG-KoA. Reaksi pada biosintesis kolesterol berikutnya dikatalisis oleh HMG-KoA reduktase, enzim ini mengubah HMG-KoA menjadi mevalonat, dengan menggunakan ekivalen pereduksi yang disediakan oleh NADPH. HMG-KoA reduktase adalah enzim penentu kecepatan utama dan sangat diatur bagi jalur biosintesis ini.



Gambar 2.3. Pembentukan kolesterol secara keseluruhan²⁸

Selanjutnya mevalonat mengalami fosforilasi (penambahan gugus fosfat) oleh ATP untuk membentuk beberapa senyawa-senyawa terfosforilasi aktif dan kemudian mengalami dekarboksilasi untuk membentuk unit isoprenoid aktif yaitu isopentenil pirofosfat. Unit aktif isopentenil pirofosfat mengalami isomerisasi yang meliputi pergeseran ikatan rangkap untuk membentuk dimetilasilpirofosfat, kemudian diikuti oleh kondensasi dengan molekul isopentenil pirofosfat lain hingga terbentuk senyawa

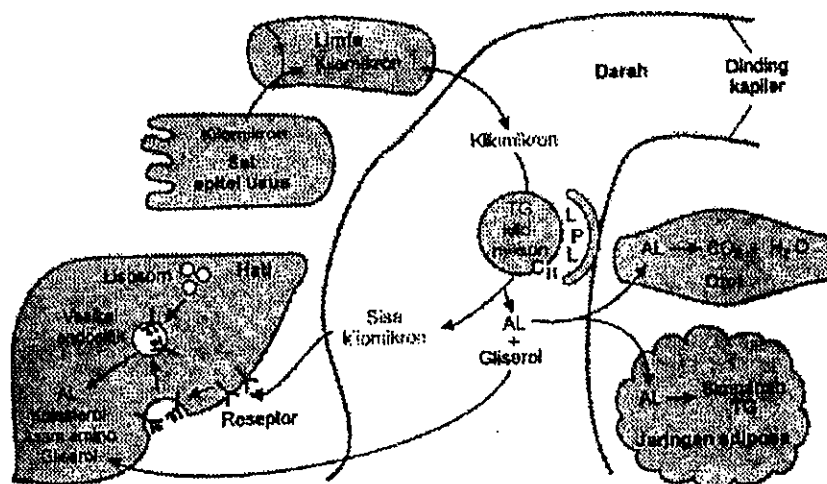
antara dengan sepuluh karbon, yaitu geranyl pirofosfat. Kondensasi selanjutnya dengan penambahan satu unit isopren lagi untuk menghasilkan farnesil pirofosfat. Kondensasi 2 farnesil pirofosfat menghasilkan skualen, suatu senyawa yang mengandung 30 atom karbon. Setelah oksidasi pada karbon 3, skualen mengalami siklisasi membentuk lanosterol yang memiliki empat cincin yang membentuk inti steroid pada kolesterol, melalui serangkaian reaksi terjadi pembebasan 3 atom karbon dari lanosterol sewaktu zat ini diubah menjadi kolesterol.²⁶

2.2.2. Transport kolesterol oleh lipoprotein darah

Kolesterol sangat tidak larut dalam air. Dengan demikian, zat ini diangkut dalam darah sebagai komponen lipoprotein darah.

Kilomikron. Triasilgliserol, kolesterol dan berbagai lipid lain yang diperoleh dari makanan diserap dari misel garam empedu ke dalam sel epitel usus. Kolesterol ini bersama dengan kolesterol yang disintesis oleh sel usus dikemas dalam bentuk kilomikron dengan protein utama apolipoprotein B-48 (Apo B-48) selanjutnya masuk ke dalam darah melalui pembuluh limfe. Dalam darah kilomikron memperoleh apo C-II dan apo E dari HDL. Di dalam jaringan otot dan lemak, triasilgliserol dalam kilomikron dihidrolisis oleh enzim lipoprotein lipase yang terdapat pada endotel pembuluh darah yang diaktifkan oleh Apo C-II, dengan demikian kilomikron beralih menjadi sisa kilomikron (yang kaya kolesterol). Sisa kilomikron akan berikatan dengan reseptor yang spesifik untuk Apo E pada sel hati dan mengalami internalisasi melalui endositosis²⁸. Sisa kilomikron yang kaya kolesterol dan ester kolesterol dicerna oleh lisosom sehingga terbentuk asam lemak dan kolesterol bebas. Akibatnya kandungan kolesterol bebas meningkat, sehingga menghambat sintesis kolesterol dan

sintesis reseptor LDL oleh hati menurun.²⁸ Jumlah reseptor LDL di membran sel berkurang karena reseptor tersebut masuk ke dalam sel melalui proses endositosis. Metabolisme sisa kilomikron disajikan pada gambar 2.4. Perubahan serupa terjadi pada VLDL. Setelah dibentuk di hati, triasilgliserol kemudian dikemas bersama dengan kolesterol di dalam hati, fosfolipid dan apo B-100 menjadi VLDL yang kemudian disekresikan ke dalam darah untuk dibawa ke seluruh tubuh.²⁸

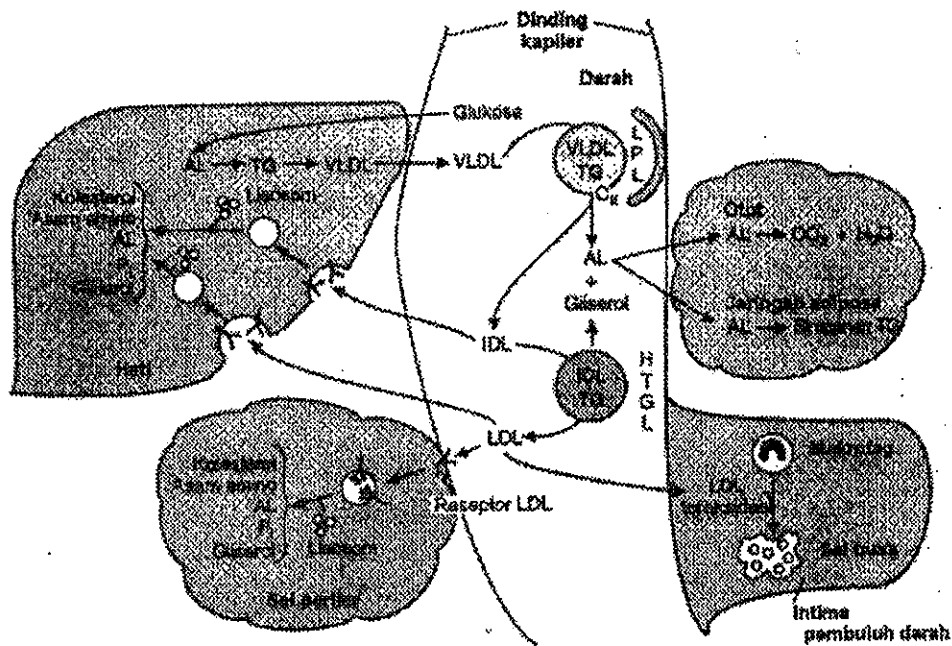


Gambar 2.4. Metabolisme sisa kilomikron²⁸

Di dalam darah VLDL mengalami proses penguraian lipid secara bertahap. Dalam proses ini gliserol dan asam lemak dilepaskan, dikatalisis oleh enzim lipoprotein lipase yang terdapat pada permukaan jaringan mesenchym dan jaringan lemak. Dengan berlangsungnya penguraian lipid secara bertahap ini, kerapatan partikel semakin menjadi besar, VLDL berubah menjadi IDL (Intermediate density lipoprotein) dan selanjutnya IDL mengalami penguraian menjadi LDL.³⁰ Metabolisme VLDL disajikan pada gambar 2.5.

LDL (Low density lipoprotein) merupakan partikel lipoprotein utama pembawa kolesterol dalam sirkulasi, membawa kolesterol dari hati ke sel-sel perifer. LDL membawa kolesterol ke jaringan perifer melalui endositosis yang diperantarai

reseptor. Proses ini diperantarai oleh Apolipoprotein B-100 dan Apo E. Reseptor protein ini terletak pada permukaan sel perifer. Endositosis dimulai oleh pengikatan Apo B-100 ke reseptor protein. Membran sel selanjutnya mengalami invaginasi membentuk vesikel sitoplasmik. Vesikel kemudian berfusi dengan lisosom. LDL yang terdapat di dalamnya didegradasi oleh enzim-enzim lisosom.²⁹



Gambar 2.5. Metabolisme Very Low Density Lipoprotein²⁸

Ester kolesterol yang terdapat dalam inti LDL dilepaskan sebagai kolesterol bebas, dengan kemungkinan-kemungkinan²⁸ :

- 1) Segera digunakan untuk pembentukan membran baru dan sterol
- 2) Meningkatnya kadar kolesterol bebas intrasel merangsang aktivitas asil KoA kolesterol asiltransferase (ACAT), enzim yang mengubah kolesterol menjadi ester kolesterol untuk disimpan dalam sel.
- 3) Apabila kadar kolesterol intrasel meningkat, pembentukan kolesterol dari asetil KoA di dalam sel berkurang, karena meningkatnya depot persediaan kolesterol bebas menyebabkan penurunan pembentukan HMG-KoA reduktase.

- 4) Meningkatnya kadar kolesterol bebas intrasel menurunkan pembentukan reseptor LDL yang bekerja pada tingkat ekspresi gen. Sewaktu konsentrasi reseptor-reseptor tersebut di membran berkurang, LDL yang diserap dari darah berkurang dan kadar kolesterol sel berkurang. Mekanisme ini dikenal sebagai down regulator untuk pembentukan reseptor.

Apabila kadar kolesterol intrasel menurun, proses-proses tersebut berbalik dan sel bekerja meningkatkan kadar kolesterol mereka. Baik sintesis kolesterol dari asetil KoA maupun sintesis reseptor LDL akan terangsang. Bertambahnya jumlah reseptor menyebabkan peningkatan absorpsi kolesterol LDL dari darah.

HDL (High density lipoprotein) disintesis dan disekresikan oleh hati maupun intestinum. HDL mengangkut kolesterol yang berlebihan menjauhi jaringan perifer. Setelah disekresikan ke dalam darah HDL memindahkan protein Apo C-II dan Apo E ke kilomikron dan VLDL, lipoprotein yang kaya akan triasilgliserol. Apo C-II merangsang penguraian triasilgliserol dalam partikel dengan mengaktifkan Lipoprotein lipase (LPL). Penguraian ini menghasilkan sisa kilomikron (dari kilomikron) dan IDL (dari VLDL). Apo E yang terkandung dalam partikel-partikel ini berfungsi sebagai ligan untuk reseptor protein di membran sel hati yang berperan dalam penyerapan sisa kilomikron dan IDL.²⁸

Perubahan kolesterol bebas menjadi ester kolesterol oleh lesitin kolesterol asiltransferase (LCAT). Apo A-II yaitu suatu protein yang dibawa oleh HDL, diperlukan untuk pengaktifan LCAT ini.²⁹ Adapun gugus asil lemak yang digunakan untuk mengesterifikasi kolesterol diperoleh dari fosfatidil kolin (lesitin) lapisan permukaan HDL.

yang mencerna lemak makanan yang dihasilkan oleh pankreas. Lipase pankreas disekresi bersama dengan protein enzim lain yaitu kolipase. Peran kolipase adalah mengikat lemak makanan dan meningkatkan kerja lipase, sehingga enzim ini menjadi lebih aktif. Pankreas juga mensekresikan bikarbonat, yang menetralkan asam yang masuk ke dalam usus bersama dengan makanan setelah tercerna dari lambung. Bikarbonat meningkatkan pH isi lumen usus menjadi sekitar 6 yang merupakan pH optimal bagi kerja semua enzim pencernaan dalam usus. Lipase pankreas menghidrolisis lemak pada atom C₁ dan C₃ dari gliserol pada triasilgliserol yang menghasilkan dua asam lemak bebas dan monoasilgliserol.²⁵ Asam lemak dan monoasilgliserol yang dihasilkan dari proses pencernaan dapat dengan mudah diabsorpsi oleh sel mukosa usus melalui difusi pasif dan mencapai sel epitel usus. Di dalam sel epitel usus asam lemak rantai panjang diaktifkan dengan bantuan koenzim A dan kemudian digunakan kembali untuk resintesis triasilgliserol, selanjutnya hasil sintesis lemak ini disalurkan pada pembuluh limfe (kelenjar getah bening) dan mengalir ke dalam duktus toraksikus tanpa melalui hati sedangkan asam lemak rantai pendek dengan atom C kurang dari 12 langsung masuk ke dalam darah dan hati melalui pembuluh porta.²⁵ Gliserol setelah terserap dan masuk ke dalam sel epitel usus melalui pembuluh balik porta menuju ke dalam darah dan hati.

2.2.4. Penyakit yang ditimbulkan oleh lemak (kolesterol)

Berbagai himpunan profesi di bidang kesehatan dan gizi selama dekade terakhir ini makin gencar mengeluarkan anjuran kepada masyarakat untuk mengurangi konsumsi lemak dan kolesterol agar terhindar dari penyakit jantung koroner.³¹ Namun, sebenarnya kolesterol di dalam tubuh justru sebagian besar

disintesis/dibentuk oleh jaringan hati tubuh sendiri. Adapun lemak dalam darah bisa berupa kolesterol ataupun dapat berupa trigliserida (lemak netral). Bila terjadi hiperlipidemia tentu sangat berbahaya, karena lemak tersebut terutama kolesterol dapat mengendap pada lapisan dalam dinding pembuluh-pembuluh darah. Apabila endapan kolesterol ini terjadi pada pembuluh darah otak dan atau pembuluh darah koroner, maka lama kelamaan akan terjadi penyumbatan (karena kedua jenis pembuluh darah itu tidak/kurang sekali memiliki percabangan/kolateral). Penyumbatan pembuluh darah otak akan menimbulkan gangguan yang disebut stroke, sedangkan penyumbatan pembuluh darah koroner akan menimbulkan serangan jantung koroner. Terdapat hubungan antara aterosklerosis dengan tinggi kadar lipid atau lemak darah terutama kadar kolesterol dalam darah (hiperkolesterolemi). Hudyono dan Raharja (1995)³² menyatakan bahwa peningkatan kadar kolesterol berperan dalam terjadinya aterosklerosis melalui perubahan fungsi endotel. Peningkatan kadar kolesterol LDL menyebabkan disfungsi endotelial diikuti proliferasi sel-sel otot polos dalam pembuluh darah dan pembentukan *foam cell* atau sel busa. Pembentukan sel busa merupakan kondisi awal untuk timbulnya aterosklerosis.

2.3. GARAM EMPEDU

2.3.1. Pembentukan Garam Empedu

Asam empedu dibentuk dari kolesterol di dalam sitosol hati melalui reaksi hidroksilasi dan pemutusan rantai sisi. Reaksi-reaksi yang terjadi antara lain :

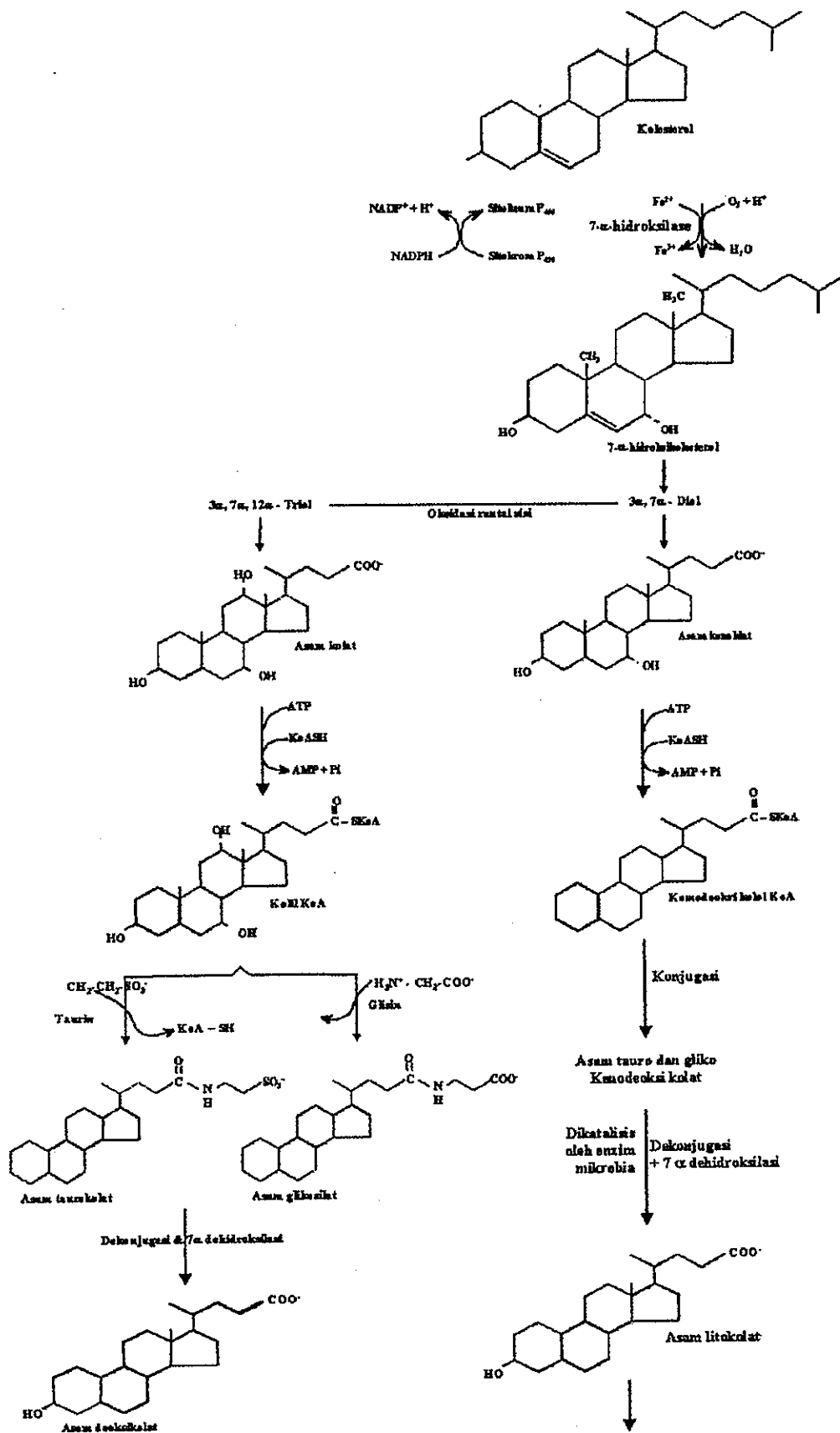
- 1) Terjadi penambahan 1 gugus α hidroksi pada C7 (disisi α pada cincin B) yang dikatalisis oleh 7α -hidroksilase yaitu suatu enzim mikrosomal. Enzim ini dihambat oleh garam-garam empedu
- 2) Terjadi reduksi pada ikatan rangkap dan mungkin terjadi hidroksilasi tambahan, sehingga dihasilkan 2 kelompok senyawa yang berbeda yaitu :
 - a). Senyawa yang memiliki gugus α -hidroksil pada posisi 3,7 dan 12 yang menghasilkan kolil KoA dengan garam empedu turunan **asam kolat**, ditandai oleh gugus ekstra -OH pada posisi 12.
 - b). Senyawa yang memiliki gugus α hidroksil pada posisi 3 dan 7 menghasilkan kenodeoksikolil KoA dengan garam empedu seri **asam kenodeoksikolat (asam kenokolat)**.
- 3). Melalui reaksi oksidasi, 3 karbon dikeluarkan dari rantai sisi. Fragmen 5 karbon sisa yang melekat pada struktur cincin memiliki sebuah gugus karboksil.

Gugus hidroksil di ujung sisi garam empedu diaktifkan melalui reaksi yang memerlukan ATP dan KoA. Turunan asil KoA dapat bereaksi dengan glisin maupun taurin. Asam kolat dan asam kenokolat dikenal sebagai asam empedu primer. Asam empedu primer ini sebelum meninggalkan hati, berkonjugasi dengan asam amino glisin dan taurin. Jadi asam taurokolat merupakan asam empedu terkonjugasi dengan taurin, sedangkan asam glikokolat merupakan asam empedu yang terkonjugasi dengan glisin. Bila dibandingkan dengan bentuk tidak terkonjugasinya, lebih banyak molekul konjugat ini terionisasi di dalam lumen usus.²⁸ Getah empedu mengandung kalium serta natrium dengan jumlah yang bermakna dengan pH alkalis, maka diasumsikan bahwa asam empedu dan konjugatnya sebenarnya berbentuk garam,

karena itu getah empedu dinamakan “garam empedu”.²⁹ Biosintesis dan penguraian asam empedu disajikan pada gambar 2.7.

2.3.2. Metabolisme Garam empedu

Garam empedu yang dihasilkan hati, disekresi ke dalam empedu dan disimpan di dalam kandung empedu. Selanjutnya, garam empedu dialirkan ke dalam usus sewaktu makan, untuk berfungsi sebagai deterjen yang membantu pencernaan lemak dalam makanan. Garam empedu sebagai deterjen memungkinkan emulsifikasi triasilgliserol dari bahan makanan dengan membuat lemak bahan makanan menjadi larutan melalui pembentukan misel selama pencernaan sehingga bahan makanan tersebut mudah dicerna oleh lipase pankreas. Setelah lemak dalam misel diserap, sebagian besar garam empedu mengalir ke ileum. Di dalam kolon, bakteri usus yang memproduksi enzim-enzim yang memungkinkan garam-garam empedu dapat melakukan dekonjugasi dan 7α -dehidroksilasi untuk mengeluarkan residu glisin dan taurin serta gugus hidroksil pada atom C posisi 7.²⁵ Garam empedu yang tidak memiliki gugus hidroksil pada atom C-7 disebut garam empedu sekunder, yaitu asam litokolat dan asam deoksikolat. Lebih dari 95% garam empedu diserap kembali di ileum dan dikembalikan ke hati melalui sirkulasi enterohepatik. Selanjutnya di dalam hati garam empedu sekunder dapat mengalami rekonjugasi, tetapi tidak mengalami rehidroksilasi. Garam empedu kemudian disekresikan oleh hati ke dalam empedu. Sedangkan asam litokolat, suatu garam empedu sekunder yang memiliki gugus hidroksil hanya diposisi C-3 adalah garam empedu yang paling tidak larut. Sebagian besar zat ini diekskresikan melalui feses, mungkin hanya 400 mg/hari.

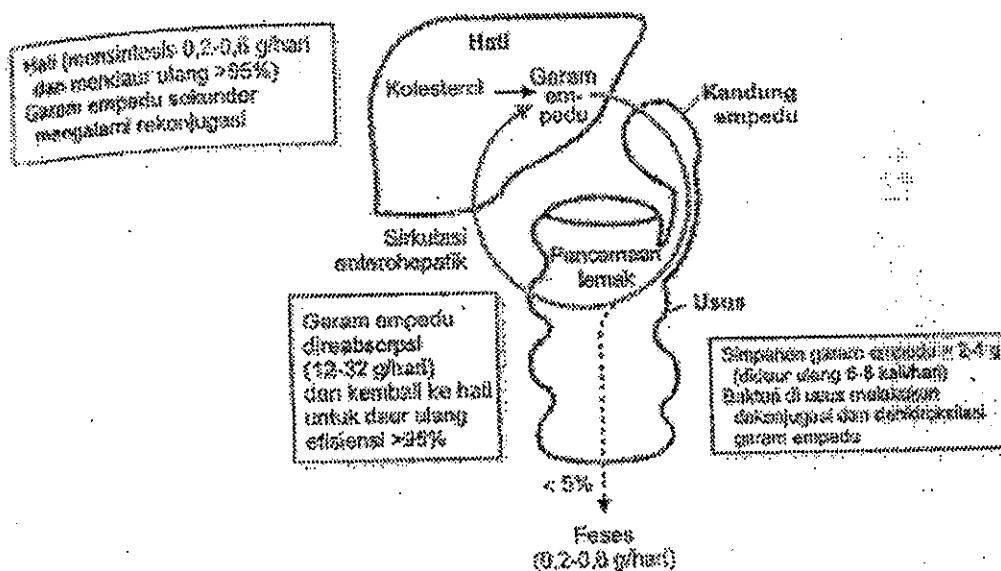


Gambar 2.7. Biosintesis dan penguraian garam empedu²⁸

Meskipun jumlah ini sangat sedikit, namun lintasan tersebut merupakan lintasan utama untuk mengeluarkan kolesterol.²⁹

Sirkulasi enterohepatik garam empedu terjadi begitu efisien sehingga setiap hari depot asam empedu yang relatif kecil (sekitar 3-5 gram) dapat didaur ulang oleh intestinum sebanyak 6-10 kali dari jumlah garam empedu yang diekskresikan dalam jumlah kecil melalui feses yaitu kurang lebih sebanyak 1-2% per kali lintasan lewat sirkulasi enterohepatik. Setiap hari asam empedu dengan jumlah sama seperti jumlah yang diekskresikan melalui feses akan disintesis kembali oleh hati dari kolesterol, sehingga depot asam empedu dapat dipertahankan dengan kondisi yang tetap.²⁸

Gambaran ringkas metabolisme garam empedu disajikan pada gambar 2.8.



Gambar 2.8. Gambaran ringkas metabolisme garam empedu²⁸

2.4. BAKTERI ASAM LAKTAT

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan nama umum yang diberikan kepada kelompok bakteri yang dapat memfermentasi gula, seperti laktosa dan glukosa untuk menghasilkan asam laktat. Bakteri ini termasuk bakteri gram positif dan tidak

berspora, berbentuk batang atau bulat, katalase negatif, pada umumnya tidak motil tetapi ada beberapa yang motil, anaerob sampai mikroaerotoleran. Suhu optimum pertumbuhannya antara 20-40°C, mampu tumbuh pada kadar garam tinggi, juga pada pH 3,5 sampai 8,0 serta memfermentasi berbagai monosakarida dan disakarida. Berdasarkan tipe fermentatifnya, BAL juga diklasifikasikan menjadi 2 tipe yaitu homofermentatif (hanya menghasilkan asam laktat) dan heterofermentatif (selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan asam asetat, etanol dan CO₂).³³

Bakteri asam laktat selain ditemukan pada beberapa bahan makanan misalnya susu, buah-buahan, dan sayuran juga merupakan mikroflora alami yang menghuni usus manusia maupun hewan. Beberapa strain *Lactobacillus* seperti *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei* dan *L. fermentum* kadang-kadang ditemukan di dalam usus dan dapat menjangkau usus dalam keadaan hidup. Jenis *Lactobacillus* yang tidak ditemukan dalam usus misalnya *L. bulgaricus* dan *L. helveticus*, sering digunakan sebagai kultur starter pada produk-produk susu.³³

Peranan *Lactobacillus* sebagai mikrobial yang menguntungkan dari segi nutrisi dan kesehatan telah banyak ditemukan oleh beberapa peneliti. Manfaat tersebut antara lain menurunkan kolesterol,^{18,20-21,34} memperbaiki keluhan malabsorpsi laktosa,³⁵⁻³⁷ mencegah diare,³⁸ kolitis dan gastroenteritis, menormalkan komposisi bakteri saluran pencernaan setelah pengobatan antibiotika serta menstimulasi sistem kekebalan tubuh,³⁹ dan supresi kanker kolon.⁴⁰

2.4.1. Peran Bakteri asam laktat terhadap penurunan serum kolesterol

Salah satu peranan *Lactobacillus* adalah menurunkan kadar kolesterol darah. Beberapa peneliti telah mendapatkan efek hipokolesterolemi pada hewan maupun manusia yang mengkonsumsi produk-produk susu fermentasi yang mengandung

bakteri asam laktat, seperti yang terangkum dalam tabel 2.1 (lampiran 2). Konsumsi *Lactobacillus acidophilus* terhadap kolesterol dalam media pertumbuhan ternyata dapat menurunkan kadar kolesterol pada babi yang diberi diet tinggi kolesterol.¹⁸ Penelitian Hepner *et al* (1979)¹⁰ menyatakan bahwa konsumsi susu pasteurisasi yogurt memiliki efek hipokolesterolemik pada manusia. Oleh Rao *et al* (1981)¹¹ didapatkan bahwa mengkonsumsi susu termofilus dapat menurunkan serum kolesterol dan menghambat *hepatic kolesterogenesis* pada tikus. Pengaruh pemberian susu skim yang difermentasi dengan *L. acidophilus* level serum kolesterol dievaluasi dengan menggunakan tikus sebagai hewan percobaan, didapatkan bahwa setelah 4 minggu kadar kolesterol tikus menurun dan diduga faktor yang mempengaruhi level kolesterol diproduksi selama fermentasi.¹² Pada penelitian tersebut belum dijelaskan mengenai pengaruh *L. acidophilus* secara langsung. Konsumsi *Lactobacillus acidophilus* terhadap kolesterol dalam media pertumbuhan, ternyata dapat menurunkan kadar kolesterol pada babi yang diberi diet tinggi kolesterol.¹⁵ Yogurt dan acidophilus yogurt berpengaruh terhadap kolesterol tikus, didapatkan bahwa rata-rata serum kolesterol tikus dan LDL kolesterol menurun dengan nyata pada pemberian acidophilus yogurt, selain itu juga terjadi peningkatan jumlah lactobacillus dan penurunan coliform pada feses.¹⁹

Terdapat dua karakteristik yaitu kemampuan mengasimilasi kolesterol dan mendekongugasi garam empedu yang mampu memberikan efek hipokolesterolemi, pada saat mengkonsumsi produk-produk fermentasi yang mengandung bakteri asam laktat oleh manusia maupun hewan percobaan, seperti yang didapatkan dari penelitian sebelumnya.⁴¹⁻⁴³ Pertumbuhan bakteri asam laktat yang mempunyai kemampuan mengambil kolesterol di dalam usus halus berpotensi sebagai pengontrol serum

kolesterol pada manusia karena usus halus merupakan bagian pokok absorpsi kolesterol dalam tubuh manusia.

Lactobacillus acidophilus dapat mengasimilasi kolesterol dari media pertumbuhan.⁴⁴ Asimilasi memerlukan kondisi pertumbuhan anaerob dan kehadiran asam empedu. Kemampuan mengasimilasi kolesterol bervariasi diantara strain. Strain yang tidak memiliki efek hipokolesterolemi ketika dicobakan pada tikus tidak memberikan efek menurunkan kolesterol (Grunewald and Mitchell, 1983 dan Thompson *et al* , 1982 yang dikutip oleh Usman dan Hosono, 2000²²) sedangkan strain yang aktif mengasimilasi kolesterol memiliki efek menurunkan serum kolesterol pada tikus.

Penurunan kolesterol oleh bakteri asam laktat terjadi secara langsung dengan mekanisme asimilasi kolesterol atau secara tidak langsung dengan mekanisme dekonjugasi garam empedu.³⁵ Asimilasi kolesterol di dalam usus halus barangkali penting dalam penurunan absorpsi kolesterol diet dari sistem pencernaan ke dalam darah.¹⁵ Pada mekanisme asimilasi kolesterol, bakteri asam laktat akan mengambil atau mengabsorpsi kolesterol dan selanjutnya akan berinkorporasi pada membran selular bakteri, sehingga bakteri lebih tahan terhadap lisis.³⁵ Aktivitas asimilasi kolesterol oleh beberapa bakteri asam laktat terangkum dalam tabel 2.2 (lampiran 3).

Lactobacillus yang ada pada saluran usus dapat melakukan dekonjugasi asam taurokolat dan glikokolat.²² Aktivitas lain yang ditunjukkan oleh *Lactobacillus acidophilus* yaitu mampu mendekongugasi asam empedu, barangkali dengan adanya enzim-enzim yang dihasilkan oleh bakteri tersebut seperti enzim *bile salt hidrolase* mungkin penting dalam mempengaruhi level kolesterol.²⁴ Beberapa aktivitas mendekongugasi garam empedu terangkum dalam tabel 2.3 (lampiran 4). Pada

mekanisme dekonjugasi garam empedu, penurunan kolesterol terjadi secara tidak langsung, yaitu melalui pembentukan asam litokolat yang sangat tidak larut air dan diekskresikan lewat feses. Dekonjugasi garam empedu dalam usus halus penting dalam mengontrol konsentrasi kolesterol serum sebab dekonjugasi asam empedu tidak berfungsi seperti konjugasi asam empedu dalam kelarutan dan absorpsi lemak.⁴⁴ Garam empedu primer dibentuk di dalam hati, sebelum meninggalkan hati, garam empedu berkonjugasi dengan asam amino glisin dan taurin membentuk *conjugated bile salt* kemudian akan disekresikan ke dalam saluran empedu dan akhirnya ke kandung empedu. Akhirnya garam empedu sampai ke ileum dan caecum dimana lebih lanjut akan didekonjugasi oleh enzim *bile salt hidrolase* yang dihasilkan oleh bakteri usus seperti *lactobacilli*. Selain mengalami dekonjugasi garam empedu juga mengalami dehidroksilasi oleh enzim *7 α -dehidroksilase* menjadi asam empedu sekunder yang akhirnya dikeluarkan lewat feses. Garam empedu yang telah diekskresikan perlu diganti dengan garam empedu yang baru, dimana pembentukannya memerlukan kolesterol sebagai prekursor. Dengan demikian siklus ini akan berlangsung terus sehingga katabolisme kolesterol semakin cepat, dan akhirnya dapat menurunkan penumpukan kolesterol.

Studi Walker dan Gilliland (1993)⁴⁴ tentang hubungan antara ketahanan terhadap garam empedu dan asimilasi kolesterol oleh *Lactobacillus acidophilus*, menunjukkan bahwa *Lactobacillus acidophilus* yang ditumbuhkan pada suhu 37°C pada media MRS (Man Rogosa and Sharp) broth dengan suplementasi sodium thioglycolat, sodium taurocholol dan kolesterol memiliki aktivitas dekonjugasi maksimum dan aktivitas asimilasi kolesterol pada akhir fase eksponensial.

Klaver dan Van der Meer (1993)⁴⁵ menduga bahwa penghilangan kolesterol oleh *L. acidophilus* dari media pertumbuhan disebabkan oleh terjadinya kopresipitasi kolesterol dengan asam empedu bebas yang dihasilkan dari dekonjugasi asam empedu oleh *L. acidophilus* selama pertumbuhan. Hasil penelitian tersebut didukung oleh Marshall and Taylor (1995),⁴⁶ bahwa kolesterol akan mengalami kopresipitasi dengan dekonjugasi asam empedu pada $\text{pH} < 5$.

Kolesterol yang diasimilasi oleh *L. Acidophilus* ATCC 4321 tidak didegradasi secara metabolis, kebanyakan kolesterol ditemukan dalam sel. Sel yang ditumbuhkan dengan kehadiran kolesterol dan garam empedu lebih resisten terhadap lisis. Beberapa bagian yang diasimilasi oleh sel ditemukan dalam fraksi membran sel, diduga kemungkinan dinding sel atau membran sel mengalami perubahan.³⁵

Lactobacillus merupakan kontributor pokok dalam aktivitas bile salt *hydrolase* di dalam ileum dan cecum tikus.⁴⁷ Tingginya aktivitas *bile salt hydrolase* dapat meningkatkan aktivitas dekonjugasi di dalam usus halus dapat menghasilkan ekskresi sejumlah besar asam empedu dari usus, dan hal ini cenderung menurunkan level serum kolesterol karena penggantian asam empedu yang diekskresikan memerlukan empedu baru, dan untuk pembentukannya memerlukan kolesterol sebagai prekursor.

Mekanisme lain yang diduga dapat menerangkan efek hipokolesterolemi oleh bakteri probiotik adalah kopresipitasi kolesterol dengan *conjugated bile salt* yang dihasilkan oleh aktivitas *bile salt hidrolase*, dan selanjutnya terjadi binding/pengikatan kolesterol oleh sel bakteri.⁴³

2.4.2. *Lactobacillus casei* strain Shirota

Lactobacillus casei termasuk bakteri homofermentatif dapat memecah 90% glukosa terutama menjadi asam laktat.⁴⁸ Wibowo (2001)⁴⁹ melaporkan bahwa senyawa volatil yang dihasilkan pada fermentasi susu segar dengan bakteri komersial yakult adalah : *asetal dehidra, aseton, etanol dan diasetil*.

Lactobacillus casei telah digunakan sebagai bakteri biang dalam fermentasi susu menjadi minuman kesehatan. *Lactobacillus casei* termasuk dalam golongan bakteri probiotik, yaitu bakteri hidup yang memberi efek menguntungkan pada induk semang dengan meningkatkan keseimbangan mikroflora di saluran pencernaan dengan cara menekan jumlah bakteri penyebab penyakit.⁵⁰ Akibat pemberian antibiotik bisa mengganggu keseimbangan mikroflora usus yang berakibat diare, maka *Lactobacillus casei* akan menekan jumlah perkembangan bakteri penyebab diare tersebut. *Lactobacillus casei* adalah bakteri gram (+), fakultatif anaerob, berbentuk batang tunggal atau berantai dengan ukuran panjang 2-4 μ dan lebar 0,6-0,7 μ ,⁵¹ tidak membentuk endospora, memiliki flagella.⁵²

Gilliland and Speck (1977)²² telah melakukan penelitian untuk mengetahui kemampuan dekonjugasi asam empedu oleh *Lactobacillus casei* pada media pertumbuhan MRS broth (MRS = Man Rogosa and Sharp) diperoleh hasil bahwa dari 13 strain *L. casei*, 9 strain *L. casei* mampu melakukan dekonjugasi dengan glikokolat dan tidak ada satupun yang mampu melakukan dekonjugasi taurokolat. *Lactobacillus casei* YIT 0078, YIT 9018 dan YIT 9029 (YIT = Yakult Central Institute of Tokyo) memiliki aktivitas *7 α -dehidroksilase* yang mampu mengasimilasi kolesterol pada

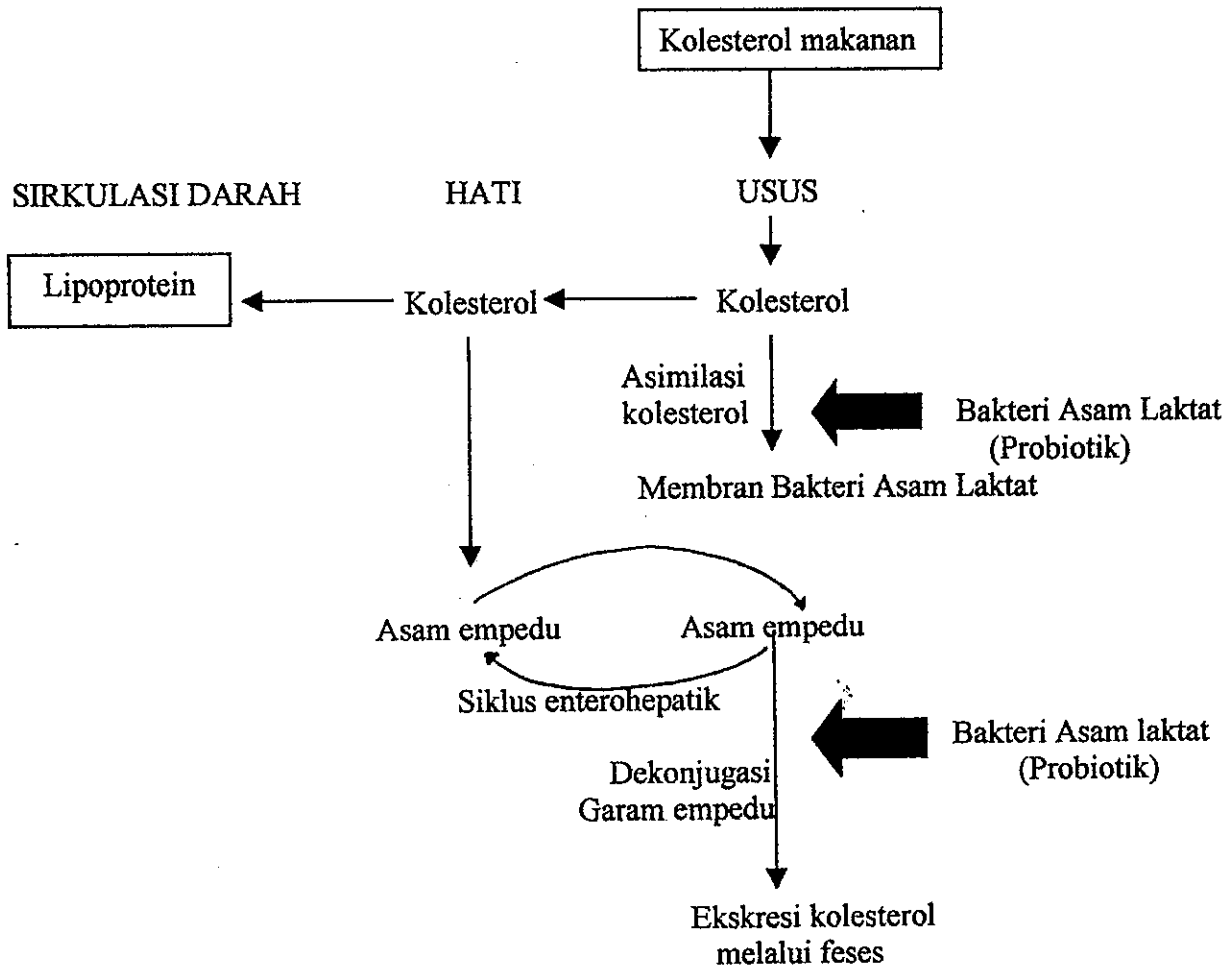
kultur modifikasi ekstrak yeast-pepton broth yang mengandung 150 µg/ml Asam kolat dan 1% glukosa dalam PBS 1M (pH 6).²³

Produk minuman susu yang difermentasi dengan *Lactobacillus casei* strain Shirota telah beredar di pasaran dengan nama dagang "yakult". Jenis minuman susu fermentasi ini berasal dari Jepang. Pada tahun 1930 ditemukan strain shirota dari spesies bakteri *Lactobacillus casei* oleh Dr. Minoru Shirota, strain (galur) yang cukup tahan kondisi asam lambung dan garam empedu untuk dapat mencapai usus. Lima tahun kemudian Dr. Shirota, sebagai pendiri perusahaan Yakult mulai memasarkan produk Yakult di Jepang. Bakteri yakult tumbuh pada temperatur 15 sampai 41°C dan pH lebih besar dari 3,5 (optimum 6,8). Aktivitas bakteri diperlambat pada temperatur kurang dari 15°C. Oleh karena itu susu hasil fermentasi oleh bakteri yakult sebaiknya disimpan pada suhu dingin.⁵⁰ Yakult mengandung bakteri *Lactobacillus casei* strain shirota hidup, dengan jaminan 65 ml tiap botol yakult mengandung $6,5 \times 10^9$ cfu bakteri (cfu = colony forming unit)

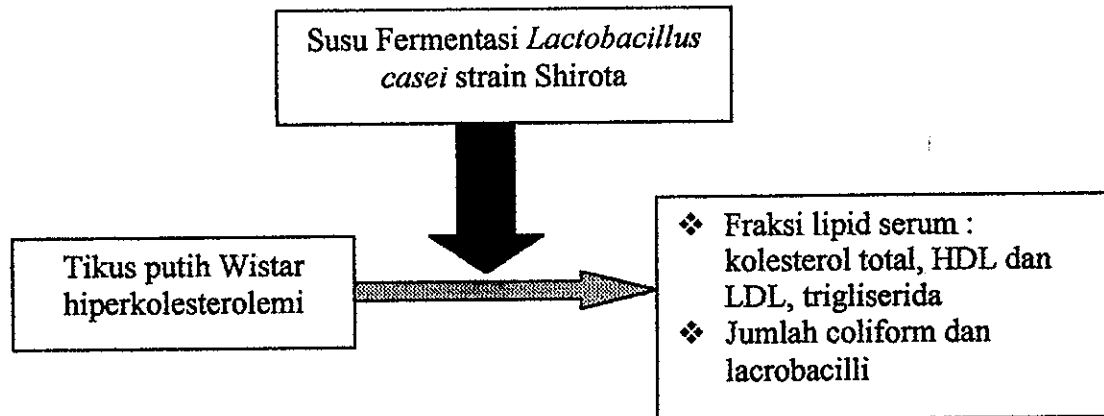
BAB 3

KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEPTUAL

3.1. Kerangka Teori



3.2. Kerangka Konseptual



3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan uraian pada latar belakang dan tinjauan pustaka, maka hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : *Lactobacillus casei* strain Shirota yang terkandung di dalam susu fermentasi mampu untuk :

1. menurunkan kadar kolesterol total serum darah tikus hiperkolesterolemi
2. menurunkan kadar trigliserida serum darah tikus hiperkolesterolemi
3. menurunkan kadar kolesterol LDL serum darah tikus hiperkolesterolemi
4. meningkatkan kadar kolesterol HDL serum tikus hiperkolesterolemi
5. menurunkan jumlah coliform dan meningkatkan jumlah lactobacilli.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Subyek dan Sampel Penelitian

4.1.1. Subyek

- Subyek target : Tikus putih jantan galur Wistar.
- Subyek terjangkau : Tikus putih jantan galur Wistar usia 15 minggu, berat badan 180-220 gram di Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Alasan pemilihan sampel tikus putih jantan, karena bila tikus betina terdapat hormon estrogen yang dikhawatirkan dapat ikut mempengaruhi kadar kolesterol. Tikus galur Wistar dipilih, karena pengaruh pemberian lactobacillus lebih spesifik pada galur wistar, memiliki karakteristik mirip manusia baik data dasar fisiologi maupun pemeriksaan biokimia kolesterol, dan pengambilan serum melalui *plexus retroorbitalis* relatif mudah

4.1.2. Sampel

Sampel diambil secara acak dari populasi terjangkau yaitu tikus putih jantan, galur wistar berusia 15 minggu (sesuai usia eksperimental) yang berada di Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, dengan syarat sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

a). Kriteria inklusi :

- Berat badan : 180 - 220 gram, sehat
- Kadar kolesterol total : 70 - 120 mg/dl
- Selama 3 hari pra perlakuan tidak mengalami penurunan berat badan, sehingga berat total tidak dibawah 180 gram.

b). Kriteria eksklusi :

- Berat badan kurang dari 180 gram; kesehatan terganggu karena diare.
- Tikus mati pada saat perlakuan
- Perilaku berubah (tidak doyan makan, lemas, tidak lincah)

4.1.3. Besar sampel

Perhitungan jumlah sampel minimal mempergunakan rumus besar sampel eksperimental dari Freeder (Hanafiah, 1991)⁵³ dimana $(t-1)(r-1) \geq 15$, t : adalah jumlah perlakuan dan r : adalah jumlah hewan coba tiap kelompok perlakuan. Penelitian dengan 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol, sehingga $t = 4$, $(4-1)(r-1) \geq 15 \rightarrow r \geq 4,75$ dibulatkan menjadi 5, berarti $r \geq 5$. Jumlah tikus yang digunakan sebanyak 7 ekor untuk masing-masing kelompok (3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol) sehingga jumlah sampel keseluruhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 28 ekor tikus.

4.2. Variabel Penelitian**4.2.1. Klasifikasi Variabel**

Variabel Bebas : pemberian susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota pada kelompok perlakuan dan kontrol.

Variabel tergantung : fraksi lipid serum darah tikus yang meliputi kolesterol total, kolesterol LDL, kolesterol HDL, dan trigliserida serta jumlah bakteri lactobacilli dan coliform pada feses tikus.

Variabel terkendali : jenis kelamin, berat badan, kondisi sehat, umur, pakan, keadaan kandang, ukuran kandang dan sistim perkandangan (kandang individu).

Variabel “intervening” : dekonjugasi bakteri *Lactobacillus casei* strain Shirota dalam tubuh tikus tidak dapat dilakukan pemantauan.

4.2.2. Definisi Operasional Variabel

1. Susu fermentasi yang mengandung bakteri *Lactobacillus casei* strain Shirota hidup dengan merek dagang Yakult, tiap satu botol sebanyak 65 ml mengandung $6,5 \times 10^9$ cfu (colony forming units) bakteri.
2. Tikus hiperkolesterolemi adalah tikus jantan galur Wistar umur 15 minggu dengan kadar kolesterol total serum > 120 mg/dl dan abnormalitas kolesterol dinilai berdasarkan kadar kolesterol dalam serum tikus setelah diberi pakan tinggi lemak dan tinggi kolesterol.
3. Kolesterol total adalah kandungan semua jenis kolesterol dalam darah yang dilakukan secara enzimatik dengan metode fotometri, dalam satuan mg/dl.
4. Kolesterol LDL : adalah kadar kolesterol LDL ditentukan secara tidak langsung dengan rumus Friedewald.²⁸ Rumus Friedewald : Kolesterol LDL = Kolesterol total – [Kolesterol HDL + (TG/5)].
5. Kolesterol HDL adalah kadar kolesterol yang diamati di dalam serum setelah dilakukan pengendapan kolesterol LDL, dilakukan secara enzimatik dengan metode fotometri, dengan satuan pengamatan mg/dl.

6. Trigliserida adalah kandungan trigliserida serum darah yang ditentukan secara enzimatis dengan metode fotometri, dengan satuan pengamatan mg/dl.
7. Angka coli dan angka lactobacilli pada feses adalah jumlah bakteri yang keluar bersama dengan feses untuk mengetahui banyaknya bakteri *lactobacilli* atau *coliform* sebagai indikator kesehatan.⁷

4.3. Bahan yang digunakan

4.3.1. Bahan utama

1. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan yang berumur 15 minggu dengan berat 180-220 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
2. Pakan standar rodentia dibuat berdasarkan standar AIN-93⁵⁴ diperoleh dari PAU Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Yang terdiri dari : pati jagung, kasein murni yang dibeli di Toko Mirota Babarsari, Yogyakarta, sukrosa (Merck), minyak kedele Happy Salad Oil, Selulosa, Kolin bitartat (Merck), Tert-butyl hidroquinon (Merck), L-sistin (Merck), campuran vitamin (ICN) dan campuran mineral (ICN) (lampiran 5).
3. Pakan tinggi lemak dan kolesterol dibuat berdasarkan standar AIN-93 dengan menambahkan lemak sapi (tallow) dan kolesterol murni (Merck). Komposisi pakan tinggi lemak/kolesterol disajikan pada lampiran 5.

4.3.2. Bahan untuk penetapan kadar kolesterol

Untuk analisa fraksi lipid digunakan reagen kit Triglycerida (10.164), Cholesterol (10.017) dan HDL-cholesterol (10.018) dari Dyasis.

4.3.3. Bahan untuk penetapan jumlah bakteri feses

1. Ragosa agar (Oxoid).
2. Gaspack hydrogen-carbon dioxide (BBL).
3. Violet red bile agar (Oxoid).
4. NaCL 0,85%.

4.4. Peralatan Penelitian

4.4.1. Alat untuk pengambilan serum

1. Terumo cappillary tubes VC Ho 75 H for Microhematocrit Determination (Terrumo Cotrporation, Tokyo, Japan).
2. Tabung centrifuge
3. Sentrifuge mlw T 51.1 (3600 rpm)

4.4.2. Alat untuk penetapan kadar kolesterol

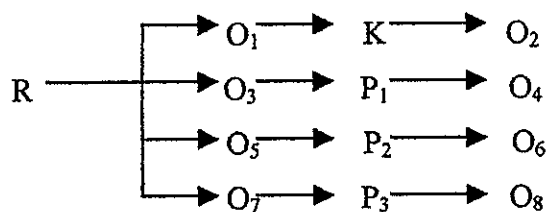
1. Penangas air (15 – 25 °C)
2. Spectronic-21, Bausch & Lomb, Arthur H, ThomasCo (Scientific Apparatus, Philadelphia,USA).
3. Kuvet.

4.4.3. Alat untuk penetapan jumlah bakteri pada feses

1. Inkubator suhu 37°C dengan CO₂ 99%
2. Vortex Mixer Thermolyne Type 37600 Mixer
3. Petri dish
4. Tabung steril

4.5. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian ekperimental laboratorik dengan rancangan *pre test post test* dengan kelompok kontrol (*Randomized control pre test post test design*).⁵⁵ Perlakuan adalah pemberian susu fermentasi pada tikus hiperkolesterolemi dengan keluaran (outcome) adalah profil lipid serum darah tikus.



Keterangan :

R = Hewan percobaan dibagi secara acak menjadi 4 kelompok

K = Kelompok kontrol

P₁ = Kelompok perlakuan 1 (susu fermentasi dosis 2 ml/ekor/hari)

P₂ = Kelompok perlakuan 2 (susu fermentasi dosis 2,25 ml/ekor/hari)

P₃ = Kelompok perlakuan 3 (susu fermentasi dosis 2,5ml/ekor/hari)

O₁ = Hasil pemeriksaan fraksi lipid serum awal pada kelompok kontrol

O₂ = Hasil pemeriksaan fraksi lipid serum akhir pada kelompok kontrol

O₃ = Hasil pemeriksaan fraksi lipid serum awal pada kelompok perlakuan 1

O₄ = Hasil pemeriksaan fraksi lipid serum akhir pada kelompok perlakuan 1

O₅ = Hasil pemeriksaan fraksi lipid serum awal pada kelompok perlakuan 2

O₆ = Hasil pemeriksaan fraksi lipid serum akhir pada kelompok perlakuan 2

O₇ = Hasil pemeriksaan fraksi lipid serum awal pada kelompok perlakuan 3

O₈ = Hasil pemeriksaan fraksi lipid serum akhir pada kelompok perlakuan 3

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan dan intervensi terhadap hewan coba dilaksanakan di Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pemeliharaan semenjak masa seleksi sampai masa perlakuan berlangsung dalam waktu 30 hari.

Pemeriksaan kadar kolesterol total, kadar kolesterol LDL, kadar kolesterol HDL dan kadar trigliserida di laboratorium PAU Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Sedangkan pemeriksaan bakteri pada feses tikus di Balai Laboratorium Kesehatan Jl. Ngadinegaran MJ III/62, Yogyakarta.

4.7. Prosedur Perlakuan

a). Pemeliharaan Tikus Percobaan.

Tikus dipelihara dalam ruangan yang berventilasi cukup, dikandangkan secara individual. Suhu ruangan berkisar 28 - 32 derajat Celcius, dengan kelembaban $56 \pm 5\%$. Makanan dan minuman diberikan ad libitum dalam bentuk pelet pakan tikus, setiap 2 hari dilakukan pembersihan kandang. Selama penelitian dilakukan tikus tidak ada yang mati.

b). Prosedur Pemberian Pakan.

Duapuluh delapan ekor tikus diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari, diberi pakan standar rodentia AIN-93 dan minum air ad libitum. Selanjutnya diberi pakan tinggi lemak tinggi kolesterol selama 9 hari. Setelah itu dibagi secara acak dalam 4 kelompok : Kelompok I sebagai kelompok kontrol diberi pakan standar dan air minum ad libitum selama 14 hari.

Kelompok II sebagai kelompok perlakuan yang diberi pakan standar dan susu fermentasi 2 ml/ekor/hari selama 14 hari.

Kelompok III sebagai kelompok perlakuan yang diberi pakan standar dan susu fermentasi 2,25 ml/ekor/hari selama 14 hari.

Kelompok IV sebagai kelompok perlakuan yang diberi pakan standar dan susu fermentasi 2,5 ml/ekor/hari selama 14 hari.

Dosis batas aman pemberian susu fermentasi yang dianjurkan menurut Reid (2001) yang dikutip oleh Agustina (2002)⁵⁶ adalah $10^6 - 10^{10}$ cfu bakteri hidup. Dalam bentuk susu dosis sehari yang dianjurkan sebesar 100 – 150 ml setara dengan 10^7 sel per gram dari makanan, selanjutnya dikonversi pada dosis hewan percobaan.⁵⁷

Penentuan dosis susu fermentasi untuk tikus berpedoman pada beberapa hal yaitu dosis yang biasa dikonsumsi manusia yang dihubungkan dengan berat rata-rata manusia dan konversi dosis antar jenis hewan. Dalam hal ini untuk dosis manusia dengan berat badan 70kg ke mencit dengan berat badan 200 gram (Donatus, 1994).⁵⁷

Konversi dosis manusia dan antar jenis hewan

	Mencit	Tikus	Marmot	Kelinci	Kera	Anjing	Manusia
Mencit 200 gr	1,0	7,0	12,25	27,8	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 gr	0,14	1,0	1,74	3,9	9,2	17,8	56,0
Marmot 400 gr	0,08	0,57	1,0	2,25	5,2	10,2	31,15
Kelinci 1,5kg	0,04	0,25	0,44	1,0	2,4	4,5	14,2
Kera 4kg	0,016	0,11	0,19	0,42	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,521	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,161	0,32	1,0

Sumber : Laurence dan Bacharah, 1964 yang dikutip oleh Imono Argo Donatus, 1994⁵⁷.

Konversi dosis manusia dan tikus adalah 0,018. Perhitungan konversi dosis susu fermentasi dari manusia ke tikus adalah sebagai berikut :

- I. Kelompok perlakuan I : $100 \text{ ml} \times 0,018 = 1,8 \approx 2$, dengan demikian kelompok perlakuan I, dosis pemberian susu fermentasi : 2 ml/ekor/hari.
- II. Kelompok perlakuan II : $(100 + 150) : 2 \text{ ml} \times 0,018 = 2,25$, dengan demikian kelompok perlakuan II, dosis pemberian susu fermentasi : 2,25 ml/ekor/hari.
- III. Kelompok perlakuan III : $150 \text{ ml} \times 0,018 = 2,7 \approx 2,5$, dengan demikian kelompok perlakuan III, dosis pemberian susu fermentasi : 2,5 ml/ekor/hari.

4.8. Prosedur Pengumpulan data

4.8.1. Aklimatisasi

Duapuluh delapan tikus putih jantan galur Wistar umur 15 minggu, berat badan 180-220 gram diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diadaptasikan dengan diberi pakan standar AIN-93 secara ad libitum selama 7 hari. Selanjutnya tikus dipuasakan selama 12 jam, diambil sampel darah melalui *plexus retro orbitalis* sebanyak 2 ml, untuk menentukan kadar fraksi lipid serum darah yang digunakan sebagai standard.

4.8.2. Kadar fraksi lipid

Tikus diberi pakan tinggi lemak tinggi kolesterol selama 9 hari, selanjutnya tikus dipuasakan selama 12 jam, dan diambil sampel darah melalui *plexus retro orbitalis* sebanyak 2 ml untuk menentukan kadar fraksi lipid serum keadaan hiperkolesterolemia awal perlakuan. Selanjutnya tikus dibagi secara acak menjadi 4

kelompok, terdiri dari 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan Pada akhir perlakuan masing-masing diambil sampel darahnya dari pembuluh darah *plexus retro orbitalis* untuk dianalisa fraksi lipid meliputi kolesterol total, kolesterol LDL, kolesterol HDL dan trigliserida. Kemudian dilakukan pemeriksaan masing-masing kadar kolesterol tersebut dengan spektrofotometri.

4.8.2.1. Kolesterol Total

Kolesterol ditentukan secara enzimatik dengan metoda CHOD-PAP.⁵⁸ Prinsip metoda ini adalah kolesterol dan bentuk esternya dibebaskan dari lipoprotein oleh deterjen. Bentuk esternya selanjutnya dihidrolisis oleh enzim kolesterol esterase. Dengan bantuan enzim kolesterol oksidase, kolesterol akan dioksidasi menghasilkan hidrogen peroksida, senyawa ini selanjutnya akan mengubah 4-aminoantipirin dan phenol dengan bantuan enzim katalase peroksidase menjadi quinomine yang berwarna dan intansitasnya dapat diukur secara fotometrik.

4.8.2.2. Kolesterol LDL

Kolesterol LDL ditentukan secara enzimatik dengan metoda CHOD-PAP.⁵⁸ dengan prinsip LDL diendapkan. Supernatan yang mengandung kolesterol HDL ditetapkan dengan metode CHOD-P seperti pada penetapan kolesterol total. Konsentrasi kolesterol LDL ditentukan dengan rumus :

$$\text{Kolesterol LDL} = \text{Kolesterol total} - [\text{Kolesterol HDL} + (\text{TG}/5)]\text{mg/dl.}^{28}$$

4.8.2.3. Kolesterol HDL

Kolesterol HDL ditentukan secara enzimatik dengan metoda CHOD-PAP.⁵⁸ Prinsip metoda ini sebagai berikut : Kolesterol VLDL dan LDL diendapkan dengan reagen pengendap asam fosfotungstat dan ion magnesium. Selanjutnya supernatan yang mengandung HDL dipisahkan dengan sentrifuge, untuk selanjutnya ditetapkan kadar kolesterol HDL dengan metoda CHOD-PAP seperti pada penetapan kolesterol total.

4.8.2.4. Trigliserida

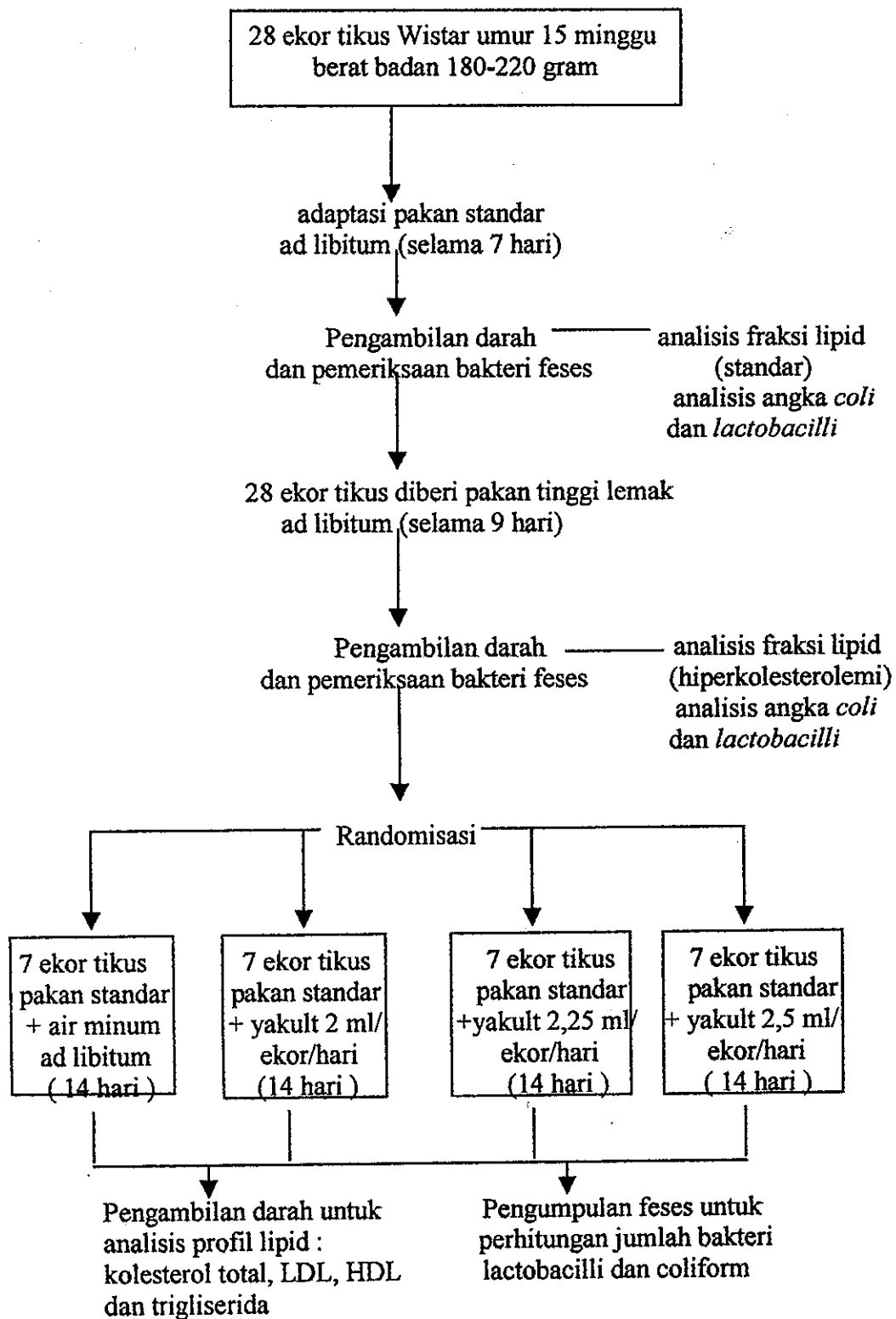
Trigliserida ditentukan secara enzimatik dengan metoda GPO-PAP.⁵⁸ Prinsip metoda ini adalah : trigliserida dihidrolisis secara enzimatik menjadi gliserol dan asam-asam lemak bebas dengan bantuan enzim lipase khusus. Gliserol yang dibebaskan kemudian akan bereaksi dengan gliserol kinase menjadi gliserol fosfat, yang selanjutnya oleh enzim gliserolphosphat oksidase akan diubah menjadi dihidroksiaseton fosfat dan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida akan bereaksi dengan chlorophenol dan 4-aminoantipirin membentuk kompleks 4-o-benzoquinonemonomine yang berwarna dan dapat diukur intensitas absorbansinya.

4.8.3. Jumlah bakteri *coliform* dan *Lactobacilli*

Jumlah bakteri *Lactobacilli* dan *coliform* pada feses tikus pada hari ke 7, 14 dan 30 dihitung. Pemeriksaan angka *coli* dan angka *Lactobacilli* dilakukan dengan prosedur sebagai berikut : sampel feses segar dikumpulkan dalam tabung test steril pada hari ke 7, 14 dan 30, selanjutnya feses ditimbang \pm 10 gram kemudian

diencerkan dalam NaCL 0,85% sebanyak 90 ml, dilakukan pengenceran hingga 10^{-7} sampel dihomogenisasi pada mikser vortex selama 4 menit. Untuk menentukan total lactobacilli, sampel feses yang telah diencerkan masing-masing ditanam di media Rogosa Agar (Oxoid) padat dengan cara menggoreskan (*surface spreadship*) menggunakan alat ose kemudian diinkubasi selama 48 jam dalam lingkungan 99% CO_2 pada suhu $37^{\circ}C$. Setelah periode inkubasi, koloni yang terpilih diberi warna untuk gram. Biasanya terdapat bentuk tidak berspora, gram positif berbentuk batang. Sedangkan untuk menentukan jumlah bakteri coliform pada feses ditentukan dengan Violet Red Bile agar (Merck) cara penanaman sama dengan lactobacilli. Plate diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^{\circ}C$. Hasilnya dilaporkan sebagai log 10/gram berat basah feses²¹. Bila bakteri *coliform* pada feses jumlahnya lebih banyak maka keberadaan *Lactobacilli* di dalam usus lebih banyak dan bakteri *coliform* dalam usus lebih sedikit begitu pula sebaliknya.

c). Alur Penelitian



Gambar 10. Diagram alur penelitian

4.9. ANALISIS DATA

4.9.1. Analisis Statistik

Data yang terkumpul dilakukan cleaning, coding dan tabulasi selanjutnya dientry ke dalam komputer dan dilakukan analisis diskriptif data. Pada analisis diskriptif, data disajikan sebagai rerata, simpang baku dan median. Sebelum dilakukan analisis lebih lanjut, dilakukan uji normalitas dengan uji *Kolmogorov Smirnov*.

Data kadar kolesterol total, kolesterol LDL dan trigliserida berdistribusi normal, sedangkan data kadar kolesterol HDL distribusinya tidak normal maka terlebih dahulu dilakukan transformasi terhadap data kadar kolesterol HDL. Selanjutnya untuk mengetahui status perubahan kadar fraksi lipid yang terjadi setelah perlakuan susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota dianalisis dengan uji t berpasangan (paired t-test). Adapun nilai perubahan kadar fraksi lipid pada masing-masing kelompok dosis perlakuan susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota dianalisis dengan analisa sidik ragam (Anova). Hasil analisis menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan, sehingga analisis dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (LSD = Least Significant Difference) pada tingkat kepercayaan 95%.

Analisis dilakukan dengan menggunakan program SPSS for Window Release 7.5.⁵⁹

4.10. Keterbatasan Penelitian

4.10.1. Penelitian ini tidak didahului oleh uji terhadap keberadaan *Lactobacillus casei* strain Shirota pada susu fermentasi sebelum perlakuan.

4.10.2. Lama waktu pemberian susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota dibatasi hanya sampai 14 hari.

4.10.3. Perubahan kadar fraksi lipid yang terjadi tidak ditunggu sampai mencapai kadar fraksi lipid seperti pada awal penelitian dilakukan.

BAB 5

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. HASIL

5.1.1. Fraksi lipid awal pada tikus percobaan

Telah dilakukan penelitian terhadap duapuluh delapan tikus putih jantan galur Wistar umur 15 minggu dengan berat badan 180-220 gram yang diberi pakan standar (AIN-93) selama 7 hari. Tikus selanjutnya dipuasakan selama 12 jam kemudian diambil sampel darahnya melalui *plexus retro orbitalis* untuk menentukan kadar kolesterol total, triglisarida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL awal sebagai ukuran kadar standar. Kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL serum darah tikus sebelum dan setelah pemberian pakan tinggi lemak disajikan pada lampiran 7.

Pemberian ransum pakan tinggi lemak tinggi kolesterol (TLTK) selama 9 hari pada 28 ekor tikus jantan galur Wistar berhasil meningkatkan kadar fraksi lipid serum darah tikus seperti yang tersaji pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Fraksi lipid darah tikus sebelum dan setelah pemberian pakan tinggi lemak (n=28).

	Sebelum (mg/dl)	Setelah (mg/dl)	t	Sig
Kolesterol total	(106,7 ± 5,65)	(150,5 ± 6,21)	27,765	0,000
Trigliserida	(132,9 ± 3,97)	(170,2 ± 4,38)	30,654	0,000
Kolesterol HDL	(66,1 ± 5,37)	(57,2 ± 5,17)	9,160	0,000
Kolesterol LDL	(13,9 ± 2,18)	(59,2 ± 8,80)	25,108	0,000

Rata-rata kadar kolesterol total, trigliserida, dan kolesterol LDL mengalami peningkatan setelah pemberian pakan tinggi lemak, tetapi kadar kolesterol HDL

menurun dan secara statistik kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL setelah pemberian pakan tinggi lemak berbeda secara signifikan dengan sebelum pemberian pakan tinggi lemak (lampiran 8).

Kolesterol, ester kolesterol, trigliserida dan fosfolipida merupakan lemak utama yang terdapat di dalam darah. Gangguan metabolisme lemak yang menimbulkan peningkatan kadar lemak darah atau hiperlipidemia sering dihubungkan dengan penyakit jantung koroner ditandai oleh adanya peningkatan kolesterol LDL dan trigliserida serta rendahnya kadar kolesterol HDL⁶⁰. Hiperkolesterolemia adalah salah satu bentuk hiperlipidemia yang sudah dikenal secara umum sebagai faktor penyebab penyakit jantung koroner.

Ada hubungan antara peningkatan kadar kolesterol LDL dengan penyakit jantung koroner. Peningkatan kolesterol kadar LDL menyebabkan aterosklerosis pada pembuluh darah perifer. Tentang kolesterol HDL, Barr (1951) yang dikutip oleh Soeparman (1987)⁶¹ menemukan pada 28 pasiennya yang menderita *infark miokard*, ternyata kadar kolesterol HDL-nya rendah. Miller dan Miller secara jelas menemukan hubungan antara kadar kolesterol HDL dan penyakit jantung koroner⁶¹. Meskipun hubungan antara penyakit jantung koroner dengan kadar kolesterol HDL yang rendah tidak diragukan lagi, tetapi belum ada bukti bahwa risiko timbulnya penyakit jantung koroner akan lebih rendah bila kadar kolesterol meningkat⁶¹.

5.1.2. Fraksi Lipid setelah pemberian susu fermentasi

Setelah ke duapuluh delapan ekor tikus mengalami hiperkolesterolemi dibagi secara acak menjadi 4 kelompok. Kelompok kontrol (SF₀) adalah kelompok tikus yang diberi pakan standar AIN-93 tanpa pemberian susu fermentasi yang

mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota ($6,5 \times 10^9$ cfu), kelompok perlakuan I (SF₁) mendapat dosis susu fermentasi 2 ml/ekor/hari, kelompok II (SF₂) mendapat dosis susu fermentasi 2,25 ml/ekor/hari, dan kelompok III (SF₃) mendapat dosis susu fermentasi 2,5 ml/ekor/hari.

Kadar kolesterol total, kolesterol LDL dan trigliserida setelah perlakuan mengalami penurunan dan kadar kolesterol HDL mengalami peningkatan. Hasil analisis statistik menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara kadar fraksi lipid darah tikus percobaan sebelum dengan setelah pemberian susu fermentasi. Data statistik fraksi lipid serum darah tikus sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi disajikan pada tabel 5.2 berikut ini.

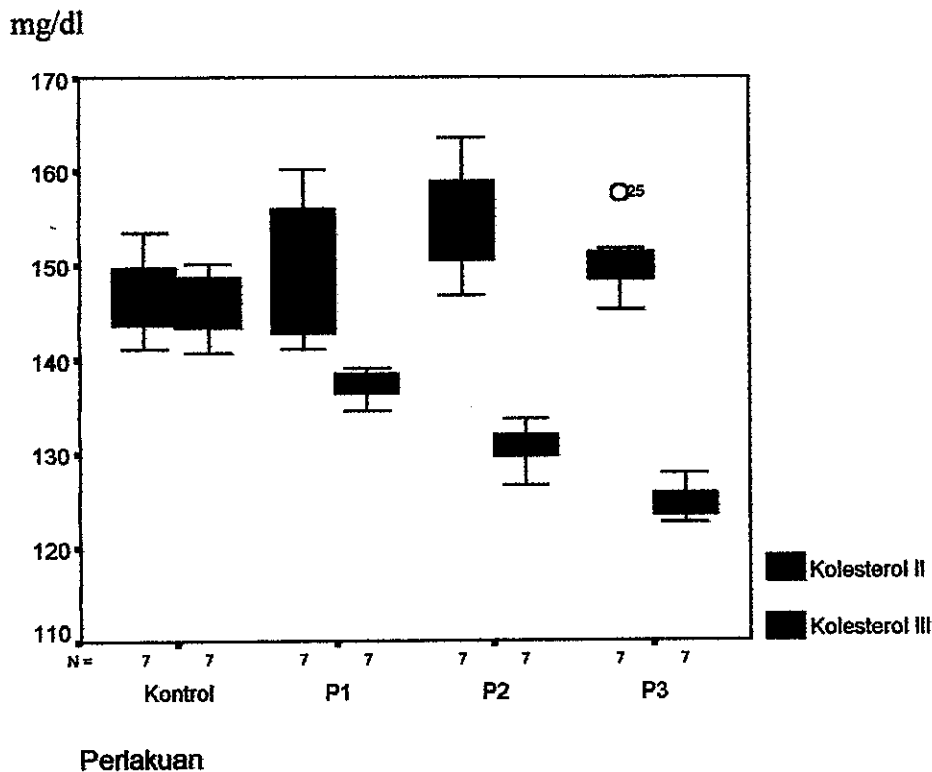
Tabel 5.2. Fraksi lipid darah tikus sebelum dan sesudah pemberian susu fermentasi (n=28).

	Sebelum (mg/dl)	Sesudah (mg/dl)	t	Sig ¹
Kolesterol total	(150,5 ± 6,21)	(134,6 ± 8,37)	7,71	0,000
Trigliserida	(170,2 ± 4,38)	(156,4 ± 8,56)	9,48	0,000
Kolesterol HDL	(57,3 ± 5,17)	(75,1 ± 5,90)	4,623	0,000
Kolesterol LDL	(59,2 ± 8,80)	(28,2 ± 12,32)	10,09	0,000

5.1.2.1. Kadar kolesterol total setelah pemberian susu fermentasi

Kadar kolesterol rata-rata serum darah tikus kelompok kontrol (SF₀) adalah (145,9 ± 3,65) mg/dl, kelompok I (SF₁), kelompok II (SF₂) dan kelompok III (SF₃) berturut-turut adalah (137,2 ± 1,64) mg/dl, (130,5 ± 2,35) mg/dl, dan (124,7 ± 1,87) mg/dl. Kadar kolesterol total rata-rata kelompok perlakuan III ini lebih rendah jika dibandingkan dengan kadar kolesterol rata-rata kelompok I dan kelompok II. Kadar

kolesterol total sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan disajikan pada gambar 5.1.



Perlakuan
 Kolesterol II = kadar kolesterol sebelum pemberian susu fermentasi
 Kolesterol III = kadar kolesterol setelah pemberian susu fermentasi
 P1 = 2 ml/ekor/hari, P2 = 2,25 ml/ekor/hari dan P3 = 2,5ml/ekor/hari

Gambar 5.1. Grafik kadar kolesterol total sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan

Analisis statistik menunjukkan perbedaan bermakna kadar kolesterol total antara kelompok III dengan kelompok I ($p=0,000$; $F= 12,48$) dan kelompok III dengan kelompok II ($p=0,000$; $F=-5,81$). Hasil analisis perbedaan kadar kolesterol total antara masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada tabel 5.3.

Secara umum, kadar kolesterol total rata-rata setelah pemberian susu fermentasi mengalami penurunan secara nyata dibandingkan kadar kolesterol tikus saat hiperkolesterolemi ($p=0,000$; $t= 7,708$), tetapi penurunan tersebut tidak sampai

mendekati kadar kolesterol total rata-rata normal, yaitu kadar kolesterol total rata-rata pada saat awal penelitian ($106,7 \pm 5,65$) mg/dl.

Tabel 5.3. Perbedaan kadar kolesterol total antara masing-masing kelompok perlakuan

Perlakuan	t	Sig
Kontrol (SF ₀)	2,432	0,051
SF ₁	5,017	0,002
SF ₂	13,721	0,000
SF ₃	28,160	0,000

SF = Susu Fermentasi

Adapun kadar kolesterol total rata-rata setelah pemberian susu fermentasi berbeda nyata dengan kadar kolesterol total rata-rata pada awal penelitian ini dilakukan ($p=0,000$; $t= 14,4$). Rerata kadar kolesterol sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi disajikan pada tabel 5.4.

Tabel 5.4. Rerata kadar kolesterol total sebelum dan sesudah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan

Kelompok	N	Sebelum (mg/dl)	Setelah (mg/dl)	delta	Sig
P ₀	7	(147,0 \pm 4,68)	(145,9 \pm 3,65) ^a	1,1	0,000
P ₁	7	(149,7 \pm 7,90)	(137,2 \pm 1,64) ^b	12,5	0,000
P ₂	7	(154,9 \pm 5,96)	(130,5 \pm 2,35) ^c	24,4	0,000
P ₃	7	(150,4 \pm 3,97)	(124,7 \pm 1,87) ^d	25,7	0,000

P₀ = kelompok kontrol

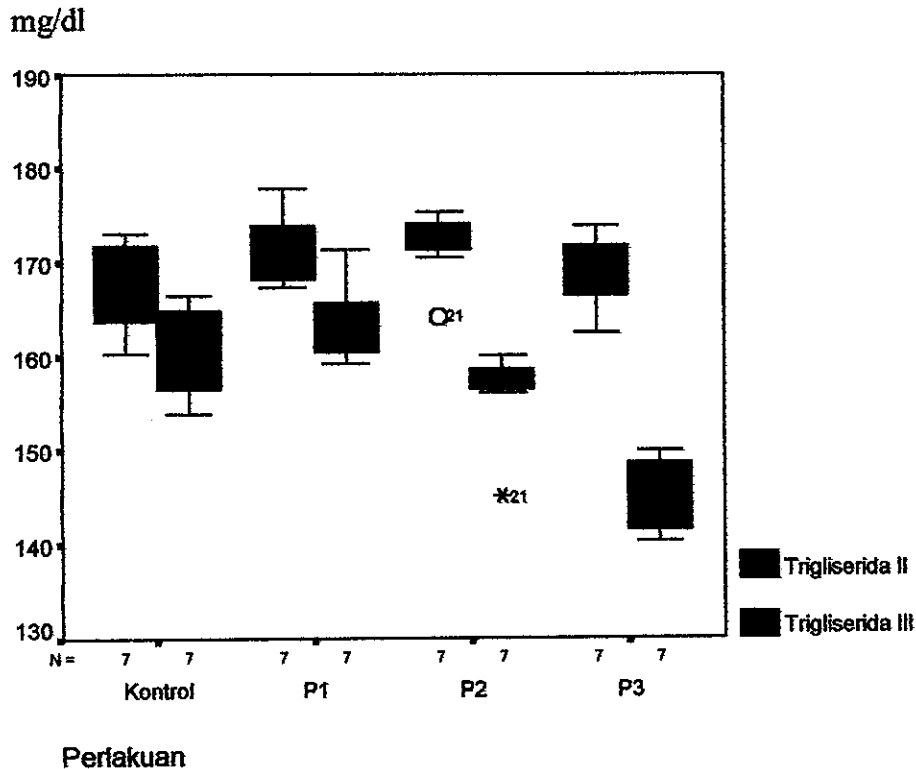
P₁, P₂, P₃ = kelompok perlakuan

^{a,b,c,d} Superskrip yang berbeda pada kolom sama, berbeda bermakna ($p<0,05$)

5.1.2.2. Kadar Triglicerida setelah pemberian susu fermentasi

Pada tikus kelompok kontrol (SF₀) yang hanya diberi pakan standar AIN-93 tanpa pemberian susu fermentasi, kadar triglicerida rata-rata serum darah tikus adalah ($160,7 \pm 5,12$) mg/dl, sedangkan kadar triglicerida rata-rata serum darah kelompok I (SF₁), kelompok II (SF₂) dan kelompok III (SF₃) berturut-turut adalah ($163,8 \pm 4,19$) mg/dl, ($156,2 \pm 5,08$) mg/dl, dan ($14,8 \pm 4,13$) mg/dl. Kadar triglicerida sebelum dan

sesudah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan disajikan pada gambar 5.2.



Perlakuan
 Triglicerida II = kadar trigliserida sebelum pemberian susu fermentasi
 Triglicerida III = kadar trigliserida setelah pemberian susu fermentasi
 P1 = 2 ml/ekor/hari, P2 = 2,25 ml/ekor/hari dan P3 = 2,5ml/ekor/hari

Gambar 5.2. Grafik kadar trigliserida sebelum dan sesudah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan

Kadar trigliserida rata-rata kelompok III berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p=0,000$; $F = 15,93$), dengan kelompok I ($p=0,00$; $F = 19,01$) dan dengan kelompok II ($p=0,000$; $F= 11,38$). Rerata Kadar trigliserida serum darah tikus kelompok I tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p=0,228$; $F = 3,07$), demikian juga kelompok II dengan kelompok kontrol ($p=0,080$; $F=4,55$). Hasil analisis perbedaan kadar kolesterol total antara masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada tabel 5.5.

Tabel 5.5. Perbedaan kadar trigliserida antara masing-masing kelompok perlakuan

Perlakuan	t	Sig
Kontrol (SF ₀)	22,426	0,000
SF ₁	32,367	0,000
SF ₂	26,854	0,000
SF ₃	11,011	0,000

SF = Susu Fermentasi

Kadar trigliserida rata-rata setelah pemberian susu fermentasi mengalami penurunan nyata dibandingkan dengan kadar trigliserida tikus pada saat hiperkolesterolemi ($p=0,000$, $t = 9,48$), tetapi penurunan tersebut tidak sampai mendekati kadar trigliserida rata-rata normal, yaitu kadar trigliserida rata-rata pada saat awal penelitian ($132,9 \pm 3,97$) mg/dl. Kadar trigliserida rata-rata setelah pemberian susu fermentasi berbeda nyata dengan kadar trigliserida rata-rata pada awal penelitian ($p=0,000$; $t= 13,2$). Rerata kadar trigliserida sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi disajikan pada tabel 5.6.

Tabel 5.6. Rerata kadar trigliserida sebelum dan sesudah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan

Kelompok	N	Sebelum (mg/dl)	Setelah (mg/dl)	delta	Sig
P ₀	7	(167,9 ± 5,12)	(160,7 ± 5,12) ^a	7,2	0,000
P ₁	7	(171,5 ± 3,82)	(163,8 ± 4,19) ^a	7,7	0,000
P ₂	7	(172,1 ± 3,79)	(156,2 ± 5,08) ^a	15,9	0,000
P ₃	7	(169,2 ± 4,16)	(144,8 ± 4,13) ^b	24,4	0,000

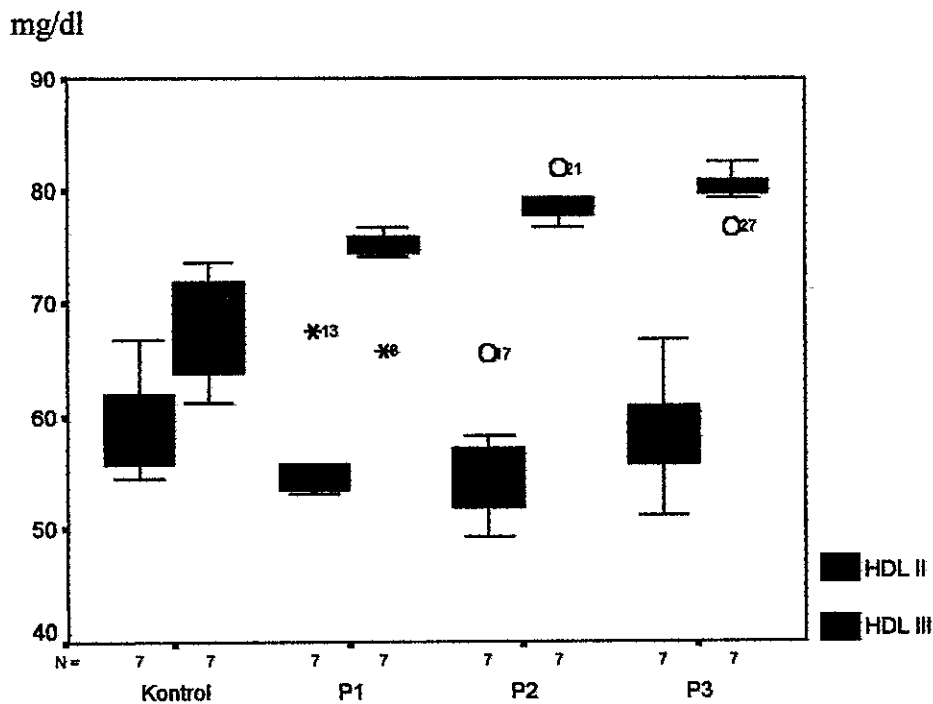
P₀ = kelompok kontrol

P₁, P₂, P₃ = kelompok perlakuan

^{a,b} Superskrip yang berbeda pada kolom sama, beda nyata ($p<0,05$)

5.1.2.3. Kadar kolesterol HDL setelah pemberian susu fermentasi

Kadar kolesterol HDL setelah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan disajikan pada gambar 5.3.



Periakuan

HDL II = kadar kolesterol HDL sebelum pemberian susu fermentasi
 HDL III = kadar kolesterol HDL setelah pemberian susu fermentasi
 P1 = 2 ml/ekor/hari, P2 = 2,25 ml/ekor/hari dan P3 = 2,5ml/ekor/hari

Gambar 5.3. Grafik kadar kolesterol HDL sebelum dan sesudah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan

Pada tikus kelompok kontrol (SF_0) yang hanya diberi pakan standar AIN-93 tanpa pemberian susu fermentasi, kadar kolesterol HDL rata-rata serum darah tikus adalah $(67,6 \pm 4,91)$ mg/dl, sedangkan kadar kolesterol HDL serum darah rata-rata kelompok I (SF_1), kelompok II (SF_2) dan kelompok III (SF_3) berturut-turut adalah $(74,0 \pm 3,72)$ mg/dl, $(78,8 \pm 1,69)$ mg/dl, dan $(80,1 \pm 1,80)$ mg/dl. Kadar kolesterol HDL rata-rata kelompok III lebih tinggi jika dibandingkan dengan kadar kolesterol rata-rata kelompok Kontrol, kelompok I dan kelompok II ($p=0,000$; $F=20,5$). Kadar kolesterol HDL rata-rata kelompok I berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p=0,001$; $F=6,45$), dengan kelompok II ($p=0,012$; $F=4,79$) dan dengan kelompok III

($p=0,002$; $F=6,08$). Kadar kolesterol HDL kelompok II berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p=0,000$; $F=11,24$), tetapi tidak berbeda bermakna dengan kelompok III ($p=0,473$; $F= 1,29$). Hasil analisis perbedaan kadar kolesterol total antara masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada tabel 5.7.

Tabel 5.7. Perbedaan kadar kolesterol HDL antara masing-masing kelompok perlakuan

Perlakuan	t	Sig
Kontrol (SF ₀)	18,083	0,000
SF ₁	27,312	0,000
SF ₂	61,144	0,000
SF ₃	58,602	0,000

SF = Susu Fermentasi

Kadar kolesterol HDL rata-rata setelah pemberian susu fermentasi mengalami peningkatan secara nyata dibandingkan dengan kadar kolesterol HDL tikus pada saat hiperkolesterolemi ($p=0,000$; $t=12,136$), dan peningkatan tersebut kembali mendekati pada kadar kolesterol HDL rata-rata normal, yaitu kadar kolesterol HDL rata-rata saat awal penelitian ($66,1 \pm 5,37$) mg/dl. Kadar kolesterol HDL rata-rata setelah pemberian susu fermentasi berbeda bermakna dengan kadar kolesterol HDL rata-rata pada awal penelitian ini dilakukan ($p=0,000$; $t=5,994$). Rerata kadar kolesterol HDL sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi disajikan pada tabel 5.8.

Tabel 5.8. Rerata kadar kolesterol HDL sebelum dan sesudah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan ($n=28$)

Kelompok	N	Sebelum (mg/dl)	Setelah (mg/dl)	delta	Sig
P ₀	7	(59,2 ± 4,74)	(67,6 ± 4,91) ^a	8,4	0,000
P ₁	7	(56,3 ± 5,09)	(74,0 ± 3,72) ^b	17,7	0,000
P ₂	7	(55,3 ± 5,40)	(78,8 ± 1,69) ^c	23,5	0,000
P ₃	7	(58,4 ± 5,57)	(80,1 ± 1,80) ^c	21,7	0,000

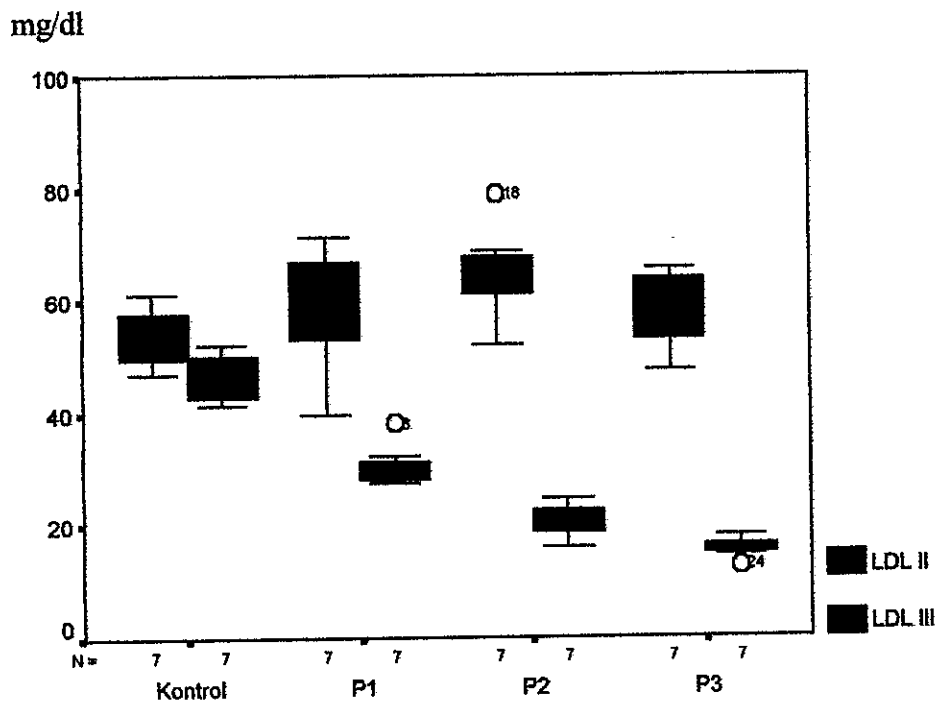
P₀ = kelompok kontrol

P₁, P₂, P₃ = kelompok perlakuan

^{a,b,c} Superskrip yang berbeda pada kolom sama, beda nyata ($p<0,05$)

5.1.2.4. Kadar kolesterol LDL setelah pemberian susu fermentasi

Kadar kolesterol LDL setelah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan disajikan pada gambar 5.4.



Perlakuan

LDL II = kadar kolesterol LDL sebelum pemberian susu fermentasi
 LDL III = kadar kolesterol LDL setelah pemberian susu fermentasi
 P1 = 2 ml/ekor/hari, P2 = 2,25 ml/ekor/hari dan P3 = 2,5ml/ekor/hari

Gambar 5.4. Grafik kadar kolesterol LDL sebelum dan sesudah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan

Pada tikus kelompok kontrol (SF_0) yang hanya diberi pakan standar AIN-93 tanpa pemberian susu fermentasi. Kadar kolesterol LDL rata-rata serum darah tikus adalah $(46,2 \pm 4,45)$ mg/dl, sedangkan kadar kolesterol LDL serum darah rata-rata kelompok I (SF_1), kelompok II (SF_2) dan kelompok III (SF_3) berturut-turut adalah $(30,4 \pm 3,85)$ mg/dl, $(20,5 \pm 3,11)$ mg/dl, dan $(15,7 \pm 1,78)$ mg/dl. Kadar kolesterol

LDL rata-rata kelompok III lebih rendah secara bermakna jika dibandingkan dengan kadar kolesterol LDL rata-rata kelompok kontrol, kelompok I dan kelompok II. Kadar kolesterol LDL rata-rata kelompok I berbeda nyata dengan kelompok kontrol ($p=0,000$; $F=15,76$), dengan kelompok II ($p=0,000$; $F=9,93$) dan dengan kelompok III ($p=0,000$; $F=14,76$). Hasil analisis perbedaan kadar kolesterol total antara masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada tabel 5.9.

Tabel 5.9. Perbedaan kadar kolesterol LDL antara masing-masing kelompok perlakuan

Perlakuan	t	Sig
Kontrol (SF ₀)	5,108	0,002
SF ₁	8,58	0,000
SF ₂	20,752	0,000
SF ₃	14,393	0,000

SF = Susu Fermentasi

Kadar kolesterol LDL rata-rata kelompok II berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p=0,000$; $F=25,69$) dan dengan kelompok III ($p=0,015$; $F=4,82$).

Kadar kolesterol LDL rata-rata setelah pemberian susu fermentasi mengalami penurunan bermakna dibandingkan dengan kadar kolesterol LDL tikus pada saat hiperkolesterolemi ($p=0,000$; $t = 10,09$). Pada pemberian susu fermentasi dosis 2 ml/ekor/hari dan 2,25 ml/ekor/hari penurunan yang terjadi tidak sampai mendekati normal, sedangkan pada pemberian susu fermentasi dosis 2,5 ml/ekor/hari penurunan kadar kolesterol LDL rata-rata ($15,7 \pm 1,78$) mg/dl mendekati kadar kolesterol LDL rata-rata normal, yaitu kadar kolesterol LDL pada saat awal penelitian ($13,9 \pm 2,18$) mg/dl. Adapun kadar kolesterol LDL rata-rata setelah pemberian susu fermentasi berbeda bermakna dengan kadar kolesterol LDL rata-rata pada awal penelitian ini dilakukan ($p=0,000$; $t = 5,92$). Rerata kadar kolesterol LDL sebelum dan sesudah pemberian susu fermentasi disajikan pada tabel 5.10.

Tabel 5.10. Rerata kadar kolesterol LDL sebelum dan sesudah pemberian susu fermentasi pada keempat kelompok tikus percobaan (n=28)

Kelompok	N	Sebelum (mg/dl)	Setelah (mg/dl)	delta	Sig
P ₀	7	(54,2 ± 5,41)	(46,2 ± 4,44) ^a	8	0,000
P ₁	7	(59,1 ± 11,17)	(30,4 ± 3,85) ^b	28,7	0,000
P ₂	7	(65,3 ± 8,38)	(20,5 ± 3,11) ^c	44,8	0,000
P ₃	7	(58,3 ± 7,20)	(15,7 ± 1,78) ^d	42,6	0,000

P₀ = kelompok kontrol

P₁, P₂, P₃ = kelompok perlakuan

^{a,b,c,d} Superskrip yang berbeda pada kolom sama, berbeda bermakna (p<0,05)

5.1.6. Angka *E. Coli* dan *Lactobacilli* pada feses tikus percobaan

Angka coli dan lactobacilli ditentukan untuk melihat banyaknya bakteri yang terdapat pada feses tikus percobaan baik pada awal percobaan, setelah perlakuan pakan tinggi lemak maupun setelah pemberian susu fermentasi, karena komposisi bakteri dalam feses bisa menjadi indikator keberadaan bakteri di dalam usus dapat sebagai indikator kesehatan seseorang. Data angka coli dan angka lactobacilli pada awal percobaan, setelah pemberian pakan tinggi lemak, dan setelah pemberian susu fermentasi disajikan pada tabel 5.7.

Tabel 5.11. Angka *coli* dan *lactobacilli* pada awal percobaan, hiperkolesterolemi dan setelah pemberian susu fermentasi (sel/gram)

Angka bakteri	Awal (sel/gram)	TLTK (sel/gram)	Setelah (sel/gram)			
			SF ₀	SF ₁	SF ₂	SF ₃
<i>E. coli</i>	6.1 x 10 ⁷	3.6 x 10 ⁷	4.5 x 10 ⁷	4.0 x 10 ⁷	6.4 x 10 ⁷	5.3 x 10 ⁷
<i>lactobacilli</i>	2.4 x 10 ⁷	7000	6.3 x 10 ⁴	4.7 x 10 ⁷	8.0 x 10 ⁷	8.1 x 10 ⁷

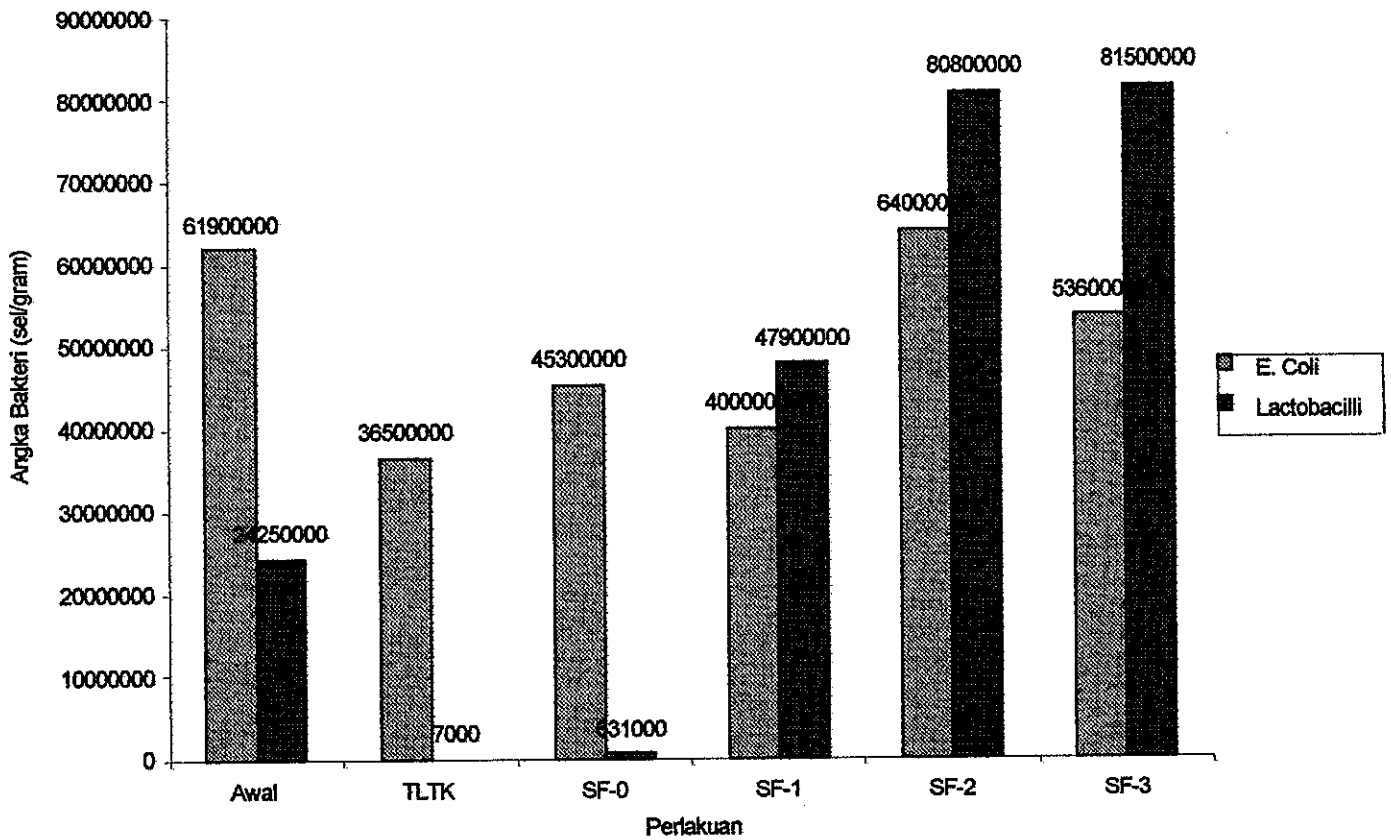
TLTK = Tinggi Lemak Tinggi Kolesterol

SF = susu fermentasi

Angka *E coli* sebelum pemberian pakan tinggi lemak (awal percobaan) lebih tinggi daripada angka *lactobacilli*. Setelah pemberian pakan tinggi lemak angka *E coli* semakin meningkat sedangkan angka *lactobacilli* mengalami penurunan yang tajam. Pada akhir percobaan, setelah pemberian susu fermentasi angka *E coli* lebih besar

daripada angka *lactobacilli* pada kelompok kontrol (SF-0), sedangkan pada kelompok perlakuan SF-1, SF-2 dan SF-3 angka *E. coli* lebih rendah daripada angka *lactobacilli*. Grafik angka *coli* dan *lactobacilli* sebelum dan setelah perlakuan susu fermentasi disajikan pada gambar 5.5.

Grafik Angka E. Coli dan Lactobacilli



Gambar 5.5. Grafik angka *coli* dan *lactobacilli* sebelum dan setelah pemberian susu fermentasi.

5.2 Pembahasan

5.2.1. Fraksi Lipid Awal

Pada tahap awal penelitian, tikus normal yang dibebani dengan pakan tinggi lemak tinggi kolesterol mengalami peningkatan kadar fraksi lipid yang meliputi kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol LDL dan penurunan kolesterol HDL pada sembilan hari setelah perlakuan dan terdapat perbedaan yang signifikan dengan kadar fraksi lipid awal sebelum perlakuan pakan tinggi lemak (lampiran 9), sehingga dapat disimpulkan bahwa pakan tinggi lemak yang mempunyai kandungan energi 5087,9 dan 18% lemak sapi dan 10% kolesterol murni (lampiran 6) mempengaruhi perubahan kadar fraksi lipid serum darah tikus.

Pemberian pakan tinggi lemak selama 9 hari pada penelitian ini meningkatkan kadar kolesterol total. Hasil ini sesuai dengan laporan penelitian Purnamaningsih (1998)⁶² yang menyatakan bahwa tikus yang diberi pakan tinggi lemak tinggi kolesterol (TLTK) dapat menyebabkan kenaikan kadar kolesterol. Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Quintao yang disitasi oleh Kaplan (1979)⁶³ bahwa pemberian diet dengan kandungan tinggi kolesterol dapat menyebabkan peningkatan kadar kolesterol total.

Kadar trigliserida pada penelitian ini mengalami peningkatan, hal ini sesuai dengan hasil penelitian Rukmi (1999).⁶⁴ Asam lemak tak jenuh ganda menyebabkan penurunan kadar trigliserida, sedangkan asam lemak tak jenuh tunggal secara umum tidak menyebabkan peningkatan trigliserida. Asam lemak jenuh akan meningkatkan kadar trigliserida dalam darah.⁶⁵ Hasil penelitian ini mendukung pendapat tersebut,

meskipun mekanisme spesifik pengaruh lemak jenuh dan tidak jenuh terhadap kolesterol serum belum diketahui secara pasti.

Penurunan kadar HDL dalam penelitian ini kemungkinan berhubungan dengan metabolisme lipoprotein yang kaya trigliserida yaitu kilomikron dan VLDL. Seperti penelitian Sheperd dan kawan-kawan yang disitasi oleh Eastwood (1987)⁶⁶ bahwa asam lemak jenuh ganda menyebabkan penurunan HDL dengan cara menekan sintesis HDL melalui penurunan kadar apoprotein A-I yang merupakan prekursor untuk pembentukan HDL. Hal ini juga dijelaskan oleh Rudel dan Park yang disitasi oleh Eastwood (1987)⁶⁶ bahwa asam lemak jenuh akan menghasilkan kilomikron dengan ukuran lebih kecil dan permukaannya mempunyai kemampuan lebih besar untuk membawa material inti apoprotein A-I yang merupakan prekursor pembentukan HDL.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan peningkatan kolesterol LDL, sesuai dengan pendapat beberapa peneliti bahwa pemberian diet yang mengandung kolesterol tinggi atau diet dengan kolesterol yang banyak diberikan bersama-sama dengan adanya lemak jenuh akan meningkatkan kolesterol LDL.⁶⁵

5.2.2 Angka bakteri *E. coli* dan *lactobacilli*

Angka *E. Coli* (6.1×10^7) pada saat sebelum pemberian pakan tinggi lemak jumlahnya lebih tinggi daripada angka *lactobacilli* (2.4×10^7) sedangkan pada kondisi normal (sehat) angka *E coli* lebih rendah dari angka *lactobacilli*. Tingginya angka *E coli* tersebut kemungkinan adalah karena angka yang dihitung bukan hanya angka *E. coli* saja, tetapi dihitung pula spesies bakteri yang lain karena pada awal pengenceran biasanya bakteri yang sifat dan media hidupnya sama dengan *E. coli*

bisa ikut pula terhitung. Dua atau bahkan lebih spesies yang ikut terhitung sehingga perhitungan awal merupakan perhitungan angka kuman, tetapi hal ini dapat diabaikan karena pada awal penelitian kenyataannya secara keseluruhan spesies bakteri selain *E coli* ikut pula terhitung dan tidak mempengaruhi hasil penelitian karena masih tahap awal penelitian, belum dilakukan perlakuan.

Pada tikus percobaan yang diberi pakan tinggi lemak tinggi kolesterol (TLTK) jumlah bakteri *coliform* feses (angka *coli*) meningkat dan jumlah bakteri *lactobacilli* (angka *lactobacilli*) menurun, kemungkinan jumlah bakteri coliform dalam usus juga meningkat. Populasi bakteri dalam ekosistem saluran pencernaan dengan konsumsi diet berimbang umumnya stabil, tetapi pemberian pakan tinggi lemak dapat mengubah stabilitas ekosistem tersebut.⁶⁷ Diet adalah faktor utama penentu komposisi bakteri usus, oleh karena itu penurunan angka *lactobacilli* dan peningkatan angka *coli* berhubungan dengan pemberian pakan tinggi lemak tinggi kolesterol ini.. Penelitian membuktikan bahwa populasi bakteri *E. coli*, *Vibrio cholera* atau *Salmonella* dalam feses pengonsumsi diet tinggi lemak dan rendah serat lebih tinggi dibanding feses pengonsumsi rendah lemak dan lebih banyak serat (sayuran).⁶⁸

Kemungkinan terjadinya penurunan bakteri *lactobacilli* adalah karena berkurangnya serat sebagai nutrisi bakteri *lactobacilli*, sedangkan bakteri *E. coli* tidak menyukai nutrisi jenis serat.⁶⁷ Serat yang berkurang jumlahnya sebagai nutrisi bagi bakteri *lactobacilli* menyebabkan kemampuan *lactobacilli* untuk dapat berkembang terhambat, sehingga proporsi bakteri *lactobacilli* jumlahnya berkurang dan proporsi bakteri *coli* jumlahnya meningkat.

5.2.3. Fraksi Lipid Setelah Pemberian Susu Fermentasi

Pada pemberian susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota terjadi perubahan fraksi lipid tikus percobaan yaitu penurunan kolesterol total, penurunan trigliserida, peningkatan kolesterol HDL dan penurunan kolesterol LDL serum darah tikus hiperkolesterolemi serta terjadi peningkatan angka *lactobacilli* pada feses dan penurunan angka *E. coli* pada feses.

5.2.3.1. Kadar Kolesterol Total

Kadar kolesterol total serum darah tikus setelah pemberian susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota selama 14 hari ternyata berhasil menurunkan kadar kolesterol total. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Usman dan Hosono (2000)²¹ yang menyatakan bahwa suplementasi susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus gasseri* SBT 0270 dalam pakan menurunkan kadar kolesterol total, kolesterol LDL dan trigliserida.

Pada semua perlakuan susu fermentasi terjadi penurunan tersebut dan secara statistik terdapat perbedaan nyata pada keempat kelompok perlakuan (lampiran 8). Pada kelompok kontrol (SF-0) meskipun tidak diberi susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota juga mengalami penurunan kadar kolesterol total. Hal ini kemungkinan disebabkan menurunnya konsumsi pakan yang mengandung tinggi lemak tinggi kolesterol, karena pada periode ini tikus kembali diberi pakan standar AIN-93. Pada perlakuan SF-1 (2ml/ekor/hari susus fermentasi), SF-2 (2,25 ml/ekor/hari susu fermentasi) dan SF-3 (2,5 ml/ekor/hari susu fermentasi) terjadi penurunan kadar kolesterol total serum darah berbeda signifikan ($p=0,000$;

F=92,715). Penurunan terbanyak terjadi pada perlakuan SF-3 (17,1%) diikuti SF-2 (15,75%) dan SF-1 (8,37%).

Penurunan kadar kolesterol darah tersebut kemungkinan disebabkan oleh kemampuan bakteri *Lactobacillus casei* strain Shirota dalam mengasimilasi kolesterol. Pada mekanisme asimilasi kolesterol, *Lactobacillus casei* strain Shirota akan mengambil atau mengabsorpsi kolesterol dan lebih lanjut kolesterol akan bergabung menjadi satu pada membran seluler bakteri, sehingga bakteri lebih tahan terhadap lisis. Akibat penurunan absorpsi kolesterol diet dari sistem pencernaan, maka kadar kolesterol di dalam darah juga mengalami penurunan. Beberapa penelitian sebelumnya mendapatkan bahwa *Lactobacillus acidophilus* mampu mengasimilasi kolesterol sekitar 20,5 µg/ml sampai 103,9 µg/ml.^{42,44} Mekanisme lain yang mungkin terjadi adalah aktivitas dekonjugasi oleh *Lactobacillus casei* strain Shirota. Kemungkinan ini didukung oleh penelitian Gilliland and Speck (1977)²² yang meneliti aktivitas dekonjugasi beberapa bakteri yang berasal dari feses. *L. casei* dan *L. plantarum* mampu mendekongugasi glycocholat, sedangkan *L. acidophilus* mampu mendekongugasi glycocholat dan taurocholat. Kemampuan bakteri asam laktat dalam dekonjugasi garam empedu berhubungan erat dengan aktivitas enzim *bile salt hidrolase*. Tannock *et al* (1989)⁴⁷ mengamati beberapa strain *Lactobacillus* yang memiliki aktivitas *bile salt hidrolase* seperti *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis* dan *L. fermentum* diduga aktivitas ini dikode oleh plasmid, yaitu merupakan DNA (penentu sifat organisme) ekstra kromosom pada bakteri.

Dari dua karakterisitk spesifik tersebut ternyata kemampuan dekonjugasi garam empedu lebih dominan dibanding kemampuan mengasimilasi kolesterol. Di

dalam tubuh kemampuan mengasimilasi kolesterol terkait dengan kolesterol yang berasal dari luar tubuh (kolesterol diet), sedangkan dalam dekonjugasi garam empedu jenis kolesterol yang berkaitan erat adalah kolesterol yang disintesis oleh tubuh.

Degradasi kolesterol dan hilang setiap hari dari tubuh pada prinsipnya terjadi melalui empedu. Walaupun kolesterol dan asam empedu yang disintesis di hati dan dialirkan ke kantung empedu disekresikan ke usus sebagian besar diserap kembali. Kolesterol yang dikeluarkan melalui feses cukup banyak dibanding produksi dan/atau penyerapan makanan setiap hari.

Hasil penelitian menunjukkan penurunan kadar kolesterol total akibat pemberian susu fermentasi selama 14 hari pada tikus percobaan tidak mencapai kadar normal atau kadar kolesterol total awal. Kemungkinan untuk menurunkan kolesterol hingga kadar awal perlu waktu lebih lama. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Agustina (2002)⁵⁶ bahwa untuk memperoleh manfaat optimal perlu mengkonsumsi probiotik terus menerus, sedangkan pada penelitian ini konsumsi susu fermentasi hanya diberikan dalam waktu terbatas (14 hari).

5.2.3.2. Kadar Trigliserida

Kadar trigliserida dalam serum darah tikus setelah pemberian susu fermentasi pada semua perlakuan mengalami penurunan. Secara statistik penurunan tersebut tidak berbeda nyata antara kelompok kontrol (SF-0) dengan kelompok perlakuan I (SF-1) dan kelompok kontrol (SF-0) dengan kelompok perlakuan II (SF-2). Kelompok perlakuan SF-3 menurunkan kadar trigliserida, secara statistik berbeda nyata dengan ketiga kelompok perlakuan tersebut. Penurunan terbanyak terjadi pada perlakuan SF-3 (2,5, ml/ekor/hari) sebesar 24,37 mg/dl (14,41%).

Oleh karena penurunan kadar trigliserida pada kelompok SF-1 (2 ml/ekor/hari susu fermentasi) dan kelompok perlakuan SF-2 (2,25 ml/ekor/hari susu fermentasi) tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol (tanpa susu fermentasi), maka dapat dikatakan pemberian susu fermentasi 2 ml/ekor/hari dan 2,25 ml/ekor/hari tidak berpengaruh terhadap kadar trigliserida serum darah tikus. Hasil ini mendukung pendapat Danielson *et al* (1989)¹⁶ dan Akalin *et al* (1997).¹⁹ Penurunan kadar trigliserida ini kemungkinan disebabkan menurunnya konsumsi pakan yang mengandung tinggi lemak tinggi kolesterol. Asam lemak tak jenuh ganda menyebabkan penurunan kadar trigliserida, sedangkan asam lemak tak jenuh tunggal pada umumnya tidak menyebabkan peningkatan trigliserida.⁶⁵

Trigliserida adalah lemak utama dalam makanan manusia.²⁸ Sel epitel usus mengemas trigliserida yang berasal dari lemak makanan menjadi kilomikron dan mensekresikannya melalui limfe ke dalam darah. Oleh karena itu bila asupan lemak sedikit maka trigliserida yang disekresi ke dalam darah juga sedikit sehingga kadar trigliserida di dalam serum darah lebih rendah dibanding saat tikus diberi pakan tinggi lemak. Penurunan kadar kolesterol total dan kadar trigliserida berkaitan dengan penurunan LDL. LDL merupakan hasil sisa metabolisme VLDL yang melepaskan trigliserida dan kerapatannya berkurang sehingga secara bertahap berubah menjadi LDL.⁶⁹

5.2.3.3 Kadar kolesterol HDL

Kadar kolesterol HDL setelah pemberian susu fermentasi *L. casei* strain Shirota mengalami peningkatan bermakna dibanding kadar kolesterol HDL pada saat tikus percobaan diberi pakan tinggi lemak dan tinggi kolesterol. Peningkatan kadar

kolesterol HDL pada keempat kelompok perlakuan juga berbeda bermakna. Uji lanjut dengan Beda Nyata terkecil (LSD) menunjukkan bahwa perlakuan SF-2 (2,25 ml/ekor/hari susu fermentasi) tidak berbeda nyata dengan perlakuan SF-3 (2,5 ml/ekor/hari). Pemberian susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota 2 ml/ekor/hari menyebabkan peningkatan kadar kolesterol HDL sebesar 14,12%, sedangkan dosis 2,25ml/ekor/hari menyebabkan peningkatan kadar kolesterol HDL sebesar 42,57% dan dosis 2,5 ml/ekor/hari sebesar 37,23%. Hasil ini berbeda dengan penelitian Danielson *et al* (1992)¹⁶ yang menyatakan bahwa pemberian yoghurt *acidophilus* setelah lebih dari 8 minggu tidak berpengaruh pada kadar kolesterol HDL serum dan Akalin *et al* (1997)¹⁹ yang menyatakan bahwa pemberian yogurt yang mengandung *Lactobacillus acidophilus* secara nyata menurunkan kolesterol total tetapi tidak berpengaruh pada kolesterol HDL. Perbedaan hasil tersebut kemungkinan karena perbedaan strain *Lactobacillus* yang digunakan dan waktu/lama pemberian susu fermentasi. Kemungkinan lain, karena tidak diberikan pakan tinggi lemak tinggi kolesterol pada pakan tikus percobaan. Sebagaimana diketahui bahwa asam lemak jenuh ganda menyebabkan penurunan kadar apoprotein A-I yang dapat menekan sintesis HDL sehingga bila konsumsi asam lemak jenuh ganda ditiadakan/berkurang maka kadar apoprotein A-I meningkat dan memacu sintesis HDL. Passwater (1997) yang dikutip oleh Kusmiyati (2000)⁷⁰ menyebutkan bahwa kenaikan HDL kemungkinan disebabkan kenaikan apoprotein A-I yang merupakan prekursor untuk pembentukan HDL dengan mekanisme yang belum diketahui dengan jelas.

5.2.3.4. Kadar kolesterol LDL

Pemberian susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota ternyata mampu menurunkan kadar kolesterol LDL secara signifikan pada keempat kelompok perlakuan. Pada perlakuan SF-0 terjadi penurunan kadar kolesterol LDL sebesar 14,79%. Penurunan kadar kolesterol LDL ini kemungkinan akibat dari penurunan kadar kolesterol total (0,75%), mengingat LDL merupakan lipoprotein berdensitas rendah yang mengandung kolesterol dan ester kolesterol dalam konsentrasi tinggi.²⁸ Oleh karena itu bila kadar kolesterol total dalam serum rendah maka kadar kolesterol LDL dalam serum juga rendah.

Hasil penelitian ini mendukung penelitian yang dilakukan oleh Usman dan Hosono (2000)²¹ yang menyatakan bahwa suplementasi susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus gasseri* SBT 0270 menurunkan kadar kolesterol LDL. Hasil ini juga sesuai penelitian Akalin et al (1997)¹⁹ menunjukkan penurunan kadar kolesterol LDL secara signifikan setelah pemberian yogurt acidophilus pada hari ke 28 dan 56.

5.2.4. Angka *E. Coli* dan Angka *Lactobacilli* pada feses

Pada pemberian susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota pada tikus percobaan, angka *E. coli* pada feses mengalami penurunan dan angka *lactobacilli* mengalami peningkatan. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa secara in vivo jumlah *lactobacillus* mengalami peningkatan dengan adanya penambahan *lactobacillus casei* strain Shirota. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Usman dan Hososno (2000)²¹ dan Akalin et al (1997).¹⁹ Lambung hanya mengandung bakteri yang tahan terhadap

asam, sebagaimana diketahui pH atau keasaman lambung sangat rendah, sekitar 1,7 dan jumlah bakteri asam laktat yang bisa bertahan dalam jumlah sedikit (10^3 cfu/ml asam lambung). Di dalam usus didapatkan 400 jenis bakteri yang merupakan populasi normal. Konsentrasi bakteri meningkat sepanjang usus, di dalam kolon mencapai 10^{12} cfu/gram⁵³ dan bakteri asam laktat jumlahnya sekitar 10^4 - 10^9 cfu, karena itu sepertiga berat feses mengandung bakteri baik hidup maupun mati.⁷

Pemberian susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota menyebabkan proporsi bakteri *lactobacilli* lebih banyak dibandingkan jumlah bakteri *E. coli*. Bakteri asam laktat juga menghasilkan senyawa hasil metabolisme yang bersifat antimikroba bagi bakteri *E. coli*.⁶⁹ Oleh karena itu setelah pemberian susu fermentasi *L. casei*, feses tikus percobaan mengandung *lactobacillus* lebih banyak dibandingkan *E. coli*.

Adapun mekanisme bakteri asam laktat sebagai probiotik dalam mencegah invasi dan kolonisasi dari mikroorganisme patogen adalah melalui kompetisi dalam nutrisi dan ruangan, menghambat bakteri patogen dengan cara mempertahankan pH permukaan usus, menghasilkan hidrogen peroksida yaitu antagonis bakteri patogen dan memproduksi zat antibioma mikrosin (Agustina, 2002).⁵⁶

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. KESIMPULAN

Pengaruh pemberian susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota pada tikus putih jantan galur Wistar dosis 2 ml/ekor/hari, 2,25 ml/ekor/hari dan 2,5 ml/ekor/hari satu kali sehari selama 14 hari sebagai berikut :

1. Menurunkan kadar kolesterol total serum darah tikus hiperkolesterolemi secara bermakna.
2. Menurunkan kadar kolesterol LDL serum darah tikus hiperkolesterolemi secara bermakna.
3. Meningkatkan kadar kolesterol HDL serum darah tikus hiperkolesterolemi secara bermakna.
4. Menurunkan jumlah *coliform* dan meningkatkan jumlah *lactobacilli* pada feses tikus percobaan.

Pengaruh pemberian susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota pada tikus putih jantan galur Wistar dengan dosis 2,5ml/ekor/hari selama 14 hari sebagai berikut :

1. Menurunkan kadar trigliserida serum darah tikus hiperkolesterolemi secara bermakna.
2. Menurunkan kadar kolesterol LDL serum darah tikus hiperkolesterolemi mendekati kadar pada awal penelitian.

6.2. SARAN-SARAN

Beberapa saran yang dapat dikemukakan mengacu pada pengalaman selama penelitian dan berdasar hasil penelitian ini antara lain :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota terhadap perubahan kadar fraksi lipid serum tikus hiperkolesterolemi dengan dosis 2,5 ml/ekor/hari dalam jangka waktu pemberian lebih lama (lebih dari 14 hari) untuk memperoleh hasil perubahan kadar fraksi lipid normal.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut penggunaan susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota pada manusia dengan dosis 150 ml/hari (setara dengan 2,5 ml/ekor/hari pada tikus percobaan) untuk melihat apakah memberikan efek yang sama seperti pada tikus percobaan.

BAB 7

RINGKASAN

Penyakit Jantung Koroner (PJK) merupakan salah satu penyebab utama kematian di beberapa negara berkembang. Penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa tingginya kolesterol total dan kolesterol LDL serum berisiko tinggi berkembangnya penyakit jantung koroner. Penelitian telah banyak dilakukan untuk menentukan faktor-faktor yang efektif menurunkan konsentrasi kolesterol serum, antara lain modifikasi diet dan penggunaan obat-obatan dan produk makanan yang berpotensi mengontrol hiperkolesterolemi pada manusia saat ini terus dikembangkan. Produk pangan probiotik yang menguntungkan semakin diminati oleh konsumen dan produsen seiring dengan munculnya kesadaran masyarakat tentang kesehatan. Beberapa tahun terakhir ini telah diketahui bahwa produk pangan yang mengandung bakteri asam laktat (BAL) mampu menurunkan kolesterol serum pada manusia dan hewan coba secara alami. Terdapat berbagai macam strain bakteri asam laktat, sehingga permasalahan yang muncul adalah Apakah bakteri asam laktat *Lactobacillus casei* strain Shirota dalam produk susu fermentasi berpengaruh terhadap perubahan fraksi lipid tikus hiperkolesterolemi terutama pada penurunan kolesterol total dan kolesterol LDL.

Telah dilakukan penelitian secara *in vivo* pada tikus putih jantan galur Wistar di laboratorium Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta selama bulan Mei – Juni 2003, bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian susu fermentasi yang mengandung bakteri *Lactobacillus casei*

strain Shirota terhadap perubahan fraksi lipid serum darah tikus meliputi kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL pada tikus hiperkolesterolemi serta jumlah bakteri *E. coli* (angka coli) dan *Lactobacilli* pada feses tikus percobaan.

Pada penelitian ini tikus diaklimatisasi dalam kandang individu selama 7 hari dan diberi pakan standar AIN-93. Selama 9 hari berikutnya tikus diberi pakan tinggi lemak tinggi kolesterol (TLTK). Selanjutnya tikus dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol (SF-0) adalah kelompok tikus yang hanya diberi pakan standar AIN-93 tanpa pemberian susu fermentasi yang mengandung *Lactobacillus casei* strain Shirota ($6,5 \times 10^9$ cfu), kelompok I (SF-1) adalah kelompok yang mendapat dosis susu fermentasi 2 ml/ekor/hari, kelompok II (SF-2) adalah kelompok yang mendapat dosis susu fermentasi 2,25 ml/ekor/hari dan kelompok III (SF-3) yaitu kelompok yang mendapat dosis susu fermentasi 2,5 ml/ekor/hari. Pemberian susu fermentasi selama 14 hari. Pada seluruh tahapan percobaan pakan dan minum diberikan secara ad libitum.

Serum darah diambil pada saat sebelum pemberian pakan tinggi lemak tinggi kolesterol, sebelum dan setelah perlakuan pemberian susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota melalui *plexus retroorbitalis*. Fraksi lipid serum darah (kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL) diperiksa dengan metode enzimatik. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji t berpasangan untuk mengetahui perbedaan perlakuan dan uji anova untuk mengetahui perbedaan perlakuan keempat kelompok tikus percobaan bila terdapat

perbedaan maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (LSD = Least Significant Difference).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota pada kelompok perlakuan tikus percobaan menyebabkan penurunan kolesterol total, penurunan kolesterol LDL dan peningkatan kolesterol HDL secara bermakna. Penurunan kadar trigliserida secara bermakna hanya terjadi pada kelompok perlakuan susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota dosis 2,5 ml/ekor/hari (kelompok III/SF-3). Secara keseluruhan penurunan kolesterol total, trigliserida dan peningkatan kolesterol HDL belum mencapai kadar normal (kadar awal penelitian), tetapi pemberian susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota dosis 2,5 ml/ekor/hari mampu menurunkan kolesterol LDL mendekati normal.

Kesimpulan dari penelitian ini bahwa pemberian susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota pada tikus putih galur Wistar dosis 2 ml/ekor/hari, 2,25 ml/ekor/hari dan 2,5 ml/ekor/hari mampu menurunkan kadar kolesterol total dan kadar kolesterol LDL serta meningkatkan kadar kolesterol HDL serum darah tikus hiperkolesterolemi secara bermakna. Pemberian susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota dosis 2,5 ml/ekor/hari mampu menurunkan kadar trigliserida serum darah tikus hiperkolesterolemi secara bermakna dan menurunkan kadar kolesterol LDL (15,7 mg/dl) mendekati normal / kadar awal penelitian (13,9 mg/dl).

Oleh karena itu disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh penggunaan dosis susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota 2,5

ml/ekor/hari terhadap perubahan kadar fraksi lipid serum tikus hiperkolesterolemi dengan waktu pemberian lebih dari 14 hari (lebih lama / terus menerus) untuk memperoleh hasil perubahan kadar fraksi lipid normal serta penelitian penggunaan susu fermentasi *Lactobacillus casei* strain Shirota pada manusia dengan dosis 150 ml/hari (setara dosis 2,5ml/ekor/hari pada tikus percobaan) untuk melihat apakah memberikan efek sama seperti pada tikus percobaan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sulistiyani. Terapi estrogen dan Jantung Koroner. *Harian KOMPAS*, Minggu, 14 Januari. 1996.
2. Departemen Kesehatan. Profil Statistik Kesehatan di Indonesia. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1996.
3. Taranto, M.P., M. Medici, G. Perdigon, A.P. Ruiz Holgado and G.F. Valdez. Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *J. Dairy Sci.*, 83, 401 - 403. 2000.
4. Dalimartha, S. *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kolesterol*. PT. Penebar Swadaya, Jakarta : 3 dan 100. 1999.
5. Gibson, G.R., Fuller, R. Aspect of in vitro and in vivo researches directed toward Identifying Probiotics and Prebiotics for Human use. *J. Nutr.* 130 (2S Suppl) : 391S-395S. 2000.
6. Prangdimurti, E. Probiotik dan Efek Perlindungan Terhadap Kanker Kolon. Tesis S-2. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 2001.
7. Fuller, R. Probiotics in Human Medicine. *Gut.* 32. 439-442.1999.
8. Harrison, V.C. and G. Peat. Serum Cholesterol and bowel flora in the new born. *Am. J. Clin. Nutr.*, 28, 595-618. 1975.
9. Mann, G.V. A factor in yoghurt which lower cholesterolemia in Man. *Atherosclerosis.* 26, 335-340.1977.
10. Hepner, G., R. Fried, Sachiko S. Jeor, Lydia Fusettil and R. Morin. Hypocholesterolemi effect of yogurt and milk. *Am.J.of Clin.Nutr.*, 32, 19-24. 1979.
11. Rao, D.R., C.B. Chawan and S.R. Pulusani. Influence of milk and thermophilus milk on plasma cholesterol level and hepatic cholesterogenesis in rats. *J. Food Sci.* 46, 1339-1341. 1981.
12. Grunewald, K.K. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. of Food. Sci.* 47, 2078-2079. 1982
13. Pulusani, S.R. and D.R. Rao. Whole body liver and plasma cholesterol level in rats fed thermophilus, bulgaricus and acidophilus milk. *J. of Food. Sci.* 48, 280-281. 1983.

14. Jasper, D.A., L.K. Massey and L.O. Luedoke. Effect of consuming yogurt prepared with three culture strain on human serum lipoproteins. *J. Food Sci.* 49, 1178-1181. 1984.
15. Gilliland, S.E., C.R. Nelson and Maxwell. Assimilation of cholesterol by lactobacillus acidophilus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 377. 1985.
16. Danielson, A.D., E.R. Peb, Jr., K.M. Shahani, A.J. Lewis, P.J. Whalen and M.A. Amer. Anticholesterolemic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J. Anim. Sci.* 67, 966-974. 1989.
17. Agerbaek, M., L.U. Gerdes and B. Richelsen. Hypocholesterolemic effect of a new fermented milk products in healthy middle-age men. *Eur. J. Clin. Nutr.* 49, 346-352. 1995.
18. Rodas, B.Z., S.E. Gilliland and C.V. Maxwell. Hypocholesterolemic action *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and Calcium in Swine with Hypercholesterolemia Induced by diets. *J. Dairy Sci.*, 79, 2121 - 2128. 1996.
19. Akalin, A.S., S. Gont and S. Duzel. Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol level in mice. *J. Dairy Sci.*, 80, 2721 - 2725. 1997.
20. Taranto, M.P., M. Medici, G. Perdigon, A.P. Ruiz Holdago and G.F. Valdez. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J. Dairy Sci.*, 81, 2336 - 2340. 1998.
21. Usman and A. Hosono. Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. *J. Dairy Sci.*, 83, 1705 - 1711. 2000.
22. Gilliland, S.E and M.L. Speck. Dekonjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 15 - 18. 1977.
23. Takahashi, T and M. Morotomi. Absence of Cholic Acid 7 α -Dehydroxylase activity in the strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *J. Dairy Sci.*, 77, 3275-3286. 1994.
24. Gilliland, S.E. Health and nutritional benefit from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 175-188. 1990.
25. Koolman, J dan Klaus, H.R. Biokimia, Atlas Berwarna dan Teks. Alih Bahasa : Septelia Inawati Wanandi. Hipokrates. Jakarta. 2000.
26. Mayes, P.A. Lipid dengan makna fisiologis yang penting. Dalam Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes P.A. dan Rodwell, V.W (eds.). *Biokimia Harper*. Ed. 22, EGC. Jakarta, 163 - 177. 1997a.

27. Ismadi, M. *Biokimia*. Suatu Pendekatan berorientasi kasus. Jilid 2, Edisi ke-4, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 1993.
28. Marks, D.B., A.D. Marks and C.M. Smith. Metabolisme Kolesterol dan Lipoprotein Darah *Biokimia Kedokteran dasar. Sebuah Pendekatan Klinis*. Penerbit buku Kedokteran EGC, Jakarta : 518 - 530. 2000.
29. Mayes, P.A. Pengangkutan dan Penyimpanan Lipid. Dalam Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes P.A. dan Rodwell, V.W (eds.). *Biokimia Harper*. Ed. 22, EGC. Jakarta, 283 - 301. 1997b.
30. Wirahadikusuma. *Biokimia : Metabolisme energi, karbohidrat dan lipid*. Penerbit ITB Bandung. 1995.
31. Raharja, S. Produk oksidasi lemak salah satu penyebab Penyakit Jantung Koroner. *Agritech*, 15, 31 - 35. 1995.
32. Hudyono, J. dan D.S Raharja. Gambaran Kadar Gula darah dan Kolesterol Pejabat Struktural. *Ukrida Meditek*, 3, 45-60. 1995
33. Mitsuoka. *Microbes in The Intestine Our Life Long Partner*. Yakult Honsho Co. Ltd. Japan. 1989.
34. Lin, S.Y. and J.W Ayres. Lactobacillus effects on cholesterol : in vivo and in vitro results. *J. Dairy Sci.* 72, 2885-2899
35. Noh, D.O., S.H. Kim and S.E. Gilliland. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4321. *J. Dairy Sci.*, (80), 12, 3107 - 3113. 1997.
36. Montes, R.G., T.M. Bayless, J.M. Savedra and J.A. Perman. Effect of milk inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or a yogurt starter culture in lactose maldigesting children. *J. Dairy Sci.*, 78, 1657 - 1664. 1995.
37. Mastini, Hove, H., I.N. Andersen and P.B. Mortensen. Effect of Lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. *Am. J. Clin. Nutr.*, 59, 74 - 79. 1991.
38. Marteau, P.R., Micheil, d.V., Christhope, J.C and Jurgen, S. Protection from gastrointestinal disease with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 :430-436. 2001.
39. Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid. Dietary modulation of the human colonic microbiota : Introducing the concept of probiotics. *J. Nutr.*, 125, 1401-1412. 1995.

40. Wollowski, I., Gerhard, R., and Beatrice, LPZ. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (Supp). 451S-455S.2001.
41. Gilliland, S.E. and D.K. Walker. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci.*, 73, 905 - 911. 1990.
42. Buck, M.L. and S.E. Gilliland. Comparison of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. *J. Dairy Sci.*, 77, 2929 - 2933. 1994.
43. Hosono, A. dan Usman. Bile tolerance, taurocholate deconjugation and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri*. *J. Dairy. Sic.*, 82, 243-248. 1995.
44. Walker, D.R. and S.E. Gilliland. Relationship among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 76, 956 - 961. 1993.
45. Klaver, FAM and R. Van der Meer. The Assumed Assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* is due to the Bile salt deconjugation activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (4), 1120-1124. 1993.
46. Marshal, V.M and E. Taylor. Ability of neonatal human *Lactobacillus* isolates to remove cholesterol from liquid media. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 30, 571-577. 1995.
47. Tannock, G.W., M.P. Dashkevicz and S.D. Feighner. *Lactobacilli* and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(7), 1848-1851. 1989.
48. Jenie, B.S.L., E.Y. Candrasari dan L. Nuraida. Aktivitas antimikrobia dari susu kedelai yang difermentasi oleh *Lactobacillus casei*. *J. Ilmu dan Tek. Pangan*, vol. I, no. 1, 16 - 26. 1996.
49. Wibowo, A.A. Deteksi Senyawa volatil susu segar, yakult dan kefir dari susu Peternakan Rakyat di Daerah Istimewa Yogyakarta. Skripsi. Sarjana Peternakan. Fakultas Peternakan. Universitas Gadjah Mada. 2001.
50. Margawani, K.R.. *Lactobacillus casei* galur Shirota (Bakteri yakult), peranannya dalam kesehatan manusia. *Buletin Teknologi Industri Pangan*. Vol. VI, No. 2, 93 - 94. 1995.
51. Schelegal, H.G. and K. Schmidt Penerjemah R.M. Tedjo. *Mikrobiologi Umum*. Edisi Lab. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 1985.

52. Anonim. *Morphology and biological properties of yakult strain : report on yakult beverage and yakult strain*. Yakult Institute for Microbiological Research, No. 14, June. 1980.
53. Hanafiah, K.A. *Rancangan Percobaan : Teori dan Aplikasi*. Rajawali Pres. Jakarta. Hal : 4. 1991.
54. Reeves, P.G., Forrest H. Nielsen and George C.F, Jr. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents : Final Report of The America Institut of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on The Reformulation of The AIN-76A Rodent Diet. American Institut of Nutrition. *J. Nutrition.*, 123, 1939-1951. 1993.
55. Pratiknya, A.W. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta : 150 - 151. 1993
56. Agustina, R.A. Probiotik, Saatnya Telah Datang ?. *Majalah GizMind*, Vol 1. No. 2. 2002.
57. Donatus, I. A. *Petunjuk Praktikum Toksikologi*. Edisi I. Yogyakarta : Lab. Farmakologi dan Toksikologi. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Hal : 21-22. 1994.
58. Tim Patalogi Klinik. *Tuntunan Praktikum Patologi Klinik*. Laboratorium Patalogi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 1996.
59. Santoso, S. *Statistical Product and Service Solution (SPSS) versi 7.5*. PT. Elex Media Komputindo. Gramedia. Jakarta. 1997.
60. Grundy, S.M. Atherogenic Dyslipidemia : Lipoprotein Abnormalities and Implications for Therapy. *Am. J. Cardiol* 75 : 45B-52B. 1995.
61. Soeparman. *Ilmu Penyakit Dalam. Gaya Baru*. Jakarta. 1987. Hal : 526-531.
62. Purnamaningsih, H. *Profil Lipid Darah dan Gangguan Kardiovaskuler pada Tikus Putih yang diberi Ransum Tinggi Kolesterol dan/atau Tinggi Lemak*. Tesis S-2. Program Studi Sain Veteriner. Jurusan Ilmu-ilmu Pertanian. Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 1998.
63. Kaplan, M.D. *Prevention of Coronary Heart Disease in Practical Management of The Risk Factor*. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 1979.
64. Rukmi, I. *Pengaruh Berbagai Konsentrasi Tempe Gembus Dalam Ransum Pakan terhadap Profil Lipid Serum Darah Tikus*. Tesis S-2. Program Magister Ilmu Biomedik. Program Pascasarjana Universitas Diponegoro. Semarang. 1999.
65. Norum, K.R. Dietary Fat and Blood Lipids. *Nutr. Nev.* 50 (4) : 30-37. 1992.

66. Eastwood, M., Edwards, C., and Pery, D. Human Nutrition. Chapman & Hall. London. Hal : 33-65. 1987.
67. Collins, Gibson, G.R. Prebiotic, Probiotic and Synbiotic : Approaches for Modulating The Microbial Ecology of The Gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 69 (S) : 1052S-1057S.1999.
68. Silalahi, J. Manfaat dan Khasiat Probiotik untuk Mencegah Penyakit. www.kompas.com/kcm/produk.htm. 2001.
69. Montgomery, R., Dryer, R.L. Biokimia Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus. Jilid 2. Edisi Keempat. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal : 687, 903-905. 1993.
70. Kusmiyati. Pengaruh Pemberian Vitamin E terhadap Fraksi lipid Serum Tikus Hiperkolesterolemik. Tesis S-2. Program Magister Ilmu Biomedik. Program Pascasarjana. Universitas Diponegoro. Semarang. 2000.
71. Sreekumar, O. and A. Hosono. Immediate Effect of *Lactobacillus acidophilus* on The Intestinal Flora and Fecal Enzymes of Rats and The *In vitro* Inhibition of *Escherichia coli* in Coculture. *J. Dairy. Sci.* 83 : 931-939. 2000.