

# KAJIAN EFEK SINERGISTIK ANTARA *CHITO-OLIGOSAKARIDA* (COS) DAN PROBIOTIK (*Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051) TERHADAP PENURUNAN KADAR KOLESTEROL SECARA *in vivo*

## THE SYNERGISTIC EFFECT OF CHITO-OLIGOSACCHARIDE (COS) AND PROBIOTIK (*Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051) TO CHOLESTEROL REDUCTION by *in vivo*

Agnes Sri Harti<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Setia Budi Surakarta

### ABSTRACT

*Chitooligosaccharide (COS) is a complex substance of glycoprotein group with 1,4 glucosamine chain, from deacetylation process of chitin and as oligosaccharides were recovered from shrimp and crab shell that was potensial and abundant in Indonesia. The concept of synergistic is the combination of chitooligosaccharide (COS) as prebiotic and probiotic (Lactic Acid Bacteria) that can be used as multi function and economical food additive, alternative antibiotic and immunostimulant for cholesterol reduction in public health. The aim of this research were to investigate sinegistic effect of prebiotic (Chitooligosaccharide) and probiotic (Lactobacillus acidophilus FNCC 0051) to cholesterol reduction by in vivo. Analysis of Variance General Linier Models Univariate was used to analyze the data. The research showed that synthesis and quality analysis of COS from shrimp and crab shell were rendemen 51,36% , solubility 58,59%, deacetylation degree 88,76% and viscosity 122 cp. The synergistic effect of Chitooligosaccharide and Lactobacillus acidophilus FNCC 0051 to cholesterol reduction by in vivo were significant.*

*Key words : Chito-Olygosaccharide (COS), cholesterol, probiotic, synergistic*

### ABSTRAK

Chitooligosakarida (COS) merupakan senyawa kompleks golongan glikoprotein yang memiliki ikatan 1,4 glukosamin, hasil proses deasetilasi kitin dan sebagai oligosakarida yang berasal dari hewani dari limbah kulit kepiting yang sangat potensial dan berlimpah di Indonesia. Konsep sinergistik yaitu campuran COS sebagai prebiotik alami hewani dengan probiotik (Bakteri Asam Laktat) diharapkan dapat digunakan sebagai sebagai satu bahan yang berpotensi sebagai *food additive, antibiotik alternatif*, imunostimulan penurun kolesterol yang bersifat ekonomis, multiguna khususnya di bidang kesehatan. Tujuan penelitian adalah mengkaji efek sinergistik Chitooligosakarida dan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terhadap penurunan kadar kolesterol secara *in vivo*. Analisis mutu meliputi rendemen, kelarutan, derajat deasetilasi, viskositas serta pengkajian efek sinergistik sinbiotik secara *in vitro* meliputi pengukuran pertumbuhan probiotik dalam media kultur. Analisis data menggunakan analisis varian general linier models univariate. Hasil penelitian diperoleh sintesis dan analisis mutu COS dari kulit kepiting meliputi rendemen 51,36%, kelarutan 58,59%, derajat deasetilasi 88,76% dan viskositas 122 cp. Adanya efek sinergistik Chitooligosakarida dan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 COS terhadap penurunan kadar kolesterol secara signifikan.

Kata kunci : Chito-Oligosakarida (COS), kolesterol, probiotik, sinergistik

### PENDAHULUAN

Chito-Oligosakarida (COS) adalah senyawa turunan dari kitosan hasil proses deasetilasi kitin dan merupakan senyawa kompleks golongan glikoprotein yang memiliki ikatan 1,4 glukosamin dan mampu bersifat antimikrobia, menurunkan kadar kolesterol serta bersifat imunostimulan. Prebiotik merupakan makanan yang tidak dapat dicerna, tetapi menguntungkan terhadap penghuni bakteri colon dengan cara meningkatkan jumlah dan aktivitas probiotik. Beberapa kelompok substrat yang digunakan selama ini sebagai sumber prebiotik berasal

dari pangan nabati adalah tepung (selulosa, hemiselulosa, lignin) yang tidak larut dalam air, fiber, oligosakarida dan gula alcohol [2,3,4,6,7].

Probiotik adalah bakteri hidup yang diberikan sebagai suplemen makanan yang mempunyai pengaruh menguntungkan pada kesehatan pada manusia dan binatang, dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal. Mikroflora yang digolongkan sebagai probiotik adalah mikroba yang memproduksi asam laktat terutama dari golongan *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* atau dikenal dengan BAL (Bakteri Asam Laktat)

Tujuan penelitian adalah mengkaji efek sinergistik Chitooligosakarida dan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 terhadap penurunan kadar kolesterol secara *in vivo*.

## METODE PENELITIAN

### Alat

Inkubator, autoclave, centrifuge, corong, beker glass, erlenmeyer, batang pengaduk, stirring hot plate, membran filter, oven, neraca analitis, pH meter, anaerobic jar, viscometer, oven, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu, mikropipet, cawan petri, tabung reaksi, Gas Generating Kit, vortex, appendorf, aluminium foil, pipet ukur, cawan penguap, vaccum pump.

### Bahan

Sampel untuk sintesa COS adalah limbah kulit udang dan kepiting (*Portunus pelagicus*) yang diperoleh dari salah satu rumah boga di Solo, isolat BAL (*Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dari PAU Pangan Gizi UGM),

Bahan uji : NaOH, HCl, asam asetat, NaCl fisiologis, buffer pepton 0,1 %, cat Gram, reagen kolesterol diagnostic kit, pakan ayam, kolesterol cair, probiotik.

### Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian dapat digambarkan secara skematis pada **Gambar 1**.

### Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian dapat dilihat pada **Gambar 2**.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis mutu COS antara lain pengukuran rendemen, kelarutan, derajat deasetilasi, viskositas dan berat molekul.

### Pengukuran Rendemen

Rendemen dihitung berdasarkan perbandingan antara berat COS dengan berat limbah kulit kepiting, menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen} = (\text{Berat COS} / \text{Berat limbah kepiting}) \times 100 \%$$

Hasil pengukuran rendemen seperti tercantum pada **Tabel 1**.

Rendemen kitosan ditentukan berdasarkan persentase berat kitosan yang dihasilkan terhadap berat bahan baku atau sampel sebelum diproses. Hasil percobaan menunjukkan dari 100 g bahan baku sebelum proses diperoleh rendemen kitosan suksinat yang terendah 48,73 % dibandingkan dengan rendemen lainnya. Hal ini disebabkan proses pemurnian kitosan yang bertingkat Semakin tinggi proses pemurnian meliputi demineralisasi, deproteinasi dan deasetilasi maka semakin rendah rendemen yang dihasilkan tetapi semakin tinggi derajat deasetilasi.

### Uji Kelarutan

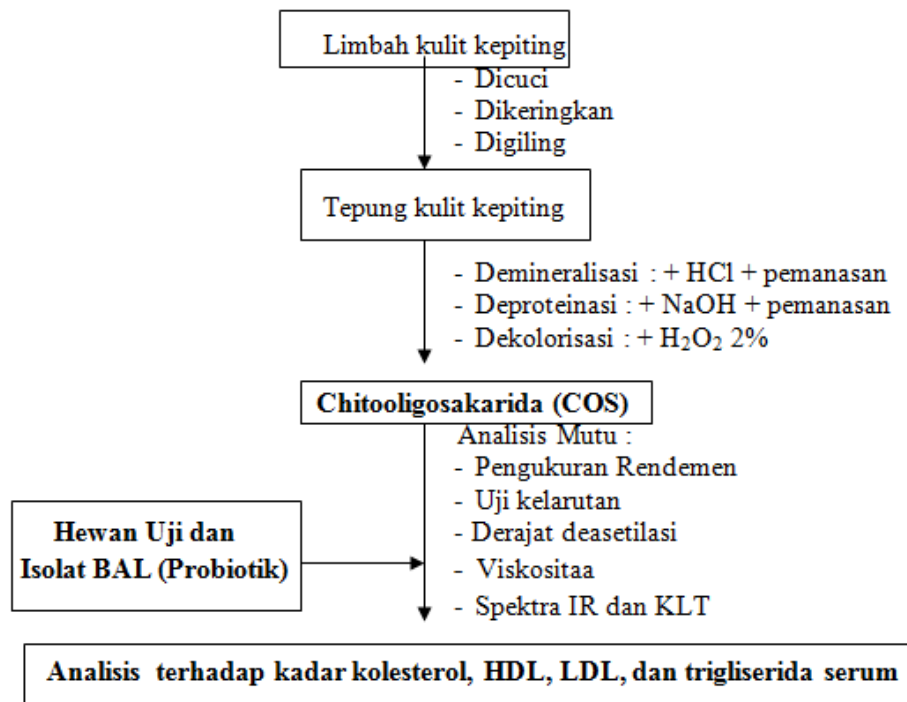
COS 0,5 % dilarutkan dalam asam asetat 1 %, lalu difiltrasi. Persentase kelarutan COS ditunjukkan dengan berat COS tersisa dibandingkan dengan COS awal. Hasil pengukuran uji kelarutan COS seperti tercantum pada **Tabel 2**.

Hasil percobaan menunjukkan kelarutan COS sampel lebih rendah dibandingkan sampel . Hal ini disebabkan karena COS dalam sampel tingkat kemurnian dari sampel yang dipengaruhi oleh senyawa yang terkandung di dalam sampel masih dalam bentuk polimer.

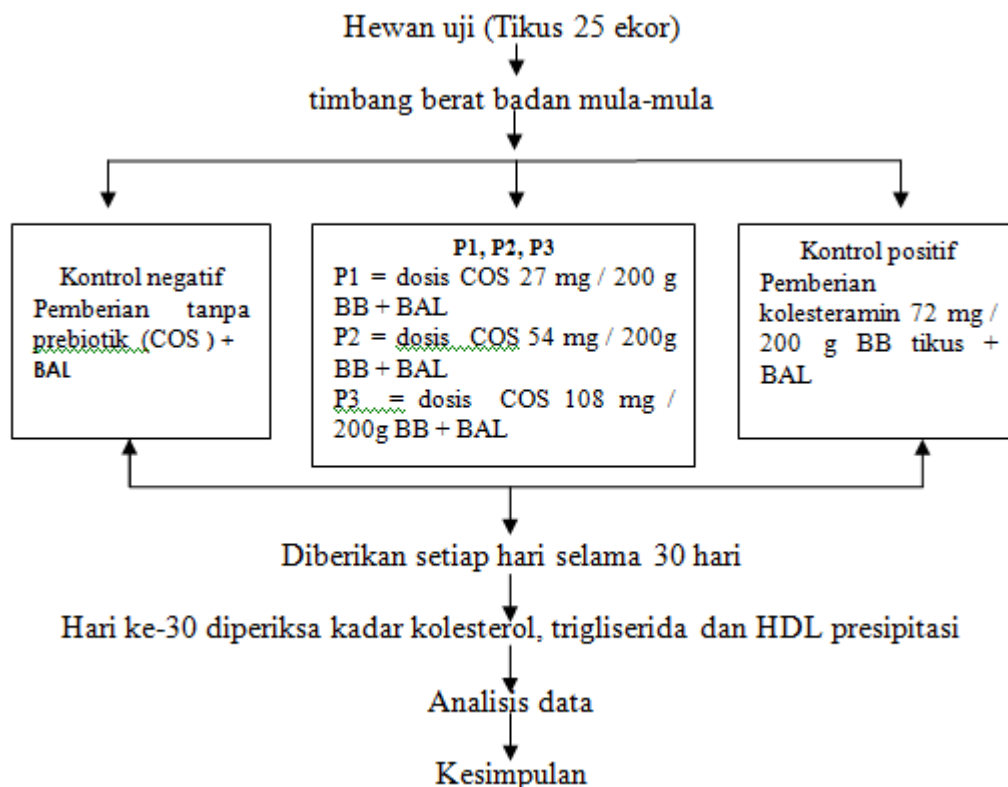
Kitin termasuk polisakarida yang sangat sukar dilarutkan pada pH netral seperti air sehingga pelarutan dilakukan dalam suasana asam atau basa. Kitosan tidak larut dalam air tapi larut dalam pelarut asam dengan pH di bawah 6,0. Pelarut yang umum digunakan untuk melarutkan kitosan adalah asam asetat 1%, dengan pH sekitar 4,0.[8].

### Derajat Deasetilasi

Pengukuran derajat deasetilasi COS ditentukan dengan metode Spektroskopi UV turunan pertama pada panjang gelombang 202 nm. Selanjutnya dibuat kurva standar N-asetil glukosamin yang menunjukkan derajat asetilasi. Persentase derajat deasetilasi dihitung dengan :



**Gambar 1.** Tahapan Penelitian



**Gambar 2.** Rancangan Penelitian

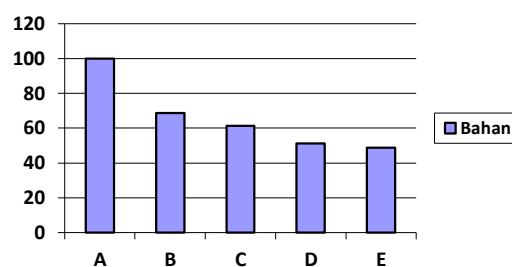
$$\% \text{ Derajat deasetilasi} = 100 - \{ \text{derajat asetilasi} \} \times 100 \%$$

Hasil pengukuran derajat deasetilasi seperti tercantum pada **Tabel 3**.

Perbedaan di antara kitin dan kitosan terdapat dalam derajat deasetilasinya. Kitosan mempunyai derajat deasetilasi 80–90%, akan tetapi kebanyakan publikasi

**Tabel 1.** Pengukuran Rendemen

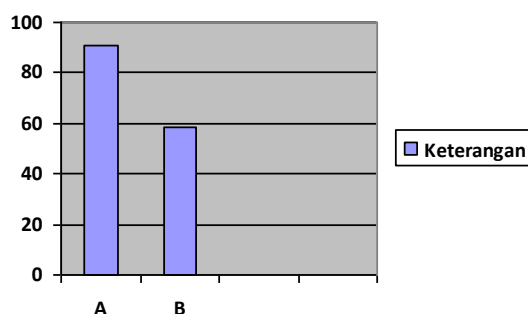
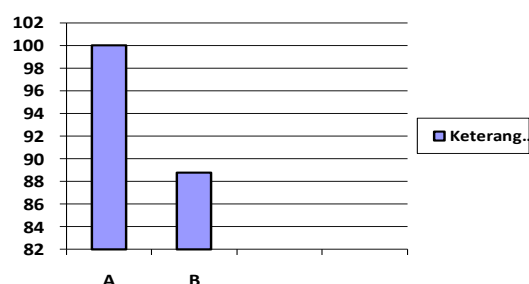
No.	Kode	Bahan	Berat penimbangan (g)	Rendemen (%)
1.	A	Tepung kulit kepiting	100	-
2.	B	Kitin	68,56	68,56
3.	C	Kitosan	61,34	61,34
4.	D	Chito-oligosakarida	51,36	51,36
5.	E	Kitosan suksinat	48,73	48,73

**Grafik 1.** Pengukuran Rendemen**Tabel 2.** Pengukuran Uji Kelarutan dalam asam asetat 1%

No	Kode	Keterangan	Berat awal (g)	Berat sisa (g)	Kelarutan (%)
1.	A	Standart	0,2501	0,0234	90,64
2.	B	Chito-oligosakarida (COS)	0,2524	0,1045	58,59

**Tabel 3.** Pengukuran Derajat Deasetilasi Pada  $\lambda = 202$  nm

No.	Kode	Keterangan	Asam asetat	Derajat deasetilasi (%)
1.	A	Standart	0,569	100
2.	B	Chito-oligosakarida (COS)	0,505	88,76

**Grafik 2.** Pengukuran Uji Kelarutan dalam asam asetat 1%**Grafik 3.** Pengukuran Derajat Deasetilasi Pada  $\lambda = 202$  nm

menggunakan istilah kitosan apabila derajat deasetilasi lebih besar 70%. Hasil percobaan menunjukkan bahwa derajat deasetilasi COS lebih dari 70%. Hal ini menunjukkan bahwa COS hasil sintesis termasuk kitosan.

Kelarutan juga berhubungan erat dengan derajat deasetilasi. Proses deasetilasi akan memotong gugus asetil pada kitin, menyisakan gugus amina. Adanya H pada amina memudahkan interaksi dengan air

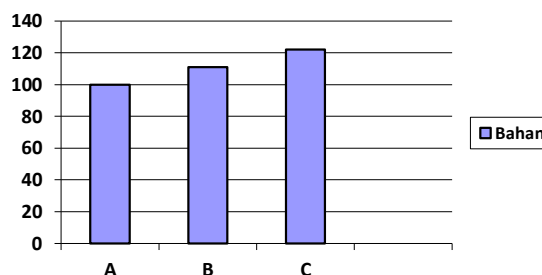
melalui ikatan hidrogen. Adanya gugus karboksil dalam asam asetat akan memudahkan kelarutan kitin dan kitosan karena adanya interaksi hidrogen antara gugus karboksil dengan gugus amina dari keduanya [8,9]

### Viskositas

Viskositas diukur menggunakan alat viscometer. Sebagai blanko digunakan asam

**Tabel 4. Pengukuran Viskositas**

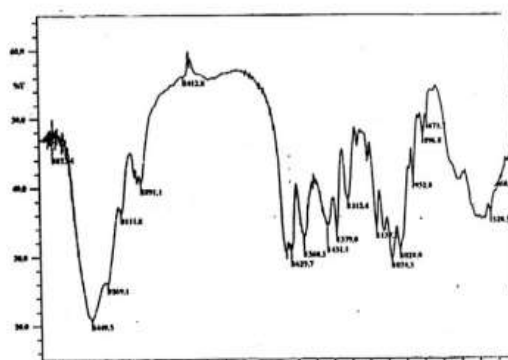
No.	Kode	Bahan	Viskositas (cP)
1.	A	Akuadest	100
2.	B	Standard	111
3.	C	Chito- oligosakarida (COS)	122



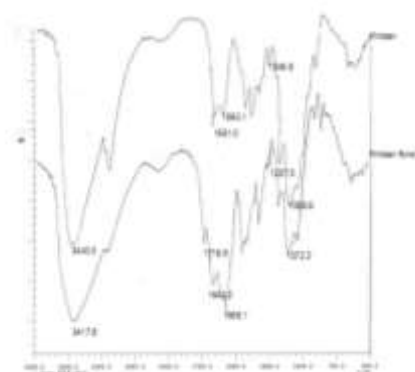
**Grafik 4. Pengukuran Viskositas**

asetat aqueous 0,1 M dan sodium asetat 0,25 M.

Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskometer dengan alat penggerak rotor. Hasil percobaan menunjukkan viskositas COS tidak berbeda nyata dengan COS standart. Viskositas intrinsik menunjukkan kemampuan polimer untuk meningkatkan viskositas larutan. Berat molekul berhubungan dengan derajat polimerisasi. Polimer rantai lurus seperti kitosan akan menunjukkan peningkatan densitas jika derajat polimerisasi bertambah. maka viskositas intrinsik juga akan meningkat. [9,10]



**Gambar 3. Spektra IR Kitin**

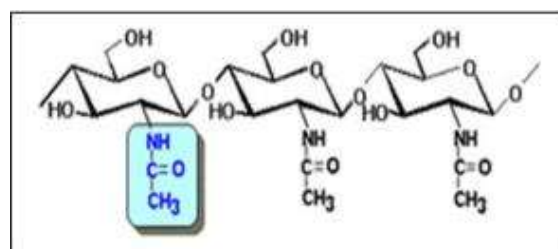


**Gambar 4. Spektra IR kitosan (COS) dan kitosan suksinat**

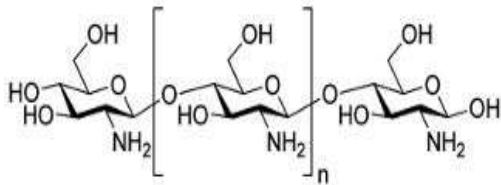
### Spektrum Infra Red

Identifikasi terhadap mutu Chitologosakarida (COS) dilakukan dengan pengukuran spektrum gugus kimia metode Spektrofotometri Infra Red. Sampel dibuat pelet dengan KBr dan dilakukan scanning pada daerah panjang gelombang 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ . **Gambar 3 – 7** adalah hasil pengukuran yang diperoleh antara kitosan dan kitosan suksinat.

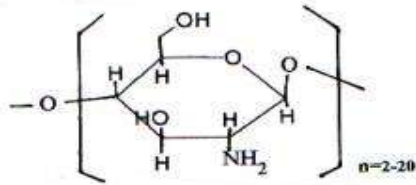
Hasil analisis spektra IR antara kitin, kitosan dan kitosan suksinat menunjukkan kemiripan pola terhadap gugus kimia yang terkandung di dalamnya. Adanya puncak lain merupakan senyawa residu yang terkandung di dalamnya. Perbedaan dari kemurnian COS dapat diketahui dari derajat deasetilasinya.



**Gambar 5. Struktur kimia kitin**



Gambar 6. Struktur kimia kitosan



Gambar 7. Struktur kimia Chito-Oligosakarida (COS)

### Analisis efek hiperkolesterolemia

Pengujian efek anti hiperkolesterolemia COS dilakukan terhadap hewan uji tikus putih jantan dengan berat badan sekitar 200 g. Analisis hiperkolesterolemia dilakukan

dengan pengukuran sampel darah menggunakan reagen diagnostik kit berdasarkan metode spektrofotometri. kadar kolesterol total, trigliserida, HDL dan LDL. Data hasil pengukuran parameter tersebut dilakukan dua kali yaitu sebelum ( $T_0$ ) dan sesudah perlakuan pada minggu ke-3 ( $T_3$ ).

Efek anti hiperkolesterolemia dinilai dengan pengukuran 3 parameter yaitu kolesterol total, trigliserida, HDL dan LDL sebelum dan sesudah perlakuan. Nilai penurunan kadar glukosa darah ini menunjukkan kemampuan bahan uji (COS) dapat menurunkan kadar glukosa darah pada hewan uji. Hasil pengukuran 4 parameter tercantum dalam **Tabel 5** dan **6**.

Hasil analisis statistik uji hipotesis anova satu jalan menunjukkan pemberian COS dan probiotik mampu menurunkan kadar kolesterol total secara signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif. Dosis pemberian COS tidak menunjukkan beda nyata antar perlakuan juga terhadap kontrol positif.

Uji statistik pada awal perlakuan dan setelah perlakuan atau minggu ketiga menunjukkan bahwa pemberian COS pada dosis perlakuan (27 mg, 54 mg dan 108 mg) dan probiotik memberikan beda non

signifikan terhadap kadar kolesterol total, HDL, LDL dan trigliserida). Hal ini menunjukkan pada dosis tersebut mampu menurunkan kadar kolesterol total pada hewan uji yang setara dengan kolesteramin dosis 72 mg/200 mg BB

Berdasarkan hal tersebut maka COS dan probiotik dapat berfungsi untuk pencegahan hiperkolesterolemia. Mekanisme COS sebagai anti hiperkolesterolemia dikaitkan peranan COS dalam metabolisme karbohidrat dan peranan COS sebagai bioadsorben yang sangat efektif terutama sebagai mikropartikel dengan sifat porositas yang tinggi sehingga mampu mengikat senyawa makromolekul seperti halnya lemak. Sedangkan penambahan BAL diharapkan dapat memberikan efek sinergistik antara probiotik (BAL = Bakteri Asam Laktat) dan COS sebagai prebiotik alami yang berasal dari limbah kulit kepiting. Mekanisme probiotik (Bakteri Asam Laktat) dalam menurunkan kadar kolesterol serum berhubungan dengan kemampuannya menghasilkan enzim *bile salt dehidrogenase* yang berperan dalam metabolisme kolestereol

Hasil percobaan menunjukkan dosis COS tidak menunjukkan beda nyata terhadap pertumbuhan probiotik. Jika dibandingkan dengan kontrol menunjukkan beda secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan COS mampu meningkatkan pertumbuhan probiotik secara nyata. COS sebagai oligosakarida dapat digunakan sebagai prebiotik untuk pertumbuhan probiotik.

Beberapa jenis prebiotik mampu menggunakan lacto sucrose, soybean oligosakarida, palatinose, isomaltive oligosakarida, gluco oligosakarida, xylo oligosakarida, laktulosa, laktitol dan xilitol, sorbitol dan manitol. Beberapa kelompok substrat yang termasuk prebiotik adalah tepung (selulosa, hemiselulosa, lignin) yang tidak larut dalam air, fiber, oligosakarida dan gula alcohol [1,5]

**Tabel 5.** Pengukuran kadar Kolesterol, Trigliserida, HDL dan LDL pada awal perlakuan (T<sub>0</sub>) (mg/dL)

Perlakuan	Ulangan	Kolesterol total	Trigliserida	HDL	LDL
<b>A</b>	1	102	115	64	15,0
	2	102	100	63	19,0
	3	101	98	65	16,4
	4	100	99	61	19,2
	5	102	100	63	19,0
<b>Rata-rata</b>		<b>101.4</b>	<b>102.4</b>	<b>63.2</b>	<b>17.72</b>
<b>B</b>	1	104	105	66	17,0
	2	107	103	71	15,4
	3	110	99	68	22,2
	4	106	100	63	23,0
	5	108	104	66	21,2
<b>Rata-rata</b>		<b>107</b>	<b>102.2</b>	<b>66.8</b>	<b>19.76</b>
<b>C</b>	1	97	106	57	18,8
	2	102	103	59	22,4
	3	104	98	60	24,4
	4	98	96	58	20,8
	5	99	97	57	22,6
<b>Rata-rata</b>		<b>100</b>	<b>100</b>	<b>58.2</b>	<b>21.8</b>
<b>D</b>	1	96	93	65	12,4
	2	103	101	66	16,8
	3	104	111	69	12,8
	4	96	98	65	11,4
	5	97	96	65	12,8
<b>Rata-rata</b>		<b>99.2</b>	<b>99.8</b>	<b>66</b>	<b>13.24</b>
<b>E</b>	1	100	93	65	16,4
	2	107	98	69	18,4
	3	99	99	60	19,2
	4	100	96	64	16,8
	5	101	97	66	15,6
<b>Rata-rata</b>		<b>101.4</b>	<b>96.6</b>	<b>64.8</b>	<b>17.28</b>

Keterangan :

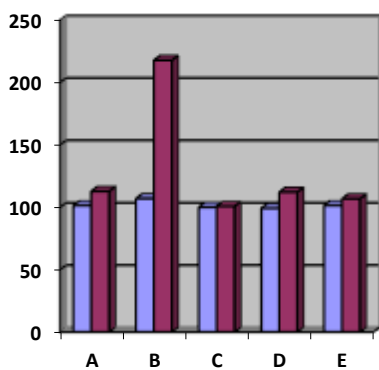
Perlakuan A = kontrol positif (larutan kolesteramin 72 mg/200 mg BB)

Perlakuan B = kontrol negatif

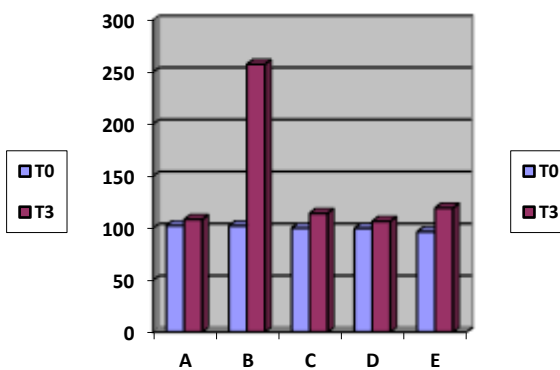
Perlakuan C = dosis COS 27 mg / 200 g BB

Perlakuan D = dosis COS 54 mg / 200 g BB

Perlakuan E = dosis COS 108 mg / 200 g BB



**Grafik 5.** Pengukuran Kolesterol Total (mg/dL)



**Grafik 6.** Pengukuran Trigliserida (mg/dL)

**Tabel 6.** Pengukuran kadar Kolesterol, Trigliserida, HDL dan LDL setelah perlakuan (T<sub>0</sub>) (mg/dL)

Perlakuan	Ulangan	Kolesterol total	Trigliserida	HDL	LDL
A	1	119	133	68	24,4
	2	106	95	61	26,0
	3	115	101	71	23,8
	4	112	108	69	21,4
	5	112	105	70	20,3
<b>Rata-rata</b>		<b>112.8</b>	<b>108.4</b>	<b>67.8</b>	<b>24.4</b>
B	1	220	257	120	48,6
	2	225	271	121	49,8
	3	206	251	113	42,8
	4	220	253	120	49,4
	5	218	256	119	45,8
<b>Rata-rata</b>		<b>217.8</b>	<b>257.6</b>	<b>118.6</b>	<b>47.28</b>
C	1	101	121	65	11,8
	2	102	121	65	13,4
	3	99	104	64	14,2
	4	102	116	67	11,8
	5	100	109	64	14,2
<b>Rata-rata</b>		<b>100.8</b>	<b>114.2</b>	<b>65</b>	<b>13.08</b>
D	1	110	106	71	17,8
	2	114	106	74	18,8
	3	112	104	70	21,2
	4	113	113	73	17,4
	5	112	104	72	19,2
<b>Rata-rata</b>		<b>112.2</b>	<b>106.6</b>	<b>72</b>	<b>18.88</b>
E	1	105	125	68	12,0
	2	116	128	71	19,4
	3	101	108	61	18,4
	4	104	121	67	15,4
	5	108	115	67	18,0
<b>Rata-rata</b>		<b>106.8</b>	<b>119.4</b>	<b>66.8</b>	<b>16.64</b>

Keterangan :

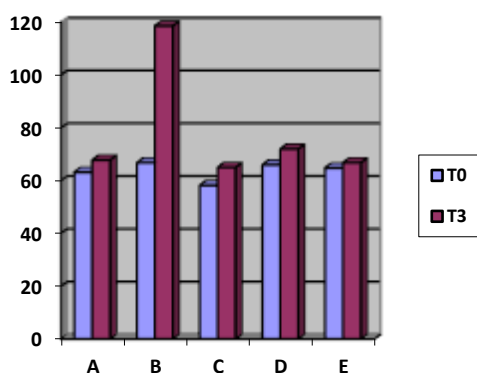
Perlakuan A = kontrol positif (larutan kolesteramin 72 mg/200 mg BB)

Perlakuan B = kontrol negatif

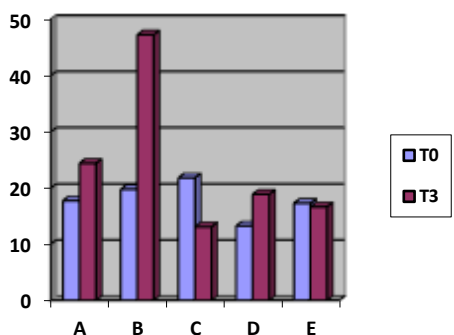
Perlakuan C = dosis COS 27 mg / 200 g BB

Perlakuan D = dosis COS 54 mg / 200 g BB

Perlakuan E = dosis COS 108 mg / 200 g BB



**Grafik 7.** Pengukuran HDL (mg/dL)



**Grafik 8.** Pengukuran LDL(mg/dL)



## KESIMPULAN

Adanya efek sinergistik chitooligosakarida (COS) dan probiotik (*Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051) terhadap penurunan kadar kolesterol secara in vivo.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bomba, A., Nemcova, R., Gancarcikova, S., Herich, R., Guba, P., Mudronova, D., 2002, *Improvement of The Pribiotic Effect of Microorganism by Their Combination with Metodextrins, Fructo-oligosaccharides and Polyunsaturated Fatty Acid*, British Journal of Nutrition, Volume 88 September Supplement 2002.
- Buddington, K. K., J. B. Donahoo, and R. K. Buddington. 2002. *Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers*. J. Nutr. 132:472–477.
- Choi H. J., Ahn J., Kim N.C., Kwak H.S., 2006. *The effects of microencapsulated chitooligosaccharide on physical and sensory properties of the milk*. Asian-australasian journal of animal sciences ISSN 1011-2367. Volume. 19, No. 9, page 1347-1353
- Dunn, ET., EW. Grandmaison dan MFA. Goosen, `997. *Application and properties of chitosan* Didalam MFA. Goosen (ed). *Applications of Chitin and Chitosan*. Technomic Pub., Basel p 3 – 30.
- Harti,A.S. 2007. *Kajian Efek Sinergistik Probiotik dengan Prebiotik terhadap Diaregenik Escherichia coli*. Laporan Hasil Penelitian Dosen Muda. Dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Tahun 2007
- Harti,A.S. Ratno A.S., Nony P. 2009. *Biopreparasi Synbiotik (Probiotik dan Prebiotik) Dalam Yoghurt Sebagai Imunostimulan dan Penurun Kolesterol*. Program Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch I Tahun. Dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Tahun 2009.
- .Hwang J., S. Hong dan C. Kim. 1997. *Effect of molecular weight and NaCl concentration on dilute solution properties of chitosan*. J.Food Sci. Nutr. 2 : 1- 5.
- Kaban J. 2009. *Modifikasi Kimia dari Kitosan dan Aplikasi Produk yang Dhasilkan* dalam Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Tetap dalam Bidang Kimia Organik Pada Fakultas MIPA, Universitas Sumatera Utara, 24 Januari 2009.
- Lin, Shih-Bin; Chen, Shan-He; Peng, Kou-Cheng, 2009. *Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of  $\beta$ -chitosan in a Trichoderma harzianum chitinase-hydrolysing process* Journal of the Science of Food and Agriculture, Volume 89, Number 2, 30 January 2009 , pp. 238-244(7)
- P Liu, XS Piao, SW Kim, L Wang, YB Shen, HS Lee and SY Li. 2008. *Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of Escherichia coli and Lactobacillus in weaning pigs*. Journal of Animal Science, 86:2609-2618.