

PENCEGAHAN PEROKSIDASI LEMAK DAN KERUSAKAN JARINGAN PADA TIKUS DENGAN KITOSAN

(EFFECT OF CHITOSAN ON OXIDATIVE STATUS OF RATS FED WITH THERMALLY TREATED PALM OIL)

Sri Raharjo^{*)}

ABSTRACT

The present study focused on the effect of chitosan on oxidative status of rats fed with diets containing thermally oxidized palm oil. Fourty eight white male Sprague-Dawley rats weighing in the range of 90 to 105 g were fed with three different experimental diets *ad libitum* for up to 90 days. The first group was fed with a control diet containing 15 % fresh palm oil, the second group with the same diet except that the palm oil was thermally treated at 180° C for 24 hr, and the third group was fed with diet containing thermally treated palm oil and chitosan. Chitosan was added at a 2 % level at the expense of fiber content. The experimental diets were analyzed for peroxide value, TBARS (2-thiobarbituric acid acids-reactive substances) and tocopherol content. Four rats from each dietary group were killed at time intervals of 30, 60 and 90 days of feeding and blood as well as tissue analyses were performed. Rats fed with diet containing thermally treated palm oil showed no significant differences in term of weight gain. TBARS level in serum, kidney, brain and heart as well as liver superoxide dismutase activity compared with other groups. However, rats fed with thermally treated palm oil had heavier liver weight, higher TBARS and lower vitamin E levels in liver. It seem that the addition of chitosan in the experimental diet could neutralize the negative effects of lipid oxidation products in the liver.

Keywords: Chitosan, oxidized palm oil, rat

PENDAHULUAN

Penderita penyakit kardiovaskuler di Indonesia secara persentase masih relatif rendah bila dibandingkan dengan angka dari negara maju. Namun yang cukup memprihatinkan adalah jumlah penderita penyakit degeneratif ini semakin meningkat dari tahun ke tahun, khususnya di wilayah perkotaan. Hasil survei kesehatan rumah tangga tahun 1992 menunjukkan bahwa penyakit kardiovaskuler kini menduduki peringkat pertama penyebab kematian (Suryono dan Djauzi, 1993). Hal ini diduga ada kaitannya dengan konsumsi lemak, kolesterol dan antioksidan dalam menu tiap hari. Lemak dan minyak biasanya mengalami perlakuan pemanasan dengan suhu dan waktu yang bervariasi selama pengolahan makanan. Hal ini menyebabkan lemak dan minyak teroksidasi dan

terdegradasi oleh panas sehingga bisa menghasilkan senyawa-senyawa yang sangat reaktif. Senyawa produk oksidasi lemak inilah yang ditengarai ikut berperan dalam proses terjadinya lesi pada saluran darah dan mengarah ke timbulnya atherosklerosis (Addis, 1990). Oleh karena itu untuk memperkecil resiko terjadinya penyakit degeneratif disarankan untuk meningkatkan status antioksidatif tubuh melalui konsumsi bahan makanan yang mengandung antioksidan seperti alfa-tokoferol, betakaroten dan vitamin C (Duthie, 1991).

Kitosan adalah polimer dari beta (1-4)-amino-2-deoksi-D-glukan yang banyak ditemukan pada cangkang udang, kepiting maupun lobster yang memiliki fungsi sebagai antioksidan (Knorr, 1991).. Diperkirakan produksi kitosan di dunia pada tahun 1990 sudah mencapai 150.000 ton (Chavasit and Torres, 1990). Kitosan secara komersial telah digunakan sebagai bahan pengendap atau koagulan dan kini telah banyak digunakan untuk bahan tambahan pada makanan. Penambahan kitosan dalam pakan sebagai suplemen untuk menurunkan kadar kolesterol darah diteliti pada tikus, ayam, kelinci dan sapi (Patton and Chandler, 1975; Sugano *et al.*, 1980; 1981; Jennings *et al.*, 1988; Hirano *et al.*, 1990; Ikeda *et al.*, 1993). Selain itu kitosan juga dapat menurunkan kadar trigliserida pada hati dan meningkatkan ekskresi steroid netral melalui feces (Sugano *et al.*, 1978; 1980). Namun pengaruh kitosan dalam mencegah peroksidasi lemak pada pakan tikus belum dipublikasikan. Oleh karena itu tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari pengaruh konsumsi kitosan terhadap status oksidatif tikus yang diberi pakan yang mengandung minyak kelapa sawit yang sudah teroksidasi dengan pemanasan maupun minyak kelapa sawit yang belum dipanaskan.

METODE PENELITIAN

Hewan Percobaan dan Pakan

Tikus Sprague-Dawley putih jantan berumur sekitar 60 hari sebanyak 48 ekor diberi pakan dasar (Tabel 1) selama 4 minggu hingga mencapai berat badan berkisar antara 90 s/d 105 g. Hewan percobaan masing-masing dimasukkan kandang terbuat dari logam dan diletakkan

^{*)} Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

dalam ruangan dengan lama waktu penerangan dan gelap yang hampir sama setiap harinya.

Tabel 1. Komposisi pakan (% b/b) untuk percobaan

Komponen pakan	Kelompok Perlakuan		
	Kontrol	Tengik	Tengik + Kitosan
Kasein	20	20	20
Maizena	40	40	40
Sukrosa	17	17	17
Minyak sawit	15	15*	15*
Serat **	3	3	1
Kitosan	0	0	2
Mineral mix	4	4	4
Vitamin	1	1	1
Total	100	100	100

* Minyak sawit sebelum digunakan telah dipanaskan pada suhu 180°C selama 24 jam.

** Berupa bekatul tanpa minyak (diekstraksi dengan heksana)

Binatang percobaan secara acak dibagi menjadi tiga kelompok masing-masing 16 ekor. Kelompok pertama diberi pakan dasar (kontrol), kelompok kedua diberi pakan mengandung minyak sawit yang telah dipanaskan (tengik), dan kelompok ketiga diberi pakan sama dengan kelompok kedua namun ditambah dengan kitosan (tengik + kitosan) (Tabel 1). Mengingat ada pakan yang mengandung minyak yang sudah teroksidasi dan memiliki aroma yang sedikit berbeda dengan yang lain maka penyimpanan pakan tidak lebih dari 30 hari. Pada awal perlakuan (hari ke-0) empat ekor tikus dari setiap kelompok dipilih secara acak, didekapitasi dan diambil darah serta organ tubuhnya yaitu hati, otak, jantung dan ginjal untuk dilakukan analisa lebih lanjut. Organ yang telah dipisahkan selanjutnya disimpan pada suhu -80° C hingga saatnya dilakukan analisa. Hal yang sama dilakukan pada hari 30, 60 dan 90. Pakan dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Berat badan tikus dan jumlah pakan yang dikonsumsi dimonitor secara periodik.

Analisa Pakan

Pada minyak kelapa sawit yang belum ataupun yang sudah dipanaskan pada suhu 180° C selama 24 jam dilakukan analisa angka peroksida dengan metoda tirasi iodometrik (AOAC, 1995) dan angka TBARS (2-thiobarbituric acid reactive substances) menggunakan metoda spektrofotometri yang dimodifikasi oleh Raharjo *et al.* (1993) dengan menggunakan Sep-Pak C₁₈ cartridge (Water Corporation, Milford, MA). Kadar tokoferol dianalisa menggunakan prosedur HPLC menurut McMurray *et al.* (1980). Jenis analisa yang sama juga dilakukan terhadap pakan yang sudah berupa pelet baik dalam kondisi sebelum maupun sesudah 30 hari penyimpanan aerobik pada suhu kamar.

Analisa Darah dan Organ

Kadar TBARS pada serum darah dan organ yang dinyatakan dalam malonaldehida equivalen dianalisa menurut metoda Draper and Hadley (1990). Kadar vitamin E pada hati dianalisa menggunakan HPLC menurut prosedur Zaspel and Csallany (1982). Aktivitas enzim superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) pada hati ditentukan berdasarkan kemampuannya untuk menghambat reaksi reduksi nitroblue tetrazolium oleh radikal superoksida yang dihasilkan oleh xanthine oxidase (Beauchamp and Fridovich, 1971).

Analisa Statistik

Untuk mengetahui ada atau tidaknya beda nyata antar perlakuan maka dilakukan analisa keragaman dan dilanjutkan dengan Duncan's multiple range test (DMRT) bila memungkinkan (Steel and Torrie, 1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pakan yang digunakan dalam penelitian ini dibuat isokalori dan mengandung 15 % lemak yang berasal dari minyak kelapa sawit. Dengan demikian komponen lemak menyumbangkan sekitar 30 % dari total kalori. Hasil analisa angka peroksida, TBARS dan kadar kolesterol pada minyak sawit segar (sebelum dipanaskan) dan yang sudah dipanaskan dapat dilihat pada Tabel 2. Minyak sawit yang sudah dipanaskan memiliki angka peroksida dan TBARS yang lebih tinggi ($P < 0,05$) daripada minyak sawit yang masih segar, namun kadar tokoferolnya lebih rendah ($PK < 0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan pemanasan pada minyak sawit pada suhu 180°C selama 24 jam telah menyebabkan kerusakan terhadap kualitas minyak sawit. Selanjutnya minyak sawit yang sudah dipanaskan tersebut digunakan untuk perlakuan pemberian pakan pada tikus percobaan.

Ketiga jenis pakan yang digunakan untuk perlakuan dipreparasi masing-masing dalam tiga batch dan setiap batch diperkirakan cukup untuk persediaan selama 30 hari perlakuan. Mengingat asam lemak tidak jenuh pada pakan bisa mengalami oksidasi selama penyimpanan maka karakteristiknya perlu dimonitor pada saat awal dan akhir penyimpanan. Ketika pakan baru saja selesai dipreparasi (1 hari disimpan) diketahui bahwa pakan kontrol memiliki angka peroksida dan TBARS yang lebih rendah ($P < 0,05$) daripada pakan tengik maupun yang mengandung kitosan (Tabel 3). Hal ini disebabkan pada pakan selain kontrol mengandung minyak sawit yang sudah teroksidasi oleh panas dan memiliki angka peroksida dan TBARS yang lebih tinggi. Kadar tokoferol pada pakan sebelum dan sesudah penyimpanan 30 hari ternyata ada perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) untuk ketiga jenis pakan. Perbedaan kadar tokoferol pada minyak sawit sebelum dan sesudah dipanaskan tidak lagi terlihat ketika minyak tersebut sudah dicampur dalam preparasi pakan. Hal ini disebabkan oleh penambahan vitamin mix sebanyak 1 % yang didalamnya terkandung tokoferol sebanyak 2 % (AIN 76).

Tabel 2. Karakteristik minyak kelapa sawit sebelum dan sesudah dipanaskan*

Parameter	Minyak sawit sebelum dipanaskan	Minyak sawit sesudah dipanaskan
Angka peroksida (mEq/kg)	0,8 ± 0,3	5,3 ± 1,2
TBARS (mg MA uquiv./kg)	0,5 ± 0,2	2,7 ± 0,6
Tokoferol (µg/g)	126 ± 23	14 ± 4

* Minyak kelapa sawit dipanaskan dalam oven pada suhu 180° C selama 24 jam.

Tabel 3. Karakteristik pakan selama penyimpanan pada suhu ruangan

Parameter	Lama simpan (hari)	Jenis Perlakuan:		
		Kontrol	Tengik	Tengik + Kitosan
Angka peroksida (mEq/kg)	1	0,5 ± 0,3	4,1 ± 0,8	3,9 ± 0,9
	30	2,3 ± 0,6	9,4 ± 1,6	5,1 ± 0,8
TBARS (mg MA equiv. / kg)	1	0,4 ± 0,2	1,9 ± 0,4	2,2 ± 0,5
	30	1,7 ± 0,3	5,3 ± 0,8	2,7 ± 0,6
Tokoferol (µg/g)	1	217 ± 32	183 ± 18	196 ± 22
	30	131 ± 10	22 ± 6	76 ± 8

Berat badan tikus di awal perlakuan rata-rata 98 ± 6 g. Laju pertambahan berat badan tikus yang diberi pakan selama 90 hari ternyata tidak ada perbedaan nyata (P>0,05) untuk ketiga perlakuan (Tabel 4). Jumlah pakan yang dikonsumsi oleh tikus dari setiap perlakuan selama 90 hari juga tidak berbeda nyata (P>0,05). Hal ini menunjukkan bahwa ketiga jenis pakan memberikan pengaruh yang sama terhadap pertumbuhan berat badan tikus percobaan. Oleh karena itu lebih lanjut perlu dilakukan pengukuran berat beberapa organ untuk mengetahui pengaruh pakan terhadap berat organ. Selama 60 hari pemberian pakan ternyata tidak ada perbedaan nyata berat hati tikus dari ketiga perlakuan (Tabel 4). Namun tikus yang diberi pakan minyak tengik memiliki hati yang lebih berat dibandingkan dengan yang lain setelah diberi pakan selama 90 hari. Berat organ lain seperti otak, jantung dan ginjal tidak berbeda nyata untuk ketiga perlakuan (data tidak dicantumkan dalam paper ini). Hati yang lebih berat pada tikus dengan pakan minyak tengik mengindikasikan adanya kelainan pertumbuhan hati selama perlakuan.

Salah satu produk oksidasi lemak yang banyak digunakan sebagai penunjuk status oksidatif pada hewan percobaan adalah malonaldehida. Hasil analisa kadar malonaldehida pada serum, jantung, ginjal dan otak pada tikus dari ketiga jenis perlakuan menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata (P>0,05), sedangkan perbedaan yang nyata (P<0,05) hanya ditemukan pada hati dari tikus setelah diberi pakan minyak tengik selama 60 hingga 90 hari (Tabel 5). Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan kadar produk oksidasi lemak pada pakan tidak berpengaruh terhadap kadar malonaldehida pada serum dan organ lain kecuali hati. Perbedaan kadar malonaldehida pada hati pun baru mulai bisa diketahui setelah hari ke 60. Kenaikan kadar malonaldehida pada hati tikus yang mendapat pakan tengik menunjukkan

terjadinya stres oksidatif pada hati. Diduga hal ini ada kaitannya dengan berat hati yang tidak normal pada tikus yang diberi pakan tengik selama 90 hari.

Tabel 4. Pertambahan berat badan tikus, konsumsi pakan dan berat hati tikus*

Perlakuan pakan	Lama perlakuan (hari)	Pertambahan berat badan (g)	Konsumsi pakan (g)	Berat hati (g)
Kontrol	30	33 ± 4	397 ± 56	5,1 ± 0,4
	60	62 ± 6	814 ± 104	8,6 ± 0,6
	90	114 ± 11	1220 ± 188	9,2 ± 0,7
Tengik	30	29 ± 5	363 ± 67	6,6 ± 0,3
	60	50 ± 7	788 ± 110	7,2 ± 0,5
	90	96 ± 12	1105 ± 164	14,6 ± 1,1
Tengik + Kitosan	30	26 ± 4	374 ± 72	5,8 ± 0,6
	60	52 ± 8	766 ± 96	7,2 ± 0,8
	90	102 ± 10	1164 ± 155	8,8 ± 0,6

* Berat badan tikus pada awal perlakuan rata-rata adalah 98 ± 6 g

Tabel 5. Kadar TBARS* (2-thiobarbituric acid reactive substances) pada serum darah, hati, jantung, otak dan ginjal.

Perlakuan pakan	Lama perlakuan (hari)	Serum	Hati	Jantung	Ginjal	Otak
Kontrol	0	3,2 ± 0,6	36 ± 4	22 ± 4	41 ± 6	73 ± 9
	30	4,7 ± 0,4	42 ± 6	19 ± 4	33 ± 5	65 ± 10
	60	3,8 ± 0,7	34 ± 3	26 ± 3	36 ± 3	68 ± 7
	90	4,2 ± 0,8	38 ± 8	25 ± 4	32 ± 6	76 ± 12
Tengik	0	4,6 ± 0,6	40 ± 6	28 ± 6	32 ± 7	79 ± 13
	30	4,2 ± 0,7	58 ± 8	24 ± 5	28 ± 4	62 ± 10
	60	3,6 ± 0,5	86 ± 5	21 ± 4	35 ± 4	70 ± 14
	90	5,2 ± 0,9	98 ± 13	30 ± 6	44 ± 5	68 ± 11
Tengik + Kitosan	0	3,3 ± 0,5	39 ± 5	18 ± 4	36 ± 5	68 ± 12
	30	4,7 ± 0,9	50 ± 9	25 ± 3	31 ± 7	59 ± 11
	60	4,8 ± 0,4	41 ± 6	22 ± 5	40 ± 4	65 ± 8
	90	3,7 ± 0,6	46 ± 4	29 ± 5	34 ± 6	72 ± 15

* Dinyatakan sebagai n mol malonaldehida equivalen per gram untuk organ, sedangkan untuk serum dinyatakan dalam n mol malonaldehida equivalen per mL.

Hasil analisa aktivitas enzim SOD pada hati menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata (P>0,5) pada ketiga perlakuan (Tabel 6). Hasil ini menunjukkan bahwa produk oksidasi lemak pada pakan tidak mempengaruhi aktivitas enzim SOD pada hati tikus selama 90 hari perlakuan. Kadar vitamin E pada hati tikus di awal percobaan bisa dikatakan sama (P>0,05). Perbedaan kadar vitamin E mulai nyata setelah diberi pakan selama 30 hari dan seterusnya. Tikus yang mendapat pakan tengik memiliki kadar vitamin E yang terendah setelah 60 hari perlakuan, sedangkan tikus yang diberi pakan mengandung kitosan masih dapat mempertahankan kadar vitamin E yang lebih tinggi. Oleh karena itu perlu dielaborasi lebih lanjut bagaimana kitosan bisa memberikan dampak seperti itu.

Tabel 6. Aktivitas enzim SOD dan kadar vitamin E pada hati tikus selama perlakuan

Perlakuan pakan	Lama perlakuan (hari)	Aktivitas SOD (U/mg sampel)*	Kadar vitamin E ($\mu\text{g/g}$)
Kontrol	0	15,6 \pm 2,1	28,4 \pm 3,1
	30	16,4 \pm 1,6	32,2 \pm 2,7
	60	17,0 \pm 1,9	29,0 \pm 3,8
	90	16,2 \pm 0,8	31,5 \pm 4,2
Tengik	0	16,6 \pm 1,8	26,5 \pm 2,6
	30	19,8 \pm 2,3	16,2 \pm 2,1
	60	18,4 \pm 2,1	5,2 \pm 1,3
	90	17,7 \pm 1,7	6,5 \pm 1,2
Tengik + Kitosan	0	14,8 \pm 2,1	25,8 \pm 4,3
	30	13,8 \pm 1,6	20,4 \pm 3,0
	60	16,6 \pm 1,9	23,2 \pm 2,8
	90	15,3 \pm 0,8	21,8 \pm 2,2

* 1 unit = Jumlah aktivitas enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 50% penghambatan dari reaksi reduksi nitroblue tetrazolium.

KESIMPULAN

Pemberian pakan yang mengandung produk oksidasi lemak yang cukup tinggi hingga 90 hari tidak menimbulkan perbedaan laju pertumbuhan berat badan, kadar TBARS pada serum, jantung, otak dan ginjal tikus percobaan, maupun aktivitas enzim SOD; namun sudah bisa menimbulkan kelainan pada berat hati, kadar TBARS dan vitamin E pada hati. Pemberian kitosan dapat menetralkan dampak negatif pakan tengik terhadap berat hati, kadar TBARS dan vitamin E pada hati tikus hingga mendekati kontrol.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah menyediakan dana untuk penelitian ini. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Dr. Hastari W. atas bantuannya dalam analisis laboratorium dan kepada Bapak Yulianto dan Bapak Daliyo dalam pemeliharaan tikus percobaan di PAU Pangan dan Gizi UGM.

DAFTAR PUSTAKA

Addis, P.B. 1990. *Coronary heart disease: An update with emphasis on dietary lipid oxidation products*. Food Nutr. News 62(2): 7-10.

Beauchamp, C. and Fridovich, J. 1971. *Superoxide dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels*. Anal. Biochem. 44:276-286.

Chavasit, V. and Torres, J.A. 1990. *Chitosan-poly (acrylic acid): Mechanism of complex Formation and Industrial Applications*. Biotechnol. Prog. 6:2-6.

Duthie, G.G. 1991. *Antioxidant hypothesis of cardiovascular disease*. Trends Food Sci Technol. 2(8): 205-207.

Draper, H.H. and Hadley, M. 1990. *Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation*. Methods Enzymol. 186: 421-431.

Hirano, S., Hakura, C., Seino, H., Akiyama, Y., Nonaka, I., Kanbara, N., and Kawakami, T. 1990. *Chitosan as an Ingredient for Domestic Animal Feed*. J. Agric. Food Chem. 38: 1214-1217.

Ikeda, I. Sugano, M., Yoshida, K., Sasaki, E., Iwamoto, Y., and Hatano, K. 1993. *Effects of chitosan hydrolysates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentration in rats*. J. Agric. Food Chem. 41: 431-435.

Jennings, C.D., Boleyn, K., Bridges, S.R., Wood, P.J., Anderson, J.W. 1988. *A Comparison of the lipid-lowering and intestinal morphological effects of cholestyramine, chitosan, and oat gum in rats*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 189: 13-20.

Knorr, D. 1991. *Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management*. Food Technol. 45(1): 114-122.

McMurray, C., Blauchflower, W.J., and Rice, D.A. 1980. *Influence of extraction techniques on determination of α -tocopherol in animal foodstuff*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63: 363-369.

Patton, R.S. and Chandler, P.T. 1975. *In vivo digestibility evaluation of chitinous materials*. J. Dairy Sci., 58: 397-402.

Raharjo, S., Sofos, J.N., and Schmidt, G.R. 1993. *Solid-phase acid extraction improves thiobarbituric acid method to determine lipid oxidation*. J. Food Sci. 58:921-924.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. *Principles and procedures of statistics*. 2nd edition. McGraw-Hill, New York.

Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsuji, Y., and Hasegawa, Y. 1978. *Hypocholesterolemic effects of chitosan in cholesterol-fed rats*. Nutr. Rep. Intl. 18: 531-537.

Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsuji, Y., Nakashima, K., Fukuda, N., and Hasegawa, Y. 1980. *A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats*. Am. J. Clin Nutr. 33: 787-793.

Sugano, M. Watanabe, S. Kishi, A., Izume, M., and Ohtakara, A. 1988. *Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats*. Lipids 23: 187-191.

Suryono, S. dan S. Djauzi. 1993. *Penyakit degeneratif dan gizi lebih*. Makalah Widyakarya Pangan dan Gizi. Jakarta.

Zaspel, B.J. and Csallany, A.S. 1982. *Determination of α -tocopherol in tissues and plasma by high performance liquid chromatography*. Anal. Biochem. 130: 146-150.