

repository.ub.ac.id

**PEMBERIAN *Lactobacillus plantarum* SEBAGAI AGEN PREVENTIF  
TERHADAP LEVEL BUN DAN KREATININ SERUM SERTA  
HISTOPATOLOGI GINJAL PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)  
YANG DIINDUKSI AFLATOKSIN**

**SKRIPSI**

Oleh:

**GHEA ROIHANA NURSHALIAH**

**145130100111035**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**



repository.ub.ac.id

**PEMBERIAN *Lactobacillus plantarum* SEBAGAI AGEN PREVENTIF  
TERHADAP LEVEL BUN DAN KREATININ SERUM SERTA  
HISTOPATOLOGI GINJAL PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)  
YANG DIINDUKSI AFLATOKSIN**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:  
**GHEA ROIHANA NURSHALIHAH**  
**14513010011103**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**



## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pemberian *Lactobacillus plantarum* sebagai Agen Preventif terhadap Level BUN dan Kreatinin Serum serta Histopatologi Ginjal pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Aflatoksin**

Oleh:  
**GHEA ROIHANA NURSHALIAH**  
**145130100111035**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 18 Juli 2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr.drh. Masdiana C.Padaga, M.App.Sc**  
**M.Biotech**

NIP 19560210 198403 2 001

**drh. Fajar Shodiq Permata,**

NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**

NIP. 19600903 198802 2 001

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ghea Roihana Nurshalihah

NIM : 145130100111035

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulisan Skripsi berjudul:

Pemberian *Lactobacillus plantarum* Sebagai Agen Preventif Terhadap Level BUN dan Kreatinin serum serta Histopatologi Ginjal pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Aflatoksin.

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 8 Agustus 2018

Yang menyatakan,

(Ghea Roihana Nurshalihah)

NIM. 145130100111035

**Pemberian *Lactobacillus plantarum* Sebagai Agen Preventif terhadap Level BUN dan Kreatinin Serum serta Histopatologi Ginjal pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Aflatoksin**

**ABSTRAK**

Aflatoksin merupakan metabolit sekunder yang diproduksi oleh kapang yaitu *Aspergillus flavus*. Komponen aflatoksin dapat mengganggu fungsi filtrasi glomerulus ginjal yang dapat mempengaruhi parameter kimiawi ginjal yaitu BUN dan kreatinin. Bakteri asam laktat mempunyai kemampuan mengikat aflatoksin karena memiliki komponen asam *teichoic* pada dinding sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek bakteri *Lactobacillus plantarum* terhadap level BUN dan kreatinin serum serta histopatologi ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aflatoksin. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental menggunakan RAL. Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol negatif tanpa diberi perlakuan, kelompok aflatoksikosis yang diinduksi aflatoksin (7 µg/kg BB), kelompok P1 (BAL  $1 \times 10^4$  CFU/ml dan aflatoksin 7 µg/kg BB), kelompok P2 (BAL  $1 \times 10^6$  CFU/ml dan aflatoksin 7 µg/kg BB), dan kelompok P3 (BAL  $1 \times 10^8$  CFU/ml dan aflatoksin 7 µg/kg BB). Level BUN dan kreatinin diukur menggunakan spektrofotometer secara kuantitatif dengan uji statistik One-Way ANOVA,  $\alpha = 5\%$  dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ). Histopatologi ginjal menggunakan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) dan dianalisa secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian BAL dapat mencegah kenaikan BUN dan kreatinin serum serta mencegah kerusakan glomerulus dan tubulus ginjal akibat induksi aflatoksin secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Dosis  $1 \times 10^4$  CFU/ml adalah dosis efektif dalam mencegah kenaikan BUN dan kreatinin serum serta kerusakan glomerulus dan tubulus ginjal. Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian BAL *Lactobacillus plantarum* dapat mencegah kenaikan level BUN dan kreatinin serum serta mencegah kerusakan ginjal.

Kata kunci: Aflatoksin, *Lactobacillus plantarum*, BUN dan Kreatinin, Histopatologi ginjal

**The Administration of *Lactobacillus plantarum* as Preventive Agent on BUN and Creatinine Serum Levels and Kidney Histopathology in Rats (*Rattus norvegicus*) Induced by Aflatoxin**

**ABSTRACT**

Aflatoxin is a secondary metabolite produced by mold such as *Aspergillus flavus*. Components of Aflatoxin can interfere with the function of the kidney glomerulus filtration which can affect the chemical parameters of the kidney on BUN and creatinine. Lactic acid bacteria has the ability to bind aflatoxin because it has the teichoic acid component in the cell wall. The purpose of this study was to know the effect of *Lactobacillus plantarum* bacteria on BUN and creatinine serum levels and histopathology of the kidney in rats induced by aflatoxin. This research was conducted experimentally using RAL. The animals were divided into 5 groups consisted of negative control group without treatment, aflatoxicosis group induced aflatoxin (7 µg/kgBW), group P1 (BAL 1x10<sup>4</sup> CFU/ml and aflatoxin 7 µg/kg BW), group P2 (BAL 1x10<sup>6</sup> CFU/ml and aflatoxin 7 µg/kg BW), and group P3 (BAL 1x10<sup>8</sup> CFU/ml and aflatoxin 7 µg/kg BW). BUN and Creatinine levels were measured quantitatively using spectrophotometer and was analyzed statistically by One-Way ANOVA method, α = 5% followed by Bright Interpretation (BNJ). The histopathologic of the kidney used the Hematoxylin-Eosin (HE) and was analyzed descriptively. The results showed that the administration of BAL could prevent an increase in BUN and serum creatinine and prevent damage to the glomerulus and kidney tubules due to induction of aflatoxin exposure significantly (p <0.05). A dose of 1x10<sup>4</sup> CFU/ml was an effective dose in preventing BUN and creatine serum and a few glomerulus and tubules damage of the kidney. The conclusion of this study was *Lactobacillus plantarum* could prevent increase of the BUN and creatine levels and kidney damage.

Keywords: Aflatoksin, *Lactobacillus plantarum*, BUN and Creatinine, Kidney Histopathology.

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur saya panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya penulis dapat menyelesaikan skripsi penelitian dengan judul **“Pemberian *Lactobacillus plantarum* Sebagai Agen Preventif terhadap Level BUN dan Kreatinin Serum serta Histopatologi Ginjal pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Aflatoksin”** sebagai tugas akhir/skripsi sebagai syarat kelulusan menjadi Sarjana Kedokteran Hewan.

Skripsi ini disusun berdasarkan diskusi dengan berbagai pihak serta literatur yang penulis baca dari beberapa referensi. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Dr. drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc dan drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen pembimbing yang telah menyisihkan waktunya untuk membimbing penulis pada saat penulisan skripsi ini.
2. drh. Galuh Chandra Agustina, M.Si, dan drh. Albiruni Haryo, M.Sc selaku dosen penguji atas segala ilmu, dukungan, serta saran dan masukan dalam penyempurnaan penulisan tugas akhir ini.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
4. Ayah, Ibu, Haikal, Emak dan Abah tercinta yang selalu memberi kasih sayang, dorongan, dukungan dan doa untuk menyelesaikan studi penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.

5. Rekan seperjuangan Aflatoksin dan *L.plantarum* Silvia Rafiatul N, Icha Yung Aulia, Adi Purwo Jatmiko, dan Yosua Wisnu untuk waktu dan inspirasi yang diberikan untuk penulis.
6. Seluruh dosen dan civitas akademika yang telah membimbing, memberikan ilmu, dan mewadahi penulis selama menjalankan studi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
7. Seluruh kolegium Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, khususnya kepada teman-teman Brave, Kolegium FKH UB terutama BEM Responsive dan Kordinative.
8. Rekan dekat M.Elmanaviean, Parlente dan Ciwi-ciwi, Fiveangles, Elok, dan Andhara yang selalu memberi semangat untuk penulis.

Penulis sadar bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG.....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Aflatoksin .....	5
2.2 Aflatoksikosis .....	6
2.2.1 Patomekanisme .....	6
2.2.2 Tindakan Pencegahan .....	9
2.3 BUN dan Kreatinin pada Aflatoksikosis .....	10
2.4 Kerusakan Ginjal Model Aflatoksikosis .....	11
2.5 Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Hewan Model Aflatoksikosis .....	13
2.6 <i>Lactobacillus plantarum</i> sebagai Agen Preventif Aflatoksikosis .....	14
<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....</b>	<b>16</b>
3.1 Kerangka Konseptual .....	16
3.2 Hipotesis Penelitian.....	18
<b>BAB IV METODEOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	19
4.2 Sampel Penelitian .....	19
4.3 Rancangan Penelitian .....	20
4.4 Variabel Penelitian .....	21
4.5 Alat dan Bahan .....	21
4.5.1 Alat.....	21
4.5.2 Bahan .....	21
4.6 Prosedur Penelitian.....	22
4.6.1 Persiapan Hewan Model .....	22
4.6.2 Persiapan Bakteri <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	22
4.6.3 Persiapan Aflatoksin .....	23
4.6.4 Analisis level BUN dan Kreatinin .....	24



4.6.5 Pengambilan Organ Ginjal.....	25
4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal .....	25
4.6.7 Analisa Data.....	26
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>27</b>
5.1 Pengaruh Bakteri Asam Laktat pada Pencegahan Aflatoksikosis Terhadap <i>Level Blood Urea Nitrogen (BUN) Serum Tikus (Rattus novergicus)</i> .....	27
5.2 Pengaruh Bakteri Asam Laktat pada Pencegahan Aflatoksikosis Terhadap <i>Level Kreatinin Serum Tikus (Rattus novergicus)</i> .....	32
5.3 Pengaruh Bakteri Asam Laktat pada Pencegahan Aflatoksikosis Terhadap <i>Histopatologi Ginjal Tikus (Rattusnovergicus)</i> .....	37
<b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>43</b>
6.1 Kesimpulan.....	43
6.2 Saran .....	43
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>44</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>49</b>



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>		<b>Halaman</b>
4.1	Rancangan kelompok penelitian .....	20
5.1	Level <i>Blood Urea Nitrogen</i> (BUN) serum pada kelompok tikus perlakuan .....	27
5.2	Level Kreatinin serum pada kelompok tikus perlakuan .....	33



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>		<b>Halaman</b>
2.1	Struktur Kimia AFBO .....	6
2.2	Histologi Ginjal Normal Tikus .....	12
2.3	Tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....,.....	13
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian .....	16
5.1	Histopatologi Ginjal Tikus.....	42



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik Penelitian .....	49
2. Sertifikat <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	50
3. Sertifikat <i>Aspergillus flavus</i> .....	51
4. Surat Hasil Uji TLC .....	52
5. Kerangka Operasional Penelitian .....	53
6. Persiapan bakteri <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	54
7. Persiapan aflatoksin dari <i>Aspergillus flavus</i> .....	55
8. Ekstraksi Aflatoksin dari <i>Aspergillus flavus</i> .....	56
9. Analisa Level BUN dan Kreatinin Serum .....	57
10. Pembuatan Preparat Histopatologi Organ Ginjal .....	59
11. Level Blood Urea Nitrogen (BUN) dan kreatinin Serum Tikus Perlakuan .....	60
12. Analisis Statistika Level Blood Urea Nitrogen (BUN) dan kreatinin Serum Tikus Perlakuan .....	62

## DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
<i>ad libitum</i>	tidak terbatas
AFB1	aflatoksin B1
AFB2a	aflatoksin B2a
AFM1	aflatoksin M1
AFQ1	aflatoksin Q1
ALT	<i>Alanine Aminotransferase</i>
ANOVA	<i>analysis of variant</i>
AST	<i>Aspartat Aminotransaminase</i>
BAL	bakteri asam laktat
BB	berat badan
BUN	<i>Blood Urea Nitrogen</i>
Cc	<i>cubic centimeter</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CPA	<i>cyclopiazonic acid</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
g	Gram
GSH	<i>Glutathione</i>
GC	Gas Chromatography
HE	<i>haematoxylin and eosin</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IU	<i>International Units</i>
L	Liter
<i>L.plantarum</i>	<i>Lactobacillus Plantarum</i>
LDH	<i>Lactate Dehydrogenase</i>

mL	Mililiter
Mmol	Milimol
MRSA	<i>de Man Rogosa Sharp Agar</i>
MRSB	<i>de Man Rogosa Sharp Broth</i>
NADH	<i>Niconamide Adenine Dinucleotide</i>
OD	<i>Optical Density</i>
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PFA	<i>Para Formal Dehyde</i>
pH	<i>potential of hidrogen</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i>
TNF	<i>Tumor Necrotic Factor</i>
TPC	<i>Total Plate Count</i>







## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Aflatoksin merupakan metabolit sekunder yang diproduksi oleh spesies kapang yaitu *Aspergillus flavus*. Aflatoksin sering ditemukan pada bahan pangan dan pakan ternak sebagai penyebab terjadinya aflatoksikosis (Kusumaningtyas, 2006). Kontaminasi aflatoksin pada komoditi pertanian merupakan kendala terbesar bagi perkembangan pertanian dan peternakan di Indonesia. Hal ini disebabkan oleh kondisi iklim Indonesia yang tropis, yang merupakan kondisi ideal bagi pertumbuhan kapang penghasil aflatoksin (Sa'diah, 2012). Sumantri dkk (2007) menjelaskan pada daerah Kalimantan Selatan memperlihatkan tingginya prevalensi cemaran aflatoksin dalam pakan dan produk itik alabio mencapai 100%. Tingginya kontaminasi aflatoksin yang melebihi batas ambang maksimum menyebabkan banyak komoditi pertanian tidak layak diperdagangkan. Hal tersebut mengakibatkan kerugian yang besar terhadap perekonomian suatu negara secara luas (Sa'diah, 2012).

Kontaminasi dari aflatoksin sangat berbahaya bagi tubuh karena berpotensi karsinogenik, mutagenik dan hepatotoksik yang dapat menyerang di berbagai organ salah satunya adalah ginjal (Kusumaningtyas, 2006). Ginjal merupakan organ yang berfungsi untuk mengekskresikan zat sisa metabolisme termasuk aflatoksin. Komponen aflatoksin yang masuk kedalam tubuh akan dimetabolisme oleh hepar untuk menghasilkan racun-racun turunan yang menyebar secara sistemik ke seluruh tubuh (Dhanasekaran *et al.*, 2011). Komponen aflatoksin akan dieliminasi melalui ginjal yang mengakibatkan

akumulasi toksin berlebih. Akumulasi toksin dapat mengganggu fungsi ginjal melalui perubahan degeneratif dan nekrotik pada glomerulus dan epitel tubular ginjal. Gangguan fungsi ginjal karena aflatoksin dapat menurunkan laju filtrasi glomerulus yang akan mempengaruhi parameter kadar kimiawi ginjal seperti BUN dan kreatinin serum (Valchev *et al.*, 2014).

Beberapa upaya telah dilakukan untuk mencegah pertumbuhan aflatoksin didalam tubuh, salah satunya dengan menggunakan bakteri nonpatogenik seperti bakteri asam laktat (BAL) dari genus *Lactobacillus* (Hamidi, *et al.*, 2013). Bakteri asam laktat dapat menjadi agen preventif untuk mencegah pertumbuhan aflatoksin karena memiliki senyawa anti mikrobial seperti asam-asam organik, asam lemak tak jenuh, amoniak, dan bakteriosin. Kemampuan bakteri asam laktat dalam menghambat aflatoksin melalui mekanisme *binding* komponen asam *teichoic* pada permukaan dinding sel bakteri (Hernandez *et al.*, 2010). Pemberian BAL akan mencegah metabolisme aflatoksin sehingga toksin akan menghindarkan tubuh dari keadaan stres oksidatif dan mencegah gangguan fungsi ekskresi ginjal. Tidak terjadinya gangguan fungsi ekskresi ginjal maka tidak menyebabkan kerusakan sel dan gangguan eliminasi produk urea dan kreatinin. Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh bakteri *Lactobacillus plantarum* terhadap level BUN (*Blood Urea Nitrogen*) dan kreatinin serum serta efek kerusakan pada histopatologi ginjal pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aflatoksin dari *Aspergillus flavus*.

## 1.2 Rumusan Masalah Penelitian

1. Apakah bakteri *Lactobacillus plantarum* dapat mencegah peningkatan level BUN (*Blood Urea Nitrogen*) dan kreatinin serum pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aflatoksin?
2. Apakah bakteri *Lactobacillus plantarum* dapat mencegah kerusakan pada histpatologi ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aflatoksin?

## 1.3 Batasan Masalah

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

1. Hewan model yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattusnorvegicus*) strain Wistar jantan dengan umur 8 – 10 minggu dan berat badan 150 – 250 g (Widyaastuti *et al*, 2011) yang diperoleh dari Laboratorium Faal Universitas Brawijaya Malang. Penggunaan hewan coba dalam penelitian telah mendapatkan sertifikat leik etik No: 910-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (**Lampiran 1**).
2. Bakteri asam laktat yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan isolat BAL *Lactobacillus plantarum* yang diperoleh dari Balitvet Culture Collection (BCC) Bogor (**Lampiran 2**). *Lactobacillus plantarum* diberikan dengan konsentrasi  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$ , dan  $1 \times 10^8$  CFU/mL selama 21 hari berturut-turut secara peroral (Arief dkk, 2010).
3. Aflatoksin yang digunakan yaitu *Aspergillus flavus* sediaan vial yang didapat dari Balitvet Culture Collection (BCC) Bogor (**Lampiran 3**). Dosis pemberian  $7 \mu\text{g/kg}$  BB diberikan secara peroral.

4. Analisa Aflatoksin dilakukan menggunakan uji TLC (**Lampiran 4**).
5. Analisa level BUN (*Blood Urea Nitrogen*) dan kreatinin serum dalam penelitian ini diukur menggunakan spektrofotometer.
6. Histopatologi ginjal dibuat dengan pewarnaan *haematoxylin eosin* (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

1. Mengetahui efek bakteri *Lactobacillus plantarum* terhadap level BUN (*Blood Urea Nitrogen*) dan kreatinin serum pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aflatoksin.
2. Mengetahui pengaruh bakteri *Lactobacillus plantarum* terhadap efek kerusakan pada histopatologi ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aflatoksin.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah menjadi dasar informasi tentang potensi bakteri asam laktat terhadap aflatoksikosis serta meningkatkan pengembangan penelitian mengenai pemanfaatan bakteri asam laktat sebagai probiotik untuk pencegahan dan terapi pengobatan aflatoksikosis pada hewan.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Aflatoksin

Aflatoksin merupakan golongan senyawa toksin yang berasal dari fungi yang dikenal mematikan dan bersifat karsinogenik bagi manusia dan hewan (Sa'diah, 2012). Aflatoksin memiliki tingkat potensi bahaya yang tinggi dibandingkan dengan mikotoksin lain. Aflatoksin berpotensi karsinogenik, mutagenik, dan hepatotoksik (Lanyasanya *et al.*, 2005). Hal ini sesuai dengan penelitian valchev Terdapat empat jenis aflatoksin yang paling dikenal pada ilmu toksikologi, yaitu B1, B2, G1, dan G2. Jenis lain yaitu M1 dan M2 yang merupakan hasil metabolisme dari jenis B1 dan B2 pada susu. Aflatoksin merupakan toksin yang dihasilkan dari metabolisme kapang yaitu *Aspergillus flavus* (IARC, 2002).

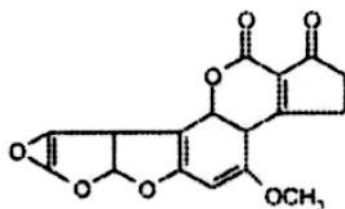
*Aspergillus flavus* merupakan kapang mesofilik yang memiliki suhu pertumbuhan minimum 6–8°C, optimum 36–38°C, dan maksimum 44–46°C (Sa'diah, 2012). Hedayati (2007) menyatakan bahwa penyebaran *Aspergillus flavus* yang merata sangat dipengaruhi oleh iklim dan faktor geografis serta faktor lingkungan. Pada kondisi lingkungan tertentu, *Aspergillus flavus* dapat menghasilkan toksin yang disebut aflatoksin (Sa'diah, 2012). Temperatur minimum bagi *Aspergillus flavus* untuk memproduksi aflatoksin adalah 12–41°C, dengan suhu optimum antara 25 – 32°C. Sintesis aflatoksin pada bahan pakan meningkat pada temperatur di atas 27°C, dengan kelembaban lingkungan di atas 62%, dan kelembaban bahan pakan di atas 14% (Dhanasekaran *et al.*, 2011; Royes *et al.*, 2002). Afiandi (2011) juga menjelaskan pada penelitiannya bahwa

isolat lokal *Aspergillus flavus* mengalami produksi aflatoksin yang optimum mulai hari ke 9 sampai hari ke 12.

## 2.2 Aflatoksikosis

### 2.2.1 Patomekanisme

Aflatoksin dapat masuk ke dalam tubuh secara per oral, inhalasi, mukosa atau kulit yang terluka, kemudian didistribusikan melalui aliran darah. Metabolisme dan mekanisme aksi aflatoksin yang tertelan kemudian diabsorpsi pada saluran pencernaan. Penyerapannya pada dosis yang rendah sudah dapat menyebabkan aflatoksikosis (Dhanasekaran *et al.*, 2011). Setelah terjadi absorpsi pada saluran pencernaan, aflatoksin dimetabolisme terutama di organ hati untuk melakukan biotransformasi menjadi senyawa yang reaktif yaitu AFBO 8,9-epoksida (AFBO). Senyawa reaktif AFBO (**Gambar 2.1**) memiliki ikatan rangkap oksigen yang dapat berikatan dengan radikal bebas sehingga memicu peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Peningkatan ROS menyebabkan terganggunya fungsi antioksidan didalam tubuh sehingga menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif ini dapat menyebabkan terjadinya reaksi peroksidasi lipid membran yang dapat merusak membran sel sehingga menyebabkan hilangnya fungsi morfologi pada ginjal (Valchev *et al.*, 2014)



**Gambar 2.1** Struktur kimia senyawa reaktif AFBO 8,9-epoksida (AFBO) (Kusumaningtyas, 2006)

Biotransformasi merupakan proses dirubahnya suatu substansi kimia menjadi bentuk senyawa lain (transformasi) oleh enzim tertentu atau reaksi kimia. Biotransformasi dalam toksikologi berperan penting sebagai bentuk pertahanan untuk eliminasi racun xenobiotik dan residu dalam tubuh menjadi bentuk yang mudah dieksresikan (Monosson, 2012). Aflatoksin mengalami proses biotransformasi dalam dua tahap. Tahap pertama, yaitu reaksi oksidasi yang melibatkan reaksi-reaksi epoksidasi, hidroksilasi, O-dimetilasi, pembentukan AFB(G)2-alfa, reduksi dan hidrolisis. Sedangkan pada tahap kedua atau disebut sebagai tahap konjugasi yang melibatkan konjugasi epoksida, glutathion, sulfat, dan glukoronidasi (Primadona, 2002).

Pada tahap pertama, reaksi yang terlibat dalam reaksi oksidasi dikatalisis oleh sistem enzim sitokrom P450. Pada reaksi epoksidasi, oksigen diperlukan oleh ikatan ganda karbon-karbon untuk menghasilkan AFB1-8,9-epoksida yang dikatalisis oleh epoksida hidrolase. Pada reaksi hidroksilasi terjadi pemasukan atom oksigen ke ikatan karbon hidrogen yang menghasilkan metabolit untuk membentuk aflatoksin M1 dan aflatoksin Q1. Pada reaksi O-dimetilasi, AFB1 akan menghasilkan metabolit AFP1 dengan reaksi karbon alfa grup alkil berdampingan dengan atom N, O, dan S menjadi hidroksilat dengan jalan memasukkan atom oksigen ke dalam ikatan karbon hidrogen. Pembentukan AFB2-alfa langsung dari AFB1 terjadi secara *in vitro* dalam kondisi asam (Primadona, 2002). Reaksi hidrasi merupakan reaksi bentuk khusus dari reaksi hidrolisis yaitu penambahan air ke dalam senyawa tanpa menyebabkan senyawa tersebut terdisosiasi menjadi sejumlah komponen-komponennya, reaksi ini akan

membentuk suatu transdiol (Primadona, 2002). Produk hasil metabolisme dari tahap pertama akan di proses menuju metabolisme tahap kedua yaitu tahap sistem enzimatis.

Pada tahap kedua, reaksi konjugasi menghasilkan suatu bahan yang lebih polar, kurang larut dalam lemak, lebih mudah dieliminasi oleh suatu organisme dan kurang toksik. Bentuk epoksida akan terkonjugasi secara enzimatik oleh glutathione reduktase dan selanjutnya akan teraktivasi. Tahap konjugasi atau tahap sintesis berperan untuk meningkatkan daya larut molekul dalam air, meningkatkan polaritas molekul, meningkatkan ukuran molekul, menyingkirkan aktivitas biologik molekul dan mempermudah pengeluaran molekul (Primadona, 2002). Konjugasi metabolit aflatoksin terdiri dari reaksi konjugasi glutathione dari metabolit epoksida dan glukuronidasi. Reaksi konjugasi oleh glutathione ini diperantarai oleh glutathione S-transferase (GST) dan kofaktor glutathione (GSH). Jalur konjugasi dari GST adalah mengkonjugasi elektrofil yang toksik dengan GSH endogenous dan kemudian melindungi bagian nukleofil seperti protein dan asam nukleat (Primadona, 2002). GSH bertindak sebagai antioksidan dan memiliki banyak fungsi pemeliharaan membran dan stabilitasnya serta mengurangi faktor stres oksidatif dan ROS yang tinggi yang dihasilkan dari proses metabolisme peroksidasi lipid. Adanya aflatoksin dapat menyebabkan deplesi (pengurangan) GSH di dalam tubuh. Kurangnya GSH di dalam tubuh dapat meningkatkan kadar ROS di dalam sel yang terjadi pada saat proses metabolisme AFB1. Kurangnya GSH juga mempengaruhi katalisis  $O_2$  menjadi  $H_2O_2$  GSH-peroksidase sehingga mempengaruhi integritas membran sel (Bbosa *et al.*, 2013).



Aflatoksin juga meningkatkan peroksidasi lipid pada jaringan hepar dan ginjal serta menginduksi kerusakan sel sehingga terjadi gangguan pada fungsi organ. Setelah itu, kemudian masuk pada reaksi glukoronidasi. Tahap ini melibatkan enzim-enzim uridin difosfat glukuronil transferase yang berperan dalam pembentukan glukuronida seperti sulfotransferase, metiltransferase, enzim N-aseil transferase beserta asetil koenzim A, dan konjugat asam amino beserta koenzim A. Adanya reaksi glukuronidasi menyebabkan aflatoksin akan lebih mudah dikeluarkan dari tubuh melalui urin atau saluran lain (Primadona, 2002).

Aflatoksin dieliminasi terutama melalui ginjal, tetapi akumulasi konsentrasi toksin yang relatif tinggi dapat mengganggu fungsi ekskresi. Efek yang terjadi akibat toksik aflatoksin terjadi pada membran glomerulus dan tubulus ginjal pada tikus. Membran glomerulus dan tubulus ginjal mengalami penurunan laju filtrasi glomerulus, reabsorpsi glukosa, elektrolit tubular dan tingkat transportasi ion organik. Penurunan dari laju filtrasi glomerulus dapat mengindikasikan adanya peningkatan kadar urea dan kreatinin (Valchev *et al.*, 2014).

### **2.2.2 Tindakan Pencegahan**

Sebagian besar kasus aflatoksikosis disebabkan oleh konsumsi makanan yang terkontaminasi kapang *Aspergillus* atau aflatoksin. Metode untuk menetralkan aflatoksin pada bahan pakan yang umum digunakan yaitu metode *thermal*, metode kimia, dan metode mikrobial. Metode *thermal* dapat mengeliminasi keberadaan aflatoksin pada bahan pakan melalui penggunaan temperatur yang tinggi, namun metode ini tidak diaplikasikan karena temperatur

tinggi akan menyebabkan perubahan tampilan, rasa, dan kualitas pakan. Metode kimia dilakukan dengan penggunaan komponen kimia seperti derivat *chlorine*, seperti *sodium hypochloride*, atau larutan pemutih. Metode ini tidak dapat digunakan karena meninggalkan residu yang memiliki efek destruktif dan toksik. Metode terbaik untuk mengurangi keberadaan aflatoksin yaitu dengan menggunakan bakteri nonpatogenik seperti bakteri asam laktat (BAL), contohnya BAL dari genus *Lactobacillus* (Abdolamir and Razagi, 2008; Boutrif, 2006; Farber *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 2011).

Upaya pencegahan yang dilakukan yaitu dengan mengurangi paparan aflatoksin pada bahan pakan. Upaya seperti penanaman tanaman resisten hama juga dilakukan dengan tujuan akan mengurangi tingkat pertumbuhan kapang. Upaya pencegahan lain dapat dilakukan dengan cara memodulasi proses detoksifikasi aflatoksin yang tertelan sehingga efek dapat ditekan, misalnya dengan penggunaan probiotik (Groopman *et al.*, 2008). Penelitian mengenai upaya pencegahan dengan pembuatan vaksin AFB1 telah dimulai oleh Wilkinso *et al.*, (2003) yang memberikan hasil bahwa IgG serum anti-AFB1 dihasilkan dengan kadar yang signifikan oleh hewan coba yang divaksin, hanya saja penelitian ini belum memperlihatkan reaksi terhadap uji tantang terhadap AFB1.

### **2.3 BUN dan Kreatinin pada Aflatoksikosis**

*Blood urea nitrogen* (BUN) dan kreatinin merupakan salah satu indikator sensitif untuk gangguan yang terjadi pada ginjal, salah satunya karena adanya aflatoksin yang dieliminasi oleh ginjal. Aflatoksin yang dieliminasi melalui ginjal dengan konsentrasi yang relatif tinggi dapat mengganggu fungsi ekskresi yang

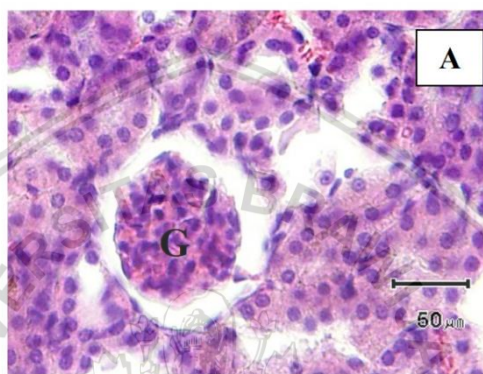
menyebabkan berkurangnya laju filtrasi glomerulus, reabsorpsi glukosa, elektrolit tubular dan tingkat transportasi ion organik. Penurunan dari laju filtrasi glomerulus akan mengindikasikan adanya peningkatan kadar urea dan kreatinin serum (Valchev *et al.*, 2014).

*Blood urea nitrogen* (BUN) merupakan indikator yang dipengaruhi oleh aliran darah ke ginjal dan fungsi tubular dan glomerular. BUN merupakan produk akhir nitrogen yang dieksresikan oleh ginjal. Kreatinin merupakan hasil degenerasi dari kreatin dan produk akhir dari metabolisme otot. Kreatinin disintesis dari asam amino arginin dan glisin didalam hati dan ginjal, kemudian difiltrasi oleh glomerulus dan disekresikan serta direabsorpsi melalui tubulus, dan akan dieleminasi dalam urin (Guyton and Hall, 2006; Salasia dan Hariono, 2014; Suckow *et al.*, 2006). Pada kondisi gangguan fungsi ginjal, seperti kasus aflatoksikosis pada penelitian Valchev *et al* (2014) kadar BUN dan kreatinin mengalami peningkatan. Peningkatan urea dan kreatinin dalam darah menunjukkan proses inflamasi dan distrofik di tubulus ginjal. Kadar urea dan kreatinin yang tinggi juga dapat terjadi karena adanya gangguan fungsi transportasi sel epitel tubulus kolektifus dan adanya penurunan fungsi difusi tubulus proksimal.

#### **2.4 Kerusakan Ginjal Model Aflatoksikosis**

Ginjal merupakan organ yang berfungsi untuk mengatur keseimbangan cairan tubuh dengan cara mengekskresikan zat sisa metabolisme dan menahan zat yang masih dibutuhkan oleh tubuh. Ginjal juga berfungsi sebagai organ ekskresi utama sekitar 20-25% dari total toksik pada tubuh, termasuk mikotoksin. Dasar unit

fungsional dan struktural yaitu pada nefron, nefron berfungsi dalam respon filtrasi, ekskresi, dan reabsorpsi ginjal. Setiap nefron terdiri atas korpuskulus ginjal dan tubulus ginjal yang terbagi menjadi tubulus proksimal, *loops of henle* dan tubulus distal yang bergabung menjadi tubulus kolektivus (Shu-Xin, 2013). Histologi ginjal normal pada tikus dapat dilihat pada **Gambar 2.1**



**Gambar 2.2** Histologi ginjal normal pada tikus dengan pewarnaan *hematoxilin-eosin* (HE) dan perbesaran 400x  
Keterangan : (G) Glomerulus (Putra dkk, 2014)

Sel epitel tubulus sangat peka terhadap anoksia dan rentan terhadap toksin. Toksin yang masuk ke dalam ginjal dapat menyebabkan berbagai macam kelainan pada struktur maupun fungsi nefron. Kerusakan pada nefron dapat terjadi pada tubulus, korpuskulus renalis, maupun kapiler-kapiler darah dalam ginjal. Gangguan pada korpuskulus dapat merusak glomerulus dan kapsula Bowman, sehingga akan mengganggu kelancaran aliran darah dalam kapiler-kapiler glomerulus. Kerusakan pada tubulus dapat terjadi pada sel-sel epitel, antara lain mengalami degenerasi dan atrofi sehingga lumen melebar. Bagian nefron yang terkena efek dari aflaktosin dapat menyebabkan nefrotoksisitas (Adleend, 2015). Pada penelitian yang dilakukan oleh Devendran *et al* (2011) menunjukkan bahwa

paparan aflatoksin pada tikus yang diinduksi aflatoksin terlihat adanya degenerasi tubulus parenkim, terutama pada tubulus distal yang dimanifestasikan oleh pembengkakan epitel dan terlihat granular sitoplasma yang menonjol pada tikus.

## 2.5 Tikus (*Rattus norvegicus*) Hewan Model Aflatoksikosis

Tikus laboratorium yang sering digunakan dalam penelitian yaitu tikus putih spesies *Rattus norvegicus*. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (**Gambar 2.2**) memiliki ciri rambut berwarna putih, panjang tubuh total 440 mm dengan panjang ekor 205 mm, berat badan tikus betina dewasa 250-300 g, dan masuk dewasa pada usia 40-60 hari (Sirois, 2005). Tikus putih memiliki tipe saluran pencernaan pencernaan monogastrik dan tidak dapat muntah karena tempat bermuaranya esophagus ke dalam lambung sehingga mempermudah proses perlakuan menggunakan sonde. Selain itu, Tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki keunggulan yaitu tenang, mudah beradaptasi, mudah ditangani, pemeliharaan mudah, sehat, bersih dan cocok untuk berbagai macam penelitian (Hedrich, 2006).



**Gambar 2.3** Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar (Alexandru, 2011)

Dalam penelitian ini digunakan *Strain* Wistar karena memiliki sistem metabolik seperti manusia baik secara anatomi maupun fisiologinya. Aflatoksin yang diberikan secara peroral akan terabsorpsi di saluran pencernaan dan akan

menuju ke hepar untuk diakumulasi (Dhanasekaran, *et al.*, 2014). Penggunaan tikus putih jantan sebagai hewan uji karena untuk memberikan hasil penelitian yang lebih stabil karena tidak dipengaruhi oleh keberadaan siklus reproduksi seperti tikus putih betina. Kadar esterogen yang tinggi pada tikus putih betina daripada tikus putih jantan dapat mempengaruhi metabolisme tubuh. Perubahan level *Blood Urea Nitrogen* (BUN) dan kreatinin sebagai penanda untuk evaluasi dan efek kimiawi pada ginjal. Level BUN normal pada tikus jantan *Rattus norvegicus strain* Wistar yaitu 12,3-24,6 mg/dL (Giknis and Clifford, 2008), sedangkan level kreatinin normal yaitu 0,2-24,6 mg/dL (Hrapkiewicz *et al.*, 2013)

Tikus putih telah banyak digunakan sebagai hewan model aflatoksikosis dan bakteri asam laktat, misalnya dalam penelitian yang dilakukan Hernandez *et al.*, (2011), tentang efek suplementasi *L. reuteri* secara oral dalam mereduksi absorpsi Aflatoksin B1 di usus tikus dan penelitian yang dilakukan oleh Puspitasari (2017) tentang pengaruh pemberian *Lactobacillus bulgaricus* terhadap kadar MDA hepar dan trigliserida pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai pencegahan aflatoksikosis.

## **2.6 *Lactobacillus plantarum* sebagai Agen Preventif Aflatoksikosis**

*Lactobacillus plantarum* merupakan salah satu jenis bakteri asam laktat homofermentatif yang memiliki banyak manfaat bagi kehidupan manusia maupun hewan. Salah satu kegunaannya adalah menjadi flora normal bagi saluran pencernaan (Bures *et al.*, 2011). *Lactobacillus plantarum* mampu menghasilkan hidrogen peroksida tertinggi di antara bakteri asam laktat lainnya yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri perusak atau patogen (Delgado *et al.*,

2001). *Lactobacillus plantarum* mampu merombak senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan hasil akhirnya yaitu asam laktat. Asam laktat dapat menghasilkan pH yang rendah pada substrat sehingga menimbulkan suasana asam. Pada keadaan asam ini, *Lactobacillus plantarum* dapat menghambat bakteri patogen dan bakteri pembusuk (Delgado *et al.*, 2001). Menurut Sjogren (2003) *Lactobacillum plantarum* juga mampu menghasilkan agen antifungi berupa *3-Hydroxy fatty acid* yang diketahui memiliki kemampuan menghambat terhadap fungi.

*Lactobacillus plantarum* dapat mencegah kasus aflatoksikosis karena merupakan agen antifungi. Agen antifungi merupakan agen yang mampu mencegah terjadinya penyakit yang disebabkan oleh toksin fungi seperti aflatoksin (Carlile *et al.*, 2001). *Lactobacillus plantarum* akan mengikat aflatoksin melalui mekanisme *binding* komponen asam *teichoic* pada permukaan dinding sel bakteri (Hernandez *et al.*, 2010). Hamidi *et al.*, (2011) menjelaskan dalam penelitiannya tentang aktivitas BAL dalam mengikat AFB1 secara *in vitro* menggunakan *L. pentosus* dan *L. berevis*. Pada penelitiannya dijelaskan bahwa *L. pentosus* dan *L. berevis* mampu mengikat AFB1 hingga 17.4% dan 34.7%. Pada proses tersebut aflatoksin yang dideteksi menggunakan metode HPLC tidak menghasilkan produk dari pengeleminasian AFB1. Kedua jenis bakteri yang digunakan memiliki kemampuan berikatan dengan AFB1. Proses ini mengindikasikan bahwa eliminasi AFB1 oleh BAL tidak terjadi melalui metabolisme yang dilakukan bakteri tetapi terjadi melalui mekanisme *binding*

komponen asam *teichoic* pada permukaan dinding sel bakteri. (Hernandez *et al.*, 2010 ; Hernandez *et al.*, 2009).

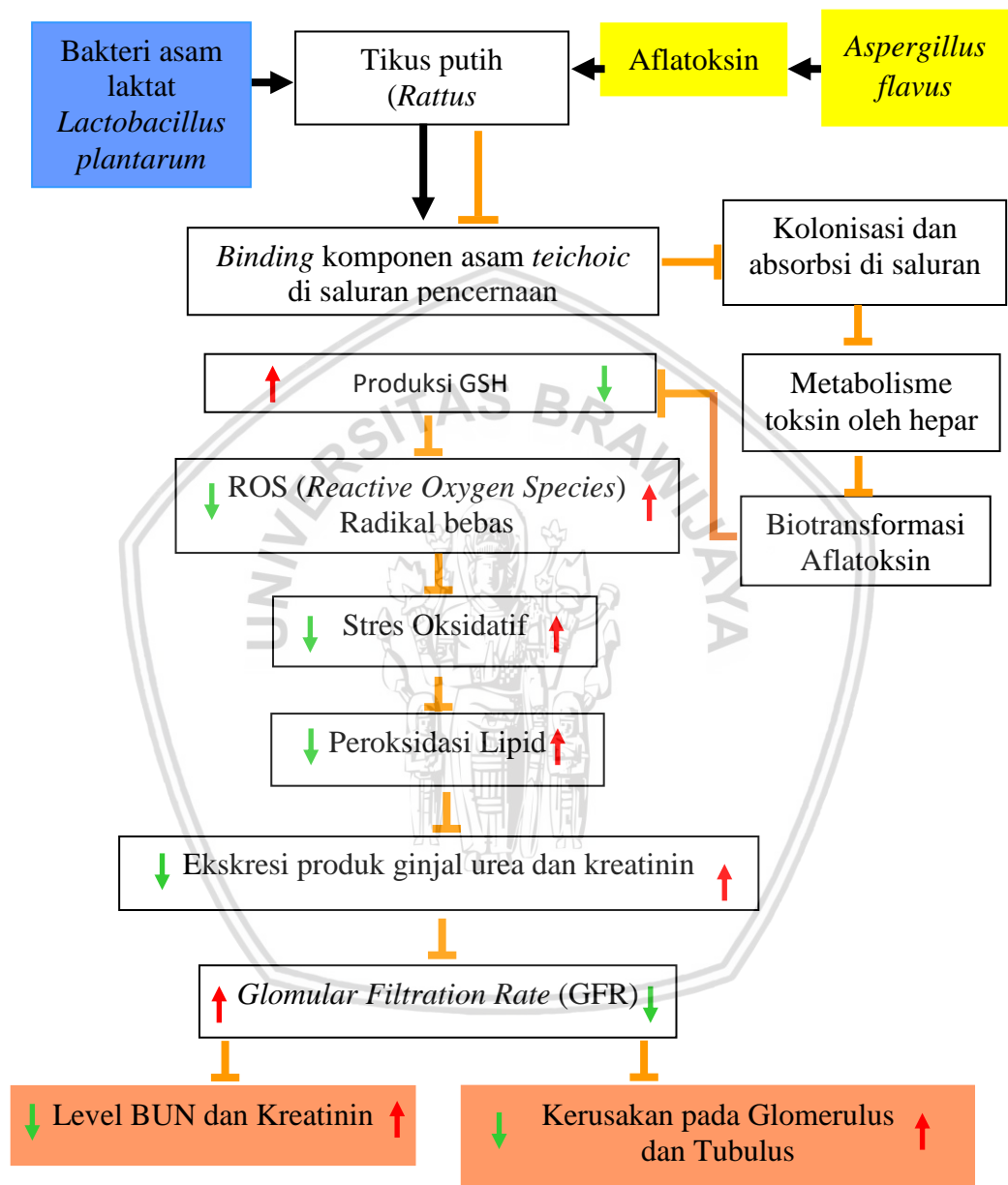






**BAB III KERANGKA KONSEP**

**3.1 Kerangka Konseptual**



**Gambar 3.1** Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

- ↓ : Patomekanisme
- ↑ : Peningkatan
- ⊥ : Menghambat
- ↓ : Penurunan
- : Hewan coba
- : Paparan
- (Yellow) : Variabel terikat
- (Blue) : Terapi



Bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* yang diberikan di awal perlakuan bertujuan sebagai agen preventif untuk mencegah terjadinya aflatoksikosis pada tubuh tikus. Bakteri asam laktat yang masuk ke dalam tubuh akan melakukan pertahanan fisik dengan melakukan mekanisme *binding* komponen asam *teichoic* pada permukaan dinding sel bakteri. Bakteri asam laktat akan mencegah terjadinya kolonisasi dan absorpsi aflatoksin di dalam saluran pencernaan.

Setelah pemberian bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* dilanjutkan dengan pemberian aflatoksin secara bersamaan dengan bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum*, aflatoksin yang masuk ke dalam tubuh tidak dapat melakukan kolonisasi dan absorpsi di dalam saluran pencernaan. Hal ini terjadi karena adanya mekanisme *binding* komponen asam *teichoic* pada permukaan dinding sel bakteri. Bakteri asam laktat yang telah diberikan sebelumnya akan mengikat aflatoksin tersebut. Aflatoksin yang tidak dapat melakukan kolonisasi dan absorpsi di dalam saluran pencernaan menyebabkan aflatoksin tersebut tidak dapat menuju ke target organ yaitu hati untuk melakukan metabolisme toksin sehingga menyebabkan terjadinya kegagalan proses biotransformasi aflatoksin menjadi senyawa yang reaktif yaitu AFB1-8,9-epoksida (AFBO).

Kegagalan proses biotransformasi aflatoksin mengakibatkan senyawa reaktif tidak terkonjugasi bersama *Glutathione* (GSH) sehingga menghambat depleksi *Glutathione* (GSH) di dalam tubuh. Tidak terjadinya depleksi di dalam tubuh menyebabkan penurunan dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam sel yaitu pada mitokondria hepatosit dan sel epitel ginjal. Penurunan *Reactive Oxygen*

*Species* (ROS) ini menyebabkan tidak terganggunya fungsi antioksidan sehingga tidak terjadi stres oksidatif didalam tubuh. Tidak terjadinya stres oksidatif tidak memicu adanya peroksidasi lipid yang menyebabkan penurunan proses peroksidasi lipid. Penurunan proses peroksidasi lipid ini tidak menyebabkan kerusakan sel dan gangguan morfologi organ, sehingga fungsi ekskresi ginjal tidak terganggu. Tidak terganggunya fungsi ekskresi ginjal menyebabkan *Glomerular Filtration Rate* (GFR) tidak mengalami penurunan sehingga aliran darah ke ginjal dan sebagian urea dalam darah difiltrasi oleh glomerulus. Berjalannya fungsi ekskresi ginjal dengan baik ditandai dengan parameter kimiawi ginjal yaitu terjadinya penurunan level BUN dan kreatinin serum serta adanya pencegahan kerusakan pada glomerulus dan tubulus ginjal tikus.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Dari rumusan permasalahan yang tertera, maka hipotesis penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* dapat mencegah peningkatan level BUN dan kreatinin tikus putih (*Rattus norvegicus*) aflatoksikosis.
2. Bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* dapat mencegah kerusakan ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) aflatoksikosis.

## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai bulan Maret 2018 di :

- a) Pemeliharaan dan pemberian perlakuan hewan coba di Laboratorium Farmako Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- b) Analisa Aflatoksin dari *Asperillus flavus* dilakukan menggunakan test TLC di Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor.
- c) Pengukuran level BUN dan Kreatinin serum dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- d) Pembuatan preparat histopatologi organ ginjal dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi "Kessima Medika" Malang

### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel menggunakan bakteri *Lactobacillus plantarum* yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor, Aflatoksin berasal dari *Aspergillus flavus* yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor, hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan *strain* Wistar berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan tikus antara 150 – 250 gram diperoleh dari Laboratorium Farmako Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif yang diinduksi Aflatoksin, serta kelompok terapi yang diinduksi aflatoksin dan diberi BAL *Lactobacillus plantarum* dengan dosis bertingkat.

Pengulangan sampel sebanyak empat kali dihitung menggunakan rumus

Kusriningrum (2008):

$p(n - 1) \geq 15$	Keterangan p : jumlah kelompok perlakuan n : jumlah ulangan yang diperlukan
$5(n - 1) \geq 15$	
$5n - 5 \geq 15$	
$5n \geq 20$	
$n \geq 4$	

### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan desain *post test only control group* menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol positif, kontrol negatif, serta kelompok terapi. Setiap kelompok perlakuan terdiri atas empat ekor tikus. Rancangan penelitian ditunjukkan pada **Tabel 4.1**.

**Tabel 4.1** Rancangan kelompok penelitian

Kelompok Tikus	Perlakuan
(Kontrol negatif)	Kelompok tikus yang diberi ransum standar dan minum secara <i>ad libitum</i> .
(Kontrol positif)	Kelompok tikus yang diinduksi aflatoksin dengan dosis 7 µg/kg BB dalam 1 mL PBS secara peroral mulai hari ke-8 hingga hari ke-21.
P1 (BAL + Aflatoksin)	Kelompok tikus yang diberikan BAL dengan dosis $1 \times 10^4$ CFU/ mL mulai hari ke-1 hingga ke-21 sebanyak 1 mL/ekor, dan diinduksi aflatoksin dengan dosis 7 µg/kg BB dalam 1 mL PBS secara peroral mulai hari ke-8 hingga hari ke-21.
P2 (BAL + Aflatoksin)	Kelompok tikus yang diberikan BAL dengan dosis $1 \times 10^6$ CFU/mL mulai hari ke-1 hingga ke-21 sebanyak 1 mL/ekor dan ditambah induksi Aflatoksin dengan 7 µg/kg BB dalam 1 mL PBS secara peroral mulai hari ke-8 hingga hari ke-21.
P3 (BAL + Aflatoksin)	Kelompok tikus yang diberikan BAL dengan dosis $1 \times 10^8$ CFU/mL mulai hari ke-1 hingga ke-7 sebanyak 1 mL/ekor dan ditambah induksi Aflatoksin dengan dosis 7 µg/kg BB dalam 1 mL PBS secara peroral mulai hari ke-8 hingga hari ke-21.

#### 4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang di amati pada penelitian ini adalah:

Variabel bebas : dosis pemberian bakteri asam laktat dan Aflatoksin

Variabel terikat : level BUN, Kreatinin dan histopatologi ginjal

Variabel kendali : tikus Putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar, homogenitas berat badan tikus, umur tikus, jenis kelamin tikus, pakan pellet, air minum, suhu, lingkungan dan kondisi kandang.

#### 4.5 Alat dan Bahan

##### 4.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: kandang tikus, botol minum tikus, sekam, alat sonde, TLC, *dissecting set*, papan bedah, sarung tangan (*glove*), *masker*, spuit 3 cc, tabung *venoject*, gelas ukur 10 mL, gelas kimia, gelas erlenmeyer, mortar, penangas air, thermometer, pengaduk kaca, *object glass*, *cover glass*, mikrotom, mikroskop cahaya, kamera digital, tabung reaksi, rak tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, cawan petri, aluminium foil, tabung erlenmeyer, pipet tetes, tabung polipropilen, *vortex*, *centrifuge* (Thermoscientific Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge), *appendorf micropipette* ukuran 10 – 100  $\mu$ L, spektrofotometer UV-VIS, karet *bulb*, pisau, gunting, bunsen, pot organ, kertas saring, *autoclave*, *disposable syringe*, *timer*, inkubator, dan lemari pendingin.

##### 4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar umur 8 – 12 minggu, *Aspergillus flavus* sediaan ampul yang diperoleh dari Balai

Besar Penelitian Veteriner Bogor, bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* sediaan ampul yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor, media MRSA (*de Man Rogosa Sharp Agar*), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), aquades, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol absolut, NaCl fisiologis, Xylol, *Para Formal Dehyde* (PFA) 4%, parafin blok, pewarna *haematoxylin* dan *eosin*, *Reagen*, 2-Oxoglutarate 85 mmol/L, L-Alanine 700 mmol/L.

#### **4.6 Prosedur Penelitian**

##### **4.6.1 Persiapan Hewan Model**

Hewan model yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan *strain* Wistar berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan tikus antara 120 – 250 gram. Persiapan hewan model dilakukan dengan aklimisasi selama satu minggu yang bertujuan untuk mengadaptasikan hewan coba dengan lingkungannya yang baru. Pada tahap ini dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum hewan coba. Pemberian pakan selama masa adaptasi berupa pakan standar sesuai kebutuhan yaitu 40 gram/kg/hari dalam bentuk pelet dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Komposisi pakan yang diberikan sesuai standar *Association of Analytical Communities* (2005) terdiri atas 5% karbohidrat, 10% protein, 3% lemak, dan 13% vitamin dan mineral.

##### **4.6.2 Pemberian Bakteri *Lactobacillus plantarum***

Pada penelitian ini digunakan isolat Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus plantarum* yang diperoleh dari Balitvet Culture Collection (BCC) Bogor. *Lactobacillus plantarum* ini diperoleh dalam bentuk ampul (*freeze drying*). Penumbuhan kembali isolat *Lactobacillus plantarum* dilakukan dengan



mencampurkan akuades steril sebanyak 5 mL dengan isolat *Lactobacillus plantarum*. Isolat *Lactobacillus plantarum* ditumbuhkan pada media MRSA miring steril yang dilakukan dengan cara inokulasi BAL sebanyak satu ose ke dalam media MRSA, inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pemiakan bakteri dilakukan dengan mengambil isolat MRSA dan dicampur dengan *phosphat buffered saline* (PBS) yang sudah terlebih dahulu di sterilisasi dengan *waterbath* pada suhu 80 °C. Perhitungan konsentrasi dilakukan dengan spektrofotometer hingga diperoleh konsentrasi pekat 10<sup>8</sup>. Isolat BAL diberikan pada tikus dengan dosis P1 sebanyak 1x10<sup>4</sup> CFU/mL, P2 sebanyak 1x10<sup>6</sup> CFU/mL, dan P3 sebanyak 1x10<sup>8</sup> CFU/mL, selama 21 hari dengan cara disonde (**Lampiran 6**). Suplememntasi BAL diberikan pada hari ke-1 sampai dengan hari ke-21 sebagai agen preventif.

#### 4.6.3 Persiapan Aflatoksin

##### A. Induksi Aflatoksin

Spora *Aspergillus flavus* dipanen dengan melarutkan *Aspergillus flavus* dalam PBS dan dipindahkan ke dalam tabung baru. *Aspergillus flavus* ditanamkan pada media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) diinokulasikan suspensi spora *Aspergillus flavus* pada media PBD 500 mL. Inokulum diinkubasi selama 10 hari dan inokulum *Aspergillus flavus* dimatikan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 30 menit. Selanjutnya dihomogenisasi dengan blender 2 menit. Pengukuran kadar aflatoksin dilakukan ekstraksi dan dianalisis dengan TLC (**Lampiran 7**). Induksi Aflatoksin dilakukan dengan cara sonde lambung sehingga langsung menuju ke bagian lambung tikus dan langsung diabsorpsi serta

dimetabolisme oleh tubuh. Kelompok kontrol positif, P1, P2, dan P3 diinduksi Aflatoksin dengan dosis 7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BB selama 14 hari mulai hari ke-8 hingga hari ke-21.

#### **B. Pengujian Aflatoksin dengan Metode TLC (*Thin Layer Chromatography*)**

Pengujian Aflatoksin dilakukan dengan metode *thin layer chromatography* (TLC) yang dilakukan di Balitvet Culture Collection (BCC) Bogor. Pengujian aflatoksin ini bertujuan untuk mengetahui jumlah kandungan aflatoksin yang terdapat pada *Aspergillus flavus*. Sampling hasil ekstraksi *Aspergillus flavus* kemudian dianalisis menggunakan metode *thin layer chromatography* (TLC) untuk melihat total aflatoksin yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* yang ditumbuhkan pada media. Total aflatoksin dari masing-masing sampel digambarkan dalam kurva produksi aflatoksin untuk memperoleh puncak produksi maksimum aflatoksin. Media dengan jumlah maksimum akan dipanen untuk dilakukan tahapan produksi massal (Afiandi, 2011).

#### **4.6.4 Analisis Level *Blood Urea Nitrogen* (BUN) dan Kreatinin**

Level *Blood Urea Nitrogen* (BUN) dan kreatinin diperoleh dari pemeriksaan biokimia serum pada jantung tikus. Darah diambil sebanyak 2 mL pada jantung dengan menggunakan spuit 3cc, kemudian darah dimasukkan ke dalam *whole blood tube 3d (plain tube)* dan didiamkan selama 15 menit. Darah disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil sebanyak 500  $\mu\text{l}$  serum yang terbentuk dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan dalam mikrotube. Pada analisis level BUN dan kreatinin, serum di

absorbansi dengan panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer  
(Lampiran 9)

#### 4.6.5 Pengambilan Organ Ginjal

Pengambilan organ ginjal pada semua kelompok hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) dilakukan pada hari ke-22. Prosedur *euthanasia* dilakukan dengan dislokasio pada leher. Pada proses pembedahan, organ ginjal yang terletak pada dinding posterior abdomen di belakang peritoneum pada kedua sisi vertebra thorakalis ke 12 sampai vertebra lumbalis ke-3 diambil, diisolasi dan dipotong, kemudian dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9% dan direndam dalam larutan formalin untuk selanjutnya diproses pembuatan preparat histopatologi (Andiarsa, 2014).

#### 4.6.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal

Organ ginjal diambil dari tikus yang telah dinekropsi. Organ ginjal yang diperoleh dicuci menggunakan NaCl fisiologis 0,9% untuk menghilangkan darah yang masih tersisa kemudian direndam dalam formaldehid. Proses pembuatan preparat histologi menurut Junquiera dan Carneiro (2007) meliputi prosedur fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, *embedding*, *sectioning*, penempelan di *object glass*, dan pewarnaan.

Evaluasi histopatologi dilakukan dengan pembuatan preparat histopatologi organ ginjal dengan pewarnaan *Haemotoxyn* dan *Eosin* (HE). Pewarnaan HE dilakukan dengan cara meletakkan preparat yang akan diwarnai pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan, yaitu: xylol (2x3 menit), etanol absolut (2x3 menit), etanol 90% (3 menit), etanol 80% (3 menit), kemudian

dibilas dengan aquades. Selanjutnya ditetaskan larutan *haematoxylin* selama 6 – 7 menit, lalu dibilas dengan aquades selama satu menit. Kemudian preparat ditetesi dengan larutan pembiru selama satu menit dan dibilas lagi dengan aquades selama satu menit. Prosedur selanjutnya adalah ditetesi larutan *eosin* selama 1 – 5 menit dan kembali dibilas dengan aquades selama satu menit. Kemudian preparat dicelupkan ke dalam etanol 80% sebanyak 10 kali celupan, ke dalam etanol 90% sebanyak 10 kali celupan, ke dalam etanol absolut sebanyak 10 kali celupan, lalu direndam dalam etanol absolut selama satu menit. Setelah itu preparat direndam dalam xylol sebanyak tiga kali 3 menit. Kemudian preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan perekat dan selanjutnya ditutup dengan *cover glass*. Hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop cahaya (**Lampiran 10**).

#### **4.6.7 Analisa Data**

Data penelitian berupa pengukuran level BUN dan kreatinin serum tikus dianalisa secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer dalam uji sidik ragam *One-Way ANOVA* yang selanjutnya dilakukan uji Beda Nyata Jujur atau *Tukey* dengan  $\alpha$  5% menggunakan software SPSS (*Statistical Package for The Social Science*) version 16.0 for Windows. Sementara hasil pengamatan histopatologi organ ginjal dianalisa secara deskriptif menggunakan mikroskop cahaya.

## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus plantarum* Sebagai Agen Preventif Aflatoksikosis Terhadap Level *Blood Urea Nitrogen* (BUN) Serum Tikus (*Rattus norvegicus*)

Hasil penelitian pengaruh bakteri asam laktat sebagai agen preventif aflatoksikosis terhadap level *Blood Urea Nitrogen* (BUN) serum tikus (*Rattus norvegicus*) menunjukkan perbedaan dari masing-masing kelompok perlakuan. Data yang diperoleh dianalisa secara statistik menggunakan *software* SPSS 16.0 metode *one way* ANOVA dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur dengan tingkat signifikansi  $\alpha \leq 5\%$ . (Lampiran 12.1) sehingga didapatkan hasil kuantitatif pada

#### Tabel 5.1.

**Tabel 5.1.** Level *Blood Urea Nitrogen* (BUN) Serum pada Kelompok Tikus Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Level BUN		
	Rata – Rata Kadar BUN (mg/dL) $\pm$ SD	Peningkatan terhadap kelompok kontrol negatif (%)	Penurunan terhadap kelompok kontrol positif (%)
Tikus Kontrol negatif (-)	21.00 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	0	-
Tikus Aflatoksikosis (+)	34.50 $\pm$ 2.08 <sup>c</sup>	64,2	-
BAL <i>L.plantarum</i> 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL (P1)	21.00 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	-	39.1
BAL <i>L.plantarum</i> 1x10 <sup>6</sup> CFU/mL (P2)	26.75 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>	-	22.4
BAL <i>L.plantarum</i> 1x10 <sup>8</sup> CFU/mL (P3)	33.25 $\pm$ 1.70 <sup>c</sup>	-	3.62

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) antar kelompok perlakuan.

Pada **Tabel 5.1** nilai rata-rata level BUN serum pada kelompok tikus kontrol negatif menunjukkan rata-rata 21.00 $\pm$ 0.81 mg/dL. Level BUN normal pada tikus jantan *Rattus norvegicus strain* Wistar yaitu 12,3-24,6 mg/dL sehingga kelompok tikus kontrol negatif dapat digunakan sebagai standar rata-rata level BUN serum tikus (Giknis and Clifford, 2008). Menurut Lestari (2014), pada kondisi normal

level BUN dalam darah digunakan sebagai tanda keseimbangan pembentukan urea oleh ginjal. Urea merupakan produk toksin dari ammonia yang dihasilkan dari pemecahan protein di hati yang didistribusikan didalam air dan dieksresikan oleh tubuh melalui ginjal melewati glomerulus dan memasuki tubulus ginjal, dan akan diekskresikan dalam urin. Tubuh akan mempertahankan urea dalam darah agar tetap normal, sehingga hepar dan ginjal harus memiliki fungsi yang baik.

Kelompok induksi aflatoksin menyebabkan level BUN serum berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok tikus kontrol negatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian aflatoksin ke dalam tubuh tikus mengakibatkan terjadinya efek toksik pada tubuh tikus. Aflatoksin yang diinduksi kedalam tubuh akan diabsorpsi di saluran pencernaan dan menuju ke target organ hepar untuk melakukan proses biotransformasi menjadi senyawa yang reaktif yaitu AFB1-8,9-epoksida (AFBO). Senyawa reaktif AFBO memiliki ikatan rangkap oksigen yang dapat bereaksi dengan radikal bebas. Tingginya aflatoksin menyebabkan penurunan GSH dalam sel yang dapat merangsang produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam sel terutama pada mitokondria dan sel epitel ginjal. Produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang tinggi menyebabkan antioksidan tidak bekerja dengan maksimal dan menyebabkan kerusakan biomolekul penting seperti DNA, protein dan lipid. *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang tinggi juga menyebabkan stres oksidatif yang memicu peroksidasi lipid dalam jaringan hati dan ginjal. Peroksidasi lipid menyebabkan membran sel mengalami kerusakan dan menyebabkan sel kehilangan fungsi selulernya hingga secara total.

Menurut Winarsi (2007), terdapat 3 mekanisme kerusakan membran sel, yaitu : (1) Terjadinya ikatan kovalen antara radikal bebas dengan komponen penyusun membran mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi reseptor; (2) Oksidasi gugus *thiol* pada komponen membran oleh radikal bebas sehingga menyebabkan proses transpor yang terjadi pada membran terganggu; (3) Reaksi peroksidasi lipid membran yang mengandung PUFA (*polyunsaturated fatty acid*). Pada ginjal, peroksidasi lipid tersebut mengakibatkan kerusakan sel dan gangguan morfologi pada ginjal, sehingga ginjal tidak dapat melakukan fungsi ekskresi dengan baik yang mengakibatkan sebagian urea dalam darah tidak terfiltrasi oleh glomerulus sehingga kadar urea dapat meningkat dalam darah (Valchev *et al.*, 2014).

Pencegahan aflatoksikosis dengan pemberian bakteri asam laktat *L.plantarum* dengan dosis  $1 \times 10^4$  CFU/mL dan  $1 \times 10^6$  CFU/mL menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kontrol positif, sedangkan dengan dosis  $1 \times 10^8$  CFU/mL tidak berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kontrol positif. Hal tersebut membuktikan bahwa pemberian BAL *Lactobacillus plantarum* sebagai agen preventif terhadap aflatoksikosis mampu mencegah peningkatan level BUN serum pada tikus.

Kelompok preventif BAL *Lactobacillus plantarum* dengan dosis BAL  $1 \times 10^4$  CFU/mL menunjukkan rata-rata level BUN serum berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok tikus aflatoksikosis, namun tidak berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok tikus normal. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian BAL *Lactobacillus plantarum* dengan konsentrasi  $1 \times 10^4$  CFU/mL mampu mencegah peningkatan level BUN serum pada tikus dengan baik. Bakteri asam laktat yang

diberikan sebagai agen preventif dapat beradaptasi dengan bakteri asam laktat yang sudah ada sebagai flora normal sehingga efektif untuk menekan pengaruh dari aflatoksin. Bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* memiliki kemampuan untuk mencegah biotransformasi aflatoksin dalam tubuh dengan mekanisme *binding* komponen asam *teichoic* pada permukaan dinding sel bakteri. Asam *teichoic* yang mengikat aflatoksin didalam saluran pencernaan akan menghambat penurunan produksi (*Glutathione*) GSH dan mencegah tubuh pada keadaan stres oksidatif. Tidak terjadinya stres oksidatif pada tubuh maka menyebabkan tidak terjadinya peroksidasi lipid. Tidak terjadinya peroksidasi lipid menyebabkan tidak terjadi kerusakan sel dan tidak terjadi gangguan morfologi pada organ, sehingga tidak mengganggu fungsi ekskresi ginjal yang ditandai dengan menurunnya nilai level BUN dalam darah (Valchev *et al.*, 2014).

Kelompok preventif BAL *Lactobacillus plantarum* dengan dosis BAL  $1 \times 10^6$  CFU/mL menunjukkan rata-rata level BUN serum berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok tikus aflatoksikosis dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian BAL *Lactobacillus plantarum* dengan konsentrasi  $1 \times 10^6$  CFU/mL mampu mencegah peningkatan level BUN namun hasil yang diperoleh kurang optimal apabila dibandingkan dengan pemberian BAL konsentrasi  $1 \times 10^4$  CFU/mL. Menurut Hernandez *et al.*, (2009), pengikatan aflatoksin oleh bakteri asam laktat bergantung pada jumlah bakteri yang terdapat pada saluran cerna. Sehingga apabila jumlah bakteri yang terdapat pada saluran pencernaan melebihi jumlah normal atau tidak sesuai maka dapat



mempengaruhi optimalitas dari bakteri asam laktat terhadap pengikatan aflatoksin.

Kelompok preventif BAL *Lactobacillus plantarum* dengan dosis  $1 \times 10^8$  CFU/mL menunjukkan rata-rata level BUN serum tidak berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok tikus aflatoksikosis, namun berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian BAL *Lactobacillus plantarum* dengan konsentrasi  $1 \times 10^8$  CFU/mL belum mampu mencegah peningkatan level BUN serum tikus dengan baik. Penurunan level BUN dalam jumlah sedikit terjadi karena pemberian bakteri dengan konsentrasi tinggi terhadap tikus putih. Bakteri asam laktat merupakan bakteri non patogen dan berfungsi sebagai probiotik yang dapat menghambat patogen lain disaluran pencernaan, namun pemberian probiotik dalam konsentrasi tinggi atau ketika tubuh berada dalam kondisi yang lemah, akan memiliki efek samping seperti infeksi dan efek metabolik pada tubuh (Marteau, 2003).

Konsentrasi probiotik yang tinggi pada saluran pencernaan akan menyebabkan gangguan keseimbangan mikroflora normal di usus sehingga menimbulkan respon inflamasi yang mengakibatkan infeksi. Mekanisme bakteri asam laktat yang menyebabkan infeksi meliputi pertumbuhan berlebih bakteri usus, kerusakan pada mukosa usus, dan imunodefisiensi (Marteau, 2003). Pertumbuhan mikroflora usus yang berlebihan dan perubahan komposisi mikroflora berpotensi terhadap translokasi bakteri serta produk bakteri (toksin). Hal ini juga didukung oleh penelitian Gasser (1994); Marteau, (2003) yang menjelaskan kasus infeksi seperti septikemia yang disebabkan oleh bakteri asam

laktat dari genus *Lactobacillus*. Pada sebagian besar kasus infeksi, organisme berasal dari mikroflora yang terdapat dalam tubuh, namun beberapa kasus juga disebutkan infeksi berasal dari konsumsi probiotik sebagai penyebab potensial.

Konsentrasi probiotik yang tinggi juga menyebabkan efek metabolik yang dapat menyebabkan diare dan lesi pada usus. Lesi pada usus terjadi akibat pertumbuhan mikroflora usus yang berlebihan sehingga mengakibatkan gangguan proses dekonjugasi dan dehidroksilasi garam empedu, dimana garam empedu nantinya akan disalurkan ke hepar (Marteau, 2003). Adanya infeksi atau lesi pada usus menyebabkan kerusakan mukosa vili yang akan mempermudah aflatoksin tersabsorpsi dan menuju ke target hepar untuk melakukan biotransformasi aflatoksin menjadi senyawa yang reaktif. Hal ini akan memicu adanya ROS dan stres oksidatif dalam tubuh yang mengakibatkan terjadinya proses peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid dapat merusak sel dan gangguan morfologi pada ginjal sehingga ginjal tidak dapat melakukan fungsi ekskresi dengan baik yang ditandai dengan peningkatan level BUN serum pada ginjal.

### **5.2 Pengaruh Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus plantarum* Agen Preventif Aflatoksikosis Terhadap Level Kreatinin Serum Tikus (*Rattus novergicus*)**

Hasil penelitian pengaruh bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* sebagai agen preventif aflatoksikosis terhadap level kreatinin serum tikus (*Rattus novergicus*) menunjukkan perbedaan dari masing-masing kelompok perlakuan. Data yang diperoleh dianalisa secara statistik menggunakan *software* SPSS 16.0 metode *one way* ANOVA dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur dengan tingkat

signifikansi  $\alpha \leq 5\%$ . (Lampiran 12.1) sehingga didapatkan hasil kuantitatif pada

**Tabel 5.2.**

**Tabel 5.2.** Level Kreatinin Serum pada Kelompok Tikus Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Level Kreatinin		
	Rata – rata Kadar Kreatinin (mg/dL) $\pm$ SD	Peningkatan terhadap kelompok kontrol negatif (%)	Penurunan terhadap kelompok kontrol positif (%)
Tikus Kontrol negatif (-)	0.60 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0	-
Tikus Aflatoksikosis (+)	1.55 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>	158.33	-
Preventif 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL (P1)	0.65 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	-	58.05
Preventif 1x10 <sup>6</sup> CFU/mL (P2)	0.97 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	-	37.41
Preventif 1x10 <sup>8</sup> CFU/mL (P3)	1.25 $\pm$ 0.120 <sup>c</sup>	-	19.3

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) antar kelompok perlakuan.

Pada **Tabel 5.2** nilai level kreatinin serum pada kelompok tikus kontrol negatif menunjukkan rata-rata 0.60 $\pm$ 0.08 mg/dL. Level kreatinin normal pada tikus jantan *Rattus norvegicus strain* Wistar yaitu 0,2-24,6 mg/dL sehingga kelompok tikus kontrol negatif dapat digunakan sebagai standar rata-rata level kreatinin serum tikus. Pada keadaan normal, kreatinin dalam darah merupakan hasil degenerasi dari kreatin dan produk akhir dari metabolisme otot. Kreatinin disintesis dari asam amino arginin dan glisin didalam hati dan ginjal, kemudian difiltrasi oleh glomerulus dan disekresikan serta direabsorpsi melalui tubulus, dan akan dieleminasi dalam urin. Setiap kondisi yang mempengaruhi laju *glomerular filtration rate* (GFR) maka akan mengubah kadar kreatinin serum. Sehingga kreatinin sering dijadikan indikator untuk mengetahui laju filtrasi glomerulus (Harlina,2007). Kreatinin merupakan produk akhir metabolisme kreatin, dimana kreatin ditemukan pada otot rangka untuk menyimpan energi berupa *creatine*

*phosphat* (CP). Pada proses sintesis ATP dan ADP, kreatin fosfat diubah menjadi kreatin dengan katalisasi enzim *creatine kinase* (CK). Kreatinin akan melewati plasma yang kemudian menuju ginjal untuk difiltrasi serta direabsorpsi oleh tubulus ginjal (Anshar, 2015).

Kelompok induksi aflatoksin menyebabkan level kreatinin serum berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kontrol negatif. Peningkatan level kreatinin yang tinggi diakibatkan oleh induksi aflatoksin yang merangsang efek toksik pada tubuh tikus. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian aflatoksin dapat menyebabkan adanya peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam sel, terutama pada mitokondria hepatosit dan sel epitel ginjal. Produksi ROS yang tinggi dapat menyebabkan kerusakan protein serta memicu adanya peroksidasi lipid. Kerusakan protein dapat mengganggu proses biosintesis asam amino menjadi kreatinin. Terganggunya proses biosintesis asam amino dan rusaknya sel akibat peroksidasi lipid yang menyebabkan gangguan fungsi ekskresi ginjal, sehingga sebagian kreatinin dalam darah tidak difiltrasi oleh glomerulus yang mengakibatkan kadarnya meningkat didalam darah. Menurut El-Bahr *et al.*, (2015), kreatinin serum yang meningkat terjadi karena adanya penurunan ekskresi yang disebabkan oleh adanya gangguan pada renal dan penurunan laju filtrasi glomerulus. Kreatinin serum pada tikus yang terkontaminasi aflatoksin akan menunjukkan perubahan peningkatan fosfokreatinin menjadi kreatinin dalam otot karena biosintesis yang lebih rendah dari fosfokreatinin pada saat kontraksi otot.

Pencegahan aflatoksikosis dengan pemberian bakteri asam laktat *L.plantarum* dengan dosis  $1 \times 10^4$  CFU/mL,  $1 \times 10^6$  CFU/mL, dan  $1 \times 10^8$  CFU/mL menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kontrol positif. Hal tersebut membuktikan bahwa pemberian BAL *L.plantarum* sebagai agen preventif terhadap aflatoksikosis mampu mencegah peningkatan level kreatinin serum pada tikus.

Kelompok preventif BAL *Lactobacillus plantarum* dengan dosis BAL  $1 \times 10^4$  CFU/mL menunjukkan rata-rata level kreatinin serum berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok tikus aflatoksikosis, namun tidak berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok tikus normal. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian BAL *Lactobacillus plantarum* dengan konsentrasi  $1 \times 10^4$  CFU/mL mampu mencegah peningkatan level kreatinin. Menurut Hernandez *et al.*, (2009) adanya komponen pada dinding sel bakteri yaitu asam *teichoic* dapat mengikat aflatoksin sehingga mencegah proses biotransformasi aflatoksin dalam tubuh. Asam *teichoic* yang mengikat aflatoksin didalam tubuh akan menghambat penurunan GSH dan menghindarkan tubuh dari keadaan stres oksidatif yang membuat peroksidasi lipid tidak terbentuk dan tidak mengakibatkan kerusakan sel serta tidak terjadi gangguan morfologi pada organ. Tidak terjadinya gangguan morfologi organ maka tidak mengganggu fungsi ekskresi ginjal yang ditandai dengan menurunnya nilai level kreatinin dalam darah (Valchev *et al.*, 2014). Hal ini sesuai dengan pernyataan Hernandez (2009) bahwa bakteri asam laktat yang digunakan sebagai probiotik dapat mengurangi bioavailabilitas dari aflatoksin dengan mengikat aflatoksin pada komponen dinding sel bakteri.

Kelompok preventif BAL *Lactobacillus plantarum* dengan dosis BAL  $1 \times 10^6$  CFU/mL menunjukkan rata-rata level kreatinin serum berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok tikus aflatoksikosis, namun tidak berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian BAL *Lactobacillus plantarum* dengan konsentrasi  $1 \times 10^6$  CFU/mL mampu mencegah peningkatan level kreatinin serum tikus. Adanya asam *teichoic* yang terdapat pada komponen dinding bakteri akan mengikat aflatoksin dan mencegah tubuh dari keadaan stress oksidatif sehingga dapat menurunkan nilai level kreatinin dalam darah, namun tidak optimal apabila dibandingkan dengan kelompok P1.

Kelompok preventif BAL *Lactobacillus plantarum* dengan dosis BAL  $1 \times 10^8$  CFU/mL menunjukkan rata-rata level kreatinin serum berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok tikus aflatoksikosis, namun tidak berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok tikus kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian BAL *Lactobacillus plantarum* dengan konsentrasi  $1 \times 10^8$  CFU/mL belum mampu mencegah peningkatan level kreatinin serum dengan baik apabila dibandingkan dengan konsentrasi  $1 \times 10^4$  CFU/mL dan  $1 \times 10^6$  CFU/mL. Penurunan level kreatinin serum dalam jumlah sedikit dapat terjadi karena pemberian bakteri dengan konsentrasi tinggi terhadap tikus. Seperti halnya dengan BUN, pemberian BAL dengan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan efek samping seperti efek metabolik dan infeksi pada saluran pencernaan (Marteau, 2003).

Pertumbuhan mikroflora usus yang berlebihan pada saluran pencernaan akan menyebabkan gangguan keseimbangan mikroflora normal di usus sehingga menimbulkan respon inflamasi yang mengakibatkan infeksi. Efek metabolik dapat

menyebabkan lesi pada usus yang mengakibatkan gangguan proses dekonjugasi dan dehidroksilasi garam empedu (Marteau, 2003). Adanya infeksi atau lesi pada usus akan memperparah kondisi stres oksidatif dalam tubuh akibat induksi aflatoksin. Keadaan stres oksidatif ini akan memicu proses peroksidasi dan mempengaruhi fungsi ekskresi ginjal yang ditandai dengan peningkatan level kreatinin serum pada ginjal.

Peningkatan kadar BUN dan kreatinin serum dapat dijadikan sebagai tanda katabolisme protein dan disfungsi ginjal. Aflatoksin memiliki efek stres oksidatif pada jaringan ginjal yang mengakibatkan kerusakan sel dan gangguan morfologi pada ginjal sehingga mempengaruhi kadar BUN dan kreatinin serum. Peningkatan konsentrasi BUN dan kreatinin dapat disebabkan adanya asupan makanan tinggi protein, metabolisme protein, keadaan hidrasi, dan laju ekskresi urea ginjal. Hal ini sesuai dengan pendapat Valchev *et al.*, (2014) bahwa perubahan level BUN dan kreatinin digunakan sebagai penanda penting yang menunjukkan evaluasi dari efek kimiawi dalam ginjal. Kadar urea dan kreatinin yang tinggi juga dapat diasumsikan karena adanya gangguan fungsi transportasi sel epitel tubulus kolektifus dan adanya penurunan fungsi pada tubulus proksimal.

### **5.3 Pengaruh Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus plantarum* Agen Preventif Aflatoksikosis Terhadap Histopatologi Ginjal Tikus (*Rattus norvegicus*)**

Hasil penelitian pengaruh bakteri asam laktat sebagai agen preventif aflatoksikosis terhadap histopatologi ginjal tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) disajikan pada **Gambar 5.1**. Preparat diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 40–400x dan discan dengan perbesaran maksimal 400x. Pengamatan hasil scan menggunakan *software*

“Olyvia”. Bagian yang digunakan sebagai acuan pada kerusakan ginjal adalah glomerulus, tubulus proksimal, dan tubulus distal.

Hasil pengamatan histopatologi ginjal kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.1.A**) menunjukkan histopatologi normal pada ginjal yang ditandai dengan struktur glomerulus dan tubulus yang normal, tidak nampak adanya hemoragi, dan tidak tampak nekrosis pada sel epitel tubulus dengan inti pada bagian tengah terwarnai ungu. Hal ini sesuai dengan Mescher (2009), glomerulus terdiri dari anyaman pembuluh darah kapiler yang merupakan cabang dari arteriole aferen. Glomerulus ginjal dikelilingi oleh kapsula bowman, dimana lapisan luar membentuk batas luar korpuskulus ginjal yang disebut lamina parietalis yang terdiri atas epitel pipih selapis. Sedangkan lapisan dalam (*lamina visceralis*) meliputi kapiler glomerulus yang dikelilingi oleh sel epitel podosit. Tubulus kontortus proksimal memiliki epitel kuboid dan pada bagian apeks sel terdapat banyak mikrovili yang membentuk suatu *brush border* untuk reabsorpsi. Sedangkan pada tubulus kontortus distal memiliki epitel kuboid simpleks berukuran lebih kecil dan tidak memiliki *brush border*.

Hasil pengamatan histopatologi ginjal pada kelompok positif atau tikus aflatoksikosis (**Gambar 5.1.B**) menunjukkan adanya kerusakan struktur pada glomerulus serta tubulus ginjal dan hemoragi pada glomerulus serta intersisial tubulus. Pemberian aflatoksin akan dimetabolisme AFB1 menjadi senyawa reaktif yaitu AFB1-8,9-epoksida (AFBO) yang memiliki ikatan rangkap oksigen sehingga memicu pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Adanya peningkatan ROS menyebabkan terjadinya stres oksidatif diberbagai sel dan



jaringan. Stres oksidatif memicu proses peroksidasi lipid yang mengakibatkan kerusakan sel dan gangguan morfologi pada ginjal (Isnaeni, 2006). Kerusakan sel dan morfologi tersebut menyebabkan kerusakan struktur pada membran sel glomerulus serta tubulus sebagai target efek toksin (Bbosa *et al.*, 2013). Hemoragi terjadi karena adanya radikal bebas yang masuk ke dalam kapiler darah. Adanya radikal bebas dapat menyebabkan rusaknya sel-sel endotel kapiler darah sehingga darah keluar dari pembuluh darah dan menyebabkan hemoragi. Beberapa studi menyebutkan bahwa aflatoxin menyebabkan perubahan degeneratif, nekrotik, dan hemoragi pada glomerulus, sel epitel tubulus dan hialin di lumen tubulus (Valchev *et al.*, 2014; Yaman *et al.*, 2016).

Hasil pengamatan histopatologi ginjal pada kelompok tikus yang diberi BAL dengan konsentrasi  $1 \times 10^4$  CFU/mL (**Gambar 5.1.C**) menunjukkan hasil histopatologi ginjal yang lebih baik dari kelompok P2 dan P3. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian BAL dengan konsentrasi  $1 \times 10^4$  CFU/mL mampu untuk mencegah efek toksin dari aflatoxin. Pada histopatologi ginjal  $1 \times 10^4$  CFU/mL hanya ditemukan adanya hemoragi pada glomerulus. Pada kelompok P1 hemoragi yang terjadi ditandai dengan adanya eritrosit pada daerah glomerulus akibat adanya radikal bebas yang menyebabkan rusaknya sel-sel endotel kapiler darah sehingga darah keluar dari pembuluh darah. Pada tubulus proksimal *brush border* terlihat jelas dan masih tampak kapiler peritubular yang membatasi tubulus proksimal dan distal. Histopatologi pada kelompok ini hampir mirip dengan histopatologi kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan yang merupakan histopatologi normal ginjal. Pemberian bakteri asam laktat sebagai agen preventif

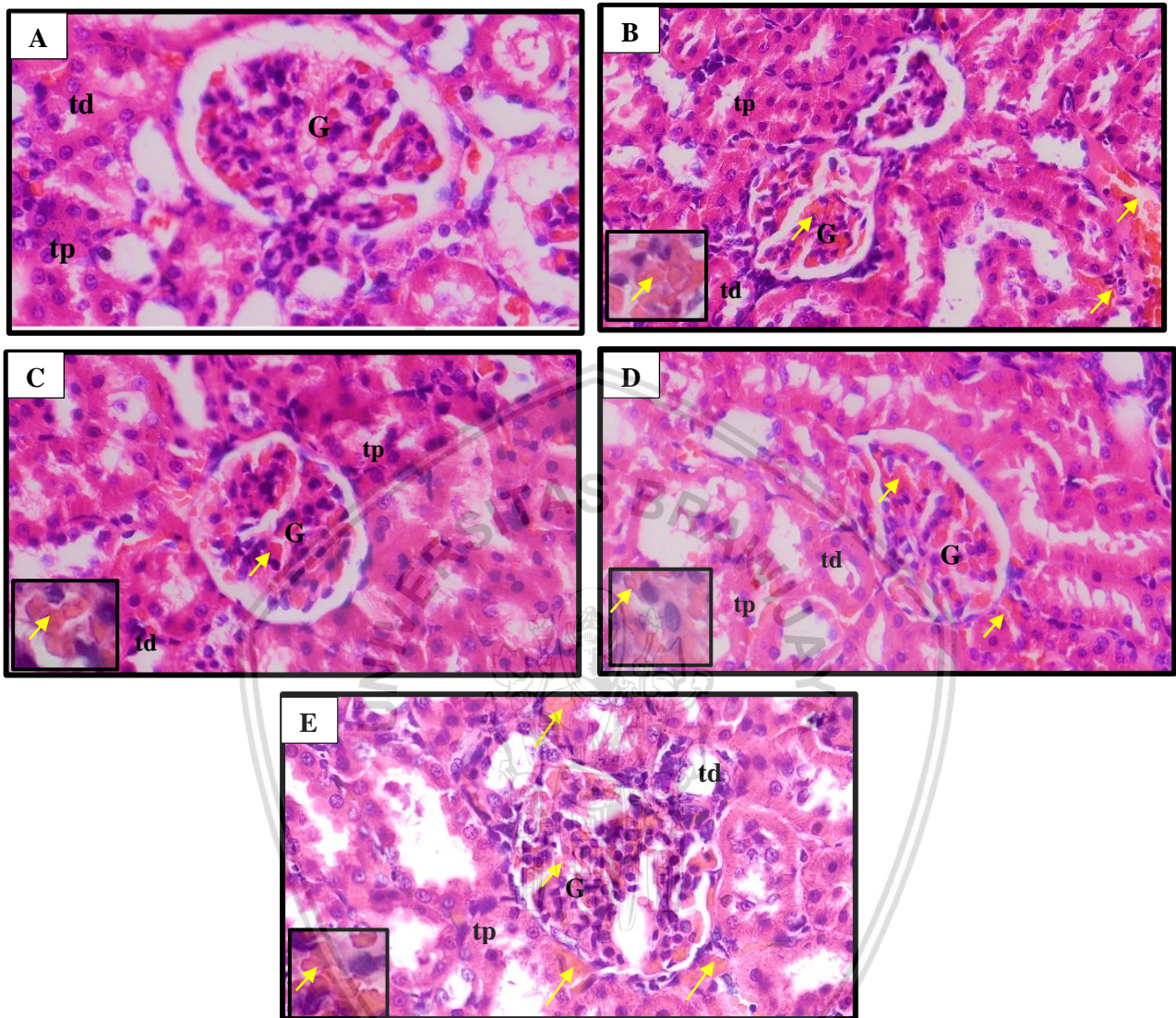
mampu mencegah metabolisme aflatoksin yang diinduksikan ke tubuh dengan mengikat aflatoksi disaluran pencernaan, sehingga akan mencegah proses absorpsi disaluran pencernaan dan dapat mencegah perubahan histopatologi ginjal akibat aflatoksikosis. Hal ini sesuai dengan pendapat Hernandez *et al.*, (2009) adanya komponen asam *teichoic* pada BAL dapat mengikat aflatoksin sehingga mencegah proses biotransformasi aflatoksin dalam tubuh.

Hasil pengamatan histopatologi ginjal pada kelompok tikus preventif yang diberikan BAL dengan konsentrasi  $1 \times 10^6$  CFU/mL (**Gambar 5.1.D**) dan  $1 \times 10^8$  CFU/mL (**Gambar 5.1.E**) menunjukkan perubahan yang sama yaitu adanya hemoragi glomerulus dan intersisial yang ditandai dengan adanya eritrosit, dan pelebaran pada tubulus ginjal. Pada kelompok P2 (**Gambar 5.1.D**) masih tampak kapiler peritubular yang membatasi tubulus proksimal dan distal. Hemoragi yang terdapat pada kelompok P2 terlihat pada glomerulus dan sedikit nampak pada intesisial tubulus. Pada konsentrasi  $1 \times 10^8$  CFU/mL mengalami perubahan yang lebih parah daripada kelompok tikus yang diberi BAL dengan konsentrasi  $1 \times 10^6$  CFU/mL. Glomerulus dan tubulus mengalami kerusakan struktur sehingga tidak menunjukkan bentukan normal. Hemoragi pada daerah intersisial tubulus terlihat lebih banyak dibanding dengan kelompok P2. Hal ini menunjukkan bahwa suplementasikan BAL dengan konsentrasikan  $10^6$  CFU/mL dan  $10^8$  CFU/mL belum mampu untuk mencegah kerusakan ginjal akibat aflatoksin.

Pemberian BAL dengan konsentrasi tinggi memiliki efek samping gangguan keseimbangan mikroflora yang menyebabkan infeksi dan efek metabolik yang mengakibatkan lesi pada saluran pencernaan. Infeksi atau lesi

pada usus akan memicu adanya ROS dan memperparah kondisi stres oksidatif dalam tubuh akibat induksi aflatoksin. Keadaan stres oksidatif ini akan memicu proses peroksidasi yang dapat merusak sel dan morfologi organ. Hal ini ditandai dengan kerusakan pada ginjal.

Aflatoksin masuk ke dalam tubuh salah satunya melalui pencernaan. Proses aflatoksin yang masuk kedalam tubuh dilakukan dengan cara diabsorpsi oleh usus halus dan didistribusikan oleh aliran darah ke hati untuk didetoksifikasi, lalu dieksresikan melalui ginjal (Lestari, 2014). Aflatoksin akan mempengaruhi fungsi filtrasi pada glomerulus dan transportasi sel epitel tubulus kolektifus serta penurunan fungsi pada tubulus proksimal sehingga dapat mempengaruhi kadar BUN dan kreatinin serta bentukan pada ginjal. Pencegahan kerusakan ginjal dikarenakan BAL mengikat aflatoksin pada permukaan bakteri dengan mekanisme binding asam *teichoic* yang menempel pada permukaan epitel dan terjadi interaksi antara molekul spesifik pada bakteri di permukaan saluran cerna *host* dengan cara menghindarkan kolonisasi molekul patogen (Qiu, 2009).



**Gambar 5.1** Histopatologi ginjal tikus dengan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) dengan perbesaran 100x dan 400x

Keterangan : A. Kontrol Negatif, B. Kontrol Positif, C. P1 (BAL *L. Plantarum*  $1 \times 10^4$  CFU/ml), D. P2 ( BAL *L. Plantarum*  $1 \times 10^6$  CFU/ml), E. P3 ( BAL *L. Plantarum*  $1 \times 10^8$  CFU/ml), ↑ : hemoragi pada glomerulus dan intersisial tubulus ginjal, tubulus tp : tubulus proksimal td : tubulus distal G : glomerulus ginjal



## BAB VI SIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Hasil dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian agen preventif bakteri asam laktat *L.plantarum* dapat mencegah peningkatan level BUN dan Kreatinin serum tikus (*Rattus novergicus*) yang diinduksi aflatoksin dari *Aspergillus flavus* dengan konsentrasi  $10^4$  CFU/mL
2. Pemberian agen preventif bakteri asam laktat *L.plantarum* dapat mencegah kerusakan glomerulus dan tubulus ginjal tikus (*Rattus novergicus*) yang diinduksi aflatoksin dari *Aspergillus flavus* dengan konsentrasi  $10^4$  CFU/mL

### 6.2 Saran

1. Diperlukan penelitian mendalam lebih lanjut mengenai lama waktu dalam induksi aflatoksin.
2. Diperlukan penelitian mendalam lebih lanjut terhadap metode pengujian aflatoksin, seperti ELISA.

## Daftar Pustaka

- Abdolamir, A. and A.M. Razagi. 2008. *Mycotoxins*. Imam Hossein University, Teheran.
- Adleend, 2015. Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Setelah Pemberian Meloxicam Dosis Toksik [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Hassanuddin.
- Afiandi, N. 2011. Uji potensi isolat lokal *Aspergillus flavus* sebagai penghasil aflatoksin [Skripsi]. Fakultas Teknolgi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Alexandru, I. 2011 Experimental Use of Animals in Research Spa. *Balneo Reserch Journal*, 2(1): 65-9.
- Andiarsa, D., D.E. Hidayat, Setyaningtyas, dan Sudarman. 2014. Gambaran Kerusakan Mukosa Usus Mencit (*Mus musculus*) pada Infeksi Escherichia coli. *Jurnal Vektor Penyakit*, 8(2): 53-60.
- Anshar, A. R. 2015. Pengaruh Pemberian Jus Buah Alpukat Terhadap Gambaran Kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) Dan Serum Kreatinin Pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Yang Diinduksi Meloxicam Dosis Toksik. [Skripsi]. Program Studi Kedokteran Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Arief, I.I., S.L. Jenie, M. Astawan, dan A. B. Witarto. 2008. Efektivitas Probiotik *Lactobacillus plantarum* 2C12 dan *Lactobacillus acidophilus* 2B4 Sebagai Pencegah Diare pada Tikus Percobaan. *Journal of Animal Science and Technology*, 33(3): 137-143
- Astuti, 2015. Pemanfaatan Probiotik Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Ikan Terhadap Pertumbuhan dan Kadar Kolesterol Daging Ayam Broiler. *Jurnal Penelitian Saintek*, 20(2): 157-165
- Bbosa, G.S., D. Kitya, and J. Ogwal-Okeng. 2013. Aflatoxins Metabolism, Effects on Epigenetic Mechanisms and Their Role in Carcinogenesis. *Health*, 5(10A): 14-34.
- Boutrif, E. 2006. Aflatoxin and food safety and aflatoxin prevention programmes. *Pistachio*, 14: 27 – 28.
- Bures, J., J. K. Vetina, A. Tichy, S. Rejchart, M. Kunes, and M. Kapacova. 2011. Morfometric Analysis of The Porcine Gastrointestinal Tract in A 10-Day High Dose Indomethcin Administration with or without Probiotic Bacteria

as *Escherichia coli*-Nissle. 1917. *Human and Experimental Toxicology*, 30(12): 1995-1962.

Carlile, M. J., S.C. Watkinson, and G.W. Gooday. 2001. *The Fungi*. Academic Press, London.

Delgado, A., D. Brito, P. Fevereiro, C. Peres, and J.F. Marques. 2001. Antimicrobial activity of *L. plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. *INRA, EDP Science*, 81 (1): 203-215.

Devendran, G., and U. Balasubramanian. 2011. Biochemical and Histopathological Analysis of Aflatoxin Induced Toxicity in Liver and Kidney of Rat. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1(4):61-69.

Dhanasekaran, D., S. Shanmugapriya, N. Thajuddin, and A. Panneerselva. 2011. Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals. *Aflatoxin – Biochemistry and Molecular Biology*, 12: 222 – 254.

El-Bahr, M., M.A. Embaby, A. Al-Azraqi, A.M Abdelghany, Y.A. Hussein, and A. AL Hizaband. 2015. Effect of Curcumin on Aflatoxin B1-Induced Toxicity in Rats: A Biochemical and Histopathological Study. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 5(1): 63-72.

Fadilah, R. dan A. Polana. 2004. *Aneka Penyakit pada Ayam dan Cara Mengatasinya*. Agromedia Pustaka, Jakarta. 130-131.

Farber. P., I. Brost, R. Adam, and W.Holzapfel. 2000. HPLC Based Method for The Measurement of The Reduction of Aflatoxin B1 by Bacterial Cultures Isolated From Different African foods. *Mycotoxin Research*, 16: 141.

Fernandez, M.G., J.A. Muzzolon, A. Dalcero, and C.E. Magnoli. 2011. Effect of acid lactic bacteria isolated from faeces of healthy dogs on growth parameters and aflatoxin B1 production by *Aspergillus* species in vitro. *Mycotoxin Research*, 27: 273 – 280.

Gasser F. 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 92: 45–67.

Giknis, M., and C.B. Clifford. 2008. *Clinical Laboratory Parameters for Wistar Rats*. Charles River Laboratories, UK.

Groopman, J.D., T.W. Kensler, and C.P. Wild. 2008. Protective Interventions to Prevent Aflatoxin-Induced Carcinogenesis in Developing Countries. *Annual Review of Public Health*, 29(1): 187 – 203.

Guyton, A.C. and J.E. Hall, 2006. *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia.



- Hamidi, A., R. Mirnejad, E. Yahaghi, V. Behnod, A. Mirhosseini, S. Amani, S. Sattari, and E.K. Darian. 2013. The Aflatoxin B1 Isolating Potential of Two Lactic Acid Bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomed*, 3(9): 732 – 736.
- Harlina E. 2007. Toksikologi dan biotransformasi senyawa toksik lamtoro merah (*Acacia villosa*) pada tikus [disertasi]. Bogor (ID): Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Hedayati, M. T., A. C. Pasqualotto, P. A. Warn, P. Bowyer, D. W. Denning. 2007. *Aspergillus flavus*: Human Pathogen, Allergen, and Mycotoxin Producer. *Microbiology*, 153: 1677-1692.
- Hedrich, H.J. 2006. Taxonomy and Stocks and Strains. Dalam: Suckow, M.A., S.H. Weisbroth & C.L. Franklin (eds.). *The laboratory rat*. 2nd ed. Elsevier, Boston. 912.
- Hernandez, M.A., A.F Gonzalez, B. Vallejo, and H.S. Garcia. 2011. Effect of oral supplementation of *Lactobacillus reuterii* reduction of intestinal absorption of Aflatoxin B1 in rats. *Jurnal Basic Microbiology*, 51: 263 – 268.
- Hernandez, M.A., D. Guzman, A.F. Gonzales, B. Vallejo, and H.S. Garcia. 2010. In Vivo Assessment of The Potential Protective Effect of *Lactobacillus casei* Shirota Against Aflatoxin B1. *Dairy Science and Technology*, 90: 729 – 740.
- Hernandez, M.A., D. Guzman, and H.S. Garcia. 2009. Key Role of Teichoic Acids on Aflatoxin B Binding by Probiotic Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 395 – 403.
- Hrapkiewicz, K., L. Colby, and P. Denison. 2013. *Clinical Laboratory Animal Medicine: An Introduction.*, John Wiley & Sons, Iowa State.
- IARC. 2002. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. *IARC Monogr Eval Carcinogenic Risks in Human*, 82: 1 – 556.
- Isnaeni, 2006. *Fisiologi Hewan*. Kanisius, Yogyakarta
- Junqueira L.C., J.Carneiro and R.O. Kelley. 2007. *Histologi Dasar*. Edisi ke-5. Tambayang J., penerjemah. Terjemahan dari *Basic Histology*. EGC, Jakarta.
- Kusumaningtyas, E., R. Widiastuti, dan R. Maryam. 2006. Penurunan Residu Aflatoxin B1 dan M1 pada Hati Itik dengan Pemberian Kultur *Saccharomyces cerevisiae* dan *Rhizopus oligosporus*. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, Bogor. 790-795.

- Lanyasunya, T.P., L.W. Wamae, H.H. Musa, O. Olowofeso, and I.K. Lokwaleput. 2005. The Risk of Mycotoxins Contamination of Dairy Feed and Milk on Smallholder Dairy Farms in Kenya. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4 (3): 162-169.
- Lestari, I. R. 2011. Pengujian Toksisitas Subakut Ekstrak Hipokotil Buah Bakau Hitam pada Tikus Galur *Sprague Dawley* [Skripsi]. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Lunggani, A.T. 2007. Kemampuan Bakteri Asam Laktat Dalam Menghambat Pertumbuhan dan Produksi Aflatoksin B2 *Aspergillus flavus*. *BIOMA*, 9 (2): 45-51.
- Marteau, P. 2003. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17: 725–740.
- Mescher, L. A. 2009. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*. McGraw-Hill Medical, English.
- Monosson E. 2012. *Evolution in a toxic world: How life responds to chemical threats*. Island Press, Washington.
- Primadona, E.S. 2002. Proses Biotransformasi Aflatoksin di Organ Hati dalam Kaitannya dengan Kerusakan Organ Hati [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Puspitasari, N. K. 2017. Pengaruh Pemberian *Lactobacillus bulgaricus* Terhadap Kadar MDA Hepar dan Trigliserida Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Sebagai Pencegahan Aflatoksikosis [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Qiu, R. 2009. Probiotic Effects on Gastrointestinal Tract Development and Immune Function in Broiler Chicken [Disertasi]. North Carolina State University.
- Royes, J.B. and R.P. 2002. Molds in Fish Feeds and Aflatoxicosis. <http://fisheries.tamu.edu/files/2013/09/Molds-in-Fish-Feeds-and-Aflatoxicosis.pdf>. [17 Februari 2018]
- Sa'diah, V.O. 2012. Kajian Produksi Aflatoksin dari Isolat Kapang *Aspergillus flavus*. [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Saka, W.A., R.E. Akhigbe, O.T. Popoola, and O.S. Oyekunle. 2012. Changes in serum electrolytes, urea, and creatinine in Aloe vera-treated rats. *Journal of Young Pharmacists* 4(2):78-81.

- Salasia, S.I.O dan B. Hariono. 2014. *Patologi Klinik Veteriner: Kasus Patologi klinik*. Samudra Biru, Yogyakarta.
- Shu-Xin, Z. 2013. *An Atlas of Histology*. Springer, New York.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine*. Mosby Inc, United of State America. 87-115.
- Sjogren, J., J. Magnusson, A. Broberg, J. Schnürer, and L. Kenne. 2003. Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied Environ Microbiology*, 69(12): 7554–7557.
- Suckow, M.A, S.H. Weisbroth, and C.L. Franklin. 2006. *The laboratory Rat*, 2nded. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Sumantri, I., A. Agus, B. Irawan, Habibah, N. Faizah, dan K.J. Wulandari. Cemaran Aflatoksin dalam Pakan dan Produk Itik Alabio (*Anas Platyrinchos Borneo*) di Kalimantan Selatan Aflatoxins Contamination In Feed And Products Of Alabio Duck (*Anas Platyrinchos Borneo*) Collected From South Kalimantan, Indonesia. *Bulletin of Animal Science*, Vol. 41 (2): 163-168
- Valchev, I., D. Kanakov, Ts. Hristov, L. Lazarov, R. Binev, N. Grozeva & Y. Nikolov. 2014. Effects of Experimental Aflatoxicosis on Renal Function in Broiler Chickens. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 17(4): 314-324.
- Widyaastuti, V.M., M.C. Padaga,, dan Aulanni'am. 2012. Gambaran Histopatologi dan Aktivitas Protease Ileum Tikus *Rattus Norvegicus* Hasil Induksi Indometasin yang Mendapat Suplementasi Bakteri Asam Laktat. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Wilkinson, J., D. Rood, D. Minior, D. Guillard, M. Darre, and L.K. Silbart. 2003. Immune Response to a Mucosally Administered Aflatoxin B1 Vaccine. *Poultri Science*, 82: 1565 – 1572.
- Yaman, T., Z.Yener, and I. Celik, 2016. Histopathological and Biochemical Investigations of Protective Role Of Honey In Rats With Experimental Aflatoxicosis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16: 232.
- Zidan, R., H. Elnegriz, and R. 2015. Evaluating the Protective Role of Gingseng against Histotological and Biochemical Changes Induced by Aflatoxin B1 in the Renal Tubules of Adult Male Albino Rats. *Journal of Clinical & Experimental Pathology*, Issue 5: 253.