

# Uji Toksisitas Akut dan Perkembangan *Lacticaseibacillus rhamnosus* MG5511 dari Susu Kuda Bima dalam Usus serta Efeknya terhadap Mukosa Usus dari Produk Uji Probiotik

(Acute Toxicity Test and Development of *Lacticaseibacillus rhamnosus* MG5511 from Bima Horse Milk in the Intestine and Its Effects on Intestinal Mucosa from Probiotic Test Products)

Mawar Subangkit<sup>1</sup>, Aulia Andi Mustika<sup>2</sup>, Hamdika Yendri Putra<sup>3</sup>, Elpita Tarigan<sup>3</sup>, Yusa Irirang<sup>3</sup>, Ridi Arif<sup>4</sup>, Andriyanto<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Divisi Patologi, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis IPB University, Bogor, Indonesia

<sup>2</sup>Divisi Farmakologi dan Toksikologi, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis IPB University, Bogor, Indonesia

<sup>3</sup>RATCo Laboratory Service, Bogor, Indonesia

<sup>4</sup>Divisi Parasitologi dan Entomologi Kesehatan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis IPB University, Bogor, Indonesia

\*Penulis untuk korespondensi: andriyanto@apps.ipb.ac.id

Diterima: 8 April 2023, Disetujui: 1 Agustus 2024

## ABSTRAK

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang dapat memberikan efek kesehatan dengan menyeimbangkan mikroba positif usus, serta mengendalikan mikroba patogen pada saluran pencernaan. Probiotik genus *Lactobacillus* merupakan jenis probiotik yang paling banyak digunakan. Selain uji efektivitas, pengembangan dan penelitian mengenai probiotik perlu dilengkapi dengan bukti dari data klinis dan nonklinis. Penelitian ini bertujuan mengoleksi data nonklinis dengan menguji efektivitas dan toksisitas kandidat probiotik *Lacticaseibacillus rhamnosus* MG 5511 dari susu kuda Bima yang selanjutnya disingkat KRG dalam usus, serta efeknya terhadap mukosa usus. Penelitian di hewan dilakukan dengan memasukkan galur spesifik tersebut dalam kaldu MRS dengan konsentrasi 10<sup>7</sup> sampai 10<sup>10</sup> CFU/mL ke mencit. Parameter yang diamati berupa pengamatan tanda toksik dan klinis, pengamatan berat badan secara harian, gross patologi organ, dan koleksi sampel isi usus untuk mengamati jumlah populasi bakteri yang tumbuh. Berdasarkan hasil penelitian, galur murni *Lacticaseibacillus rhamnosus* MG5511 mampu sintas sampai ke saluran pencernaan sampai 14 hari dan termasuk dalam kategori relatif tidak membahayakan berdasarkan hasil uji toksisitas.

**Kata kunci:** *Lactobacillus*, pertumbuhan bakteri, probiotik, toksisitas

## ABSTRACT

Probiotics are viable microorganisms that promote health benefits by balancing positive microbes in the gut, and controlling pathogenic microbes in the digestive tract. Probiotics from the genus *Lactobacillus* are the most widely used. In addition to effectiveness testing, development and research on probiotics need to be supplemented with evidence from clinical and non-clinical data. This study was aimed to collect non-clinical data by examining the effectivity and toxicity of a probiotic candidate *Lacticaseibacillus rhamnosus* MG5511 from Bima horse milk (KRG) in the intestine and their effect on the intestinal mucosa. The Animal study was conducted with administration of the specific strain in MRS broth in 10<sup>7</sup> to 10<sup>10</sup> CFU/mL concentrations to mice. The parameters observed were clinical signs, daily body weight measurement, gross organ pathology, and growth of bacterial populations. Based on the results, the strain *Lacticaseibacillus rhamnosus* MG5511 was able to survive the gastrointestinal tract for 14 days. It can be classified as relatively harmless based on the toxicity test results.

**Keywords:** *Lactobacillus*, *Rhamnosus*, probiotics, toxicity

## PENDAHULUAN

Probiotik merupakan suatu produk yang mengandung mikroba hidup non-patogen, yang diberikan pada hewan atau manusia untuk meningkatkan kesehatan dengan cara mempengaruhi keseimbangan mikroba usus dan mengendalikan mikroba patogen dalam saluran pencernaan (Khalesi *et al.* 2019). Probiotik juga diartikan sebagai segala bentuk pakan tambahan berupa sel mikroba hidup yang menguntungkan bagi inangnya (Oh *et al.* 2016). Probiotik harus memiliki karakter mampu bertahan hidup (tidak harus tumbuh) di saluran pencernaan, dapat disiapkan sebagai produk sel hidup skala industri dan dapat terjaga stabilitas serta sintasan untuk waktu yang lama pada penyimpanan maupun di lapangan (Kim *et al.* 2019). Efektivitas penggunaan bakteri probiotik untuk mengendalikan mikroorganisme patogen sangat dipengaruhi oleh jenis bakteri yang digunakan. Hal tersebut dikarenakan kehidupan bakteri sangat dipengaruhi oleh lingkungan. Populasi bakteri pada lingkungan dengan kandungan nutrisi dan kondisi fisiko-kimia yang berbeda, secara umum akan berbeda pula. Kriteria lain yang harus dipenuhi untuk menjadikan mikroorganisme tertentu sebagai probiotik adalah kepastian bahwa mikroorganisme tersebut tidak patogenik ataupun menghasilkan senyawa yang bersifat toksik bagi inangnya (Williams 2010).

Produk probiotik dikenal di pasar global sebagai ingredien, suplemen, dan bahan pangan. Industri pangan modern saat ini berlomba-lomba memproduksi beragam jenis pangan fungsional, yaitu pangan yang mengandung probiotik yang bukan sekedar memberikan nutrisi bagi konsumen melainkan menyehatkan tubuh. Produk pangan yang mengandung galur probiotik masih tetap luas dan terus berkembang. Produk utama yang terdapat di pasar adalah produk yang berbahan dasar susu (dairy) seperti susu fermentasi, keju, es krim, buttermilk, susu bubuk, dan yoghurt. Produk non-dairy berupa produk berbahan kedelai, snack bernutrisi (nutrition bars), sereal, dan variasi jus. (Meybodi dan Mortazavian, 2017).

Probiotik genus *Lactobacillus* merupakan genus yang paling banyak digunakan karena termasuk bakteri asam laktat yang berasal dari saluran pencernaan, sedangkan *Streptococcus* dan *Lactococcus* merupakan kultur fermentasi produk susu yang tidak dapat mencapai saluran pencernaan dalam keadaan hidup (Ahmed *et al.* 2010). *Lactobacillus* dapat berfungsi untuk kekebalan tubuh karena bakteri ini mampu merangsang pembentukan antibodi yang mencegah

pertumbuhan bakteri berbahaya, mencegah timbulnya infeksi saluran kemih, meningkatkan perlindungan terhadap patogen, virus dan bakteri, memulihkan keseimbangan usus setelah pemberian antibiotik, kemoterapi, serta mencegah pembentukan gas akibat pembusukan. Peningkatan daya tahan tubuh oleh *Lactobacillus* berhubungan dengan tingkat IgA. Bakteri probiotik juga menstimulasi produksi sitokin dalam darah dan meningkatkan aktivitas makrofag (Nowroozi *et al.* 2004). Namun, pengembangan dan penelitian tentang probiotik perlu dilengkapi dengan bukti dari data nonklinik dan data klinik. Obat yang akan diuji secara non klinik dan klinik memerlukan uji toksisitas yang minimal diperoleh data berupa LD50 untuk memperkirakan resiko yang berkaitan dengan pemaparan zat asing.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian lapang dilakukan pada bulan Februari – Juni 2023 di Unit Pengelola Hewan Laboratorium (UPHL) Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis Institut Pertanian Bogor (SKHB IPB) dilakukan iRatco Veterinary Laboratory Services, Bogor. Penelitian ini telah mendapatkan sertifikat ethical clearance dengan nomor 104/KEH/SKE/VII/2023 dari Komisi Etik Hewan Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis IPB University karena telah memenuhi kaidah etika penelitian yang ditetapkan.

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain adalah isolat *Lactobacillus rhamnosus* MG5511 dalam kaldu MRS 108 cfu/mL yang didapat dari PT Haldin Pacific Semesta, 25 ekor tikus betina galur Sprague-Dawley yang berumur 6 – 8 minggu dan berbobot 120 – 130 g, CMC Na 1%, akuades, RMS agar, NaCl fisiologis 0,9%. Peralatan yang digunakan antara lain adalah cawan petri, scalpel, gunting bedah, timbangan saku, tabung reaksi, dan inkubator.

### Hewan Percobaan

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 tikus strain Spargue Dawley (SD) yang berumur 6 – 8 minggu dengan berat 120 – 130 g. Sebelum diberi perlakuan, seluruh hewan percobaan diaklimatisasi selama 1 minggu. Seluruh prosedur perlakuan menggunakan hewan percobaan ini mengikuti aturan dari Unit Pengelola Hewan Laboratorium (UPHL), Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis Institut Pertanian Bogor (SKHB-IPB).

## Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut dilakukan mengikuti perKB POM No. 7 tahun 2014 dengan metode fixed dose dengan konsentrasi yang disesuaikan.

### Desain Eksperimental

Rancangan percobaan menggunakan rancangan lengkap yang dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok sebanyak 5 ekor tikus. KRG dalam kaldu MRS diperbanyak dan diinkubasi dengan waktu yang berbeda sehingga didapat jumlah koloni yang diperlukan. Kelompok 1 adalah kelompok kontrol normal, kelompok ini tanpa diberikan perlakuan. Kelompok 2 adalah kelompok yang diberikan probiotik konsentrasi  $10^7$  cfu/ml. Kelompok 3 adalah kelompok yang diberikan probiotik konsentrasi  $10^8$  cfu/ml. Kelompok 4 adalah kelompok yang diberikan probiotik konsentrasi  $10^9$  cfu/ml. Kelompok 5 adalah kelompok yang diberikan probiotik konsentrasi  $10^{10}$  cfu/ml.

### Penyiapan Sediaan Uji

Bahan uji yang digunakan berupa cairan. Bahan dihitung sesuai konversi konsentrasi yang diperlukan dan bahan uji obat dilarutkan dalam CMC Na 1%.

### Pemberian Sediaan Uji

Bahan uji obat probiotik dilarutkan dalam CMC Na 1% dan diberikan secara oral pada tikus dalam jangka waktu pemberian zat tidak boleh melampaui 24 jam. Penentuan konsentrasi untuk pengujian toksisitas akut. Jumlah volume tergantung pada berat badan hewan uji pada saat akan diberikan perlakuan diantaranya adalah kontrol normal, Probiotik  $10^7$ CFU/mL, Probiotik  $10^8$ CFU/mL, Probiotik  $10^9$ CFU/mL, dan Probiotik  $10^{10}$ CFU/mL. Masing-masing kelompok diberikan sediaan sebanyak 1 mL. Dosis ditentukan berdasarkan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Suryani dan Gaffar (2024).

### Pengamatan Hewan Uji

Hewan uji diobservasi secara individual sekurang-kurangnya pada 30 menit pertama setelah pemberian sediaan uji, dan secara periodik setiap 4 jam selama 24 jam pertama dan sehari sekali setelah itu selama 14 hari. Waktu timbul dan hilangnya gejala toksisitas. Pengamatan yang akan dilakukan adalah pengamatan tanda toksik dan klinis harian, serta pengamatan berat badan harian. Pengamatan tanda toksik dan klinis harian yang akan diamati diantaranya: perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa, sekresi, ekskresi,

dan nafsu makan, perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur), kejang, tremor dan hipersalivasi

### Gross Patologi

Semua perubahan gross patologi dicatat untuk setiap hewan uji. Pemeriksaan mikroskopik dari organ yang menunjukkan adanya perubahan secara gross patologi pada hewan yang bertahan hidup selama 24 jam atau lebih setelah pemberian KRG awal dapat dilakukan untuk mendapatkan informasi yang berguna. Organ yang diamati adalah hati, ginjal, jantung, limpa dan paru-paru, pengamatan secara makroskopi dari warna, index berat, ukuran, dan bentuk.

### Koleksi Sampel Usus

Koleksi sampel isi usus dan perhitungan jumlah bakteri asam laktat (BAL) dilakukan untuk mengetahui perubahan populasi *Lactobacillus* dalam usus pada akhir penelitian. Penentuan jumlah koloni bakteri asam laktat dilakukan dengan metode pour plate menggunakan media agar RMS yang mengandung  $\text{CaCO}_3$  1 % (b/v). Sampel usus diambil sebanyak 1 gr lalu dilakukan seri pengenceran. Seri pengenceran dilakukan dengan mengambil 1 gr sampel lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml NaCl fisiologis 0,9 % sehingga didapatkan pengenceran 10<sup>-1</sup>. Seri pengenceran tersebut dilakukan sampai dengan pengenceran 10<sup>-6</sup>. Tiga pengenceran terakhir (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>) masing-masing diambil 1 gr lalu dituang ke cawan. Kemudian cawan tersebut diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, dihitung total jumlah koloni bakteri asam laktat yang tumbuh.

### Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dan melalui uji ANOVA, diikuti oleh uji Duncan dengan bantuan aplikasi Microsoft Excel 2019 dan Minitab 19.

## HASIL

Pengujian efek toksik terhadap setiap perlakuan dilakukan dengan mengamati parameter berupa pengamatan klinis yang terdiri dari perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa, sekresi, ekskresi, nafsu makan, perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh, kejang, tremor dan hipersalivasi. Hasil pengamatan klinis tersaji dalam Tabel 1.

Hasil pengamatan terhadap gejala klinis dilakukan untuk melihat efek toksisitas tertunda oleh sediaan terhadap hewan coba. Berdasarkan hasil pengamatan

Tabel 1. Analisa pemeriksaan klinis hewan coba pada pengujian toksisitas akut

Kelompok	Kelainan Klinis	Keterangan	
		No. ID Sampel	Jumlah Sampel
Kontrol Normal	Normal	1,2,3,4,5	5
	Perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa	TT	0
	Sekresi, ekskresi	TT	0
	Perubahan Nafsu makan	TT	0
	Perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur)	TT	0
	Kejang, tremor dan hipersalivasi	TT	0
	Kematian	TT	0
KRG 10 <sup>7</sup> CFU/mL	Normal	1,2,3,4,5	5
	Perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa	TT	0
	Sekresi, ekskresi	TT	0
	Perubahan nafsu makan	TT	0
	Perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur)	TT	0
	Kejang, tremor dan hipersalivasi	TT	0
	Kematian	TT	0
KRG 10 <sup>8</sup> CFU/mL	Normal	1,2,3,4,5	5
	Perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa	TT	0
	Sekresi, ekskresi	TT	0
	Perubahan nafsu makan	TT	0
	Perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur)	TT	0
	Kejang, tremor dan hipersalivasi	TT	0
	Kematian	TT	0
KRG 10 <sup>9</sup> CFU/mL	Normal	1,2,3,4,5	5
	Perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa	TT	0
	Sekresi, ekskresi	TT	0
	Perubahan nafsu makan	TT	0
	Perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur)	TT	0
	Kejang, tremor dan hipersalivasi	TT	0
	Kematian	TT	0
KRG 10 <sup>10</sup> CFU/mL	Normal	1,2,3,4,5	5
	Perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa	TT	0
	Sekresi, ekskresi	TT	0
	Perubahan nafsu makan	TT	0
	Perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur)	TT	0
	Kejang, tremor dan hipersalivasi	TT	0
	Kematian	TT	0

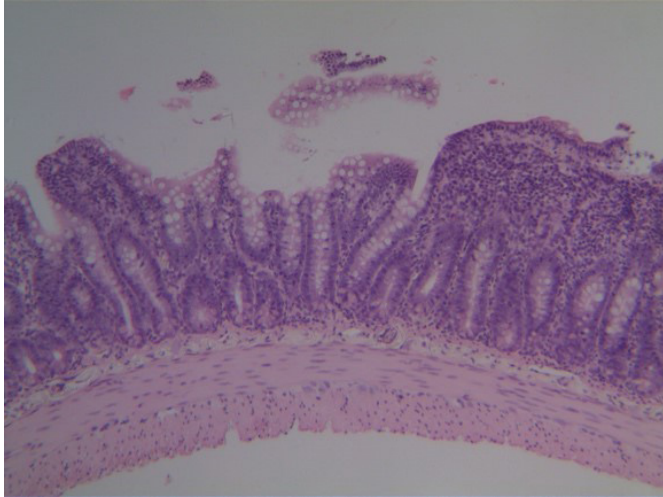
Keterangan: TT: Tidak Terjadi

gejala klinis yang ditunjukkan oleh hewan uji selama perlakuan, tidak ada gejala abnormalitas terhadap gejala klinis yang mengarah pada toksisitas sediaan.

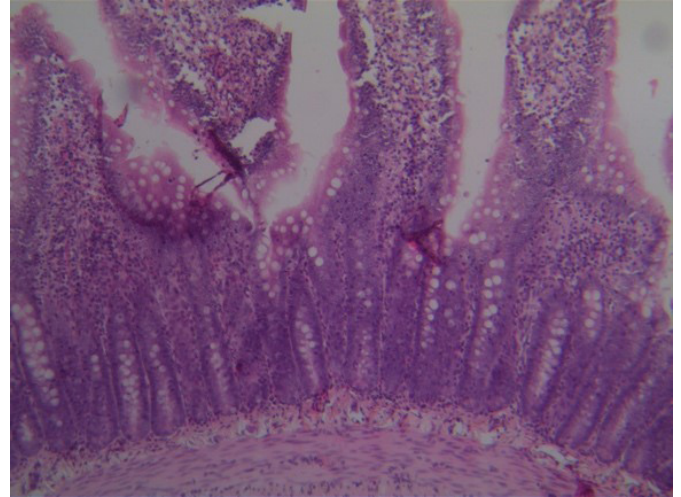
Hasil pengamatan terhadap berat badan tiap kelompok mencit per harinya terhadap pemberian

sediaan KRG dalam konsentrasi yang berbeda-beda tersaji pada Gambar 1.

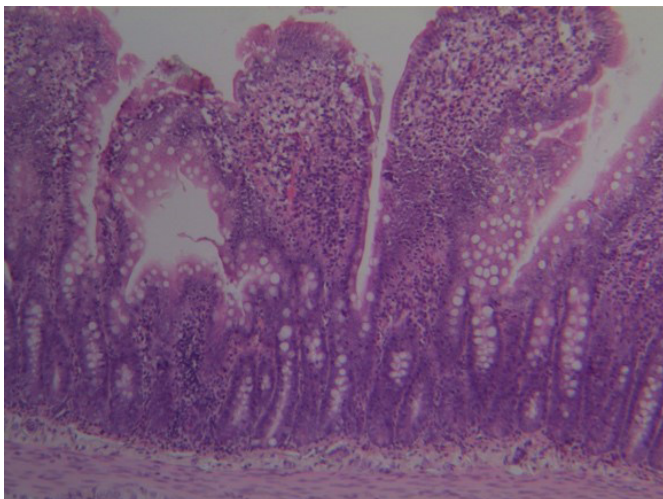
Hasil pengamatan terhadap perbedaan berat badan antar kelompok yang berbeda tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p < 0.05$ ).



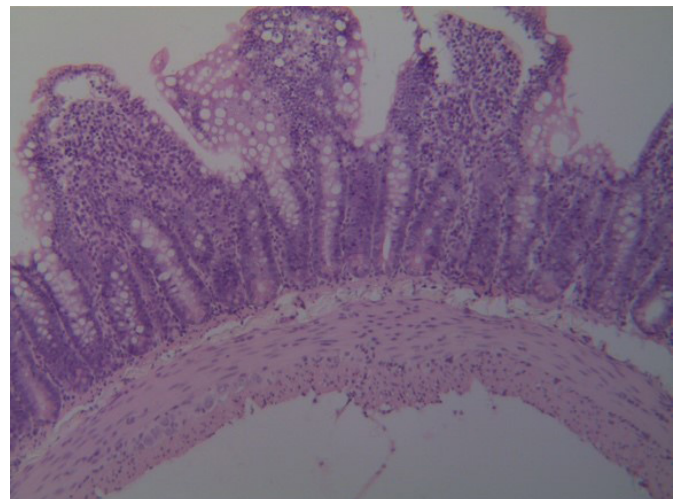
Kontrol Normal



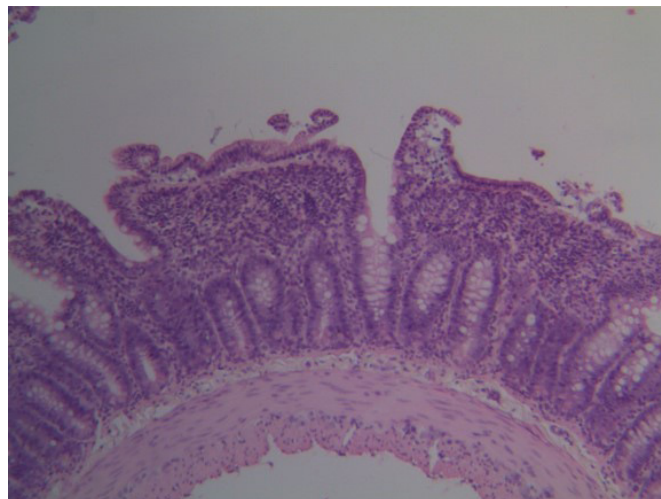
Konsentrasi  $10^7$  cfu/ml



Konsentrasi  $10^8$  cfu/ml



Konsentrasi  $10^9$  cfu/ml



Konsentrasi  $10^{10}$  cfu/ml

Gambar 1. Gambaran Histopatologi Organ Lambung pada Hewan Uji

Berdasarkan hasil pengamatan, meskipun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, hewan yang diberikan probiotik mengalami kenaikan berat badan yang lebih besar dibandingkan hewan kontrol normal. Pada kelompok perlakuan probiotik, kenaikan berat badan cenderung semakin kecil seiring dengan semakin besarnya konsentrasi probiotik. Parameter berat badan diamati per hari untuk menguji toksisitas probiotik yang dapat diamati, salah satunya dari penurunan berat badan yang drastis.

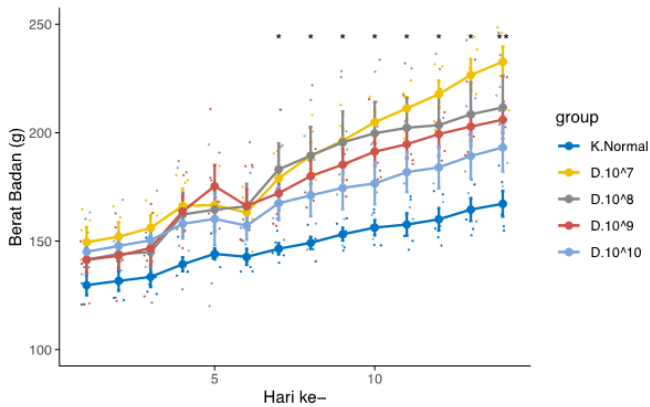
Hasil pengamatan konsumsi makanan dan minuman harian yang dilakukan secara kualitatif menunjukkan tidak ada perubahan konsumsi pakan yang signifikan selama penelitian. Rata-rata konsumsi pakan per ekor per hari adalah 33 gram. Pakan diberikan tanpa adanya

pembatasan, baik siang maupun malam. Hasil yang didapatkan tidak menunjukkan adanya penurunan nafsu makan.

Uji gross pathology dilakukan dengan mengamati kondisi organ hati, limpa, jantung, paru-paru, serta ginjal kanan dan ginjal kiri. Pengamatan dilakukan secara makroskopis dengan memberikan skoring pada keadaan organ yang diamati. Parameter abnormalitas pengamatan makroskopis meliputi kebengkakan, kebengkakan dan kepuatan serta kerapuhan. Berdasarkan hasil skoring, seluruh organ berada dalam keadaan yang normal, tanpa menunjukkan abnormalitas. Organ-organ tersebut juga diukur beratnya untuk mengamati ada toksisitas dari sediaan probiotik. Berat organ tersedia pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata berat organ hewan

Kelompok	Parameter	N (sampel)	Rata-rata
Kontrol Normal	Hati	5	3,991 ± 0,416
	Limpa	5	0,589 ± 0,104
	Jantung	5	0,411 ± 0,026
	Paru	5	2,051 ± 0,159
	Ginjal Kanan	5	0,413 ± 0,06
	Ginjal Kiri	5	0,465 ± 0,068
Konsentrasi 10 <sup>7</sup> CFU/mL	Hati	5	3,734 ± 0,611
	Limpa	5	0,465 ± 0,098
	Jantung	5	0,374 ± 0,049
	Paru	5	2,009 ± 0,243
	Ginjal Kanan	5	0,353 ± 0,077
	Ginjal Kiri	5	0,4 ± 0,084
Konsentrasi 10 <sup>8</sup> CFU/mL	Hati	5	4,053 ± 1,026
	Limpa	5	0,552 ± 0,157
	Jantung	5	0,388 ± 0,024
	Paru	5	1,934 ± 0,565
	Ginjal Kanan	5	0,441 ± 0,136
	Ginjal Kiri	5	0,48 ± 0,132
Konsentrasi 10 <sup>9</sup> CFU/mL	Hati	5	4,519 ± 1,303
	Limpa	5	0,542 ± 0,201
	Jantung	5	0,385 ± 0,034
	Paru	5	1,742 ± 0,562
	Ginjal Kanan	5	0,454 ± 0,154
	Ginjal Kiri	5	0,503 ± 0,167
Konsentrasi 10 <sup>10</sup> CFU/mL	Hati	5	4,184 ± 0,282
	Limpa	5	0,657 ± 0,062
	Jantung	5	0,416 ± 0,027
	Paru	5	1,943 ± 0,123
	Ginjal Kanan	5	0,426 ± 0,033
	Ginjal Kiri	5	0,461 ± 0,055



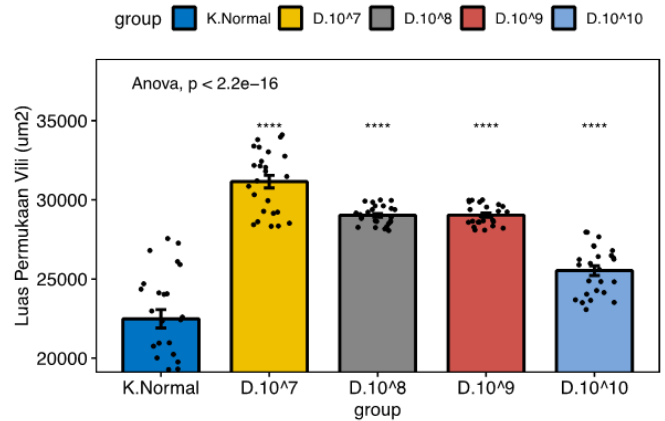
Grafik 1. Grafik perkembangan berat badan hewan uji selama pengujian.

Berdasarkan hasil pengamatan, tidak ditemukan adanya perbedaan signifikan terhadap berat organ kelompok yang diberikan perlakuan dan konsentrasi KRG yang berbeda-beda. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian sediaan probiotik tidak menyebabkan efek toksisitas terhadap organ hewan coba.

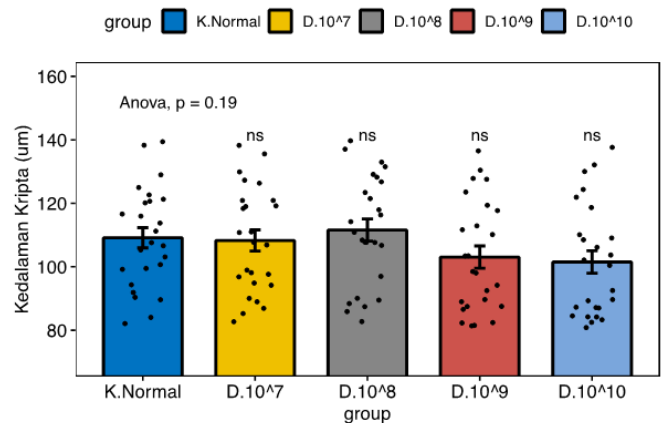
Uji makroskopis terhadap organ lambung dan usus dilakukan untuk melihat kondisi umum organ pencernaan terhadap hewan coba dan dideskripsikan dengan skoring. Parameter abnormalitas makroskopis pada organ lambung dan usus meliputi; lambung membesar usus normal; lambung membesar dan timbunan gas ringan pada usus; serta lambung dan usus mengalami timbunan gas yang berat. Berdasarkan hasil pengamatan, seluruh organ lambung dan usus hewan uji tidak ada yang menunjukkan gejala abnormalitas.

Uji secara patologis terhadap organ usus dilakukan untuk melihat kondisi mukosa. Parameter yang terdiri dari uji histopatologi usus terdiri dari; tidak ada kelainan (struktur normal); deskuamasi ringan mukosa usus (perubahan patologi ringan); deskuamasi dengan luasan sedang (perubahan patologi sedang); dan nekrosis mukosa usus (perubahan patologi berat). Berdasarkan pengamatan yang dilakukan, hasil histopatologi usus seluruh hewan masuk pada kriteria tidak ada kelainan (struktur normal). Preparat histopatologi usus hewan tersaji pada Gambar 1.

Pemeriksaan histomorfometri dilakukan dengan metode image analysis pada software ImageJ. Pengukuran luas permukaan dilakukan dengan mengukur sekeliling vili usus mulai dari basal hingga apical vili usus. Sedangkan pengukuran kedalaman kripta dilakukan dengan mengukur pada basal vili hingga tunika muskularis usus. Data luas permukaan vili dan kedalaman kripta usus tersaji pada Grafik 2 dan Grafik 3.



Grafik 2. Data Luas Permukaan Vili Usus Hewan Percobaan



Grafik 3. Data Kedalaman Kripta Usus Hewan Percobaan

Berdasarkan hasil analisa statistik, ditemukan adanya perbedaan signifikan ( $p < 0.05$ ) terhadap kelompok kontrol normal dan kelompok yang diberikan probiotik dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pemberian perlakuan meningkatkan luas permukaan vili usus. Namun, semakin tinggi konsentrasi yang diberikan, permukaan vili usus cenderung semakin rendah.

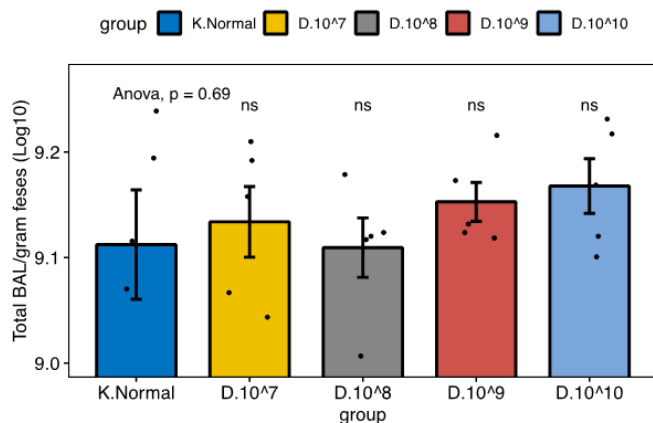
Hasil pengamatan pada kripta usus menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan pada semua kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan pemberian perlakuan tidak menyebabkan penipisan usus yang ditunjukkan masih terdapat kemiripan ketebalan kripta dengan kelompok kontrol.

Pengamatan kultur bakteri dari isi usus dilakukan untuk mengamati perkembangan bakteri asam laktat pada saluran pencernaan hewan coba. Sampel koloni bakteri tersaji pada Gambar 2. Koloni bakteri asam laktat yang tumbuh berbentuk konvek dengan permukaan yang halus dan tepi yang rata. Warna koloni putih kekuningan dengan opasitas yang tebal.



Gambar 2. Sampel Koloni Asam Laktat

Jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada setiap kelompok dan dikultur pada agar dihitung dan disajikan pada Grafik 4. Jumlah koloni bakteri asam laktat dalam kultur tiap kelompok tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p < 0.05$ ). Setelah 14 hari, masih terdapat sekitar 109 cfu/mL *Lactobacillus* di saluran pencernaan dari masing-masing perlakuan dan juga tidak ada perbedaan dengan jumlah bakteri di kelompok kontrol.



Grafik 4. Jumlah bakteri asam laktat yang terdapat dalam kultur

## PEMBAHASAN

Uji toksisitas terdiri dari pengamatan gejala klinis, berat badan, nafsu makan, makroskopis organ dan histopatologi organ usus pada hewan coba. Parameter yang diamati pada pengamatan gejala klinis berupa perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa,

adanya sekresi dan eksresi berlebihan maupun tidak normal, perubahan nafsu makan, perubahan cara jalan, adanya tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur), kejang, tremor, hipersalivasi dan adanya kematian. Pengamatan gejala klinis bertujuan mengevaluasi toksisitas probiotik *Lactobacillus*. Pengamatan gejala klinis dilakukan untuk mengetahui efek toksik yang tertunda pada mencit (Musdalipah *et al.* 2022). Berdasarkan pedoman internasional dan Good Laboratory Practice (GLP) untuk pengembangan obat dan sediaan yang aman, tanda-tanda klinis harus dipantau dan dilaporkan secara menyeluruh dalam hewan percobaan (WHO 2009). Tanda-tanda klinis digunakan untuk penilaian kondisi umum hewan dan untuk menerapkan titik akhir yang manusiawi. Dalam industri farmasi, tanda-tanda klinis juga digunakan untuk pengaturan dosis dan tujuan desain studi (Sewell *et al.* 2015). Hasil uji pengamatan gejala klinis menunjukkan bahwa setiap hewan coba berada dalam keadaan normal dan tidak menunjukkan gejala abnormalitas. Probiotik dapat meningkatkan sekresi enzim pencernaan, sehingga mempengaruhi pencernaan dan absorpsi nutrisi (Pruzynska-Oszmalek *et al.* 2015). Berdasarkan hasil pengamatan, hewan uji memiliki nafsu makan yang cenderung stabil, yaitu 33 gram per harinya. Hal ini membuktikan bahwa KRG tidak memiliki efek negatif terhadap nafsu makan hewan uji.

Parameter selain gejala klinis, yaitu berat badan juga diperlukan dalam uji toksisitas. Parameter berat badan diperlukan untuk menentukan dosis maksimum yang dapat ditoleransi (MTD) oleh hewan uji (Chapman *et al.* 2013). Berdasarkan hasil penelitian, tidak ada perbedaan signifikan terhadap berat badan masing-masing hewan uji pada tiap kelompok, namun, kenaikan berat badan mencit di kelompok uji cenderung lebih besar dibandingkan kelompok kontrol normal. Kenaikan berat badan mencit selama 14 hari tampak semakin kecil dengan semakin tingginya konsentrasi KRG yang diberikan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian probiotik dengan konsentrasi 10<sup>8</sup> cfu/mL ke tikus yang diberikan makanan berkadar lemak tinggi dapat mencegah kenaikan berat badan yang lebih besar dibandingkan terhadap tikus yang tidak diberikan probiotik (Arellano-Garcia *et al.* 2023, Di Bonaventura *et al.* 2021), Semua perlakuan pemberian KRG di penelitian ini tidak menyebabkan penurunan berat badan pada mencit.

Gross pathology pada organ-organ hewan coba seperti hati, ginjal, limpa, jantung, paru-paru dan usus juga diamati secara makroskopis untuk melihat pengaruh KRG terhadap kondisi organ-organ tersebut. Toksisitas suatu senyawa dapat mempengaruhi organ-organ yang berperan penting dalam proses



metabolisme racun dalam tubuh seperti jantung, paru-paru, limpa, hati, ginjal dan jeroan. Oleh karena itu, hewan yang dijadikan subjek penelitian baik yang mati ataupun hidup sebaiknya dinekropsi untuk dilakukan evaluasi melalui pengamatan secara makropatologi pada setiap organ (BPOM 2014). Pemeriksaan PA memberikan konfirmasi terhadap temuan klinis yang memerlukan analisis lebih lanjut. Pengamatan terhadap PA juga berguna untuk membandingkan efek konsentrasi perlakuan pada organ hewan coba (Hambal *et al.* 2019). Menurut Manzari *et al.* (2021), semua sistem organ dapat menjadi target paparan toksisitas. Perubahan yang dapat terlihat sebagai hasil dari paparan toksik adalah lokasi, jumlah, ukuran, warna, bentuk dan konsistensi organ. Berdasarkan hasil pengamatan, seluruh organ-organ yang diamati berada dalam keadaan baik secara umum dan tidak menunjukkan adanya abnormalitas. Seperti kebengkakan, kepuccatan dan kerapuhan. Seluruh organ yang diamati sebagai parameter toksisitas pada hewan coba menunjukkan tidak adanya kelainan. Hal ini membuktikan bahwa KRG tidak menunjukkan adanya toksisitas terhadap organ-organ krusial tersebut.

Hasil pengamatan terhadap permukaan vili usus menunjukkan bahwa permukaan vili dari kelompok yang diberi probiotik lebih luas secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol, namun, semakin tinggi konsentrasi probiotik yang diberikan, semakin rendah permukaan vili usus. Ruttanavut *et al.* (2009) menyatakan bahwa kapasitas dan daya dukung proses pencernaan terhadap pakan serta penyerapan nutrisi dipengaruhi oleh luas permukaan epitel usus, jumlah lipatan yang ada, tinggi vili, banyaknya vili dan mikrovili yang memperluas bidang penyerapan. Probiotik dan substansi bioaktif lainnya banyak dikenal untuk dapat meningkatkan parameter morfologis dari mukosa intestinal dan memiliki efek positif terhadap permukaan serapan pada usus. Hal ini dapat disebabkan oleh kompetisi sumber daya dan relung ekologis antara bakteri asam laktat (BAL) dan mikroorganisme patogen. Persaingan ini didasarkan pada kemampuan BAL untuk menghasilkan asam lemak volatil dan bakteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Vieco-Saiz *et al.* 2019). Semakin luas permukaan vili, maka area untuk absorpsi nutrisi akan semakin meningkat (Awad *et al.* 2018). Selain itu, peningkatan luas vili juga disebabkan peningkatan asam lemak rantai pendek yang diinduksi oleh probiotik. Asam lemak rantai pendek ini dihasilkan dari proses fermentasi yang dilakukan oleh bakteri probiotik. Asam lemak ini berperan dalam merangsang multiplikasi sel epitel intestinal (Hossain *et al.* 2022). Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian

KRG mampu meningkatkan tingkat absorpsi nutrisi pada hewan uji.

Hasil pengamatan terhadap kedalaman kriptas usus menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan. Kedalaman kriptas usus tertinggi terdapat pada pemberian konsentrasi 10<sup>8</sup> CFU/mL meskipun konsentrasi probiotik ini tidak menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kelompok lainnya. Rasio antara kriptas usus dan luas vili adalah indikator potensi digestiva sistem pencernaan dan dapat mengindikasikan perkembangan mukosa usus. Kriptas usus yang dangkal mengindikasikan kehilangan enterosit yang lebih rendah dari permukaan vili, yang dapat memperlambat mitosis sel kriptografi (Adibmoradi *et al.* 2006). Kriptas usus yang semakin mendalam dapat menyebabkan penurunan absorpsi nutrisi dan efisiensi dari hasil produksi daging (Boguslawska-Tryk 2021). Kriptas yang semakin dalam mengindikasikan pergantian jaringan yang cepat sebagai respons terhadap pengelupasan secara normal atau peradangan akibat patogen atau toksin yang menyebabkan tingginya kebutuhan jaringan (Awad *et al.* 2010). Hasil penelitian yang menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan antara kelompok kontrol normal dan kelompok yang diberikan KRG dalam parameter kedalaman kriptas usus menunjukkan bahwa probiotik aman dan tidak menyebabkan penipisan terhadap usus.

Hasil pengamatan terhadap kultur bakteri menunjukkan pertumbuhan bakteri yang berbentuk konvek dengan permukaan yang halus dan tepi yang rata. Warna koloni putih kekuningan dengan opasitas yang tebal. Perhitungan jumlah koloni bakteri asam laktat pada setiap kelompok tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok, berarti pemberian konsentrasi sebanyak 10<sup>7</sup> CFU/mL sudah cukup untuk memberikan efek untuk penelitian selanjutnya dengan jangka waktu lebih panjang. Perhitungan koloni bakteri asam laktat pada hewan percobaan juga tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara kontrol negatif dengan kelompok yang diberikan probiotik. Berdasarkan data tersebut, pemberian KRG tidak meningkatkan jumlah bakteri asam laktat dan tidak menurunkan tingkat nafsu makan. Sediaan *Lactocaseibacillus rhamnosus* MG5511 yang diisolasi dari susu kuda Bima aman untuk digunakan karena tidak menimbulkan gejala klinis abnormal, tidak menurunkan berat badan dan nafsu makan, tidak menimbulkan tanda-tanda abnormalitas pada organ hewan uji, serta tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada parameter kedalaman kriptas usus terhadap kontrol negatif. Kandidat probiotik *Lactocaseibacillus rhamnosus* MG 5511 termasuk relatif aman.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adibmoradi M, Navidshad B, Seifdavati M, Royan M. 2006. Effect of dietary garlic meal on histological structure of small intestine in broiler chickens. *Journal of Poultry Science*. 43:378-383. DOI: 10.2141/jpsa.43.378
- Ahmed Z, Wang Y, Cheng Q, Imran M. 2010. Lactobacillus acidophilus bacteriocin, from production to their application: an overview. *African Journal of Biotechnology*. 9(20):2843-2850.
- Arellano-Garcia L, Macarulla MT, Cuevas-Sierra A, Martinez JA, Portillo MR, Milton-Laskibar I. 2023. Lactobacillus rhamnosus GG administration partially prevents diet-induced insulin resistance in rats: a comparison with its heat-inactivated parabiogenic. *Food & Function*. 14:8865-8875.
- Awad WA, Ghareeb K, Bohm J, Zentek J. 2010. Decontamination and detoxification strategies for the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and effectiveness of microbial biodegradation. *Food Additives & Contaminants Part A*. 27:510-520.
- Barba-vidal E, martin Orue SM, Castillejos L. 2019. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: a review. *Livest Sci*. 223:84-96. DOI: 10.1016/j.livsci.2019.02.017.
- [BPOM]. Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2014. Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis secara In Vivo. Jakarta: Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No 7 Tahun 2014.
- Boguslawska-Tryk M, Ziolkowska E, Slawinska A, Siwek M, Bogucka J. 2021. Modulation of intestinal histology by probiotics, prebiotics and synbiotics delivered in ovo distinct chicken genotypes. *Animals (Basel)*. 11(11):3293.
- Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J. 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69:827-834.
- Chapman K, Sewell F, Allais L, *et al.* 2013. A global pharmaceutical company initiative: an evidence-based approach to define the upper limit of body weight loss in short term toxicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 67(1):27-38. DOI: 10.1016/j.yrtph.2013.04.003.
- Di Bonaventura MV, Coman MM, Tomassoni D, Di Bonaventura EM, Boticelli L, Gabrielli MG, Rossolini GM, D Pilato V, Cecchini C, Amedei A, Silvi S, Verdenelli MC, Clfani C. 2021. Supplementation with Lactiplantibacillus plantarum IMC 510 modifies microbiota composition and prevents body weight gain induced by cafeteria diet in rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(20):11171-11195.
- Hambal M, Efriyendi R, Vanda H, Rusli. 2019. Anatomical pathology and histopathological changes of Ascaridia galli in layer chicken. *Jurnal Medika Veterinaria*. 13(2):239-247. DOI: 10.21157/j.med.vet.v1.lil.14578.
- Hawaz E. 2014. Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from curd and in vitro evaluation of its growth inhibition activities against pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 8:1919.
- Hossain MK, Islam SMM, Rafiquzzaman SM, Nuruzzaman M, Hossain MT, Shahjahan M. 2022. Multi-species probiotics enhance growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) through upgrading gut, liver and muscle health. *Aquaculture Research*. 53:5710-5719. DOI: 10.1111/are.16052
- Khalesi S, Bellissimo N, Vandelanotte C, Williams S, Stanley D, Irwin C. 2019. A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype?. *European Journal of Clinical Nutrition*. 73(1):24-37. DOI: 10.1038/s41430-018-0135-9.
- Kim S, Guevarra RB, Kim Y, Kwon J, Kim H, Cho JH, Kim HB, Lee J. 2019. Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases. *Journal of Microbiology and Technology*. 29(9):1335-1340. DOI: 10.4014/jmb.1906.06064.
- Kirchhelle C. 2018. Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017). Palgrave Communications. 4(96).
- Manzari MT, Shamay Y, Kiguchi H, Rosen N, Scaltriti M, Heller DA. 2021. Targeted drug delivery strategies for precision medicines. *Nature Reviews Materials*. 6(4):351-370. DOI: 10.1038/s41578-020-00269-6.
- Markovic R, Sefer D, Krstic M, Petrujkic B. 2009. Effect of different growth promoters on broiler performance and gut morphology. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 41:163-169.
- Meybodi NM, Mortazavian AM. 2017. Biochemical Pharmacology. Probiotics supplements and food products: a comparative approach. 6:227.
- Musdalipah M, Yodha AWM, Tee SA, Daud NS, Setiawan MA, Badia E. 2022. Toksisitas akut dan lethal dose (LD 50) ekstrak buah walay (*Meistera chinensis*) asal Sulawesi Tenggara terhadap mencit (*Mus musculus*). *Pharmacoscrypt*. 5(2):186-200.
- Nowroozi J, Mirzaii M, Norouzi M. 2004. Study of Lactobacillus as probiotic bacteria. *Iranian Journal of Public Health*. 33(2):1-7.
- Oh B, Kim BS, Kim JW, Kim JS, Koh SJ, Kim BG, Lee KL, Chun J. 2016. The effect of probiotics on gut microbiota during the Helicobacter

- pylori eradication: randomized controlled trial. *Helicobacter*. 21(3):165-174. DOI: 10.1111/hel.12270.
- Rushy AA, Gomaa ZE. 2013. Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated dairy products. *Journal of Applied Microbiology*. 63:81-90.
- Prescott LM, Horley JP, Klein DA. 2022. *Microbiology* 5th Edition. Boston: Mc Graw-Hill.
- Pruszyńska-Oszmalek E, Kolodziejcki PA, Stadnicka K, Sassek M, Chalupka D, Kuston B, Nogowski L, Mackowiak P, Maiorano G, Jankowski J, et al. 2015. In ovo injection of prebiotics and synbiotics affects the digestive potency of the pancreas in growing chicken. *Poultry Science*. 94:1909-1916. DOI: 10.3382/ps/pev162.
- Ruttanavut JK, Yamauhci H, Goto, Erikawa T. 2009. Effects of dietary bamboo charcoal powder including vinegar liquid on growth performance and histological intestinal change in Aigamo ducks. *International Journal of Poultry Science*. 8(3):229-236.
- Sewell F, Chapman K, Baldrick P, et al. 2014. Recommendations from a global cross-company data sharing initiative on the incorporation of recovery phase animals in safety assessment studies to support first-in-human clinical trials. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 70:413-429. DOI:10.1016/j.yrtph.2014.07.018.
- Suryani EM, Gaffar A. 2024. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Susu Kuda Bima (*Equus sp.*) Yang Berpotensi Sebagai Probiotik. *Jurnal Ilmiah Biosaintropis (Bioscience-Tropic)*. 9(2).102-108. <https://doi.org/10.33474/e-jbst.v9i2.561>
- Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, Auclair E, Gancel F, Kempf I, Drider D. 2019. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*. 10:1-17. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00057.
- Williams NT. 2010. Probiotics. 67(6):449-458. *American Journal of Health-System Pharmacy*. DOI: 10.2146/ajhp090168.