

002975

BERKALA ILMU KEDOKTERAN (Journal of the Medical Sciences)

ISSN 0126 - 1312 CODEN: BIKEDW

Diterbitkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

Jilid XXI

Juni 1989

Nomor 2

Hepatotoksikosis Awal Keracunan Kronis Aflatoxin B₁

Pengaruhnya Terhadap Spektrum Lipid Plasma Dan Histologi

Oleh: Wiryatun Lestariana

Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada



ABSTRACT

Wiryatun Lestariana — *The earlier hepatotoxicosis of aflatoxin B₁ chronic toxicity, its affected on plasma lipid spectrum of rats*

Plasma lipid spectrum studied included total lipid plasma, plasma triglyceride, plasma phospholipid and plasma cholesterol concentration in rats.

Histologically earlier hepatotoxicosis showed hyperplasia and metaplasia, and metaplasia of bile duct epithelial cells.

The two groups of rats, the control group and the treatment group (each group comprised 10 rats), 3-month old, healthy, and 12 - 16 % haemoglobin concentration, were used as experimental animals.

All of them were fed and given water ad libitum, and 0.2 ml of propylen glycol per oral was also provided by sonde for 60 days. The treatment group was supplemented 10 µg of aflatoxin B₁ (AFB₁) diluted in 0.2 ml propylen glycol.

At the end of the treatment, histologically epithelial cells of bile duct showed extensive hyperplasia and metaplasia in rats supplemented with 10 µg AFB₁. The plasma lipid spectrum between the control group and the treatment group was:

plasma total lipid concentration ($X \pm 1$ SD): 496.0 \pm 12.61 mg/100 ml and 504.0 \pm 10.46 mg/100 ml, plasma triglyceride concentration ($X \pm 1$ SD) 93.4 \pm 14.83 mg/100 ml and 101.2 \pm 12.62 mg/100 ml, plasma phospholipid concentration ($X \pm 1$ SD) 9.3 \pm 4.21 mg/100 ml and 8.9 \pm 3.92 mg/100 ml, plasma cholesterol concentration ($X \pm 1$ SD) 106.9 \pm 17.56 mg/100 ml and 104.2 \pm 12.53 mg/100 ml. The analysis test showed that there were no significant differences between blood plasma parameter of the two groups ($p > 0.05$).

The result suggests that AFB₁ chronic toxicity on plasma lipid spectrum of rats is not proven despite the occurrence of earlier hepatotoxicosis.

Key Words: aflatoxin B₁ - hepatotoxicosis - bile duct epithelial cells - plasma lipid spectrum - rat

PENGANTAR

Aflatoksin adalah suatu mikotoksin yang sejak tahun 1960 sampai sekarang masih menjadi perhatian para ilmuwan, terutama ilmuwan negara-negara yang mempunyai iklim tropik seperti Indonesia. Iklim tropik ini memberi peluang yang cukup besar untuk tumbuhnya kapang *Aspergillus flavus* Link. *Aspergillus flavus* dapat tumbuh pada bahan makanan dan atau makanan pada suhu 20—30°C dengan kelembaban 75—85%. Dengan demikian faktor suhu dan kelembaban udara sekeliling dapat mempengaruhi pertumbuhan kapang tersebut (Spensley, 1963).

Berbagai macam aflatoksin telah ditemukan, yaitu aflatoksin: B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, B_{2a}, B_{2b}, GM₁, GM₂, Q₁, Q₂ dan B₃. Di antara sekian macam aflatoksin yang sangat berbahaya adalah aflatoksin B₁ (AFB₁) (Soekeni Soedigdo, 1984).

AFB₁ merupakan racun yang bersifat hepatotoksik, karsinogenik, dan diperkirakan sebagai senyawa penyebab hepatitis, hepatoma, sindrom Reye, kematian karena kerusakan hati serta gangguan kesehatan lain seperti kwashiorkor. Beberapa pengamatan epidemiologik dan penelitian yang dilakukan pada binatang menunjukkan bahwa AFB₁ jelas merupakan penyebab penyakit tersebut di atas, bahkan sasaran karsinogenitas oleh efek AFB₁ tidak hanya pada hepar, tetapi juga pada lambung, ginjal dan usus (Angsubhakorn *et al.*, 1981; Gross & Newberne, 1970; Newell, 1983; Peers, 1985; Peers *et al.*, 1976; Redricks *et al.*, 1977). AFB₁ dengan dosis rendah bila masuk ke dalam tubuh terus-menerus dalam jangka waktu lama dapat menimbulkan kanker hepar (Soekeni Soedigdo, 1984). Cepat atau lambat responsi toksisitas AFB₁ tergantung dari besar kecilnya dosis AFB₁ itu sendiri dan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti umur, jenis kelamin, galur dan pola makanan sehari-hari (Wogan, 1973).

Efek biokimiawi AFB₁ telah diteliti pada hewan percobaan yang diberi dosis tunggal AFB₁ dengan kadar tinggi. Hasil penelitian Gumbmann dan Williams (1969) menunjukkan bahwa pengaruh AFB₁ terhadap fungsi hepar menaikkan kandungan lipid hepar, mengakibatkan gangguan sintesis protein dan sangat menurunkan kadar vitamin A dalam hepar. Wogan (1973) melaporkan bahwa AFB₁ menekan replikasi DNA dan sintesis RNA. Gangguan replikasi tersebut disebabkan karena terjadinya hambatan pada RNA polimerase.

Hasil penelitian Daryono dan Widya Asmara (1986) dan Newberne dalam Duhne (1970) menunjukkan bahwa toksisitas awal keracunan kronis akibat aflatoksikosis pada tikus adalah terjadinya hiperplasi dan metaplasia pada sel-sel epitel pembuluh empedu.

Hepar adalah organ tubuh yang dapat memproduksi empedu yang diperlukan untuk memudahkan pencernaan dan absorpsi lipid. Empedu mengandung kolesterol dan garam-garam empedu yang disintesis didalam hepar. Dengan terjadinya hiperplasi dan metaplasia sel-sel epitel saluran empedu, maka keluarnya empedu melalui saluran tersebut kemungkinan akan terhambat hingga akan berakibat pencernaan dan absorpsi lipid terganggu, sehingga pola lipid darah terganggu juga.

Di Indonesia hasil penelitian menunjukkan bahwa pada bahan makanan dan hasil olahannya seperti kacang, oncom, beras, kentang, kemiri, bihun, mi-

nyak kelapa dan jamu-jamu telah terdeteksi AFB₁ (Endang Soeprapto, 1977; Haryono Adenan *et al.*, 1984; Muhilal, 1984; Muhilal *et al.*, 1971; Soekeni Soedigdo, 1984; Wiryatun Lestariana *et al.*, 1985). Haryono Adenan *et al.* (1984) dalam hasil penelitiannya menunjukkan adanya AFB₁ dalam serum orang normal, penderita hepatitis dan hepatoma, sedang Wiryatun Lestariana *et al.* (1985) menunjukkan adanya AFB₁ dalam urine beberapa pasien yang datang di Rumah Sakit DR. Sardjito, Yogyakarta, dengan berbagai macam keluhan.

Di Indonesia pemerintah belum menetapkan batas kadar AFB₁ yang diperbolehkan (dianggap tidak berbahaya) untuk bahan makanan yang beredar. Akan tetapi beberapa organisasi dunia telah menetapkannya, yaitu World Health Organization (WHO): 30 ppb; Food and Drug Administration (FDA) U. S. A.: 15 ppb, dan di Swedia: 5 ppb (Soekeni Soedigdo, 1984).

Dari uraian di atas timbul permasalahan bagaimana pola lipid plasma darah tikus pada hepatotoksik awal akibat keracunan kronis AFB₁.

Tujuan penelitian ini ialah untuk mengetahui apakah hasil pemeriksaan pola lipid plasma dapat digunakan untuk mendukung dalam diagnosis adanya hepatotoksikosis awal tanpa biopsi hepar. Pola lipid yang diperiksa adalah kadar lipid total, trigliserid, fosfolipid dan kolesterol plasma darah. Hepatotoksikosis awal ialah pada gambaran histologis hepar terlihat adanya hiperplasi dan metaplasia pada sel-sel epitel pembuluh empedu.

BAHAN DAN CARA KERJA

Hewan percobaan adalah tikus putih jantan jenis *Rattus*, umur \pm 3 bulan, tampak sehat dengan kadar hemoglobin 12 – 16 g%.

Jumlah tikus yang digunakan sebanyak 20 ekor, dibagi menjadi 2 kelompok (masing-masing 10 ekor), yaitu kelompok kontrol (K) dan kelompok pembandingan (P). Tikus pada P setiap hari diberi makanan dan minum (air) *ad libitum* serta 10 μ g AFB₁ yang telah dilarutkan dalam 0,2 ml propilen glikol yang diberikan per oral dengan sonde, sedang tikus pada K diperlakukan sama seperti P tetapi tanpa AFB₁. Propilen glikol adalah satu-satunya pelarut AFB₁ yang tidak mempunyai pengaruh negatif pada tubuh. Percobaan dilakukan selama 60 hari, karena pada penelitian pendahuluan, pemberian 10 μ g AFB₁ selama 60 hari sudah menunjukkan hepatotoksikosis awal.

AFB₁ yang digunakan diperoleh dari Maker Chemical L., Israel. Selama percobaan ransum yang dimakan tiap ekor tikus setiap hari ditimbang dan tiap tujuh hari sekali berat badan tiap-tiap tikus ditimbang untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh AFB₁ terhadap nafsu makan dan berat badan tiap-tiap tikus selama percobaan. Pada akhir percobaan tiap-tiap tikus dipuaskan \pm 10 jam, kemudian dipingsankan dengan eter, darah diambil untuk pemeriksaan pola lipid plasma dan heparnya ditimbang, selanjutnya dimasukkan dalam larutan formalin 10% untuk pemeriksaan histopatologik.

ANALISIS DATA

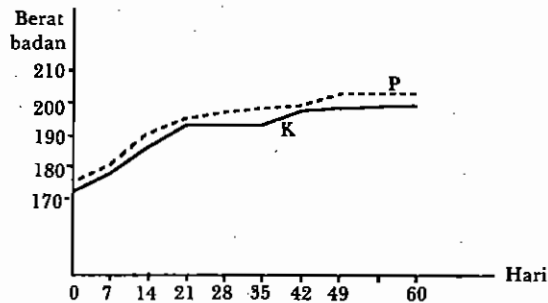
Data berat ransum yang dimakan setiap hari, tiap tujuh hari sekali dirata-rata, kemudian dianalisis dengan *t-test*, ada perbedaan atau tidak antara 2 kelompok K dan P. Data perkembangan berat badan, data kadar lipid total, tri-

gliserid, fosfolipid dan kolesterol plasma antara kedua kelompok tersebut dianalisis dengan *t-test*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berat badan dan berat ransum yang dimakan.

Perkembangan berat badan tikus kelompok K dan P selama percobaan 60 hari dapat dilihat pada GAMBAR 1 dan TABEL 1, dan jumlah ransum yang dimakan dapat dilihat pada GAMBAR 2.



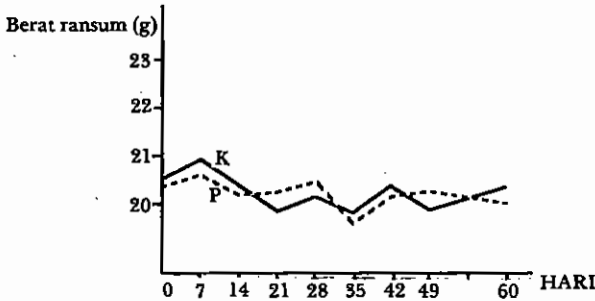
GAMBAR 1. — Grafik perkembangan berat badan tikus percobaan kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P) selama 60 hari.

TABEL 1. — Berat badan tikus kelompok K dan kelompok P selama percobaan 60 hari ($\bar{X} \pm 1 \text{ SD}$)

Hari Perlakuan ke	Berat Badan Kelompok (K) dalam gram	Berat Badan Kelompok (P) dalam gram
0	174,6 \pm 3,46	176,1 \pm 5,17
7	179,7 \pm 4,10	180,1 \pm 2,61
14	185,0 \pm 2,31	187,3 \pm 3,24
21	190,2 \pm 1,60	190,4 \pm 2,63
28	190,6 \pm 2,71	195,4 \pm 1,76
35	192,5 \pm 3,51	195,5 \pm 3,24
42	195,1 \pm 2,70	197,6 \pm 2,34
49	196,2 \pm 1,52	200,7 \pm 3,21
60	197,6 \pm 1,98	200,2 \pm 2,10

Pada GAMBAR 1 dan TABEL 1 ditunjukkan bahwa selama percobaan 60 hari baik kelompok K maupun P keduanya mengalami kenaikan berat badan dan pada GAMBAR 2 ditunjukkan bahwa ransum yang dimakan rata-rata perhari tidak sama (naik turun jumlahnya). Meskipun pada akhir percobaan berat badan kedua kelompok tersebut tidak sama, perbedaannya tidak nyata ($P > 0,05$); hal ini disebabkan antara lain karena jumlah ransum yang dimakan kedua kelompok tersebut setelah dianalisis dengan *t-test* juga tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Penyebab lain mungkin belum ada pengaruh

pemberian AFB₁ terhadap organ tubuh, sehingga fungsi organ tubuh dan proses metabolisme di dalam tubuh tetap normal. Dari hasil ini tampak bahwa pengaruh pemberian 10 µg AFB₁ perhari pada tikus percobaan selama 60 hari terhadap berat badan dan nafsu makan tidak tampak.



GAMBAR 2.— Grafik jumlah ransum rata-rata perhari yang dimakan tikus kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P) selama 60 hari.

BERAT HEPAR TIKUS

Berat hepar basah rata-rata tikus kelompok K dan P masing-masing ($X \pm 1$ SD): $7,007 \pm 0,969$ g dan $6,987 \pm 1,562$ g. Perbedaan berat tersebut setelah dianalisis dengan *t-test* tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$). Hal ini karena kemungkinan ada hubungannya dengan berat badan kedua kelompok tersebut yang tidak berbeda nyata atau mungkin karena pengaruh AFB₁ terhadap organ hepar tikus kelompok P belum ada, atau mungkin karena kedua-duanya, sehingga berat hepar tikus kedua kelompok tersebut menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna.

GAMBARAN HISTOLOGIK HEPAR TIKUS

Gambaran histologik hepar tikus kelompok kontrol menunjukkan gambaran normal tetapi kelompok perlakuan menunjukkan gambaran patologik, meskipun tingkat patologiknya tidak sama untuk tiap-tiap tikus pada kelompok P. Gambaran histopatologik hepar terlihat pada GAMBAR 4. Pada gambar tersebut ditunjukkan bahwa sel-sel epitel pembuluh empedu telah mengalami hiperplasi dan metaplasia. Hal ini sesuai dengan penelitian pendahuluan, yaitu pemberian 10 µg AFB₁ perhari selama 60 hari telah menunjukkan hepatotoksikosis awal. Daryono dan Widya Asmara (1986) serta Newberne dalam Duhne (1970) dalam penilaiannya menunjukkan bahwa asal keracunan kronis akibat AFB₁ ditandai dengan terjadinya hiperplasi dan metaplasia sel-sel epitel pembuluh darah.

Dengan demikian dari penelitian ini jelas ditunjukkan bahwa pemberian 10 µg AFB₁ selama 60 hari baru menunjukkan hepatotoksikosis awal, karena pada GAMBAR 4 juga terlihat sel-sel heparnya sendiri masih normal seperti GAMBAR 3 (gambaran histologis hepar tikus kelompok kontrol).



GAMBAR 3. -- Gambaran histologis hepar tikus kontrol (normal).
 a. saluran empedu
 b. sel-sel hepar pengecatan hematoksilin-eosin (H-E).



GAMBAR 4. -- Gambaran histologis hepar tikus yang mendapatkan 10 μ g AFB₁ selama 60 hari. Terlihat saluran empedu besar dengan hiperplasi dan metaplasia. Pengecatan H-E.

KADAR LIPID TOTAL PLASMA

Kadar lipid total plasma darah tikus rata-rata pada kelompok K dan P masing-masing ($X \pm 1$ SD) adalah: $496,0 \pm 12,61$ mg/100 ml dan $504,0 \pm 10,46$ mg/100 ml (TABEL 2). Dari hasil tersebut tampak bahwa kadar lipid total plasma kelompok P lebih tinggi dari K. Tetapi harga-harga tersebut setelah dianalisis ternyata tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Hasil ini membuktikan bahwa produksi dan pengeluaran empedu belum terganggu, se-

hingga pencernaan dan absorpsi senyawa lipid kelompok P masih normal, meskipun gambaran histologik heparinya telah menunjukkan histopatologi. Dengan demikian hasil pemeriksaan total lipid yang normal tidak selalu menjamin bahwa gambaran histologik hepar juga normal atau harga total lipid plasma tidak ada hubungannya dengan hepatotoksikosis awal.

KADAR TRIGLISERID, FOSFOLIPID DAN KOLESTEROL PLASMA DARAH

Kadar trigliserid plasma darah tikus rata-rata kelompok K dan P masing-masing ($X \pm 1$ SD) adalah: $93,4 \pm 14,83$ mg/100 ml dan $101,2 \pm 12,62$ mg/100 ml. Kadar fosfolipid plasma: $9,3 \pm 4,21$ mg/100 ml dan $8,9 \pm 3,92$ mg/100 ml, sedang kadar kolesterol plasma darah: $106,9 \pm 17,56$ mg/100 ml dan $104,2 \pm 12,53$ mg/100 ml.

TABEL 2. — Kadar lipid total, trigliserid, fosfolipid dan kolesterol plasma antara kelompok kontrol (K) dan kelompok pembanding selama 60 hari perbedaan ($X \pm 1$ SD).

No.	Jenis Kelompok Plasma	Kadar Lipid Total (mg/100 ml)	Kadar Trigliserid Plasma (mg/100 ml)	Kadar Fosfolipid Plasma (mg/100 ml)	Kadar Kolesterol Plasma (mg/100 ml)
1.	Kontrol (K)	$496,0 \pm 12,61$	$93,4 \pm 14,83$	$9,3 \pm 4,21$	$106,9 \pm 17,56$
2.	Pembanding (P)	$504,0 \pm 10,46$	$101,2 \pm 12,62$	$8,9 \pm 3,92$	$104,2 \pm 12,53$

Meskipun kedua kelompok menunjukkan harga-harga yang berbeda, setelah dianalisis tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Hasil ini juga membuktikan bahwa tikus dalam kelompok P pengelolaan senyawa-senyawa lipid dalam tubuhnya masih normal, meskipun gambaran histologis heparinya telah menunjukkan histopatologi atau mungkin disebabkan karena belum ada gangguan produksi atau pengeluaran empedu, telah terjadi hepatotoksikosis awal, yaitu terjadinya hiperplasi dan metaplasia sel-sel epitel pembuluh empedu. dengan demikian proses pencernaan dan absorpsi lipid tidak terganggu, sehingga pola lipid plasma masih normal. Dengan demikian hal ini juga membuktikan bahwa harga-harga trigliserid, fosfolipid dan kolesterol yang normal tidak selalu menjamin kondisi hepar dalam keadaan normal.

KESIMPULAN

Hasil-hasil di atas menunjukkan bahwa:

- Pemberian aflatoksin B₁ sebesar 10 µg perhari selama 60 hari jelas telah menunjukkan hepatotoksikosis awal, yaitu dengan terjadinya hiperplasi dan metaplasia sel-sel epitel pembuluh darah empedu.
- Kadar-kadar lipid total, trigliserid, fosfolipid dan kolesterol plasma darah tikus kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol ($P > 0,05$).

Berdasarkan data tersebut maka dapat diambil kesimpulan, bahwa spektrum lipid plasma darah tikus masih dalam keadaan normal, meskipun telah terjadi hepatotoksikosis awal akibat keracunan kronis aflatoksin B₁ atau spek-

trum lipid plasma darah yang normal tidak selalu menjamin kondisi hepar dalam keadaan normal, jadi hasil pemeriksaan spektrum lipid plasma tidak dapat digunakan untuk membantu diagnosis hepatotoksikosis awal.

KEPUSTAKAAN

- Angsubhakorn, S., Bhamarapravati, N., Romruen, K., & Sahaphong, S. 1981 Enhancing effects of dimethyl nitrosamine on aflatoxin B₁, hepatocarcinogenics in rats. *Int. J. Cancer* 28:621-8.
- Daryono & Widya Asmara 1986 *Laporan Penelitian DPPM* Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Duhne, H. W. 1970 *Disease of Swine*. ISU Press, Ames, Iowa.
- Endang Suprpto 1977 Aflatoxin dalam bahan makanan. *W. Standardisasi* 4:10-15.
- Fletcher, M. J. 1968 A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin. Chem. Acta* 22:393-397.
- Foster, C. B., & Dunn, R. T. 1974 Stable reagent for determination of serum triglycerides by a colorimetric Hanzch Concentration Method. *Clin. Chem.* 19(3):338-40.
- Gross, R. L., & Newberne, P. M. 1970 Naturally occurring toxic substances in foods. *Clin. Pharm. Ther.* 22:680-87.
- Gumbmann, M. R., & Williams, S. N. 1969 Biochemical effects of aflatoxin in pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15:393-404.
- Haryono Adenan, Tsuboi S., Kawamura Koji, Crus Mari L., Suliadi, H. W., & Haryono Soeharto 1984 Determination of AFB₁ in serum samples in liver disease patients and normal subjects in Yogyakarta. *ICMR Ann.* 4:167-73.
- Henry, R. J. 1964 *Clinical Chemistry Principles and Technics*. Harper and Row Publ., New York.
- Martin, D. W., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., & Granner, D. K. 1985 *Harper's Review of Biochemistry*, 20th ed. Lange Medical Publ., Maruzen Co., Ltd., Singapore.
- Muhilal 1984 Pencemaran aflatoxin pada kacang tanah. *Pros. Sem. Nas. Biokim. V*. Surakarta.
- Muhilal, Karyadi, & Prawironegoro 1971 Kadar aflatoxin dalam kacang tanah dan hasil olahannya. *Penelitian Gizi dan Makanan*, 1:87-93.
- Newell, Y. 1983 Treatment for starvation may kill. *New Scient.* 471.
- Pang, R. T. L., Husaini & Darwin Karyadi 1974 Aflatoxin and primary hepatic cancer in Indonesia. *5th World Congr. of Gastroenterol.*, Mexico.
- Peers, F. G. 1985 Aflatoxin in relation to the epidemiology of human liver cancer, *Med. Mycol.* 8: 279-89.
- _____, Gilman, G. A., & Linsell, C. A. 1976 Dietary aflatoxin and human liver cancer. A study in Swaziland. *Int. H. Cancer* 17:167-76.
- Redricks, J. V., Heseltine, C. W., & Mehlman, M. A. 1977 *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Pathotox Publ. Inc., Pasforests, South Ill.
- Spensley, P. C. 1963 Aflatoxin the active in turkey X disease. *Endeavour* 22:75-9.
- Soekeni Soedigdo 1984 Aflatoxin dalam makanan serta pengaruhnya terhadap kesehatan. *Ceramah Ilmiah FPMIPA IKIP*, Semarang.
- Wiryatun Lestariana, Sucipto, & Tsuboi, S. 1985, Detection of aflatoxin B₁ in urine samples of Indonesian subjects and foodstuffs by high performance chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *ICMR Ann.* 5:81-9.
- Wogan, G. N. 1973 Aflatoxin carcinogenesis. *Methods Cancer* 7:309.