

Pertumbuhan dan Perkembangan Otak Fetus Mencit Setelah Induksi Ochratoxin A Selama Periode Organogenesis

ARUM SETIAWAN*¹ MAMMED SAGI², WIDYA ASMARA³, DAN ISTRIYATI⁴

¹Jurusan Biologi Fakultas MIPA, Universitas Sriwijaya, Palembang

^{2,4}Laboratorium Embriologi dan Histologi Hewan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Diterima: tanggal 07 Februari 2013 - Disetujui: tanggal 20 Maret 2013

© 2013 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

ABSTRACT

This experiment was performed to examine the effects of Ochratoxin A (OTA) during organogenesis period on fetuses brain growth and development. Thirty pregnant mice were divided randomly into 5 groups of 6. Ochratoxin A was dissolved in sodium bicarbonate and administered orally on seventh to fourteenth days of gestation at dosage of 0.5, 1.0, 1.5 mg/kg bw, respectively. The remaining animals were used as an untreated control, and placebo were given by Sodium Bicarbonate. At the age of 18-day pregnancy, mice were sacrificed and taken its brains. The fetuses brain growth and development were observed by measure brain weight, cereberum width and length, cerebellum width and length, and the wall thichkness of cerebrum. Result of this studies indicated that OTA caused decreased of brain weight, the length and width of cerebrum and cerebellum, the wall thickness of cerebrum significantly.

Key words: Ochratoxin A, brain, cerebrum, cerebellum, mice.

PENDAHULUAN

Sistem saraf pusat merupakan sistem yang pertama kali dibentuk pada saat embriogenesis, serta merupakan sistem yang paling akhir selesai pembentukan dan perkembangannya. Perkembangan otak pada mencit dimulai dengan pembentukan lempeng neural dan alur neural yang terjadi pada umur kebuntingan (uk) 7 hari. Pada uk 14 hari otak sudah berbentuk utuh seperti induknya (Theiler, 1989). Menurut Wilson (1973), kepekaan fetus terhadap teratogen dimulai saat terbentuknya lapisan keping lembaga. Periode organogenesis pada mencit adalah umur ke-

buntingan (uk) 7-14 hari (Smith & Mangkoe-widojo, 1988).

Ochratoxin A (OTA) sebagai salah satu metabolit dari kelompok ochratoxin diketahui mempunyai sifat nefrotoksik, hepatotoksik, teratogenik dan imunotoksik pada beberapa spesies hewan. Selain itu, dapat menyebabkan tumor pada ginjal, hepar mencit dan tikus (Miraglia & Brera, 2002), juga bersifat neurotoksik (Ueta *et al.*, 2009). Baru-baru ini, dilaporkan bahwa perlakuan pralahir OTA menyebabkan mikrosefali dengan frekuensi tinggi pada tikus. Mikrosefali yang merupakan malformasi ini juga diinduksi dengan frekuensi yang sama dengan asupan *oral* OTA. OTA diketahui menimbulkan cacat tabung saraf (*Neural Tube Defects/NTDs*) pada embrio tikus (Ohta *et al.*, 2006; Ueta *et al.*, 2009). Penurunan jumlah sel Purkinje *cerebellum* otak mencit umur 21 hari terjadi setelah pendedahan

*Alamat Korespondensi:

Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Sriwijaya,
Palembang, Kampus Indralaya Ogan Ilir, Sumatera
Selatan 30662. e-mail: setiawan_unsri@yahoo.com

OTA selama periode organogenesis sehingga akan berpengaruh terhadap perilaku mencit neonatus (Setiawan *et al.*, 2011). Lebih lanjut, Setiawan *et al.*, (2012) menyebutkan bahwa OTA juga berpengaruh terhadap ketebalan zona pada kartilago epifisial os tibia dan menyebabkan terjadinya hambatan pertumbuhan skeleton fetus mencit.

Ochratoxin A mempunyai struktur kimia yang mirip dengan struktur asam amino fenilalanin (Phe) sehingga menyebabkan OTA dapat menghambat enzim yang menggunakan Phe seperti *Phe-tRNA synthetase*. Hal ini menyebabkan terjadinya penghambatan sintesis protein, disamping merangsang peroksidasi lemak (Marti, 2006). Beberapa penyakit *neurodegenerative* (misalnya Alzheimer dan penyakit Parkinson's) yang melibatkan proses apoptosis sel otak juga bisa disebabkan oleh paparan OTA (Shava *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2009). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh induksi OTA selama periode organogenesis terhadap pertumbuhan dan perkembangan otak fetus mencit.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Maret sampai Oktober 2011, bertempat di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM) dan Laboratorium Embriologi Histologi Hewan, Fakultas Biologi UGM, Yogyakarta.

Bahan, Alat dan Persiapan Hewan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ochratoxin A (Sigma Aldrich Co.), hewan uji yaitu 30 ekor mencit (*Mus musculus* L.) betina belum pernah bunting, umur 2 bulan, dengan berat 25–30 g dan 5 ekor mencit (*Mus musculus* L.) jantan dewasa fertil. Hewan uji diberi pakan berupa pellet *Par G*. Sodium bikarbonat dipergunakan sebagai pelarutnya. Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah buffer formalin untuk larutan fiksatif, alkohol 70 %, kapas dan chloroform. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang untuk

pemeliharaan hewan percobaan. S spuit injeksi ukuran 1 ml untuk pemberian perlakuan, satu set alat bedah untuk membedah hewan perlakuan, mikrometer, jangka sorong, timbangan digital dan alat fotomikrografi sebagai alat dokumentasi.

Sebelum penelitian ini dimulai, hewan percobaan disiapkan dan diperiksa siklus estrusnya dengan cara membuat preparat apus vagina. Setelah mendapatkan mencit yang memiliki siklus reguler sebanyak 30 ekor, dilakukan pembagian secara acak menjadi 5 kelompok, masing-masing 6 ekor tiap kelompok. Mencit betina yang berada dalam stadium estrus dikandangkan bersama-sama dengan mencit jantan untuk dikawinkan. Pencampuran mencit jantan dan mencit betina itu dilakukan pada sore hari dan apabila pada keesokan harinya ditemukan sumbat vagina (*vaginal plug*) atau sperma di dalam vagina, maka pada hari itu ditentukan sebagai hari pertama kebuntingan.

Perlakuan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan masing-masing 6 ulangan. Sebelum perlakuan terlebih dahulu ditentukan dosis perlakuan OTA. Tiga puluh ekor mencit betina bunting dikelompokkan menjadi 5 kelompok secara acak, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit. Dosis perlakuan untuk masing-masing kelompok adalah sebagai berikut:

Kontrol (akuades), tanpa dosis.

Kontrol Plasebo (diberi pelarut sodium bikarbonat).

Ochratoxin A Dosis 0,5 mg/kgbb/hari.

Ochratoxin A Dosis 1,0 mg/kgbb/hari.

Ochratoxin A Dosis 1,5 mg/kgbb/hari.

Perlakuan diberikan secara oral dengan volume 1 ml selama 8 hari berturut-turut secara oral, yaitu mulai hari ke-7 sampai dengan hari ke-14 kebuntingan.

Pengambilan Data dan Analisis

Pengamatan embrio dilakukan pada hari ke-18 kebuntingan dengan cara pembedahan bagian perut untuk mengeluarkan fetus dari uterus. Fetus dibersihkan dan diambil bagian kepala untuk

dilakukan pengambilan otak fetus. Otak fetus kemudian difiksasi dengan larutan buffer formalin selama 24 jam. Pengamatan terhadap pertumbuhan dan perkembangan otak meliputi pengamatan terhadap berat otak, panjang dan lebar *cerebrum*, panjang dan lebar *cerebellum* menggunakan metode Naruse dan Tsutsui (1989) serta ketebalan dari dinding *cerebrum* menggunakan metode Taylor (1986).

Data dianalisis secara varian dengan pola satu arah untuk rerata berat otak, panjang dan lebar *cerebrum*, panjang dan lebar *cerebellum*, serta ketebalan dinding *cerebrum*. Jika menunjukkan perbedaan yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Analisis data ini menggunakan program SPSS versi 16.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan terhadap otak fetus mencit uk 18 hari terlihat bahwa berat otak, panjang dan lebar *cerebrum*, panjang dan lebar *cerebellum*, tebal dinding *cerebrum* berbeda nyata pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol dan plasebo, dimana dosis yang paling berpengaruh sangat tinggi adalah dosis terbesar yaitu dosis 1,5 mg/kgbb dibandingkan dosis lainnya (Tabel 1; Gambar 1; Gambar 2; Gambar 3).

Gambar 3 terlihat bahwa bentuk otak fetus mencit uk 18 hari semakin kecil dengan bagian-bagian otak yang belum tampak jelas, seiring

dengan peningkatan dosis perlakuan OTA selama masa organogenesis, sehingga dapat dikatakan bahwa OTA mengganggu pertumbuhan dan perkembangan otak fetus mencit uk 18 hari. Untuk berat otak fetus dan lebar *cerebrum* otak fetus, pada dosis 0,5 mg/kgbb tidak berbeda nyata dengan kontrol dan plasebo, meskipun nilainya cenderung menurun. Hal ini berarti OTA sudah mulai mempengaruhi kedua parameter tersebut, sedangkan pada dosis 1,0 mg/kgbb dan 1,5 mg/kgbb sudah memberikan perbedaan yang nyata. Dari hasil analisis ANOVA dan uji lanjut DMRT menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis OTA yang diberikan akan semakin menurunkan ukuran parameter morfometri otak mencit fetus perlakuan. Hal ini berarti bahwa OTA yang diberikan pada induk mencit bunting selama masa organogenesis (uk 7-14 hari) akan mempengaruhi perkembangan otak fetus mencit.

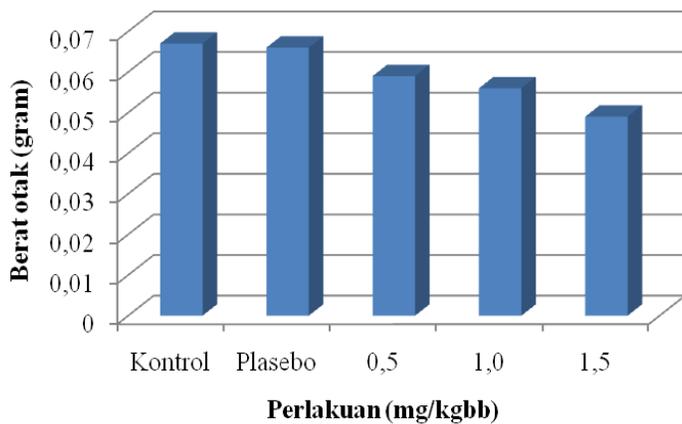
Untuk parameter panjang *cerebrum*, panjang dan lebar *cerebellum*, tebal dinding *cerebrum* berbeda nyata antara kontrol dan kontrol plasebo dengan perlakuan. Dari hasil analisis ANOVA dan uji lanjut DMRT dapat dilihat bahwa semakin tinggi dosis perlakuan OTA maka terjadi penurunan panjang *cerebrum*, panjang dan lebar *cerebellum*, serta tebal dinding *cerebrum* yang signifikan. OTA yang diberikan selama periode organogenesis mempengaruhi perkembangan otak fetus mencit.

Ochratoxin A yang diberikan pada induk mencit bunting selama masa organogenesis (pada

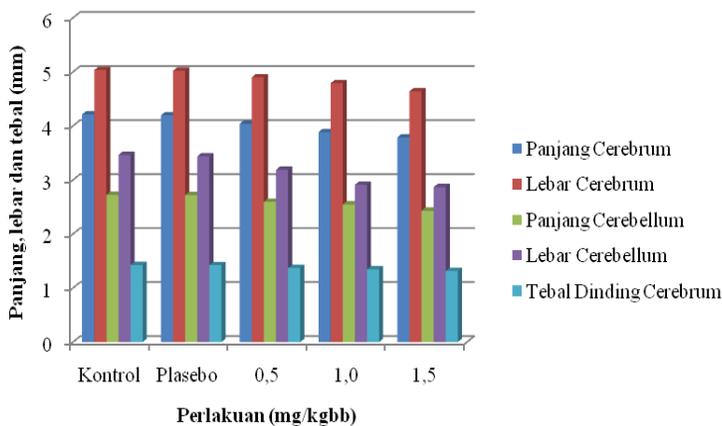
Tabel 1. Morfometri otak fetus mencit uk 18 hari setelah induksi OTA selama periode organogenesis.

Perlakuan (mg/kg bb)	Berat otak (g) $\bar{X}_i \pm SD$	Panjang <i>cerebrum</i> (mm) $\bar{X}_i \pm SD$	Lebar <i>cerebrum</i> (mm) $\bar{X}_i \pm SD$	Panjang <i>cerebellum</i> (mm) $\bar{X}_i \pm SD$	Lebar <i>cerebellum</i> (mm) $\bar{X}_i \pm SD$	Tebal dinding <i>cerebrum</i> (mm) $\bar{X}_i \pm SD$
Kontrol	0,067±0,016a	4,213±0,090a	5,033±0,176a	2,723±0,121a	3,463±0,236a	1,425±0,086a
Plasebo	0,066±0,011a	4,195±0,096a	5,021±0,179a	2,719±0,085a	3,437±0,169a	1,423±0,056a
0,5	0,059±0,006ab	4,040±0,084b	4,899±0,031ab	2,595±0,109b	3,189±0,217b	1,371±0,025b
1,0	0,056±0,007bc	3,885±0,120bc	4,789±0,063bc	2,545±0,103b	2,910±0,380c	1,346±0,036bc
1,5	0,049±0,012c	3,787±0,323c	4,639±0,375c	2,429±0,146c	2,868±0,282c	1,316±0,044c

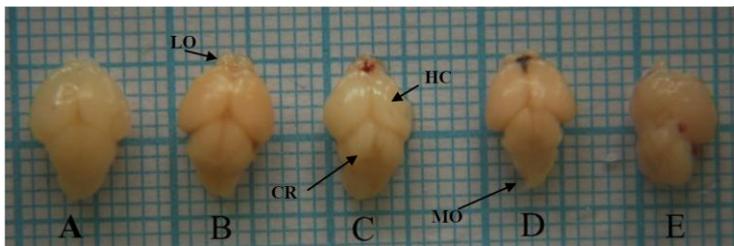
Ket.: angka diikuti huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak berbeda nyata.



Gambar 1. Histogram berat otak fetus mencit pada uk 18 hari.



Gambar 2. Histogram rerata panjang cerebrum (mm), lebar cerebrum (mm), panjang cerebellum (mm), lebar cerebellum (mm) dan tebal dinding cerebrum (mm) otak fetus mencit uk 18 hari setelah induksi OTA selama periode organogenesis.



Gambar 3. Bentuk otak fetus mencit uk 18 hari dilihat dari bagian dorsal. (A) Kontrol (B) plasebo (C) dosis 0,5 mg/kgbb (D) dosis 1,0 mg/kgbb (E) dosis 1,5 mg/kgbb, LO= Lobus olfactorius, HC= Hemisphaerium Cerebri, CR= Cerebellum, MO= Medulla Oblongata.

akan mempe-ngaruhi koordinasi motoris dan sensoris mencit tersebut.

Berkurangnya berat otak serta menurunnya ukuran panjang dan lebar cerebrum, panjang dan lebar cerebellum, serta tebal dinding cerebrum dapat disebabkan oleh berkurangnya jumlah sel penyusun otak akibat matinya sel neuroepitel selama neurulasi. Selain disebabkan oleh kematian sel, penurunan berat otak dan lebih kecilnya ukuran cerebrum, diduga disebabkan oleh berkurangnya jumlah sel yang berplori-ferasi dan berkurangnya protein karena karena terhambatnya sintesis DNA dan RNA. Hal ini sesuai dengan penelitian Marti (2006), yang menyebutkan bahwa struktur OTA yang mirip dengan struktur asam amino fenilalanin (Phe-) akan menyebabkan OTA menghambat enzim yang menggunakan Phe seperti Phe-tRNA synthetase sehingga menyebabkan terjadinya penghambatan sintesis protein, disamping merangsang peroksidasi lipid. Menurut Belmadani et al. (1998), pengurangan berat otak dan jumlah DNA terjadi karena adanya reduksi monoamin seperti dopamin, noradrenalin dan serotonin.

Gambar 3 nampak bahwa bentuk otak fetus mencit uk 18 hari semakin mengecil dan berat otak serta ukuran morfometri mengecil seiring dengan peningkatan dosis perlakuan OTA selama masa organogenesis, sehingga dapat dikatakan bahwa OTA menghambat pertumbuhan dan perkembangan otak fetus mencit. Proses pembentukan otak mulai terjadi pada uk 7 hari. Proses pembentukan otak ini dimulai dengan pembentukan otak depan, otak tengah dan otak belakang. Selanjutnya pada otak depan berdiferensiasi menjadi telensefalon. Cerebrum merupakan perpanjangan dari telensefalon. OTA yang bersifat neurotoksik dapat dengan mudah menembus barrier plasenta sehingga

uk 7-14 hari) mempengaruhi per-kembangan otak mencit sampai dewasa, sehingga diperkirakan

dapat mencapai fetus dan mempengaruhi perkembangannya. Pada masa awal perkembangan

otak, otak belum dibungkus oleh membran pelindung. Membran pelindung otak fetus dan bayi lebih permeabel untuk bahan kimia. Di dalam sel, asetaldehida dapat merusak fungsi protein, sehingga menyebabkan terjadinya kematian sel atau terganggunya pembelahan dan pertumbuhan sel (Bangalore, 2007). Selain disebabkan oleh kematian sel-sel neuroepitel, penurunan berat otak atau menurunnya ukuran *cerebrum*, diduga juga disebabkan oleh berkurangnya jumlah sel otak yang mampu berproliferasi atau berkurangnya protein akibat terhambatnya sintesis DNA dan RNA.

Penurunan sintesis protein yang disebabkan oleh adanya hambatan aktivitas enzim *Phe-tRNA synthetase* menyebabkan terjadinya penurunan metabolisme protein, yang berarti dapat menyebabkan penurunan kadar protein dan berkurangnya kemampuan otak karena asam amino yang ada di dalam otak sebagian besar disintesis menjadi protein dalam bentuk neurotransmitter. Protein merupakan makromolekul yang menyusun lebih dari setengah berat kering sel, sehingga kadar protein yang menurun pada otak menyebabkan terjadinya penurunan berat otak (Purvess *et al.*, 2001). OTA yang mempunyai berat molekul kecil (403,8 Da) mampu melewati barier plasenta, sehingga OTA menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan proliferasi sel pada pertumbuhan awal otak dan dapat berakibat kepada penurunan berat otak.

Kecenderungan penurunan berat otak ini juga disebabkan oleh adanya penurunan perkembangan fetus secara keseluruhan, seperti yang dapat dilihat pada penurunan berat badan fetus. Kelainan perkembangan otak, khususnya pada *cerebrum* berupa penipisan korteks *cerebrum* dan pelebaran ventrikel lateral *cerebrum* terutama karena pada uk 13 hari merupakan waktu perkembangan *cerebrum* yang sangat pesat, sehingga bila ada zat toksin yang masuk akan berpengaruh pada tahap perkembangan ini. OTA diduga mampu menyebabkan kematian sel neuron di bagian korteks sebelah luar sehingga dalam perjalanan perkembangan otak, pemulihan dari proses kematian sel atau kerusakan jaringan tersebut tidak sempurna. Hal ini karena OTA atau metabolitnya masuk dalam sirkulasi darah dan

cairan otak melalui selaput otak. Pada umumnya kerusakan jaringan otak atau kematian sel neuron akan menyebabkan perangsangan terhadap sel astrosit sehingga mengalami proliferasi dan menggantikan daerah yang rusak. Proses ini disebut dengan gliosis atau penggantian sel neuron dengan sel glial astrosit (Gondona *et al.*, 1996; Darmanto *et al.*, 2004).

Secara umum, hasil penelitian dapat dilihat bahwa pemberian OTA selama periode organogenesis yang dimulai pada awal pembentukan *neural tube* (uk 7 hari) sampai awal pembentukan *cerebellum* (uk 14 hari) mampu menyebabkan penyimpangan perkembangan otak fetus mencit uk 18 hari. Penyimpangan ini berupa penurunan berat otak, penurunan panjang dan lebar *cerebrum*, penurunan panjang dan lebar *cerebellum*, serta penipisan tebal dinding *cerebrum*.

KESIMPULAN

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa OTA yang diberikan pada induk mencit bunting selama periode organogenesis menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan perkembangan otak fetus uk 18 hari. Hambatan pertumbuhan otak terjadi seiring dengan semakin tingginya dosis OTA yang diberikan. Pada perlakuan tidak ditemukan adanya *hidrocephalus internal*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada DP2M Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, dan Lembaga Penelitian Universitas Sriwijaya atas bantuan dan kerjasamanya sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bangalore, L. 2007. *Brain development*. Chelsea House Publisher. USA. p: 110.
Belmadani A., G. Tramu, A.M. Betbeder and E.E. Creppy. 1998. Subchronic effects of ochratoxin A on young adult

- rat brain and partial prevention by aspartame, a sweetener. *Hum. Exp. Toxicol.* 17: 380-386.
- Darmanto W., E. Prihiyantoro dan R. Harmonis. 2004. Induksi 2-Methoxyethanol pada masa prenatal sebagai penyebab kelainan otak pada mencit. *Ber. Pen. Hay.*, 10: 1-5.
- Gondona J.M., M.P. Martin and M. Cifuentes. 1996. Epyndemal denudation, aqueductal obliteration and hydrocephalus after a single injection of neuroaminidase into the lateral ventricle of adults rats. *J. Neurophat. Exp. Neurol.* 55: 999-1008.
- Marti N.B. 2006. Ochratoxin A and ochratoxigenic moduls in grapes, must and wine, ecophysiological study, tesis doctoral Universitat de Lleida Spain, from URL: http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UdL/AVAILABLE/TDX_0406107172700/Tbmn10de18.pdf. 10 Juni 2007.
- Miraglia M. and C. Brera. 2002. *Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A by the Population of EU Member States*. Directorate General Health and Consumer Product, Rome, Italy.
- Naruse I. and Y. Tsutsui. 1989. Brain abnormalities induced by murine cytomegalovirus injected into the cerebral ventricles of mouse embryos exo utero. *Teratol.* 40: 181-189.
- Ohta, K., M. Maekawa, R. Katagiri, E. Ueta and I. Naruse. 2006. Genetic susceptibility in the neural tube defects induced by Ochratoxin A in the genetic archiencephaly mouse, Pdn/Pdn. *Congen. Anom. Kyo.* 46:144-148.
- Purvess D., G.J. Augustine, D. Fitzpatrick, L.C. Katz, A.S. Lamantia, J.O. McNamara and S.M. William. 2001. *Neuroscience* 2nd ed., Sinauer Associates Inc. Massachusetts. 409-426.
- Sava V., O. Reunova, A. Velasques, R. Harbison and J. Sanchez-Ramos. 2006. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite Ochratoxin A. *Neuro. Toxicol.* 27:82-92.
- Setiawan, A., M. Sagi, W. Asmara dan Istriyati. 2011. Analisis kuantitatif sel purkinje *cerebellum* mencit (*Mus musculus* L.) Swiss Webster setelah induksi ochratoxin A selama periode organogenesis. *J. Biota.* 16(2): 262-268.
- Setiawan, A., M. Sagi, W. Asmara dan Istriyati. 2012. Analisis pertumbuhan kartilago epifisialis *Os Tibia* fetus mencit (*Mus musculus* L.) Swiss Webster setelah induksi Ochratoxin A selama periode organogenesis. *J. Biol. Papua* 4(1): 25-31.
- Smith J.N., dan S. Mangkoewidojo. 1988. Pemeliharaan, pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis. UI press. Jakarta. p: 356.
- Taylor P. 1986. *Practical teratology*. Academic Press Inc. London. p: 265.
- Theiler K., 1989, *The house mouse : atlas of embryonic development*. Springer-Verlag, New York. pp: 26-53.
- Ueta, E., M. Kodama, Y. Sumino, M. Kurome, K. Ohta, R. Katagiri and I. Naruse. 2009. Gender-dependent differences in the incidence of ochratoxin A-induced neural tube defects in Pdn/Pdn mouse, *Con.Anom.* Manuscript ID:CGA-08-2009-043.R2.
- Wilson J.G. 1973. *Environment and birth defects*. Academic Press, New York. pp: 92-94.
- Zhang X., C. Boesch-Saadatmandi, Y. Lou, S. Wolfram, P. Huebbe and G. Rimbach. 2009. Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. *Genes. Nutr.* 4: 41-48.