

# Efek perlakuan rubratoksin B pada tahap praimplantasi terhadap perkembangan embrio praimplantasi dan fetus mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster

Ramadhan Sumarmin\*, Tien W. Surjono\*\*, dan Sri Sudarwati\*\*

\*Jurusan Biologi, IKIP Padang

\*\*Jurusan Biologi, FMIPA, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa 10 Bandung, 40132

Masuk: 3 Agustus 1999; revisi masuk: 25 Desember 1999; diterima: 29 Desember 1999

## Sari

Rubratoksin B adalah metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Penicillium rubrum* dan *Penicillium purpurogenum*, yaitu kapang yang acapkali terdapat sebagai pencemar sereal, terutama pada bahan makanan dan pakan ternak. Rubratoksin B dosis tunggal 0,8 dan 0,9 mg/kg berat badan diberikan secara intraperitoneal pada mencit Swiss Webster umur kebuntingan 0 hari atau 2 hari (tahap praimplantasi). Mencit kontrol hanya diberi propilen glikol sebagai pelarut rubratoksin B. Efek perlakuan terhadap perkembangan embrio praimplantasi diamati pada umur kebuntingan 3,5 hari, sedangkan terhadap fetus pada umur kebuntingan 18 hari. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa perkembangan embrio praimplantasi terhambat, ditandai oleh berkurangnya jumlah blastosista akhir dan jumlah sel penyusunnya, serta masih adanya tahap perkembangan awal. Pada tahap pascaimplantasi tampak bahwa jumlah implantasi dan jumlah fetus hidup menurun, kematian intrauterus meningkat, dan muncul kelainan berupa langit-langit bercelah pada fetus. Secara umum, hasil pengamatan yang diperoleh berbeda nyata dari kontrol dan sejalan dengan besarnya dosis rubratoksin B yang diberikan. Pada perlakuan umur kebuntingan 0 hari, embrio lebih banyak terhambat pada tahap 1-8 sel dan morula tidak mampu, sedangkan pada perlakuan umur kebuntingan 2 hari terjadi pergeseran hambatan ke tahap yang lebih tua, terutama pada morula mampu. Terbukti bahwa perlakuan rubratoksin B pada tahap praimplantasi menghambat perkembangan embrio praimplantasi yang mengakibatkan penurunan jumlah implantasi dan jumlah fetus hidup, serta mampu memunculkan kelainan perkembangan pada fetus.

**Kata kunci:** efek rubratoksin B; embrio; fetus; malformasi; mencit; perlakuan tahap praimplantasi.

## Abstract

### Effects of preimplantation treatments of rubratoxin B on the development of preimplantation embryos and fetuses of Swiss Webster mouse (*Mus musculus*)

Rubratoxin B is a secondary metabolite of *Penicillium rubrum* and *Penicillium purpurogenum*, which moulds are often contaminating cereals, particularly food and feed. Single dosages of rubratoxin B 0.8 and 0.9 mg/kg body weight were administered intraperitoneally to Swiss Webster mice on day 0 or day 2 of gestation (preimplantation stage). Control mice were given propylene glycol only as rubratoxin B solvent. The effects of those treatments on preimplantation embryos were observed on gestation day 3.5, whereas those on fetuses were observed on day 18 of gestation. The results revealed that the development of preimplantation embryos was inhibited, shown by the decreased number of late blastocysts and the presence of earlier developmental stages. In the postimplantation stage these occurred: reduction in the number of implantation sites and live fetuses, increased intrauterine death, and cleft palate in the fetuses. In general, the results of the parameters obtained differed significantly compared to the controls and were dose related. In the treatment on gestation day 0, most of the preimplantation developmental delays occurred at earlier stages, i.e. 1-8 cells stage and uncompact morulae, whereas in the groups treated on gestation day 2 inhibition shifted to older stages, predominantly at compacted morulae. It is concluded that preimplantation treatments of rubratoxin B inhibit the preimplantation development of the embryos, and consequently decrease the number of implantation sites, as well as the number of live fetuses, and is able to induce fetal malformation.

**Key words:** effects of rubratoxin B; embryos; fetuses; malformation; mouse; preimplantation treatment

## 1 Pendahuluan

Rubratoksin B adalah suatu mikotoksin yang merupakan metabolit sekunder dari *Penicillium rubrum* dan *Penicillium purpurogenum*. Kedua jenis kapang ini acapkali tumbuh dan mencemari biji-bijian dan sereal,

yang merupakan bahan makanan dan pakan ternak, misalnya jagung, kacang, biji bunga matahari, gandum, dan beras, yang tersimpan dalam ruangan berkelembaban tinggi. Selain terdapat di alam, rubratoksin B dapat diproduksi di laboratorium bila kedua jenis kapang itu dikultur pada suhu 25°C selama tiga minggu, dalam

medium khusus yang mengandung gandum serta ragi, dan selanjutnya diisolasi [3].

Efek rubratoksin B terhadap hewan, terutama unggas dan ternak, telah banyak dilaporkan. Pemberian pakan yang terkontaminasi oleh *P. rubrum* kepada unggas, ternak, babi, kuda, dan mencit terbukti menimbulkan berbagai efek patologis, terutama berupa kerusakan hati dan ginjal [10]. Perlakuan serupa pada kuda menyebabkan perdarahan lambung dan usus halus, kerusakan jaringan otak, serta inkoordinasi sistem saraf pusat [22].

Terhadap hewan percobaan, rubratoksin B dapat memunculkan efek teratogenik berupa berbagai malformasi pada fetus. Kemunculan malformasi itu tergantung pada besarnya dosis rubratoksin B yang diberikan dan umur kebuntingan induk saat mendapat perlakuan. Beberapa kelainan yang sering didapat bila rubratoksin B diberikan pada tahap organogenesis ialah eksensefali, kelainan pina, kelainan rahang, hernia umbilikalis (omfalosel), dan mata terbuka [5,7,20].

Rubratoksin B merupakan embrosida yang efeknya lebih parah bila diberikan pada awal kebuntingan, dibandingkan dengan pada umur kebuntingan yang lebih lanjut [7,20]. Pemberian rubratoksin B pada umur kebuntingan awal juga menimbulkan kelainan rangka yang sangat nyata pada fetus mencit [20].

Efek perlakuan rubratoksin B pada tahap organogenesis terhadap perkembangan pralahir telah banyak dilaporkan, bahkan pengaruhnya terhadap perkembangan pascalahir atau perilaku pun sudah diteliti [19]. Hasilnya menunjukkan adanya berbagai kelainan eksternal, internal, rangka, dan penyimpangan perilaku. Sejauh ini belum ada laporan mengenai pengaruh perlakuan rubratoksin B pada tahap praimplantasi terhadap perkembangan embrio praimplantasi dan fetus.

Russel dan Russel [13] menyatakan bahwa suatu teratogen yang bekerja pada embrio tahap praimplantasi (zigot, pembelahan, blastosista) atau tahap praorganogenesis akan menyebabkan embrio itu mati atau tumbuh normal (hukum all or nothing), tergantung pada derajat kerusakan yang dialaminya. Namun, beberapa teratogen seperti siklofosfamida [18], akrilamida [11], etilnitrosourea [12], dan adriamisin [14] dapat menimbulkan kelainan perkembangan pada fetus bila diberikan pada tahap praimplantasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai efek rubratoksin B, yang diberikan pada tahap praimplantasi, terhadap perkembangan embrio praimplantasi termasuk jumlah sel penyusun blastosista, terhadap penampilan reproduksi induk, serta kemunculan kelainan perkembangan pada fetus.

## 2 Bahan dan cara kerja

### 2.1 Bahan

Hewan percobaan yang digunakan ialah mencit Swiss Webster yang diperoleh dari Jurusan Farmasi-ITB.

Pemeliharaan dilakukan di Rumah Hewan Jurusan Biologi-ITB, dalam ruangan yang diberi penerangan listrik selama 12 jam (pukul 06.00 – 18.00). Suhu ruangan rata-rata selama pemeliharaan ialah minimum 22,86° C dan maksimum 26,83° C, dan rata-rata kelembaban relatif 84,78 %. Pakan butiran (CP551, PT Charoen Pokphand Indonesia) dan air minum berupa air ledeng diberikan secara *ad libitum*.

Bahan yang diuji adalah rubratoksin B produksi Makor Chemical Ltd., Jerusalem.

### 2.2 Cara kerja

Mencit betina dewasa dara (umur 8-10 minggu), dengan berat badan 25-30 gram, pada saat estrus dikawinkan (1:1) dengan mencit jantan umur 12-14 minggu pada sore hari. Kecokan paginya mencit yang bersumbat vagina dinyatakan bunting 0 hari. Selanjutnya, mencit bunting dikelompokkan menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Pada umur kebuntingan 0 atau 2 hari, mencit perlakuan disuntik secara intraperitoneal dengan rubratoksin B yang dilarutkan dalam propilen glikol dalam akuabidestilata (1:1 v/v). Dosis yang diberikan adalah dosis tunggal 0,8 dan 0,9 mg/kg berat badan (b.b.) dengan volume penyuntikan 0,1 ml/10 g b.b. Pada umur kebuntingan yang sama dengan kelompok perlakuan, mencit kontrol diberi pelarut rubratoksin B dengan volume dan cara penyuntikan yang sama.

Penelitian terdiri atas dua percobaan:

1 Untuk melihat efek rubratoksin B terhadap perkembangan embrio praimplantasi dan jumlah sel penyusun blastosista akhir.

Induk mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher pada umur kebuntingan 3,5 hari. Uterus, oviduk, dan ovarium dikeluarkan dari rongga abdomen. Setelah dipisahkan dari ovarium, uterus dan oviduk dibilas (flushed) dengan larutan Hanks menggunakan jarum ukuran 30 G yang ditumpulkan dan dipasang pada syringe tuberkulin. Ovarium diamati untuk penghitungan korpus luteum. Selanjutnya, embrio yang diperoleh dikelompokkan menurut Setiorini *et al.* [17] dengan beberapa modifikasi, yaitu:

- a embrio yang mengalami kelambatan perkembangan atau belum mencapai tahap blastosista akhir (1-8 sel); morula tidak mampat; blastosista awal; dan blastosista sedang),
- b embrio tahap blastosista akhir, dan
- c embrio yang mengalami kelainan perkembangan (abnormal). Selanjutnya, terhadap blastosista akhir dilakukan metode pewarnaan kromosom menurut Tarkowski [21] dengan beberapa modifikasi, untuk penghitungan jumlah sel penyusunnya.

2 Untuk mengetahui penampilan reproduksi induk dan kelainan perkembangan pada fetus.

Induk mencit dibunuh pada umur kebuntingan 18 hari, kemudian dilakukan pengamatan dan analisis terhadap jumlah implantasi, kehilangan praimplantasi, jumlah fetus hidup, kematian intrauterus (fetus mati dan embrio yang diresorpsi), dan berat badan fetus. Fetus yang mengalami kelainan perkembangan dan jenis kelainan yang muncul diamati dan dianalisis pula .

Analisis data parametrik dilakukan dengan uji sidik ragam yang dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT). Data nonparametrik diuji dengan Wilcoxon's rank sum test. Derajat signifikansi ditentukan pada  $p < 0,05$  (nyata) dan  $p < 0,01$  (sangat nyata). Data dianalisis atas dasar unit anakan (litter unit), yang berarti bahwa semua nilai purata yang dicantumkan dalam hasil pengamatan adalah purata dari purata tiap anakan (mean of the litter mean).

3 Hasil dan pembahasan

Dari Tabel 1 dapat dibaca bahwa rubratoksin B dosis 0,8 dan 0,9 mg/kg b.b. yang diberikan secara intraperitoneal pada tahap praimplantasi umur kebuntingan 0 atau 2 hari telah menghambat dan menyebabkan kelainan perkembangan embrio praimplantasi. Hambatan perkembangan ditandai dengan berkurangnya jumlah embrio yang berhasil mencapai tahap blastosista akhir, sehingga masih terdapat embrio tahap 1-8 sel, morula tidak mampat, morula mampat, blastosista awal, dan blastosista sedang. Pada umur 3,5 hari, seharusnya sebagian besar dari embrio sudah mencapai tahap

blastosista akhir [16]. Pada penelitian ini sekitar 50% atau lebih embrio kontrol telah berada di tahap blastosista akhir, sedangkan embrio perlakuan hanya 11,97% - 29,35%. Persentase blastosista akhir menurun secara sangat nyata dari kontrol pada semua kelompok perlakuan, terutama pada kelompok perlakuan umur kebuntingan 2 hari dengan dosis 0,9 mg/kg b.b., serta sejalan dengan besarnya dosis rubratoksin B yang diberikan, untuk semua kelompok perlakuan.

Embrio tahap 1-8 sel ditemukan pada perlakuan umur kebuntingan 0 hari dengan dosis 0,8 mg/kg b.b. dan persentase keberadaannya sangat nyata dari kontrol. Pada kelompok kontrol sudah tidak ada lagi embrio tahap 1-8 sel, demikian pula pada semua kelompok perlakuan lainnya.

Morula tidak mampat masih terdapat secara sangat nyata hampir pada semua kelompok perlakuan, terutama pada perlakuan umur kebuntingan 0 hari. Pada perlakuan umur kebuntingan 2 hari, embrio tahap ini hanya terdapat pada dosis tertinggi saja. Hambatan yang terjadi pada tahap morula mampat paling banyak dan sangat nyata didapat pada perlakuan umur kebuntingan 2 hari, sedangkan pada perlakuan umur kebuntingan 0 hari, meskipun pada dosis 0,8 mg/kg b.b. secara nyata lebih tinggi dari kontrol, namun kemunculannya rendah seperti juga halnya pada kontrol. Hal ini terjadi karena pada saat perlakuan di umur kebuntingan 0 hari, embrio masih berada pada tahap satu sel, sedangkan pada umur kebuntingan 2 hari sudah mencapai tahap 8-16 sel atau tahap morula [16]. Oleh karena itu, hambatan perkembangan pada perlakuan umur 2 hari terjadi pada tahap yang lebih tua daripada bila perlakuan diberikan pada umur kebuntingan 0 hari.

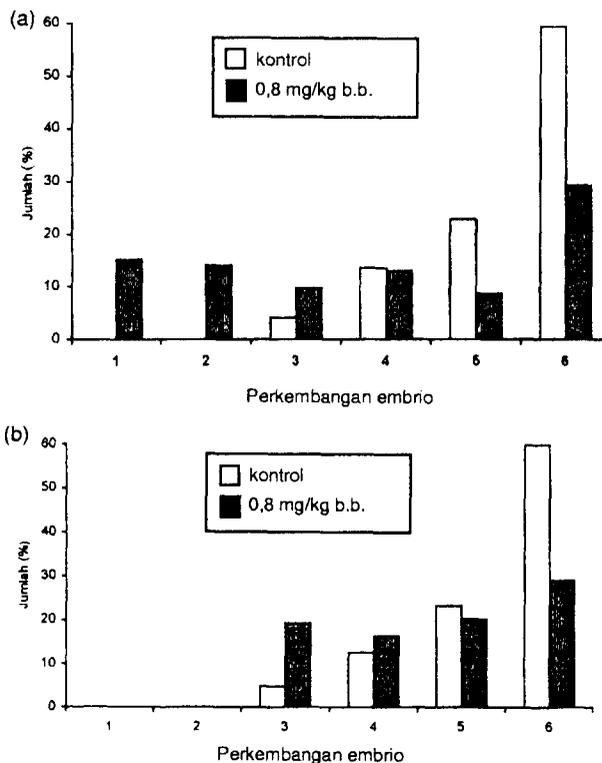
Tabel 1 Keadaan perkembangan embrio praimplantasi yang diamati pada umur kebuntingan 3,5 hari dari induk mencit yang diberi perlakuan rubratoksin B pada umur kebuntingan nol atau dua hari

Umur kebuntingan saat perlakuan (hari)	Dosis (mg/kg b.b.)	Jumlah induk	Purata persentase embrio yang mengalami hambatan perkembangan, blastosista akhir dan embrio abnormal (jumlah)									Purata persentase zona pelusida tanpa embrio (jumlah)
			Embrio yang terhambat perkembangannya pada tahap					Blastosista akhir	Embrio abnormal			
			1-8 sel	Morula		Blastosista			Tanpa zona pelusida	Berdegenerasi	Total	
				Tidak mampat	Mampat	Awal	Sedang					
0	0 (kontrol)	8	0	0	4,17 (4)	13,54 (13)	22,92 (22)	59,37 (57)	0	0	0	0
	0,8	8	15,3** (14)	14,13** (13)	9,78* (9)	13,04 (12)	8,69** (8)	29,35** (27)	5,44* (5)	2,17 (2)	7,61* (7)	2,17 (2)
	0 (kontrol)	8	0	0	8,26 (10)	20,66 (25)	24,79 (30)	44,64 (54)	1,65 (2)	0	1,65 (2)	0
	0,9	8	0	10,17** (12)	7,63 (9)	11,86* (14)	16,95* (20)	22,03** (26)	11,02** (13)	20,34** (24)	31,36** (37)	0
2	0 (kontrol)	8	0	0	4,80 (5)	12,5 (13)	23,08 (24)	59,62 (62)	0	0	0	0
	0,8	8	0	0	19,23** (20)	16,23 (17)	20,19 (21)	28,85** (30)	13,64** (14)	1,92 (2)	15,38** (16)	0
	0 (kontrol)	8	0	0	8,26 (10)	18,18 (22)	23,97 (29)	49,59 (60)	0	0	0	0
	0,9	8	0	8,55** (10)	21,37** (25)	3,42** (4)	4,27** (5)	11,97** (14)	10,26** (47)	40,17 (47)	50,43** (59)	0

\* : berbeda nyata dari kontrol pada  $p < 0,05$  \*\* : berbeda sangat nyata dari kontrol pada  $p < 0,01$  (Wilcoxon's rank sum test)

Persentase blastosista awal dan blastosista sedang pada kelompok perlakuan, terutama pada perlakuan umur kebuntingan 2 hari dosis 0,9 mg/kg b.b. (3,42% blastosista awal dan 4,27% blastosista sedang), umumnya lebih rendah dan berbeda nyata hingga sangat nyata dari kontrol (12,5% sampai 24,79%). Lebih rendahnya persentase ini disebabkan oleh banyaknya embrio yang perkembangannya terhambat pada tahap-tahap sebelumnya, terutama pada tahap morula mampat.

Pola hambatan perkembangan pada perlakuan umur kebuntingan 0 hari atau 2 hari, dan terjadinya pergeseran hambatan ke arah tahap perkembangan yang lebih tua pada perlakuan umur kebuntingan 2 hari, ditunjukkan pada Gambar 1, yaitu pada perlakuan dosis 0,8 mg/kg b.b. Pola hambatan perkembangan yang didapat sesuai dengan hasil pengamatan beberapa peneliti terdahulu yang menggunakan teratogen yang lain pada mencit Kud; ddy dan ICR [6,13,17].



Keterangan : Perkembangan embrio tahap :

- 1 : 1- 8 sel
- 2 : Morula tidak mampat
- 3 : Morula mampat
- 4 : Blastosista awal
- 5 : Blastosista sedang
- 6 : Blastosista akhir

Pola hambatan perkembangan embrio praimplantasi pada perlakuan rubratoksin (b) dosis tunggal 0,8 mg/kg b.b. yang diberikan secara intraperitoneal pada mencit umur kebuntingan 0 hari (a) dan 2 hari (b) serta pergeseran hambatan ke tahap perkembangan yang lebih tua pada perlakuan umur kebuntingan 2 hari (b)

Selain menghambat perkembangan embrio praimplantasi, rubratoksin B juga mengakibatkan terdapatnya embrio abnormal, yang pada kelompok kontrol tidak pernah muncul. Embrio abnormal yang paling banyak ditemukan dan kejadiannya sangat nyata adalah embrio yang berdegenerasi, pada perlakuan dengan dosis tertinggi yang diberikan pada umur kebuntingan 0 hari dan terutama pada perlakuan umur kebuntingan 2 hari. Perlakuan dengan dosis 0,9 mg/kg b.b. memunculkan 31,36% embrio abnormal pada umur kebuntingan 0 hari, dan 50,43% pada perlakuan umur kebuntingan 2 hari. Selain itu, ditemukan pula embrio tanpa zona pelusida yang menyebar pada semua kelompok perlakuan, dan pada umumnya sangat nyata lebih banyak dari kontrol. Terdapatnya zona pelusida tanpa embrio, yang muncul hanya pada perlakuan umur kebuntingan 0 hari dengan dosis 0,8 mg/kg b.b., tidak dianggap sebagai kelainan, melainkan sebagai embrio yang terlalu cepat menetas. Hal ini berbeda dengan laporan penelitian Setiorini *et al.* [17] yang menganggap zona pelusida tanpa embrio sebagai suatu kelainan. Embrio abnormal yang didapat dalam penelitian ini serupa dengan hasil yang dilaporkan oleh sejumlah peneliti terdahulu yang menggunakan teratogen yang berbeda dan mencit galur lain [1,6].

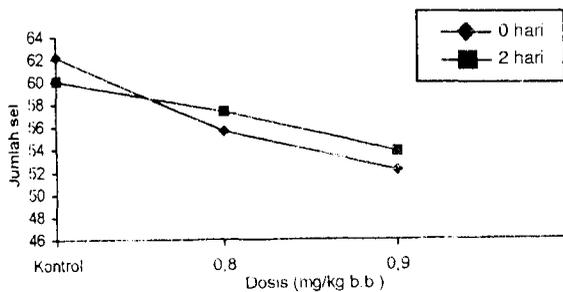
Meningkatnya persentase embrio yang terhambat dan abnormal perkembangannya dapat secara langsung disebabkan oleh rubratoksin B yang masuk ke dalam cairan di dalam rongga uterus atau oviduk, melalui sekret kelenjar, lalu masuk ke dalam blastosista. Hal ini didasarkan pada laporan Kulangara & Crutchfield [8] yang menyatakan bahwa ion dan molekul kecil yang disuntikkan kepada induk mencit bunting ternyata dapat ditemukan di dalam rongga oviduk, uterus, dan cairan blastosista. Bahkan, molekul besar seperti protein pun, yang diberikan kepada induk, dapat ditemukan pada embrio mencit di oviduk dan di dalam blastosista kelinci. Oleh karena nutrisi embrio tahap praimplantasi bergantung pada sekret kelenjar oviduk dan uterus, maka perkembangan embrio dapat terganggu oleh adanya rubratoksin B di dalam bahan nutrisi embrio itu. Selain itu, menurut Fabro & Sieber [15] senyawa dengan berat molekul 17000 dapat masuk ke dalam blastosista, sehingga rubratoksin B yang memiliki berat molekul 518 sangat besar kemungkinannya dapat masuk ke dalam blastosista yang antara lain akan menghambat pembelahan sel embrio. Hambatan perkembangan itu dapat juga merupakan akibat tidak langsung dari rubratoksin B karena adanya gangguan fisiologis induk, sebab rubratoksin B dilaporkan juga dapat merusak hati dan ginjal, serta dapat mengganggu siklus Krebs di dalam tubuh dan juga mengakibatkan disagregasi polisom [3,4].

Hasil penghitungan jumlah sel yang menyusun blastosista akhir menunjukkan penurunan secara nyata dari kontrol pada semua kelompok perlakuan dan juga antarperlakuan, serta sejalan dengan besarnya dosis yang diberikan (Tabel 2). Pada Gambar 2 tampak bahwa

**Tabel 2** Jumlah sel yang menyusun blastosista akhir pada perlakuan rubratoksin B umur kebuntingan nol atau dua hari yang diamati pada umur kebuntingan 3,5 hari

Umur kebuntingan saat perlakuan (hari)	Dosis (mg/kg b.b.)	Jumlah induk yang diamati	Kisaran jumlah blastosista akhir tiap induk	Jumlah blastosista yang diamati	Rata-rata jumlah sel blastosista akhir
0	0 (kontrol)	8	4 - 8	42	62,23 ± 3,03 a
	0,8	8	2 - 6	28	55,64 ± 3,50 b
	0,9	8	1 - 4	16	52,13 ± 2,64 c
2	0 (kontrol)	8	4 - 8	44	60,05 ± 2,61 a
	0,8	8	2 - 4	27	57,38 ± 2,18 b
	0,9	8	0 - 3	17	53,78 ± 3,33 a

Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada  $p < 0,05$



**Gambar 2** Pengaruh rubratoksin B dosis tunggal 0,8 atau 0,9 mg/kg b.b. yang diberikan secara intraperitoneal pada mencit umur kebuntingan nol atau dua hari terhadap jumlah sel yang menyusun blastosista akhir.

hambatan terhadap jumlah sel tersebut lebih parah bila rubratoksin B diberikan pada umur kebuntingan 0 hari. Penurunan jumlah sel penyusun blastosista akhir dilaporkan pula pada perlakuan dengan siklofosfamid [18], metilmerkuriklorida dan merkuriklorida [6], serta mitomisin C [3] yang diberikan pada tahap praimplantasi. Penurunan jumlah sel ini disebabkan oleh terhambatnya pembelahan sel, yang antara lain diakibatkan oleh terhambatnya inisiasi translasi mRNA oleh rubratoksin B untuk menghasilkan protein tubulin. Protein tubulin merupakan komponen mikrotubul yang berperan dalam proses pembelahan sel [2,23]. Terhambatnya proses translasi dapat juga disebabkan oleh rubratoksin B yang menyebabkan disagregasi polisom [24].

Terhadap perkembangan pascaimplantasi, ternyata rubratoksin B yang diberikan pada tahap praimplantasi dapat menurunkan jumlah fetus hidup pada semua kelompok perlakuan secara sangat nyata. Demikian pula halnya dengan meningkatnya kematian intrauterus, terutama berupa embrio yang diresorpsi, yang kejadiannya sangat nyata hampir pada semua kelompok perlakuan (Tabel 3). Jumlah implantasi menurun secara nyata pada perlakuan umur kebuntingan 0 hari dan menjadi sangat nyata pada perlakuan umur kebuntingan 2 hari. Menurunnya jumlah implantasi oleh rubratoksin

B dapat dikaitkan dengan kerja rubratoksin B terhadap perkembangan embrio praimplantasi, yakni menurunkan jumlah blastosista akhir. Untuk dapat berimplantasi, embrio harus mampu mencapai tahap blastosista akhir. Oleh karena itu, berkurangnya embrio yang berhasil mencapai tahap tersebut akan menyebabkan menurunnya jumlah implantasi. Kehilangan praimplantasi juga meningkat sangat nyata pada semua kelompok perlakuan, terutama pada perlakuan umur kebuntingan 2 hari, disebabkan oleh banyaknya embrio yang terhambat perkembangannya pada tahap praimplantasi dan juga oleh meningkatnya jumlah embrio yang abnormal. Secara umum, dibandingkan dengan kontrol, semua efek rubratoksin B terhadap penampilan reproduksi induk dan perkembangan pascaimplantasi memperlihatkan kejadian yang sejalan dengan peningkatan dosis yang diberikan.

Berbeda dengan pernyataan Russel & Russel [13] yang mengemukakan hukum all or nothing, ternyata perlakuan dengan rubratoksin B pada tahap praimplantasi dapat memunculkan kelainan perkembangan pada fetus umur 18 hari. Kelainan perkembangan yang muncul ialah club foot dan langit-langit bercehah (Tabel 4). Langit-langit bercehah muncul, baik pada kelompok perlakuan umur kebuntingan 0 hari maupun 2 hari, tetapi hanya pada perlakuan dengan dosis tertinggi saja, dan kemunculannya sangat nyata pada perlakuan umur kebuntingan 2 hari. Kelainan ini tidak didapat pada kelompok kontrol. Kemunculan club foot tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata dari kontrol, meskipun pada perlakuan umur kebuntingan 2 hari kejadiannya cenderung meningkat dan sejalan dengan besarnya dosis rubratoksin B yang diberikan. Dalam penelitian ini, club foot, seperti juga perdarahan, mungkin muncul secara spontan sebab kejadiannya rendah dan tidak selalu sejalan dengan besarnya dosis, serta ditemukan pula pada kelompok kontrol.

Penelitian dengan rubratoksin B ini mendukung hasil penelitian Nagao et al. [13,14], bahwa perlakuan dengan teratogen pada tahap praimplantasi masih dapat memunculkan kelainan perkembangan pada fetus, meskipun teratogen yang digunakannya berbeda.

**Tabel 3** Penampilan reproduksi mencit yang diberi rubratoksin B pada umur kebuntingan nol atau dua hari dan diamati pada umur kebuntingan 18 hari

Umur Kebuntingan saat perlakuan (hari)	Dosis (mg/kg b.b.)	Jumlah induk	Jumlah korpus luteum $\bar{X} \pm SD$ @	Jumlah implan-tasi $\bar{X} \pm SD$ @	Kehilangan praimplan-tasi (%) a	Kematian intrauterus a			Fetus hidup			Pertam-bahan berat badan induk (g) $X \pm SD$ @
						Jumlah embrio diresorpsi (%)	Jumlah fetus mati (%)	Total (%)	Jumlah fetus (%) a	Berat badan fetus (g) $X \pm SD$ @	Jumlah fetus dengan kelainan perkembangan # dan perdarahan (%) a	
0	0 (kontrol)	8	122 (15,25 ± 0,89)	119 (14,86 ± 1,13)	3 (2,46)	0	0	0	119 (100)	1,242 ± 0,023	2 (1,34)	24,84 ± 2,14
	0,8	8	129 (15,5 ± 0,93)	110 (13,38 ± 1,69)*	19 (15,14)**	6 (5,13)*	3 (2,49)	9 (7,62)*	101 (92,70)**	1,233 ± 0,032	0	18,44 ± 2,29**
	0,9	8	124 (15,5 ± 0,93)	108 (13,5 ± 2,07)*	16 (13,28)**	17 (14,69)**	7 (6,67)*	24 (21,36)**	84 (79,16)**	1,207 ± 0,026	5 (5,25)*	20,34 ± 2,82**
2	0 (kontrol)	8	125 (15,63 ± 1,19)	120 (14,86 ± 0,99)	5 (3,13)	1 (0,69)	0	1 (0,69)	119 (99,31)	1,223 ± 0,057	2 (1,67)	23,56 ± 2,18
	0,8	8	121 (15,13 ± 0,89)	100 (15,5 ± 1,60)**	21 (17,23)**	9 (9,07)**	2 (1,79)	11 (10,86)**	89 (89,14)**	1,152 ± 0,015	2 (1,74)	19,15 ± 2,29**
	0,9	8	120 (15,25 ± 1,04)	74 (9,25 ± 2,76)**	46 (40,74)**	20 (30,04)**	2 (4,47)	22 (34,51)**	52 (66,72)**	1,276 ± 0,053	10 (18,15)**	14,84 ± 4,77

\* : berbeda nyata dari kontrol pada  $p < 0,05$ , \*\* : berbeda sangat nyata dari kontrol pada  $p < 0,01$  (@ : Uji t-Student, a : Wilcoxon's rank sum test), # : kelainan perkembangan berupa langit-langit bercelah dan club foot

**Tabel 4** Kelainan perkembangan dan perdarahan pada fetus mencit umur kebuntingan 18 hari yang induknya diberi perlakuan rubratoksin B pada umur kebuntingan nol atau dua hari

Umur kebuntingan saat perlakuan (hari)	Dosis (mg/kg b.b.)	Jumlah induk yang diamati	Jumlah fetus yang diamati	Jumlah fetus dengan kelainan perkembangan (%)		Jumlah fetus dengan perdarahan (%)
				Club foot	Langit-langit bercelah	
0 (kontrol)	0	8	119	1 (0,56)	0	1 (0,78)
	0,8	8	101	0	0	0
	0,9	8	84	1 (0,74)	3 (3,75)	1 (0,78)
2 (kontrol)	0	8	119	0	0	2 (1,67)
	0,8	8	89	1 (0,96)	0	1 (0,78)
	0,9	8	52	4 (2,52)	6 (15,63)**	0

\*\* : berbeda sangat nyata dari kontrol pada  $p < 0,01$  (Wilcoxon's rank sum test)

#### 4 Kesimpulan

Rubratoksin B yang diberikan secara intraperitoneal pada tahap praimplantasi mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster umur kebuntingan 0 hari atau 2 hari, dengan dosis tunggal 0,8 atau 0,9 mg/kg b.b., menyebabkan hambatan dan kelainan perkembangan embrio praimplantasi, serta berkurangnya jumlah sel yang

menyusun blastosista akhir. Terhadap perkembangan pascaimplantasi, rubratoksin B menurunkan jumlah implantasi dan jumlah fetus hidup, meningkatkan kematian intrauterus, serta dapat memunculkan kelainan perkembangan pada fetus.

## 5 Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Departemen Pendidikan dan Kebudayaan RI atas bantuan biaya dari Proyek URGE untuk pelaksanaan penelitian ini.

## 6 Daftar pustaka

- Darmanto, W., Kabir, N., Inouye, M., Takagishi, Y. & Yamamura, H. Effects of 2-methoxyethanol and methoxyacetic acid on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Environ. Med.*, **38**, 33-36 (1994).
- Desaiah, D., Hayes, A.W. & Ho, I.K. Effect of rubratoxin B on adenosine triphosphatase activities in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **39**, 71-79. (1977).
- Hayes, A.W. 1977. Rubratoxins. In *Mycotoxin in human and animal health* (V.J. Rodrick., C.W. Hesseltine & M.A. Mehlmens, editors), Pathotox Publ., Park Forest South, 505-523 (1977).
- Hayes, A.W. & Hannan, C.J. Effect of rubratoxin B and aflatoxin on oxygen consumption of Krebs cycle intermediates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **25**, 30-41 (1973).
- Hood, R.D., Ines, J.E. & Hayes, A.W. Effects of rubratoxin B on prenatal development in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **10**, 200-207 (1973).
- Kajiwara, Y. & Inouye, M. Effects of methylmercury and mercuric chloride on preimplantation mouse embryos *in vivo*. *Teratology*, **33**, 231-237 (1986).
- Koshakji, R.P., Wilson, B.J. & Harbison, R.D. Effect of rubratoxin B on prenatal growth and development in mice. *Res. Comm. Pathol. Pharmacol.*, **5**, 584-592 (1973).
- Kulangara, A.C. & Crutchfield, F.L. Passage of bovine serum albumin from the mother to rabbit blastocysts. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **30**, 471-482 (1973).
- Matsumoto, N., Spindle, A., Katayama, S. & Kabo, H. Culture and transfer of embryos as testing system for embryotoxicity of chemicals. *Cong. Anom.*, **24**, 353-372 (1984).
- Moss, M.O. The rubratoxins, toxic metabolites of *Penicillium rubrum* Stoll. In *Microbial toxins* Part VI: Fungal toxin (G. Kadis, editor). Academic Press, New York, 392-407 (1971).
- Nagao, T. Developmental abnormalities due to exposure of mouse paternal germ cell, preimplantation embryos and organogenetic embryos to acrylamide. *Cong. Anom.*, **34**, 35-46 (1994).
- Nagao, T. Exposure of ethylnitrosourea before implantation induced congenital malformation in mouse fetuses. *Cong. Anom.*, **36**, 83-94 (1996).
- Nagao, T., Ishizuka, Y. & Mitzutani, M. Effects of mitomycin C treatment before implantation on the development of mouse embryos. *Cong. Anom.*, **26**, 93-101 (1986).
- Nagao, T., Shiota, M. & Sato, M. Treatment of preimplantation mouse embryos with adriamycin, methylmethanesulphonate, and retinoic acid induced congenital defect. *Cong. Anom.*, **37**, 21-29 (1997).
- Nishimura, H. & Tanimura, T. *Clinical aspects of the teratogenicity of drugs*. American Elsevier Publ. Co. Inc. New York, (1976).
- Rugh, R. *The mouse. Its reproduction and development*. Burgess Publishing Co., Minneapolis. U.S.A. 44-102 (1968).
- Setiorini, R., Inouye, M. & Oda, S. Effects of zinc chloride, mercuric chloride, and cadmium chloride on preimplantation mouse embryos *in vivo*. *Environ. Med.*, **35**, 135-138 (1991).
- Spielmann, H., Eibs, H.G. & Merker, H.J. Effects of cyclophosphamide treatment before implantation on the development of rat embryos after implantation. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **41**, 65-78 (1977).
- Surjono, T.W., Kihara, T. & Tanimura, T. Effects of prenatal rubratoxin B exposure on behaviour and function in postnatal mice. (Abstract). *Cong. Anom.*, **28** (3), 231-232 (1988).
- Surjono, T.W., Syarif, T., Sudarwati, S. & Okada, K. Sensitive period for rubratoxin B induced malformation in ICR mice. *Cong. Anom.*, 297-304 (1985).
- Tarkowski, A.K. An air drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetic*, **5**, 394-400 (1966).
- Wyllie, T.D. & Morehouse, L.G. *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycoiotoxicoses*. Vol.1. Marcel Dekker Inc., New York, (1977).
- Watson, S.A. & Hayes, A.W. Binding of rubratoxin B to mouse hepatic microsomes and *in vitro* effects of the mycotoxin on polysome binding to microsomal membranes as measured by the activity of an enzyme catalyzing disulphide interchange. *Toxicon*, **19**, 509-516 (1981).
- Watson, S.A. & Hayes, A.W. Effects of alteration in metabolism on rubratoxin B toxicity *in vitro* and in the isolated rat parenchymal cell. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **64**, 504-516 (1982).